

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Estandarización de un protocolo de cultivo *in vitro*
para la regeneración vía organogénesis de camote
(*Ipomoea batatas* (L.) Lamarck, 1793) variedades
Tanzania y Wagabolige**

Tesis para optar el título profesional de LICENCIADA EN BIOLOGÍA

MILAGROS ORMACHEA ARAUCO

LIMA-PERÚ

2008

ASESORES

Asesor interno:

Dr. Mauro Quiñones Aguilar

Jefe del Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Ricardo Palma

Asesor externo:

PhD. Marc Ghislain

Jefe del Laboratorio de Biotecnología Aplicada

División de Mejoramiento de Germoplasma y de Cultivos

Centro Internacional de la Papa

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia al PhD. Marc Ghislain, Jefe del Laboratorio de Biotecnología Aplicada del Centro Internacional de la Papa (CIP) y asesor de la presente tesis, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación.

Muy en especial al Biol. José Carlos Tovar por su constante apoyo, acertadas sugerencias e indiscutible interés en mi carrera profesional.

A Lorena y Cristina por sus consejos y persistente apoyo en el área de cultivo de tejidos.

A todos mis amigos y personal del Laboratorio de Biotecnología Aplicada por permitirme trabajar en un ambiente agradable y lleno de familiaridad.

Al profesor Mauro Quiñones por aceptar ser asesor universitario y haberme guiado en el desarrollo y sustentación de la presente investigación.

A mi familia por brindarme su total confianza y cariño. De manera especial a mis padres, mi abuelo y Renato porque son el motor de mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE	4
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	8
I. INTRODUCCIÓN	12
II. ANTECEDENTES.....	14
2.1. Generalidades.....	14
2.1.1. Taxonomía	14
2.1.2. Importancia	14
2.2. Morfogenesis in vitro.....	15
2.3. Control de la organogénesis <i>in vitro</i>	16
2.3.1. Efecto del explante	17
2.3.2. Efecto del medio de cultivo	18
2.4. Organogénesis directa e indirecta	22
2.5. Variación somaclonal	23
2.6. Organogénesis en camote	24
III. MATERIALES Y METODOS	29
3.1. Materiales	29
3.1.1. Material Vegetal	29
3.1.2. Reactivos	29
3.1.3. Utensilios de Laboratorio.....	29
3.1.4. Equipo de Laboratorio.....	30
3.1.5. Medios de cultivo	30
3.2. Métodos	31
3.2.1. Micropropagación.....	31
3.2.2. Preparación de los explantes	31
3.2.3. Corte de los explantes	31
3.2.4. Posición de los explantes	32
3.2.5. Diseño de los Protocolos de Regeneración	32
3.2.6. Condiciones de cultivo	33
3.2.7. Evaluación.....	33
3.2.8. Análisis estadístico	34

IV.	RESULTADOS.....	35
4.1.	Micropropagación.....	35
4.2.	Corte de los peciolo.....	36
4.3.	Posición de los explantes.....	36
4.4.	Formación de regenerantes.....	36
4.4.1.	A partir de hojas con peciolo:.....	36
4.4.2.	A partir de raíces:.....	39
4.4.3.	A partir de peciolo:.....	40
4.5.	Formación, regeneración y tamaño de callo.....	40
4.6.	Influencia del AG ₃ y 2,4-D en la organogénesis.....	40
4.6.1.	Regenerantes normales.....	41
4.6.2.	Número de callos con raíces.....	42
V.	DISCUSION.....	45
VI.	CONCLUSIONES.....	51
VII.	RECOMENDACIONES.....	52
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
IX.	ANEXOS.....	60
9.1.	TABLAS.....	60
9.2.	FIGURAS.....	74
9.3.	Análisis estadístico RGui.....	82
9.3.1.	Comparación de los medios de micropropagación en Tanzania.....	82
9.3.2.	Comparación de los medios de micropropagación en Wagabolige.....	82
9.3.3.	Posición de los explantes: Horizontal vs. vertical en Tanzania.....	82
9.3.4.	Tratamientos de regeneración en Tanzania.....	83
9.3.5.	Tratamientos de regeneración en Wagabolige.....	100
9.3.6.	Comparación de los mejores tratamientos con callos con raíces en Tanzania: 11, 16, 19, 20, 24 y 25.....	110
9.3.7.	Comparación de los mejores tratamientos con callos con raíces en Wagabolige: 8, 13 y 19.....	111
X.	APENDICES.....	112
10.1.	Preparación de las soluciones Stock de Hormonas.....	112
10.2.	Compuestos nitrogenados presentes en el AC de Puerto Rico y Filipinas, y su contenido en terminos de µg de aminoácidos y de N por mililitro de agua entera*	

TERMINOS Y ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	N ⁶ -(2-isopentenil) adenina
4-FA	Ácido 4-fluorofenoxiacético
Acropetal	Movimiento de fluidos vegetales dirigido de la raíz hacia ápices y hojas
AG ₃	Ácido giberélico-3
AIA	Ácido indol-3-acético
ANA	Ácido 1-naftaleno acético
BA	Benciladenina
BAP	6-bencilaminopurina
Basipetal	Movimiento de fluidos vegetales dirigidos del ápice y hojas hacia la raíz
Callo	Masa celular vegetal
ER	Eficiencia de regeneración
Explante	Segmento de órgano o tejido de la planta usado como material de estudio en el cultivo de tejido in vitro
Friable	Textura desmenuzada de un callo
KIN	Kinetina
MS	Medio Murashige & Skoog

Plántula	Planta originada por técnicas de cultivo de tejidos
ppm	Partes por millón
PPP	Paclobutrazol
RR	Rendimiento de regeneración
S _n	Fase de cultivo <i>in vitro</i>
ZR	Zeatina-(trans) ribosa
TDZ	Thidiazuron

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Tabla N° 1.</i>	60
<i>Tabla N° 2.</i>	60
<i>Tabla N° 3.</i>	61
<i>Tabla N° 4.</i>	62
<i>Tabla N° 5.</i>	62
<i>Tabla N° 6.</i>	62
<i>Tabla N° 7.</i>	63
<i>Tabla N° 8. Tratamientos de Regeneración en Tanzania</i>	64
<i>Tabla N° 9. Tratamientos de Regeneración en Wagabolige</i>	65
<i>Tabla N° 10. Número de explantes y ensayos en los tratamientos de regeneración de Tanzania</i>	66
<i>Tabla N° 11. Número de explantes y ensayos en los tratamientos de regeneración de Wagabolige</i>	66
<i>Tabla N° 12. Tratamientos de Regeneración en Raíces</i>	67
<i>Tabla N° 13.</i>	67
<i>Tabla N° 14.</i>	67
<i>Tabla N° 15.</i>	68
<i>Tabla N° 16.</i>	68
<i>Tabla N° 17.</i>	69
<i>Tabla N° 18.</i>	69
<i>Tabla N° 19.</i>	70
<i>Tabla N° 20.</i>	70
<i>Tabla N° 21.</i>	71
<i>Tabla N° 22.</i>	71
<i>Tabla N° 23.</i>	72
<i>Tabla N° 24.</i>	72
<i>Tabla N° 25.</i>	73
<i>Figura N° 1. Corte transversal de peciolo</i>	74
<i>Figura N° 2. Corte transversal y longitudinal de peciolo</i>	74
<i>Figura N° 3. Posición de los explantes</i>	75
<i>Figura N° 4. Micropropagación</i>	76
<i>Figura N° 5. Posición vertical de los peciolo en el medio de cultivo</i>	77
<i>Figura N° 6. Regenerantes normales en Tanzania</i>	77
<i>Figura N° 7. Regenerantes normales en Wagabolige</i>	77
<i>Figura N° 8. Regenerantes anormales</i>	78
<i>Figura N° 9. Brotes múltiples</i>	78

<i>Figura N° 10. Regenerantes de Wagabolige obtenidos a partir de raíces</i>	79
<i>Figura N° 11. Regeneración en raíces</i>	79
<i>Figura N° 12. Peciolos en medio TDZ 0.05 mg/l + BAP 0.05 mg/l</i>	80
<i>Figura N° 13. Ensanchamiento de la base del peciolo</i>	80
<i>Figura N° 14. Tamaño promedio de callos</i>	81

RESUMEN

Para mejorar la eficiencia de regeneración en dos variedades africanas de camote (Tanzania y Wagabolige) se probó un protocolo vía organogénesis de dos fases en Tanzania y de dos, tres y cuatro fases en Wagabolige. La primera fase, en ambas variedades, consistió en el mantenimiento de los explantes en un medio con auxinas y las siguientes, con citoquininas. Se probó tres tipos de explantes: hojas con peciolo, peciolo y raíces. Todos los regenerantes fueron obtenidos a partir de hojas con peciolo. Los brotes emergentes fueron de apariencia normal y anormal. Se logró resultados favorables al trabajar con bajas concentraciones de 2,4-D y en Tanzania, al suplementar AG_3 a la primera etapa, se incrementó la frecuencia de regeneración de brotes normales; sin embargo, ambas variedades presentaron un bajo índice de regeneración: 3.33% en Tanzania y 1.46% en Wagabolige.

ABSTRACT

To improve the regeneration efficiency of two sweetpotato African varieties (Tanzania and Wagabolige), a two-stage organogenesis regeneration protocol was tested in Tanzania; while a two, three, four-stages was tested in Wagabolige. The first stage, in both varieties, maintained the explants in a medium supplemented with auxines, and the next stages, with cytokinines. Three different explants were tested: leaves with petiole, petioles and roots. All shoots came from leaves with petioles. Shoots presented normal or anomalous morphology. The best results were obtained working with low concentrations of 2,4-D. For Tanzania, the addition of GA₃ in the first stage was found to increase normal shoot frequency, nevertheless both varieties showed low regeneration efficiencies: 3.33% in Tanzania, and 1.46% in Wagabolige.

I. INTRODUCCIÓN

El camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lamarck, 1793) es una fuente importante de alimento e ingresos para los agricultores de países en vías de desarrollo, principalmente en Asia y África subsahariana, de donde proviene el 98% de la producción anual mundial. Este cultivo desempeña un papel importante en la seguridad alimentaria en los países africanos del este; sin embargo, las producciones en campo son bajas (5 toneladas por hectárea) en comparación con el promedio mundial (15 toneladas por hectárea). Esto es consecuencia del ataque de insectos, nemátodos, bacterias, virus y otros factores limitantes que reducen considerablemente su rendimiento.

Por ser un cultivo base en la alimentación de las poblaciones más pobres, el valor nutritivo del camote juega un rol muy importante en la población de escasos recursos. El camote no provee suficientes proteínas totales, B-caroteno, ácido fólico y micronutrientes totales como Hierro y Zinc. Aunque el déficit nutritivo y de producción puede ser parcial o totalmente superado por técnicas convencionales, agroquímicos y suplementos alimenticios; la solución más sostenible es el mejoramiento genético. Esta tecnología moderna permite generar variedades resistentes a plagas y enfermedades, tolerantes a stress abiótico y de alto valor nutritivo.

Los trabajos basados en mejoramiento convencional han conseguido resistencia a nemátodos, insectos e incrementar el contenido de proteína y la calidad nutricional. Sin embargo, el proceso de selección requiere de prolongados períodos, un gran número de individuos y optimizar los sistemas de mejoramiento de cultivo, debido a la condición hexaploide del camote. Por otro lado, los avances alcanzados se pueden ver obstaculizados por la incompatibilidad y esterilidad entre especies de camote.

Los trabajos basados en biotecnología moderna han conseguido generar resistencia a plagas, tales como al gorgojo del camote (*Cylas spp.*) -que devasta cultivos en áreas tropicales y zonas de elevada temperatura (20-80% de la producción)- así como, incrementar la calidad nutricional en un menor tiempo y con menores costos. Sin

embargo, su éxito depende de la disponibilidad de un protocolo de regeneración adecuado.

Las técnicas de cultivo de tejidos en camote hacen posible la regeneración de plantas completas a partir de células y tejidos diferenciados, pudiendo ocurrir por dos procesos: embriogénesis somática u organogénesis.

En la embriogénesis somática, los explantes son inducidos a formar embriones a partir de células somáticas. Mientras que en la organogénesis, se induce la formación de centros meristemáticos; los cuales, dependiendo del estímulo -fitohormonas exógenas- y la capacidad del tejido de responder a la presencia de estas hormonas, dan lugar a primordios radiculares o caulinares. Ambos fenómenos pueden ocurrir directa o indirectamente, es decir sin la presencia de la fase callosa previa a la regeneración, o con ella, respectivamente.

Hay pocos reportes sobre Organogénesis *in vitro* en camote. Mientras la mayoría de estos estudios evidencian regeneraciones exitosas, en la práctica, la frecuencia de regeneración es muy baja y los protocolos resultan ser específicos para ciertos genotipos. Cada cultivar responde de manera diferente al cultivo de tejidos y la regeneración de plantas en tratamientos *in vitro*.

En el Perú, el camote desempeña un rol importante más no fundamental en la alimentación de la población; mientras que en África subsahariana las variedades Tanzania y Wagabolige desempeñan un rol trascendental en la seguridad alimentaria de la población del este de dicho continente. Estas variedades son ampliamente cultivadas y consumidas por ser de pulpa blanca, tener un alto contenido de materia seca y conferir resistencia moderada a virus.

El presente trabajo de investigación tiene como propósito estandarizar un protocolo de cultivo *in vitro* para la regeneración vía organogénesis de las variedades de camote Tanzania y Wagabolige con la finalidad de obtener una eficiente regeneración de plantas normales; que aseguren, resultados exitosos en futuros trabajos de transformación genética.

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades

2.1.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica del camote es:

Reino	:	Plantae
Subreino	:	Tracheobionta
Superdivisión	:	Spermatophyta
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Asteridae
Orden	:	Solanales
Familia	:	Convolvulaceae
Género:		<i>Ipomoea</i> L.
Especie	:	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.

Designación dada por Lamarck (USDA, 2007)

2.1.2. Importancia

El camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) es uno de los cultivos más importantes, versátiles y menos aprovechados del mundo. Con una producción anual de más de 122 millones de toneladas, cálculos en base al peso en crudo, (FAOSTAT, 2005)

actualmente se ubica en el quinto lugar en producción en orden de importancia después del arroz, el trigo, el maíz y la yuca. Se cultiva en más de 100 países en desarrollo, figurando entre los cinco cultivos más importantes en más de 50 de ellos. En América Latina, destacan en producción Brasil, Argentina, Perú, Cuba y Haití (Centro Internacional de la Papa, 1999).

Su importancia radica en ser una fuente primordial de calorías y vitaminas (Tabla N° 1). Posee un ciclo corto, alta producción de carbohidratos en las raíces y de proteínas en las hojas nuevas; además posee un rico y variable germoplasma (Montaldo, 1991). La región de Centro América es considerada como el centro de origen primario, siendo además la zona donde se encuentra la mayor diversidad genética de camote; mientras que la región Peru-Ecuador es considerada como centro secundario de diversidad (Zhang *et al.*, 2000).

En África subsahariana se distinguen las variedades Tanzania y Wagabolige por ser ampliamente cultivadas y aceptadas por la población; las cuales se caracterizan por su pulpa blanca, alto contenido de materia seca y resistencia moderada a virus; sin embargo, presentan déficit de vitamina A (Stathers *et al.*, 2005).

2.2. Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis *in vitro* incluye la inducción de estructuras “de novo” a partir de tejidos que en forma natural no tienen la capacidad de formar tales estructuras (Sugiyama, 1999).

Esta capacidad es la manifestación de la totipotencia celular, que se caracteriza por la dediferenciación de células, el re-ingreso de células quiescentes dentro del ciclo celular y la organización de células en división para formar órganos específicos (Sugiyama, 1999).

El éxito en la formación de órganos específicos y/o plantas completas dependerá de la capacidad regenerativa del cultivar, a partir de tejidos o células somáticas, y del establecimiento de un medio de micropropagación que permita la obtención de clones vigorosos (Gómez *et al.*, 1997).

Entre los sistemas de regeneración de plantas más utilizados se encuentran la regeneración vía embriogénesis somática, cultivo de protoplastos y organogénesis (Sihachakr *et al.*, 1997).

En la ruta embriogénica, una célula somática se reprograma a un estado de célula embriogénica, desarrollándose un embrión que finalmente regenerará una planta completa luego de varios meses de maduración.

En el cultivo de protoplastos se fusionan dos protoplastos con sus genomas completos ($2n + 2n$) o con uno de ellos conteniendo sólo parte de su genoma, permitiendo la introgresión limitada de genes de especies silvestres en los cultivos. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones, como son una elevada esterilidad o imposibilidad de regenerar algunas plantas. En camote, la mayoría de genotipos fracasaron en el intento de regeneración a partir de esta técnica (Sihachakr y Ducrex, 1993. cit/ Sihachakr *et al.*, 1997).

En la organogénesis se induce la formación de centros meristemáticos los cuales, dependiendo del estímulo -fitohormonas exógenas- y la capacidad del tejido de responder a la presencia de estas hormonas, dan lugar a primordios radiculares o caulinares. Puede ocurrir de manera directa o indirecta, es decir sin la presencia de la fase callosa previa a la regeneración, o con ella, respectivamente (Lítz y Jarret, 1991).

Existen pocos reportes sobre organogénesis *in vitro* en camote usando explantes derivados de varios órganos y tejidos (Medina, 1991; Porobo Dessai *et al.*, 1995; Gosukonda *et al.*, 1995; Sihachakr *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1999; etc.). Mientras, la mayoría de estos estudios evidencian regeneraciones exitosas en plantas de camote, en la práctica; la frecuencia de regeneración es muy baja y los protocolos resultan ser específicos para ciertos genotipos. Cada cultivar responde de manera diferente al cultivo de tejidos y la regeneración de plantas en tratamientos *in vitro* (Porobo Dessai *et al.*, 1995).

2.3. Control de la organogénesis *in vitro*

Varios factores afectan la formación e inducción de callo como son la posición, tamaño, fenotipo y estado fisiológico de la planta donante del explante; concentración

de nutrientes, fitohormonas y reguladores de crecimiento en el medio de cultivo; y condiciones ambientales como luz, temperatura y humedad (Phillips y Hubstenberger, 1998).

2.3.1. Efecto del explante

Todas las partes de la planta de camote se han utilizado como explantes para la iniciación de estudios de organogénesis. Los estudios reportados incluyen trabajos con: Meristemas (Castro & De Andrade, 1995), raíces (Gunckel *et al.*, 1972), hojas, pecíolos (Porobo Dessai *et al.*, 1995) y raíces tuberosas (Newel, 1995).

Donde, el potencial organogenético de los explantes se encuentra influenciado por:

La *edad fisiológica*, presentando los tejidos juveniles un mayor grado de actividad meristemática y plasticidad *in vitro*.

La *edad ontogénica*, influyendo el estado de la planta madre y la estación durante la cual el explante es extraído.

El *tamaño*, presentando los explantes grandes un potencial regenerador considerablemente mayor (Murashige, 1974 y Narayanaswamy, 1977).

La *posición*, pudiendo la orientación del explante incrementar la producción de regenerantes (Gosukonda *et al.*, 1995a).

El *tejido u órgano* de procedencia, pudiendo distintos explantes de una misma planta diferir en su capacidad de regeneración (Murashige, 1974 y Narayanaswamy, 1977).

Se prefiere el empleo de hojas y pecíolos para trabajos de cultivo *in vitro*, debido a que ofrece importantes ventajas de manipulación, disponibilidad y rápida respuesta *in vitro*.

Además, el uso de hojas completas incrementa el porcentaje de regeneración, cuando éstas incluyen el limbo y 0.5 a 1 cm de pecíolo; habiendo un evidente aumento de regeneración en hojas juveniles con 15 a 21 días de edad (Medina, 1991).

2.3.2. Efecto del medio de cultivo

Un explante aislado *in vitro* e inducido a crecer y desarrollarse necesita agua, macro y micro nutrientes, azúcar, como fuente de carbono, y a menudo dos grupos de reguladores de crecimiento, principalmente auxinas y citoquininas. Las concentraciones de estos reguladores son determinantes en el control del crecimiento y morfogénesis.

Generalmente, una alta concentración de auxinas y una baja concentración de citoquininas en el medio de cultivo, promueve la proliferación de células que forman callos. De otro lado, bajas concentraciones de auxinas con altas concentraciones de citoquininas promueven la formación de regenerantes (Thorpe, 1981).

El medio para que la proliferación de callos sea rápida puede requerir una composición ligeramente diferente a la que se usa para la inducción de los mismos. La diferenciación de yemas se logra subcultivando los callos en un medio que tenga alta relación citoquinina: auxina; en cambio, para la diferenciación de raíces se requieren medios con una relación citoquinina:auxina baja (Litz *et al.*,1991).

2.3.2.1. Auxinas

Las auxinas juegan un rol importante en muchos aspectos del crecimiento y diferenciación. Son agregadas al medio de cultivo con la finalidad de inducir la división celular, el crecimiento de callo, diferenciación vascular y la formación de raíces. Su acción esta directamente asociada con el aumento de ARNm. Muchos de ellos responsables del alargamiento celular (Cantliffe, 2001).

Las auxinas endógenas se sintetizan en tejidos jóvenes y metabólicamente activos, son transportadas a través de las células mediante rutas de polaridades diferentes, siendo basipetal en regenerantes (brotes) y acropetal en raíces. Existe evidencia de que el Ácido indol-3-acético (AIA) se sintetiza en hojas maduras, es atrapado dentro del floema, debido a su afinidad por el pH ácido (8.0), y luego es transportado a tejidos de alta actividad metabólica como meristemos, desde donde se transportará extravascularmente. Según Baker: “Los meristemos son netamente importadores y no sintetizadores de AIA en plantas superiores” (Baker, 2000).

Las auxinas más utilizadas en el cultivo de tejidos son: Ácido indol-3-acético (AIA), ácido 1-naftaleno acético (ANA) y ácido 2,4-D diclorofenoxiacético (2,4-D). De las tres, el AIA es la más débil. Se inactiva fácilmente por la luz y por la acción de enzimas celulares. Se ha encontrado además, que el 2,4-D y el ANA son más estables que el AIA al incluirse en el medio sales de MS (Medina, 1991).

El 2,4-D es la auxina más potente. Se ha visto que induce la formación de callos tendiendo a suprimir la organogénesis en muchas especies. Sin embargo, en trabajos previos en camote es la auxina de mayor efectividad de regeneración (Blasco, 2007).

Se ha encontrado que el 2,4-D produce diferentes respuestas en explantes de camote dependiendo de la concentración usada. Aún a una misma concentración puede inducir diferentes respuestas dependiendo de la citoquinina con que este combinado (Medina, 1991).

2.3.2.2. Citoquininas

Las citoquininas inducen la división celular y la formación de órganos en cultivos *in vitro*. Su acción esta asociada con la regulación del ciclo celular (Werner *et al.*, 2001).

La síntesis de citoquininas tiene lugar, principalmente, en las raíces a partir de donde son transportadas a través del xilema, a todas las partes aéreas de la planta, por transpiración. Sin embargo, se han encontrado citoquininas en la savia del floema, infiriendo que: “Existe una recirculación de citoquininas provenientes de la raíz mediante los canales de transpiración, que luego se concentran en el floema de las hojas maduras”. Esto es consistente con la observación de la distribución de citoquininas en tejidos mayores como meristemos y órganos de almacenamiento que no estan conectados directamente con los canales de transpiración. Resolviendo que el transporte de citoquininas, asi como de auxinas, ocurre extensivamente a través del floema en plantas superiores (Baker, 2000).

Según, Werner *et al.*, 2001: “Las citoquininas tienen una doble función en el control y proliferación de regenerantes, manteniendo constante el ciclo de división celular y promoviendo la transición de células indiferenciadas a diferenciadas”.

La deficiencia endógena de citoquinina produce regenerantes con enanismo, desarrollo retardado, entrenudos cortos y hojas lanceoladas (Werner, 2001); siendo evidente el rol que juegan las citoquininas en el proceso de morfogénesis.

Contrariamente, al promover la aparición de regenerantes meristemáticos, las citoquininas tienen un efecto regulatorio negativo en el crecimiento de raíces. En presencia de bajas concentraciones de citoquininas, las raíces tienen una prolongada fase meristemática y eventualmente repeticiones mitóticas adicionales que permiten un crecimiento radicular principalmente en número y levemente en tamaño celular (Werner *et al.*, 2001).

Las citoquininas comúnmente usadas son Kinetina (KIN), 50%, 6-bencilaminopurina (BAP), 43.8% y Zeatina ribosida (ZR). En algunas especies la regeneración puede llevarse a cabo sólo con BAP (18.1%) o ZR (6.1%). Estas citoquininas, a pesar de su menor frecuencia de uso en trabajos *in vitro*, son consideradas más potentes que KIN (Thorpe, 1981).

La BAP es la citoquinina sintética de más amplia acción mientras que Zeatina (ZEA) y ZR, son productos naturales de amplio uso en cultivos *in vitro*. En donde, la ZR es transportada a partir de las raíces mediante el xilema y la ZEA a través del floema (Baker, 2000).

El uso de Zeatina y Kinetina se ha generalizado en los trabajos *in vitro* debido a que permite la regeneración de un amplio espectro de genotipos de camote, aunque con una eficiencia baja (Gosukonda *et al.*, 1995a).

2.3.2.3. Giberelinas

Las giberelinas también pueden tener un papel importante en la organogénesis (Thorpe *et al.*, 1973); aunque generalmente inhiben la diferenciación, algunas veces estimulan la formación de yemas, nudos y raíces (Pech y Ake *et al.*, 2007). La giberelina más utilizada en *cultivo in vitro* es el ácido giberélico-3 (AG₃).

El efecto del AG₃ en la formación de estructuras vasculares organizadas y la inducción de raíces depende de las concentraciones utilizadas. Así, la adición en el

medio de cultivo de 1 uM de AG₃ resulta en la producción de un mayor número de raíces por callo; y su omisión, en la ausencia de formación de raíces (Haddon & Northcote, 1976).

Concentraciones altas de AG₃ (45 uM) inhiben la cantidad de células diferenciadas de *Phaseolus vulgaris*, retrasando su iniciación (Haddon & Northcote, 1976). Sin embargo, en *Cocus nucifera*, 46 uM de AG₃, incrementa el proceso de germinación de embriones en un 60% (Pech y Ake *et al.*, 2007).

Concentraciones bajas de AG₃ (0.1-1 uM) reduce la formación de embriones de geranio en medios suplementados con auxina (60-80%) y citoquinina (80-90%). (Hutchinson, 1997). De otro lado, en *Cocus nucifera*, una concentración de 0.46 uM de AG₃ incrementa el proceso de germinación de embriones en un 80% (Pech y Ake *et al.*, 2007).

El uso de las giberelinas en el cultivo *in vitro* ha sido discutido. Por lo general se sugiere no emplear AG₃ al inicio de los tratamientos, debido a su acción inhibitoria en la acumulación de almidón a nivel celular. Sin embargo, Medina (1991), reporta que el mejor tratamiento regenerativo para entrenudos esta complementado con 5 mg/l AG₃.

2.3.2.4. Agua de coco

El agua de coco (AC) es un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos (Tabla N° 2) tiene buena capacidad de amortiguamiento y no es raro encontrar sales en ella. Aunque el AC es muy rica en magnesio y fosfato, no todos los elementos minerales que contiene son indispensables, y se pueden reemplazar por un medio salino basal. El contenido de azúcar, de alrededor de 2.5%, no es algo fuera de lo común y se puede reemplazar. Adicionalmente, se encuentra en ella nitrógeno no proteínico soluble en forma de aminoácidos (Roca, 1991).

Del AC se han aislado purinas y fracciones que muestran la presencia de compuestos fenólicos como leucoantocianinas, que pueden promover la división celular. Se han identificado las adenilcitosininas, Zeatina y ribosido de Zeatina. Aunque todavía no se

conocen completamente todas las fracciones del AC, se sabe bastante sobre ellas, sólo la fracción activa requiere una identificación más completa (Roca, 1991).

El uso del Agua de coco (AC) en la nutrición de las células y tejidos cultivados *in vitro* podría estimular la división celular de explantes. A niveles relativamente bajos (5%-10% v/v) puede interactuar con las auxinas, promoviendo el crecimiento en situaciones en que por sí sola es ineficiente (Roca, 1991).

2.4. Organogénesis directa e indirecta

La organogénesis *in vitro* depende de la aplicación de fitohormonas exógenas, en particular auxinas y citoquininas, y además de la habilidad del tejido de responder al cambio de estas fitohormonas durante el cultivo.

La organogénesis *in vitro* esta generalmente compuesta de tres fases distintas, con dependencias variables de fitohormonas exógenas: La primera fase, en la cual las células se desdiferencian para adquirir capacidad organogénica; la segunda fase, en la que las células desdiferenciadas son determinadas a formar un órgano específico en respuesta a la presencia de fitohormonas exógenas; la tercera y última, es aquella en donde la morfogénesis del órgano procede independientemente de la adición de fitohormonas. La primera fase puede ser subdividida, además, en dos subfases: (1) Células que adquieren capacidad para la proliferación y organogénesis de raíces, (2) Células que adquieren capacidad para la formación organogenética de plantas completas (Sugiyama, 1999).

La regeneración de la planta vía organogénesis puede ocurrir de tres maneras diferentes. En la primera, los regenerantes aparecen directamente del explante cerca de la sección terminal (organogénesis directa). En la segunda, emergen a partir de un callo desarrollándose en la sección final del pecíolo (organogénesis indirecta); y la tercera a partir de raíces producidas por el cultivo de explantes (Sihachakr, 1982).

En la organogénesis directa, los meristemos regenerados pueden originarse a partir del floema interno o externo, células parenquimales y/o epidérmicas. Este proceso morfogenético resulta ventajoso cuando se requiere mantener la estabilidad genética en plantas regeneradas (Medina, 1991).

En la organogénesis indirecta los regenerantes son formados a partir de callos, células parenquimales altamente vacuoladas, donde los centros meristemáticos pueden ser inducidos tanto en las capas celulares superficiales como internas del callo (Gosukonda, 1995a).

Las diferentes fases de crecimiento del callo exhiben una forma S o patrón sigmoideal de crecimiento. Presentando las siguientes fases: (a) de latencia, donde las células se preparan para dividirse, (b) exponencial, donde el porcentaje de división celular es alto, (c) linear, donde la división celular es más lenta pero la tasa de expansión celular se incrementa, (d) decrecimiento, donde la tasa de división y elongación celular decrece, (e) y estacionaria, donde el número y tamaño de células se mantiene constante (Bansal, 2003).

La organogénesis indirecta es el sistema de regeneración más utilizado para fines de modificación genética, debido a que la formación de callos permite la selección de células y, posteriormente, la obtención de plantas genéticamente modificadas. Sin embargo, el sistema de regeneración indirecto tiene la desventaja de presentar una mayor tendencia de sufrir variación somaclonal.

Pese a eso, la organogénesis indirecta se prefiere por razones prácticas de disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos y rápida respuesta *in vitro* (Lítz y Jarret, 1991).

2.5. Variación somaclonal

El cultivo de tejidos induce la variación en plantas regeneradas manifestándose de tres maneras diferentes: (a) Variación en cultivos celulares, una célula puede variar en morfología y estructura genética; (b) Variación epigenética, los primeros regenerantes no muestran efectos fenotípicos heredables, mostrando inestabilidad somática, se da principalmente en plantas propagadas asexualmente; (c) Variación genética (heredable) transmitida sexualmente a la descendencia (Jain, 2001).

Los efectos de la variación somaclonal pueden resultar beneficiosos para los programas de mejoramiento convencional si es que se consigue un rango de variación

genéticamente estable; pero resulta impredecible e indeseable para trabajos de mejoramiento genético (Ingeniería genética).

La ocurrencia de variación somaclonal está asociada con mutaciones puntuales, reordenamiento y recombinación cromosómica, metilación de ADN, alteración en el número de copias de secuencias y con elementos transposables (Jain, 2001).

El sistema de cultivo de tejidos actúa como un sistema mutagénico, debido a que las células atraviesan un proceso traumático o de stress a partir del aislamiento, pudiendo reprogramarse bajo condiciones diferentes a las naturales. La reprogramación o reestructuración de eventos puede crear un amplio rango de variación epigenética en plantas regeneradas recientemente (Jain, 2001).

La variación somaclonal se encuentra influenciada por el genotipo, tipo de explante, medio de cultivo, y edad de la planta. Se produce un mayor incremento de variación en plantas con alta ploidia y numerosos pares de cromosomas; en callos viejos - porque que presentan inestabilidad cromosómica- y en plantas con sucesivos subcultivos (Jain, 2001).

2.6. Organogénesis en camote

En camote la frecuencia de regeneración es a menudo genotipo-dependiente, habiéndose obtenido entre 0 a 85% de eficiencia en cultivares probados, cálculos en base a la proporción de explantes regenerados, multiplicados por cien (Porobo Dessai *et al.*, 1995). Sólo un pequeño número de genotipos han sido regenerados, basados en información proporcionada por publicaciones científicas (Liu *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1996; Al-Mazrooei *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). Cada cultivar responde de manera diferente al cultivo de tejidos y la regeneración de plantas en tratamientos *in vitro* (Porobo Dessai *et al.*, 1995).

Se han probado varias combinaciones de reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones en varios cultivos de camote (Gunkel, 1972; Seghal, 1975; Sihachakr, 1982; Carswell & Locy, 1984; Medina, 1991; Porobo Dessai *et al.*, 1995; Gosukonda *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2006 y Blasco, 2007). Los cultivares

probados difieren tanto en respuesta como en porcentaje de proliferación dependiendo de la capacidad de los explantes de percibir las hormonas exógenas.

En 1972, Gunckel *et al.* 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. La producción de callo dependió del suplemento orgánico, del cultivar, la orientación del explante y los efectos de la polaridad tisular. Hubo una óptima producción de callos en el cultivar Centennial al usar el medio basal suplementado con Ácido indol-3-acético (AIA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Donde, el AIA fue la auxina más eficaz en la formación de raíces adventicias y de callo; y el sulfato de adenina y el AG₃, utilizados en forma individual o combinada estimularon la formación de raíces; concluyendo que la formación de raíces adventicias estaba correlacionada positivamente con el crecimiento del callo.

En 1975, Seghal cultivó hojas inmaduras de camote de 1 cm de longitud en medio basal Murashige & Skoog (MS) modificado, suplementado con varios compuestos orgánicos. En el medio con 0.5 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de KIN ocurrió un rápido crecimiento del callo pero no hubo formación de órganos. Sin embargo, al trasladar estos callos al medio MS suplementado con 1.0 mg/l de AIA, la formación de raíces fue más rápida y abundante; de otro lado, los callos que se transfirieron al medio suplementado con 10 a 20 mg/l de sulfato de adenina, produjo tantas raíces como brotes después de cuatro semanas. Posteriormente, de estas yemas adventicias se regeneró plantas enteras.

En 1982, Sihachakr comparó varias combinaciones de reguladores de crecimiento en fragmentos de tallo y tejido foliar, revelando que la mejor respuesta se consiguió al usar 0.01 mg/l 2,4-D combinado con 0.01 mg/l KIN. En este medio la regeneración de plantas de camote ocurrió en un periodo corto y con una alta frecuencia. Sin embargo, los tallos mostraron más tendencia a formar brotes en comparación con las hojas.

En 1984, Carswell y Locy 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 ácido 1-naftaleno acético (ANA) (0.1-10.0 mg/l) y 6-bencilaminopurina (BAP) (0.1-10.0 mg/l) agregados independientemente o en

combinaciones factoriales. La formación de callo a partir de explantes de hoja o de tallo fue más marcada en el medio que contenía 1 mg/l de ANA y 10 mg/l de AIA. La elevada proporción auxina/citoquinina favoreció la formación de raíces a partir de este callo. La regeneración del brote se vio afectada tanto por el régimen hormonal del medio de cultivo como por la edad del cultivo. Setenta días después, se formaron brotes en diversos medios caracterizados por múltiples relaciones auxina/citoquinina en diferentes concentraciones.

En 1991, Medina obtuvo un porcentaje de regeneración de 59.4% y 92.7% en Jewel y Huachano, respectivamente, al cultivar hojas completas por 3 días en 0.2 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l Zeatina ribosida (ZR) y luego transfiriéndolos a un medio con 0.2 mg/l ZR; en donde la regeneración de plántulas se produjo entre los 50 y 60 días. Los porcentajes de regeneración se calcularon multiplicando los explantes que regeneraron por cien.

En 1995, Porobo Dessai *et al.* cultivaron hojas completas de camote con un protocolo de dos etapas, permaneciendo 3 días en 0.2 mg/l 2,4-D (etapa I) y 4 a 6 semanas en 0.2 mg/l ZR (etapa II), consiguiendo una alta frecuencia de regeneración (10-83.3) en 19 cultivares de camote. Demostrando que el mayor potencial regenerativo, 91.7%, provenía de hojas juveniles de la segunda y tercera posición de las porciones apicales del tallo. Los porcentajes de regeneración se calcularon multiplicando por 100 el número de explantes que regeneraron.

En 1995, Gosukonda *et al.* (a) probaron el efecto del uso de 0.2 mg/l de KIN, ZEA y Thidiazuron (TDZ) en la inducción de regeneración en peciolo; posterior al cultivo con 0.2 mg/l de 2,4-D por tres días. El subcultivo en los medios suplementados con Zeatina y Kinetina estimulo la regeneración en un amplio espectro de genotipos, como son Beauregard, Regal, Rojo Blanco, Hi Dry, pero con porcentajes regenerativos bastante bajos. En contraste, el medio suplementado con TDZ produjo la más alta frecuencia de regeneración entre las tres citoquininas probadas con un 78.2% en PI 318846-3, sin embargo, ninguno de los otros cultivares desarrolló regenerantes, presentando solo callos. Los porcentajes de regeneración fueron calculados teniendo en cuenta el número de explantes que regeneraron, multiplicados por cien.

Los peciolo de camote provenientes del segundo y tercer nudo mostraron una alta regeneración (85%) al usar 0.2 mg/L 2,4-D (estado I) y 0.2 mg/l TDZ (estado II) en comparación con el porcentaje de regeneración de las hojas (25%), (Gosukonda *et al.*, 1995a).

En el mismo año, Gosukonda *et al.* (b) cultivaron peciolo de camote en 0.2 mg/l 2,4-D por tres días y luego los transfirieron a un medio con 0.05 mg/l TDZ y 0.05 mg/l N⁶-(2-isopentenil) adenina (2iP) rasgando las capas superficiales y colocando los explantes en una posición vertical invertida. Posiblemente, la interferencia en el transporte de auxinas debido a la inversión del explante, o al rasgado tisular, pudo haber estimulado el incremento de la inducción de regenerantes; obteniendo la regeneración de 8 genotipos de camote, incluyendo cultivares élites como Jewel y Rojoblanco. La frecuencia de regeneración se calculó teniendo en cuenta el porcentaje de explantes que regeneraron al menos un brote.

En 1999, García *et al.* realizaron un estudio en dos variedades de camote, Jewel y CEMSA-78354, ensayando diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, así como distintas fuentes y tipos de explante. Solo 3 de las 151 variantes ensayadas indujeron la formación de brotes aéreos y raíces con una alta frecuencia. El primer medio combinó 1.0 mg/l ANA y 0.1 mg/l BAP; el segundo 1.0 mg/l Paclobutrazol (PPP) y 0.1 mg/l ANA; y el tercer medio constó de 0.5 mg/l AIA. Este último consiguió un 100% de regeneración via organogénesis directa en Jewel con una frecuencia mayor de dos regenerantes por explante. Entre los explantes probados, las hojas demostraron la más alta frecuencia de regeneración; siendo el área debajo del corte del peciolo, donde se forma el callo, la zona de más alta emisión de raíces y regenerantes. Cálculos basados en la eficiencia de regeneración: número total de explantes regenerados entre el número total de explantes probados, por cien.

En el 2004, Luo *et al.* desarrollaron un eficiente método de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando un protocolo de regeneración vía organogénesis de dos fases. Los explantes utilizados fueron láminas completas (hojas y peciolo). La primera fase consistió en el mantenimiento de los explantes en un medio con 4-FA (Ácido 4-fluorofenoxiacético) a 0.2 mg/l por 5 a 6 días y posteriormente (S2) en un medio con ZR a 0.2 mg/l; este protocolo se repitió en dos experimentos de transformación independientes, lográndose una eficiencia de

regeneración del 20 y 10%, respectivamente. El uso de AIA, en vez de 4-FA, bajó la eficiencia de transformación (4%). Las plantas transgénicas fueron obtenidas después de la sexta semana de infección con la bacteria. La eficiencia de transformación fue calculada teniendo en cuenta el número de líneas transgénicas obtenidas del total de explantes infectados.

En el 2006, Chen *et al.* estudiaron la regeneración de hojas completas mediante el uso de diferentes medios en un protocolo de dos etapas. En la primera etapa, los medios (3 y 5% sucrosa) indujeron la iniciación de la formación de callos al usar el medio CIM. En la segunda etapa, la regeneración de plantas, al usar el medio PRM, mediante tres combinaciones de reguladores: 1) PRM sin regulador de crecimiento, 2) PRM + 0.001 mg/l 2,4-D + 0.001 mg/l KIN y, 3) PRM + 0.02 mg/l 2iP + 0.02 mg/l TDZ. Los explantes provenientes del medio CIM 5%, luego de 4 semanas de cultivo, presentaron pocas raíces y abundantes callos friables. Posteriormente, permanecieron por 6 semanas en los diferentes medios PRM, obteniéndose una alta eficiencia de regeneración, con porcentajes de 72.2, 59.6 y 51.5% respectivamente. Los cálculos se basaron en el porcentaje de regeneración por explante.

En el 2007, Blasco expuso sus resultados de regeneración vía organogénesis mediante un protocolo de dos etapas en 5 cultivares de camote. Recomendando el uso de 2,4-D de 0.1-0.2 mg/l por un período no mayor a 4 días; y de ZR y KIN a 0.2 mg/l en Tanzania y Wagabolige, respectivamente. En ambos cultivares obtuvo un bajo porcentaje de regeneración. En Wagabolige obtuvo regenerantes a partir de raíces y callos, todos de apariencia normal; mientras que en Tanzania solo a partir de callos, regenerando brotes normales y amorfos. Blasco, concluyó que la presencia de raíces en el medio inhibe la formación de regenerantes; que la KIN reduce la formación de callos y que no existe una relación directa entre el tamaño de callo y la formación de raíces.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material Vegetal

Se utilizó plántulas de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lamarck, 1793) de las variedades Tanzania (código CIP N° 440166) y Wagabolige (código CIP N° 440167), proporcionadas por el Banco de Germoplasma de Camote del Centro Internacional de la Papa bajo la forma de plántulas *in vitro* contenidas en magenta plásticas.

3.1.2. Reactivos

Sales de Murashige y Skoog, fitohormonas (2,4-D, ZR, KIN, 4-FA, TDZ, BAP, AG₃), agua de coco, sucrosa, Gelrite, agua destilada, vitaminas para el medio de propagación, alcohol 96%.

3.1.3. Utensilios de Laboratorio

Bakers de 500 y 1000 ml, tubos de vidrio de 18 x 150 mm con tapa, magentas plásticas de 60 x 60 x 100 mm, placas Petri descartables de 100 x 15 mm, placas Petri de vidrio de 100 x 15 mm, pipetas de vidrio 1 y 10 ml, tips de 10, 20, 200, 1000 ul, probetas de 100, 500 y 1000 ml, Eppendorf de 2 ml, cinta envolvente tipo “Saran wrap” y “Parafilm”, botellas de vidrio de 1L, gradillas para tubos, algodón, pinzas, bisturíes, hojas de bisturí # 10.

3.1.4. Equipo de Laboratorio

Autoclave, balanza metálica, dispensador de medios automático, cámara de flujo laminar, mechero, esterilizador de instrumentos, agitador magnético, pH metro, cuarto de incubación.

3.1.5. Medios de cultivo

Los medios de cultivo desarrollados se destinaron para la propagación de material *in vitro* o la regeneración de plántulas.

3.1.5.1. Medio de Propagación basal (MPB):

Los medios de propagación estuvieron compuestos de sales Murashige & Skoog (MS) (Tabla N° 3), sucrosa 3%, Gelrite 0.2% (sólo MPB sólido) y fueron complementados con soluciones concentradas de vitaminas (Tabla N° 4). El MPB líquido, se usó para la micropropagación de esquejes (Tabla N° 5), variando su formulación según el cultivar utilizado; mientras que el MPB sólido, se usó para el mantenimiento del crecimiento de las plántulas regeneradas (Tabla N° 6), siendo el mismo en ambos cultivares.

3.1.5.2. Medios de Regeneración:

Los medios de regeneración estuvieron compuestos de las sales de MS, sucrosa 3%, Gelrite 0.2% y fueron suplementados con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento.

Se preparó soluciones concentradas de reguladores de crecimiento a 1000 y 2000 mg/l, de las cuales se tomaron alícuotas que se agregaron a los medios de cultivo después de ser autoclavados y enfriados (Tabla N° 7).

Todos los medios de cultivo se calibraron a pH 5.8 con NaOH o HCl antes de ser autoclavados a 15 libras de presión durante 20 minutos y a una temperatura de 121° C.

3.2. Métodos

3.2.1. Micropropagación

De cada plántula se tomó de 1 a 2 esquejes de 3 a 3.5 cm conteniendo 6 nudos. Se colocó 4 esquejes por magenta con 50 ml de medio líquido de propagación. El material fue propagado cada 5 a 7 semanas.

Se desarrolló un ensayo preliminar utilizando 5 magentas por cada medio de micropropagación diseñado, ubicando un total de 120 nudos por medio; con la finalidad de establecer un medio de propagación adecuado para la obtención de plántulas que sirvan como donantes de explantes. Se tuvo en cuenta las variaciones en las cantidades de sales MS, vitaminas MPB, sucrosa y agua de coco.

Se determinó el porcentaje de explantes (hojas) que brotaron por medio de micropropagación multiplicando el número de hojas obtenidas por 100 y luego, dividiendo dicha cantidad entre el número total de nudos utilizados (120).

3.2.2. Preparación de los explantes

Se usó como explantes: Hojas con 0.5 – 1 cm de peciolo, obtenidas a partir de las tres primeras hojas distales de plántulas con 21 a 24 días de edad. Paralelamente, a manera de comparación, se usaron raíces, provenientes de callos; y peciolos, tomados a partir de la primera a tercera hoja distal de la plántula, con los límites de edad anteriormente descritos.

3.2.3. Corte de los explantes

Se hicieron ensayos preliminares en los explantes hojas con peciolo, de ambas variedades, para determinar el efecto del corte de los peciolos en forma transversal (Figura N° 1) o transversal y longitudinalmente (Figura N° 2) en la eficiencia de regeneración. Los resultados fueron evaluados mediante la observación *in situ*.

3.2.4. Posición de los explantes

Se colocaron 30 hojas con peciolo de la variedad Tanzania en posición vertical y horizontal al medio de cultivo (Figura N° 3). Los explantes se distribuyeron uniformemente en 5 placas Petri que contenían el medio 2,4-D 0.05 mg/l (S1) y ZR 0.2 mg/l (S2). Se utilizó la variedad Tanzania como modelo de estudio, y en base a los resultados obtenidos, se cultivaron los explantes de la variedad Wagabolige en el medio 2,4-D 0.05 mg/l (S1) y KIN 0.4 mg/l (S2).

3.2.5. Diseño de los Protocolos de Regeneración

El protocolo de regeneración para hojas más peciolo consistió en un tratamiento de dos fases. La primera fase (S1) radicó en el mantenimiento de los explantes por 3 a 4 días en un medio suplementado con auxina. La segunda fase (S2), en el mantenimiento de los explantes provenientes de S1 por un período de 7 a 8 semanas en un medio suplementado con una a dos citoquininas. Los explantes de S2, en ambas variedades, se subcultivaron en medio fresco cada 15 días. En Wagabolige, además, se subcultivaron cada 5, 7, 10, 15 y 30 días en medios con concentraciones ascendentes o descendentes de citoquininas, según el tratamiento estudiado, generando protocolos de tres (S3) y cuatro (S4) fases -según el número de medios de regeneración utilizados dentro de un mismo tratamiento-. Se probaron 25 tratamientos de regeneración en Tanzania (Tabla N° 8) y 24 tratamientos de regeneración en Wagabolige (Tabla N° 9).

Los explantes se colocaron en placas Petri, manteniendo una posición vertical con una distribución paralela en dos filas, ubicando 3 explantes por fila. Cada placa Petri tuvo un contenido aproximado de 25 ml del medio de regeneración estudiado. Se realizó un mínimo de 30 repeticiones por tratamiento; considerando cada explante como una repetición. Cada experimento fue ejecutado de 1 a 16 veces en Tanzania y de 1 a 22 veces en Wagabolige. El número de repeticiones utilizadas en los experimentos se determinó teniendo en cuenta la respuesta regenerativa de brotes normales (Tabla N° 10 y 11).

El protocolo de regeneración para raíces consistió en un tratamiento de dos fases. En la S1, se colocaron las raíces - obtenidas a partir de callos- en un medio suplementado con auxina y/o ácido giberélico por un periodo de 3 días. En la S2, se mantuvieron los explantes en un medio suplementado con citoquininas por 7 a 8 semanas. Los tratamientos 1, 2 y 3 fueron comunes a ambas variedades, el tratamiento 4 de uso exclusivo para Wagabolige y el tratamiento 5 para Tanzania (Tabla N° 12). Los explantes fueron subcultivados cada 15 días. Se utilizaron 18 explantes por tratamiento. Cada tratamiento fue ejecutado dos veces.

El protocolo de regeneración para peciolo, también consistió en un tratamiento de dos fases. En la S1, se colocaron los peciolo en un medio de cultivo con 2,4-D 0.05 mg/l, en el cual la base de los peciolo se mantuvo en contacto con el medio con auxina por un periodo de tres días. En la S2, los explantes provenientes de la S1 se transfirieron a un medio de cultivo con TDZ 0.05 mg/l + BAP 0.05 mg/l por un periodo de 7 a 8 semanas, colocando la base de los peciolo en posición vertical invertida. Los explantes fueron subcultivados periódicamente cada 15 días. Se ejecutaron 35 repeticiones en un único experimento.

3.2.6. Condiciones de cultivo

Los explantes fueron mantenidos en cuartos de cultivo a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}$ C, con un fotoperiodo de 16 horas luz a 3000 lux (40 uE/ m²/ seg).

3.2.7. Evaluación

Los explantes fueron evaluados a la primera, segunda, cuarta, sexta y octava semana. Considerándose los siguientes criterios de evaluación:

Formación de callo: Porcentaje, tamaño, color, textura.

Regeneración de raíces: Porcentaje.

Regeneración de plántulas: Tiempo, porcentaje, apariencia.

El porcentaje de regeneración de plántulas, que se estableció para la presente investigación, se calculó teniendo en cuenta el número de explantes con regenerantes divididos entre el total de explantes probados, cálculo denominado eficiencia de regeneración (ER); y el número total de regenerantes obtenidos entre el total de explantes probados, denominado rendimiento de regeneración.

Mientras que los porcentajes de regeneración de callos y raíces se calculó dividiendo el número de callos o raíces formados entre el total de explantes probados.

3.2.8. Análisis estadístico

Los explantes fueron muestreados aleatoriamente y los resultados evaluados estadísticamente utilizando el Test de Proporciones RGui, en el que se comparó la diferencia significativa existente entre dos o más tratamientos de regeneración. Considerándose lo siguiente:

Número total de regenerantes.

Número de regenerantes por explante.

Número de regenerantes normales totales y por explante.

Número de regenerantes anormales totales y por explante.

La comparación se realizó entre tratamientos con características similares, tales como: el número de explantes utilizados y el número de regenerantes normales y anormales obtenidos por explante (ER) y en total (RR). Para efectos de análisis del rol de las hormonas, se enfrentó medios de regeneración con diferentes concentraciones de auxina, citoquinina y ácido giberélico.

IV. RESULTADOS

4.1. Micropropagación

De un total de 120 nudos por tratamiento, distribuidos en 4 esquejes de 6 nudos cada uno, en la variedad Tanzania brotaron de uno a dos nudos por esqueje, mientras que en la variedad Wagabolige de tres a cuatro (Figura N° 4). Esta última variedad presentó tallos con muchas ramificaciones y en algunos casos, dependiendo del medio, ausencia de hojas.

Se cuantificó el número de hojas con peciolo de la primera a tercera posición apical de las plántulas que brotaron por medio, determinando el porcentaje de explantes totales por tratamiento en los medios líquidos de micropropagación de Tanzania (Tabla N° 13) y Wagabolige (Tabla N° 14).

Los medios de propagación 4 y 5 (Tabla N° 5) permitieron la obtención de una mejor calidad y mayor número de plántulas donantes de explantes, generando un 45 y 55% de explantes -hojas con peciolo- en las variedades Tanzania y Wagabolige, respectivamente.

En Tanzania, el porcentaje de hojas obtenidas varió según el medio de micropropagación utilizado ($p= 0.003715$), Anexo 9.3.1. Las plántulas provenientes del primero (37.5%), segundo (30%) y tercer (37.5%) medio de micropropagación presentaron hojas con apariencia normal pero de tamaño pequeño; las plántulas obtenidas a partir del cuarto (45%) medio de micropropagación presentaron hojas con mejor apariencia y vitalidad -de tres magentas propagadas se obtuvo 40 explantes, 74.4% del total de explantes obtenidos para este medio. Finalmente, las plántulas provenientes del quinto (22.5%) y último medio de micropropagación presentaron hojas pequeñas, débiles y de mala apariencia, habiendo incluso ausencia de hojas en ciertas plántulas.

En Wagabolige el porcentaje de hojas obtenidas, también, varió según el medio de micropropagación utilizado ($p= 0.0000037$), Anexo 9.3.2. El quinto medio líquido de

micropropagación produjo 55% de plantas donantes. Sin embargo, los tallos presentaron una gran ramificación, lo que dificultó el proceso de propagación.

De otro lado, el segundo medio, aunque con menor cantidad de explantes producidos (37.5%), presentó hojas con mejor apariencia y vitalidad. Donde, el uso de agua de coco redujo la ramificación de tallos, lo que condujo a una mayor uniformidad de esquejes propagados.

4.2. Corte de los peciolo

Los peciolo de los explantes hojas con peciolo, en ambas variedades, se cortaron transversalmente con la finalidad de disminuir el daño producido en el explante y reducir la producción de fenoles, resultados basados en la observación *in situ*.

4.3. Posición de los explantes

La posición vertical de los explantes, en comparación con la horizontal, tiende a incrementar el porcentaje de regeneración en Tanzania (Anexo 9.3.3), en un 16.6% ($p = 0.06171$). El análisis de los resultados revela una tendencia de regeneración en los explantes cultivados en dicha posición; razón por la cual, se decidió colocar los explantes perpendicularmente al medio de cultivo en ambas variedades (Figura N° 5).

4.4. Formación de regenerantes

4.4.1. A partir de hojas con peciolo:

Los regenerantes obtenidos emergieron a partir de los callos y sólo en dos ocasiones, a partir de las raíces, provenientes de los callos. Los callos surgieron a partir de la división celular producida en la base de los peciolo que se mantuvieron en contacto

con el medio de cultivo. Los regenerantes surgieron en un corto periodo (17 a 25 días), apareciendo inicialmente como estructuras pigmentadas de color rojizo.

Los regenerantes obtenidos fueron de dos tipos: Normales (Figura N° 6 y 7) de apariencia idéntica a la planta, y anormales, de hojas suculentas “hiperhídricas” y en forma arrosetada (Figura N° 8).

La cantidad de regenerantes por callo varió según la variedad de camote utilizada, habiendo formación de brotes múltiples, es decir; convivencia de dos regenerantes en el mismo callo (Figura N° 9) o la formación de regenerantes, posteriores a la escisión del primero de ellos.

En la variedad Tanzania se formaron hasta tres regenerantes por explante. El primer regenerante tuvo apariencia normal y los dos siguientes apariencia anormal.

En la variedad Wagabolige, la formación de brotes múltiples fue menor, regenerando un máximo de dos brotes por explante.

4.4.1.1. Regenerantes en Tanzania

Al analizar la eficiencia de regeneración (ER), número de explantes con regenerantes por cien entre el número total de explantes probados (Anexo 9.3.4.1), se determinó que la variedad Tanzania tiene una mayor tendencia a la formación de regenerantes anormales (Tabla N° 15), destacando el tratamiento 15 (2,4-D 0.1 mg/l, S1; y ZR 0.2 mg/l, S2) por inducir la mayor formación de brotes amorfos (30%).

Únicamente los tratamientos 2, 4, 11, 20 y 25 regeneraron brotes normales. Entre ellos, los tratamientos 11 y 20 destacaron por inducir una mayor formación de brotes normales, generando un 3.33% de regeneración, respectivamente; seguidos por los tratamientos 2 (2.92%), 4 (1.72%) y 25 (1.66%). Sin embargo; no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0.835$).

Al analizar el rendimiento de regeneración (RR), cálculo determinado por la multiplicación del número total de regenerantes obtenidos por cien entre el total de explantes probados (Anexo 9.3.4.2), se determinó que el tratamiento 11 (2,4-D 0.01 mg/l + AG₃ 1 mg/l, S1; y ZR 0.2 mg/l, S2) fue el único que incrementó la respuesta

regenerativa de brotes normales, produciendo un 4.66% de regenerantes normales totales. De otro lado, los tratamientos 1, 2, 4 y 13 regeneraron 8.33, 10.36, 10.91 y 10% de regenerantes anormales totales, respectivamente (Tabla N° 16).

A pesar de que no existe diferencia significativa entre los tratamientos que regeneraron brotes normales por explante ($p= 0.835$) o totales ($p = 0.4533$) y los tratamientos 11 (2,4-D 0.01 mg/l + AG₃ 1 mg/l, S1; y ZR 0.2 mg/l, S2) y 20 (2,4-D 0.1 mg/l + AG₃ 5 mg/l, S1; y ZR 0.2 mg/l, S2) tuvieron la misma eficiencia de regeneración de brotes normales (3.33%); se recomienda utilizar el tratamiento 11, por haber producido una mayor uniformidad y constancia en los resultados de regeneración durante las numerosas ejecuciones de los experimentos y haber regenerado brotes con mayor vitalidad y en menor tiempo, antes de los 20 días.

4.4.1.2. Regenerantes en Wagabolige

Analizando la eficiencia de regeneración (Anexo 9.3.5.1) se determinó que en Wagabolige existe una mayor tendencia a la formación de regenerantes normales (Tabla N° 17).

El tratamiento 1, regeneró un único brote normal (0.92%) de 108 explantes ensayados; el tratamiento 2, dos regenerantes normales (0.92%) de 216 explantes probados; y el tratamiento 3, originó un total de 10 regenerantes normales (1.46%) y 3 anormales (0.14%), a partir de 682 explantes. Sin embargo; no se ha encontrado diferencia significativa entre el primer y segundo tratamiento ($p= 1$), ni entre el segundo y tercero ($p= 0.79$).

Los tratamientos 9, 10 y 12 regeneraron un único brote normal, por tratamiento, a partir de 136 explantes probados (0.73%); no existiendo diferencia significativa entre ellos ($p=1$). Sin embargo, no se pudo determinar la eficiencia real de regeneración de dichos tratamientos, en los que se ensayaba el efecto del aumento o disminución periódica de la concentración de citoquinina en S2; debido a que la regeneración de los explantes se dio durante su subcultivo en el tratamiento 3: KIN 0.4 mg/l (S2); es decir, mucho antes de cambiar los explantes a una concentración diferente de citoquinina. Razón por la cual, en los siguientes tratamientos (17, 18 y 19) se trabajaron con intervalos menores de tiempo: 5, 7 y 10 días, respectivamente.

Los tratamientos 17 y 18, de un total de 90 explantes, regeneraron cada uno un brote normal (1.11%); mientras que el tratamiento 19 regeneró un único brote anormal, de 30 explantes probados (3.33%).

Al analizar el rendimiento de regeneración de Wagabolige (Anexo 9.3.5.2) se determinó que el tratamiento 18 regeneró un adicional de 1.11% de regenerantes anormales. Mientras que el tratamiento 2 y 3, regeneraron un adicional de 0.93% y 0.29% de brotes normales, respectivamente (Tabla N° 18).

Aunque no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos que regeneraron brotes normales por explante ($p= 0.9861$) o totales ($p= 0.921$), los mejores tratamientos de regeneración fueron el 2 y 3, con 0.92% y 1.46% de regenerantes normales por explante (ER) y 1.85% y 1.75% de regenerantes normales totales (RR) obtenidos a partir de 216 y 682 explantes ensayados, respectivamente. Sin embargo; y teniendo en cuenta que la importancia de regeneración radica en el número de explantes con regenerantes (ER) y no el total de regenerantes obtenidos (RR), ya que estos pueden ser clones, el tratamiento 3 se perfila como el más apto para fines de regeneración en Wagabolige.

4.4.2. A partir de raíces:

En la variedad Wagabolige se obtuvieron dos regenerantes (uno de cada tipo) a partir de las raíces cultivadas en el cuarto tratamiento (Figura N° 10); sin embargo, en general, las raíces demostraron no tener eficiencia regenerativa significativa en las variedades estudiadas.

Las raíces usadas como explantes tuvieron, principalmente, un crecimiento longitudinal con un incremento de grosor poco notable y además, la presencia de pequeñas raíces adventicias que emergían a partir de ellas (Figura N° 11).

Las raíces cultivadas en los tres primeros tratamientos denotaron una apariencia friable y poco consistente, siendo de color amarillo pálido; pero las raíces de los tratamientos 4 y 5 mostraron una apariencia normal.

4.4.3. A partir de peciolo:

Los peciolo presentaron una apariencia compacta y granulosa. Necrosaron a los pocos días de ser cultivados en los tratamientos de regeneración y en ninguna de las dos variedades regeneró plantas completas. Sin embargo; los peciolo permitieron la regeneración de un 20% y 26.66% de raíces en Tanzania y Wagabolige, respectivamente, al usar el tratamiento 2,4-D 0.05 mg/l (S1) y TDZ 0.05 mg/l + BAP 0.05 mg/l (S2) (Figura N° 12).

4.5. Formación, regeneración y tamaño de callo

La formación de callos se inició con un ligero ensanchamiento de la base de los peciolo, después de que estos permanecieron por tres días en un medio suplementado con 2,4-D (Figura N° 13). Posteriormente, entre el quinto y décimo día, se definió la apariencia característica del callo.

En Tanzania y Wagabolige la formación de callos fue 100% exitosa; a excepción de los tratamientos 2, 3, 4 y 14 de Wagabolige; donde, el porcentaje de formación de callos fue de 88.88, 93.86, 82.44 y 86.66%, respectivamente. Sin embargo, el tratamiento 3 presentó un 3.44% de contaminación; factor que pudo haber influido en la generación exitosa de callos.

El tamaño de los callos, en ambas variedades, osciló entre 0.7 – 0.9 cm; sin embargo, en los tratamientos 14, 19, 20 y 21 de Wagabolige, varió. En el tratamiento 14 de Wagabolige, los callos disminuyeron de tamaño, llegando a medir entre 0.2 a 0.3 cm, denotando una apariencia rojiza. En los tratamientos siguientes, donde se usó 4-FA, el tamaño de los callos incrementó 1 cm (Figura N° 14).

4.6. Influencia del AG₃ y 2,4-D en la organogénesis

La acción del 2,4-D y AG₃ sobre el proceso de regeneración tuvo diferentes respuestas morfogénicas, dependiendo de la variedad de camote utilizada. Dichas

respuestas variaron según la concentración de auxina y giberelina empleada, en combinación o en forma separada.

El AG₃ y 2,4-D influyeron sobre el incremento de regenerantes normales y el número de callos con raíces.

4.6.1. Regenerantes normales

A) En Tanzania

El incremento de 2,4-D tuvo una influencia directamente proporcional sobre la regeneración de explantes anormales. A una concentración de 0.1 mg/l, el 2,4-D incrementó la respuesta regenerativa de brotes anormales (40%) en comparación la de 0.01 mg/l que la disminuyó (2.22%). Sin embargo, el uso de concentraciones medias de 2,4-D (0.05 mg/l) en S1 permitió la germinación de regenerantes normales, 2.92% (Tabla N° 19).

El efecto del AG₃ en el proceso de regeneración de brotes normales, se calculó comparando los tratamientos suplementados con diferentes concentraciones de AG₃ (0.1, 0.5, 1, 5 y 7 mg/l) en combinación con 2,4-D 0.1 mg/l (S1), usando como control un medio de cultivo, en S1, sólo con 2,4-D 0.1 mg/l. La regeneración de brotes normales se logró, únicamente, en aquellos tratamientos suplementados con 5 y 7 mg/l de AG₃ (S1), obteniéndose 3.33% y 1.66% de regeneración, respectivamente (Tabla N° 20).

El incremento de ZR, en la S2, tuvo un efecto sobre la regeneración de explantes normales, siendo mayor la regeneración en el tratamiento 2, que contuvo ZR 0.2 mg/l (2.92%); en comparación con el tratamiento 1, que usó ZR 0.1 mg/l. Este último no regeneró explantes normales (Tabla N° 21).

El uso de AG₃ y 2,4-D de manera combinada, en S1, permitió la regeneración de un gran número de brotes normales (Tabla N° 22). Presentando los tratamientos 11 y 20 los mayores porcentajes de regeneración de brotes normales (3.33%). Sin embargo, y

aunque no existe diferencia significativa entre los tratamientos mencionados ($p= 1$), se prefirió trabajar con el tratamiento 11 (2,4-D 0.01 mg/l + AG₃ 1 mg/l, S1 y ZR 0.2 mg/l, S2), por las razones descritas previamente.

B) En Wagabolige

Las concentraciones de AG₃ utilizadas (0.1 y 1 mg/l) no evidenciaron efectos positivos sobre el proceso de regeneración de explantes, pero sí una cierta tendencia a incrementar el número de callos con raíces.

El uso de bajas concentraciones de KIN en S2 disminuyó el porcentaje de regeneración de brotes normales. El tratamiento 2 (KIN 0.2 mg/l) regeneró 0.92% de brotes normales, en comparación con el tratamiento 3 (KIN 0.4 mg/l) que regeneró 1.46% de brotes normales, respectivamente (Tabla N° 23).

Entre los tratamientos que regeneraron brotes normales, y sabiendo que no existe diferencia significativa entre ellos, se prefirió utilizar el tratamiento 3 (2,4-D 0.05 mg/l, S1, y KIN 0.4 mg/l, S2); porque presentó el mayor porcentaje de regeneración de brotes normales (1.46%).

4.6.2. Número de callos con raíces

A) En Tanzania

El uso de 2,4-D a elevadas concentraciones (0.1 mg/l) disminuyó la formación de raíces, en Tanzania, mientras que el AG₃ generó un efecto antagónico en la auxina, inhibiendo su acción. Esto fue evidente al comparar el tratamiento 15 (36.66%) con el 16 (48.33%), ya que este último que contenía AG₃ (1 mg/l), incrementó la formación de callos con raíces en 11.67%.

La influencia positiva del AG₃ en el proceso de formación de raíces en Tanzania, se basó, además, en la comparación de los tratamientos 2 (2,4-D 0.05 mg/l, S1; ZR 0.2

mg/l, S2) y 4 (2,4-D 0.05 mg/l + AG₃ 1 mg/l, S1; y ZR 0.2 mg/l, S2) donde, se observó un incremento en el porcentaje de formación de callos con raíces de 18.24% a 29.16%. De igual forma, al comparar los tratamientos 17 (2,4-D 0.01 mg/l, S1; y ZR 0.2 mg/l, S2) y 11 (2,4-D 0.01 mg/l + AG₃ 1 mg/l, S1; y ZR 0.2 mg/l, S2), se observó un incremento radicular que fue de 4.44%, tratamiento sin AG₃, a 50.66%, tratamiento con AG₃.

La concentración óptima de uso de AG₃ se calculó comparando el tratamiento 15 (36.66%), sin AG₃, con los tratamientos 6 (24.07%), 19 (40%), 16 (48.33%), 20 (23.33%) y 25 (40%) que fueron suministrados con 0.1, 0.5, 1, 5 y 7 mg/l de AG₃, respectivamente. Estableciendo que el empleo de 1 mg/l de AG₃ (tratamiento 16), en el medio de cultivo, genera un mayor incremento de formación de callos con raíces.

La combinación del 2,4-D y AG₃ en los medios de regeneración, incrementó la formación de callos con raíces, principalmente en el tratamiento 11 (50.66%). Este tratamiento, coincidentemente o no, también obtuvo el mayor porcentaje de regeneración de brotes normales en Tanzania (3.33%). Sin embargo; no se puede concluir que exista una relación entre el número de callos con raíces y la eficiencia de regeneración de brotes normales, ya que los tratamientos 16 y 19 que generaron 48.33 y 40% de callos con raíces, respectivamente, sólo regeneraron brotes anormales.

En Tanzania, los tratamientos que destacaron por inducir una mayor formación de callos con raíces (mayores al 40%) fueron: 11, 16, 19, 20, 24 y 25 que regeneraron 50.66, 48.33, 40, 23.33, 46.66 y 40% de callos con raíces (Tabla N° 24). El análisis estadístico evidenció la existencia de diferencia significativa ($p = 0.006721$) entre los tratamientos (Anexo 9.3.6).

De otro lado, en aquellos tratamientos de regeneración en los que se utilizó 4-FA, a diferentes concentraciones, no se obtuvieron callos con raíces.

B) En Wagabolige

En la variedad Wagabolige el uso de KIN disminuyó la formación de callos con raíces. Sin embargo; el mantenimiento de los callos por largos períodos de cultivo, en

el medio, inhibió la acción de la KIN y por ende, favoreció la formación de raíces en los callos. El cambio de placas cada 5, 7 y 10 días produjo en los tratamientos 17, 18 y 19 un total de 15.55, 34.44 y 53.33% de callos con raíces, respectivamente (Tabla N° 25).

No se encontró diferencia ($p= 0.5524$) entre los tratamientos 8 (40%), 13 (50%) y 19 (53%) que regeneraron el mayor porcentaje de callos con raíces en la variedad Wagabolige (Anexo 9.3.7).

V. DISCUSION

Micropropagación

Los requerimientos de vitaminas fueron abastecidos, parcialmente, con agua de coco (2.5 ml/l) obteniéndose un incremento en la calidad y número de plantas donantes de explantes. Según, Roca y Mroginski (1991) esto se explicaría por la presencia de una amplia gama de componentes orgánicos, que intervienen en la nutrición celular; y de compuestos fenólicos como leucoantocianinas, que podrían incitar la división celular de explantes. Además, el agua de coco podría interactuar a niveles relativamente bajos (5%-10% v/v) con las auxinas endógenas, promoviendo el crecimiento, en situaciones en que por sí sola es ineficiente.

El uso de plántulas propagadas por esquejes con 6 nudos obtenidos de la parte central del tallo, en medio líquido, proporcionó óptima calidad de explantes; coincidiendo con los resultados obtenidos en trabajos anteriores para camote (Medina, 1991). Esto se debería fundamentalmente a que al eliminar la porción apical del tallo se aminora la dominancia apical; mejorando las posibilidades de brote de los diferentes nudos.

Posición de los explantes

En la presente investigación se utilizó las hojas con peciolo provenientes del primer, segundo y tercer nudo de la porción apical del tallo debido a que, según los datos reportados por Porobo Dessai *et al.* (1995), al utilizar las hojas de la segunda y tercera posición de la variedad Jewel, estos tipo de explantes exhiben una alta regeneración (91.67%). Esto se explicaría por la habilidad y capacidad regenerativa del explante, que varía según la edad, debido a la diferencia en los niveles endógenos de auxina o citoquinina. Además, la alta actividad metabólica de las hojas jóvenes, provenientes de la primera a tercera posición, podría contribuir a la organogénesis (Ritchie y Hodges, 1993).

La posición de las hojas con peciolo en el medio de cultivo también juega un rol importante en la respuesta organogénica, principalmente durante la primera fase de cultivo. Hay evidencia, (Gosukonda *et al.*, 1995) de que al cultivar las hojas con peciolo en posición vertical se obtiene un 77.7% de regeneración en comparación con los explantes cultivados en posición horizontal (44.4%) y verticalmente invertida (58.8%); corroborando los resultados obtenidos en la presente investigación, en donde hubo un 16.66% de diferencia de regeneración entre los explantes cultivados en posición vertical en comparación con los cultivados de forma horizontal. Infiriendo que debido a que el 2,4-D es una hormona con movimiento polar basipetalo, resulta más ventajoso colocar los explantes en posición vertical al medio de cultivo. Además, la omisión del contacto de la lámina foliar con el medio de cultivo, que se produce al mantener los explantes en posición horizontal, podría disminuir la absorción de la auxina exógena, que en exceso resulta tóxica para la planta.

Al colocar los peciolos, rasgados superficialmente, en posición verticalmente invertida en la segunda fase del protocolo de regeneración, los resultados obtenidos (ausencia de regeneración) difirieron de los documentados por Gosukonda *et al.* (1995b) quien obtuvo un 74% de regeneración en peciolos de variedades americanas de camote. Esto puede deberse a una interrupción de la polaridad del tejido, producto de la edad del explante o del movimiento de auxinas por difusión. Sin embargo, si la polaridad normal del transporte de auxinas declina o es interrumpida, se presume que nuevas rutas de transporte de auxinas se desarrollarían, induciendo la formación de nuevos haces vasculares, generando un mayor movimiento acropetalo de auxinas en plantas que han crecido en posición invertida por largos periodos. Para que esto fuera posible y hubiese diferenciación del tejido vascular debería perderse la polaridad original del tejido y además, suprimirse la polaridad del transporte original de auxinas en células vecinas (Sheldrake, 1974).

Producción de regenerantes

En la presente investigación la formación de regenerantes se logró vía organogénesis indirecta, en ambas variedades, y en muy baja frecuencia, en Wagabolige, vía

organogénesis directa. Corroborando dos de los procesos de regeneración reportados en camote por Medina (1991).

Los regenerantes aparecieron inicialmente como pequeñas estructuras pigmentadas (rojizas) que emergieron a partir del callo durante el subcultivo en la segunda fase del protocolo de regeneración, siguiendo el patrón de regeneración documentado por Porobo Dessai *et al.* (1995), en otras variedades de camote. Los regenerantes se localizaron principalmente en la base de los peciolo; sin embargo, ocasionalmente, los regenerantes emergieron a partir de raíces maduras; resultados que corroboran los obtenidos por Porobo Dessai *et al.* (1995) en Jewel.

En ambas variedades se analizó el potencial de regeneración en peciolo, raíces y hojas con peciolo.

a) Regeneración en peciolo y raíces:

Los peciolo no presentaron potencial de regeneración, corroborando los resultados obtenidos en cultivares élites de camote por Medina (1991); en contraste con la alta regeneración (85%) alcanzada por Gosukonda *et al.* (1995a) al trabajar con peciolo del segundo y tercer nudo. La ausencia de regeneración podría deberse a una insuficiencia de auxina endógena en el explante, debido a la ausencia de hojas, que producen dicha hormona en el limbo y la transportan por el floema al resto de órganos, según investigaciones realizadas por Baker (2000). De otro lado, la ausencia de los receptores celulares de auxinas que se encuentran principalmente en las hojas, genera un vacío en la percepción y respuesta morfogénica.

Las raíces utilizadas en la presente investigación no presentaron una regeneración exitosa, como la reportada por Blasco (2007) quien obtuvo un 36% de regeneración de brotes normales a partir de raíces emergentes de callos en Wagabolige. De igual forma Medina (1991) obtuvo 50% de regenerantes a partir de fragmentos de raíces de 4 a 5 cm de longitud en Jewel; sin embargo, estos fragmentos fueron precultivos en oscuridad, a diferencia del precultivo en luz de las raíces de la presente investigación. Factor que pudo haber restringido una óptima eficiencia regenerativa.

De otro lado, contradiciendo los resultados obtenidos por Sihachakr *et al.* (1997), quien utilizó Acido alfa-naftalenacético (ANA) y Benciladenina (BA) de manera combinada en fragmentos de raíces regeneradas; el uso combinado de auxinas y citoquininas tampoco permitió la regeneración de plantas completas.

b) Regeneración a partir de hojas con peciolo:

Sólo un pequeño porcentaje de explantes regeneraron en las variedades Tanzania (10.42%) y Wagabolige (0.93%). Los regenerantes obtenidos en la variedad Tanzania fueron en su mayoría anormales (8.85%) de apariencia hiperhídrica y procedentes de tratamientos cuyos callos presentaron una escasa a nula formación de raíces; mientras que en Wagabolige los regenerantes fueron, principalmente, de apariencia normal (0.80%), ratificando los resultados de regeneración obtenidos por Blasco (2007) en las variedades estudiadas, Tanzania (26%) y Wagabolige (16%), respectivamente.

La formación de regenerantes anormales podría ser producto de un reordenamiento celular anómalo o una alta concentración endógena de auxina, la cual interactuaría con la auxina presente en el medio generando un exceso que podría llegar a ser incluso tóxico para la planta.

El exceso de 2,4-D, en los medios de regeneración (S1), pudo haber inducido la formación de regenerantes anormales y provocado un incremento en la incidencia de brotes amorfos en aquellos tratamientos de Tanzania que usaron ZR (S2); y en aquellos que usaron ZR en combinación con 2,4-D (S1), inhibió y no redujo, como reportó Porobo Dessai *et al.* (1995) el porcentaje de regeneración. De otro lado, en Wagabolige, la combinación del 2,4-D con KIN, ambos a bajas concentraciones (0.01 mg/l), no sólo inhibió el proceso de regeneración, contradiciendo los resultados reportados por Sihachakr *et al.* (1997), quien documenta haber logrado una temprana y alta frecuencia de regeneración en camote, sino que; además, produjo la formación de callos pequeños (0.2 - 0.3 cm).

No se encontró diferencia entre los tratamientos que regeneraron brotes normales en Tanzania ($p=0.875$) y Wagabolige ($p=0.9861$). Sin embargo, recomiendo utilizar el tratamiento 11 y 3 porque poseen los mayores porcentajes de regeneración de brotes

normales entre los tratamientos probados, 3.33% y 1.46% en Tanzania y Wagabolige, respectivamente.

Con la presente investigación, se demostró que sí existe influencia directa entre la concentración de KIN y el tamaño del callo; en donde, a mayor concentración de esta citoquinina se generó callos con mayor volumen; difiriendo de los resultados que reportan una falta de relación (Blasco, 2007).

Dentro de las cuatro citoquininas probadas (KIN, ZR, BAP y TDZ), la KIN y ZR evidenciaron los más altos porcentajes de regeneración, principalmente la ZR; a diferencia del TDZ que no regeneró brotes en ninguna de las variedades estudiadas. Estos resultados contradicen los obtenidos por Gosukonda *et al.* (1995a), quienes reportaron que el TDZ promueve una alta frecuencia de regeneración al usar TDZ, restringiendo su campo de acción a unas pocas variedades; mientras que la KIN y ZR promueven bajos porcentajes de regeneración, pero actúan sobre un amplio espectro de genotipos de camote incluyendo algunos cultivares élites (Beauregard, Regal, Rojo Blanco y Hi Dry).

La aplicación de elevadas concentraciones de AG₃ resultó ventajosa en el proceso de regeneración (5%); resultados que difieren con los reportados para *Phaseolus vulgaris* por Haddon y Norticote, 1976; en donde ocurrió inhibición de la diferenciación celular a elevadas concentraciones exógenas de AG₃ en un rango de 10:1 mg/l (ácido giberélico: auxina)

En la investigación realizada la aplicación de AG₃ en la primera fase del protocolo, combinado con bajas concentraciones de 2,4-D, permitió la regeneración de un mayor número de brotes normales; contrariamente a los postulados de Doods y Roberts (1985) que sugieren no utilizar AG₃ al inicio de los tratamientos, debido a su acción inhibitoria en la acumulación de almidón a nivel celular. Además, el AG₃ incrementó el porcentaje de formación de callos con raíces, contrariamente a lo estipulado por Rodríguez *et al.* (1991).

La combinación del AG₃ con citoquininas (KIN y ZR) acrecentó -en longitud- el tamaño de los peciolos pero en ningún caso indujo la formación de regenerantes; contrariamente al efecto positivo que documentó Medina (1991).

La baja eficiencia de regeneración alcanzada en la presente investigación, en comparación con los datos documentados, puede atribuirse a la respuesta genotipo dependiente del cultivar empleado, existiendo reportes de que ni aún bajo las mismas condiciones de regeneración, variedades diferentes de un mismo cultivar responden de manera uniforme (Heeres *et al.*, 2002). En camote, podría haber un mayor incremento de la relación genotipo dependiente debido a la naturaleza hexaploide de su genoma, ya que genotipos con alta ploidía y número de cromosomas muestran mayor variabilidad (Jain, 2001).

También se podría presumir que una posible carencia o inadecuada cantidad de nutrientes en los medios de micropropagación haya influido en la formación de explantes con óptimas características fisiológicas y potencial de regeneración; siendo necesario optimizar la calidad fisiológica de los explantes con más investigaciones.

Otra posible causa del podría atribuirse a la ocurrencia de variación somaclonal en las plantas donantes de explantes; en donde, el sistema de cultivo de tejidos pudo haber reprogramado o reestructurado eventos bajo condiciones diferentes de las naturales, creando un amplio rango de variación epigenética en las plantas regeneradas a partir de esquejes (Jain, 2001). Así mismo, los numerosos subcultivos de las plántulas utilizadas en el presente trabajo pudieron influir en su eficiencia regenerativa.

Además, el adecuado control de los ciclos celulares, que previene la división celular antes de que se complete la replicación de ADN, podría haber sido interrumpido por el cultivo de tejidos, propiciando la ruptura de cromosomas; que, como consecuencia, causaron aberraciones, tales como: deleciones, duplicaciones, inversiones y traslocaciones (Duncan, 1997) en los regenerantes formados.

VI. CONCLUSIONES

Los medios de micropropagación 4 (MS: 2.2 g/l, sucrosa: 25 g/l, MPB: 2.5 ml/l, agua de coco: 2.5 ml/l) y 5 (MS: 2.2 g/l, sucrosa: 25 g/l, MPB: 5 ml/l) permiten la obtención de una mejor calidad y mayor número de explantes donantes en las variedades Tanzania (45%) y Wagabolige (55%).

Las hojas con peciolo cultivadas en posición vertical -en comparación con la horizontal- tienden a generar una mayor respuesta de regeneración ($p=0.06$).

El AG₃ incrementa el porcentaje de brotes normales en Tanzania.

El 2,4-D a elevadas concentraciones (0.1 mg/l) incrementa el porcentaje de brotes anormales en Tanzania.

La citoquinina incrementa la regeneración de plantas normales a determinadas concentraciones (0.2 mg/l en Tanzania y 0.4 mg/l en Wagabolige).

No existe relación entre el tamaño de callo y la eficiencia de regeneración.

La formación de raíces está influenciada por el 2,4-D y AG₃ en Tanzania, e inhibida por la KIN en Wagabolige. Sin embargo, no existe relación entre el número de callos con raíces y el número de regenerantes formados.

En Tanzania, se han obtenido 5 tratamientos con capacidad de inducir la regeneración de brotes normales ($p=0.835$); entre ellos el tratamiento 11 (2,4-D 0.01 mg/l + AG₃ 1 mg/l, S1; ZR 0.2 mg/l, S2) obtuvo el más alto porcentaje de regeneración de brotes normales (3.33%).

En Wagabolige, se han obtenido 8 tratamientos ($p=0.9861$) que regeneran brotes normales; entre ellos el tratamiento 3 (2,4-D 0.05 mg/l, S1; KIN 0.4 mg/l, S2) obtuvo el más alto porcentaje de regeneración de brotes normales (1.46%).

VII. RECOMENDACIONES

Utilizar menor cantidad de sales MS en los medios de micropropagación para evitar generar estrés osmótico en las células vegetales.

Utilizar los regenerantes que emergen a partir de callos; ya que al haber culminado de manera normal el proceso de regeneración se presume que han adquirido dicha capacidad.

Trabajar con plántulas provenientes de un banco de conservación; en las cuales la probabilidad de que haya ocurrido variación somaclonal es menor.

VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Mazrooei, S.; BATÍ, M. y G. HENSHAW (1997): Optimisation of Somatic embriogénesis in fourteen cultivars of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Plant Cell Rep.* 16:710-714
2. BAKER, D. (2000): Vascular transport of auxins and cytokinins in *Ricinus*. *Plant Growth Regulation* 32: 157-160.
3. BANSAL, A. (2003): Studies on Micropropagation of Potato Cultivars through Direct and Indirect Morphogenesis. Thesis for the award of the degree of Masters of Science in Biotechnology. Department of Biotechnology and Environmental Sciences. Thapar Institute of Engineering and Technology. Patiala, India. 50 pp.
4. BLASCO, C. (2007): Regeneración *in vitro* vía organogénesis de cinco cultivares de camote (*Ipomoea batatas* Lam.): Tanzania, SPK004, Wagabolige, 199004.2 y Nanshu. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú. 150pp
5. CANTLIFFE, D.; PADMANABHAN, K. y K. KOCH. (2001): Auxin-regulated gene expresión and embryogenic competente in callus cultura of sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Plant Cell Reports* 20: 187-192.
6. CARSWELL, G. y R. LOCY (1984): Root and shoot initiation by leaf, ítem and storage root explants of sweetpotato. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 3: 229-236.
7. CASTRO, O; y A. G. DEANDRADE. (1995): Meristem culture of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasilia 30: 917-922.
8. CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. La Batata en Cifras: Producción, Utilización, Consumo, Alimentación [En línea]. CIP. [Lima,

- Perú]. Febrero, 1999. [accedido el 02/05/2007]. Disponible en:
<http://www.cipotato.org/sweetpotato/facts/batacif.pdf>
9. CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (2002): Fomentando el Crecimiento, la Salud y la Prosperidad. Informe Anual 2002. CIP. Lima-Perú.
 10. CHEE, R.; LESKOVAR, D. y D. CANTLIFFE. (1992): Optimizing Embryogenic callus and Embryo Growth of a Synthetic Seed System for Sweetpotato by Varing Media Nutrient Concentrations. J. Am. Soc. Hort. Sci. 117:663-667.
 11. CHEN, L.; BHAGSARI A. y J. CARTER (2006): Effects of médium composition and cultura duration on in vitro morphogenesis of sweet potato. *Biologia Plantarum* 50: 114-2006.
 12. DEGRAS, L. (2003): *The Tropical Agriculturalist: Sweet Potato III*. Macmillan Education. Malasia. 67-73 pp.
 13. DOODS, J. y L. ROBERTS (1985): *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge Univ. Press, London. 232 pp.
 14. DUNCAN, R. (1997): Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Adv Agron* 58:201-240.
 15. FAOSTAT. FAO Statistical Database [En línea]. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* [Roma, Italia]. Julio, 2006. [accedido el 02/05/2007]. Disponible en:
<http://faostat.fao.org/site/340/DesktopDefault.aspx?PageID=340>
 16. GARCIA, R.; SOMONTES, D.; MENA, J.; PIMENTEL, E.; ZALDUA, Z.; LOPEZ, A.; MORAN, R. y M. GARCIA. (1999): Plant Regeneration from Leaf and Stem Explants from Two Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) cultivars. *Biotecnología Aplicada*. 16: 11-14.
 17. GOMEZ, L.; JARAMILLO, E.; JARAMILLO, S. y R. HOYOS (1997): Regeneración de Plantas de Papa (*Solanum tuberosum*) a partir de Tejido Foliar en las variedades Diacol Capiro y Parda Pastusa [En línea]. Universidad

Nacional de Colombia. Revista Papa [Medellín, Colombia]. Junio, 1997.
[accedido el 15/05/2007]. Disponible en:
<http://www.redepapa.org/regeneracion1.pdf>

18. GOSUKONDA, R.; POROBODESSAI, A.; BLAY, E.; PRAKASH, C. y C. PETERSON (1995a): Thidiazuron-induced Adventitious Shoot Regeneration of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). In *Vitro Cell Development Biology* 31: 65-71.
19. GOSUKONDA, R.; PRAKASH, C. y A. DESSAI (1995b): Shoot Regeneration *in vitro* from Diverse Genotypes of Sweetpotato and Multiple Shoot Production per Explant. *HortScience* 30: 1074-1077.
20. GUNCKEL, J.; SHARP, W.; WILLIAMS, B.; WEST, W. y W. DRINKWATER (1972): Root and Shoot initiation in Sweet potato Explants as Related to Polarity and Nutrient Media Variations. *Bot Gaz* 133: 254-262.
21. HADDON, L. y D. NORTHCOTE (1976): The Influence of Gibberellic Acid and Abscisic Acid on Cell and Tissue Differentiation of Bean Callus. *Journal Cell Sciences* 20: 47-55.
22. HEERES, P.; SCHIPPERS-ROZENBOOM, M.; JACOBSEN, E. y R. VISSER (2002): Transformation of a large number of potato varieties: genotype-dependent variation in efficiency and somaclonal variability. *Euphytica* 124: 13-22.
23. HUTCHINSON, M.; KRISHNARAJ, S. y P., SAXENA. (1997): Inhibitory effect of GA₃ on the development of Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. *Plant Cell Reports* 16: 435-438
24. JAIN, S. (2001): Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166.
25. LIU, Q.; LUO, J.; ZHOU, H. y S. LU. (1993): High Frequency Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *J. Agr. Biotechnol.* 1: 84-89.

26. LUO, H.; MARIA, S.; BENAVIDES, J.; ZHANG, D.; ZHANG, Y. y M. GHISLAIN (2004): Rapid genetic transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) via organogenesis. *African Journal of Biotechnology* 5: 1851-1857.
27. LITZ, R. Y R., JARRET. (1991): Regeneración de Plantas en Cultivo de Tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis (7) pp 152-160. En: Roca, W. M y Mroginski, L.A (eds.). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de La Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pxii, 970.
28. MEDINA, L. (1991): Organogénesis *in vitro* a partir de Entrenudos, Raíces y Hojas de nueve Cultivares de Camote (*Ipomoea batatas* Lam.): Aspectos Hormonales e Histológicos. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú. 179 pp.
29. MICHALCZUK, L.; RIBNICKY, D.; COOKE, T. y J. COHEN (1992): Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol.* (1992), 100, 1346-1353.
30. MONTALDO, A. (1991): Batata o Camote. En: Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. IICA-OEA. 2da ed. Serie: Colección de Libros y Materiales Educativos N° 21. San José, Costa Rica. 236 pp.
31. MURASHIGE, T. (1974): Plant Propagation through Tissue Cultures. *Ann. Rev. Plant Physiology* 25: 135-165.
32. NARAYANASWAMY, S. (1977): Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Berlin. 179-248 pp.
33. NEWEL, C.; LOWE, J.; MERRYWEATHER, A.; ROOKE, L. y W. Hamilton (1995): Transformation of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) with *Agrobacterium tumefaciens* and Regeneration of Plants Expressing Cowpea Trypsin Inhibitor and Snowdrop Lectin. *Plant Science* 107: 215-227.

34. PECH y AKE, A.; MAUST, B.; OROZCO-SEGOVIA, A. y C. OROPEZA. (2007): The effect of Gibberellic acid on the in vitro germination of Coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. *In Vitro Cell Development Biology Plant* 43:247–253.
35. PHILLIPS, G. y J. HUBSTENBERGER. (1998): Plant Regeneration by Organogenesis From Callus And Cell Suspension Cultures. *Plant Tissue And Organ Culture: Fundamental Methods*.
36. POROBO DESSAI, GOSUKONDA, R.; A.; BLAY, E.; KORSI, C.; DUMENYO, F.; MEDINA-BOLIVAR, F. y C. PRAKASH. (1995): Plant Regeneration of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) from leaf explant in vitro using a two-stage protocol. *Scientia Horticulturae* 62: 217-224
37. RITCHIE, S. y T. HODGES (1993): Cell culture and regeneration of transgenic plants. In: S. Kung and R. Wu (Editors), *Transgenic Plants, Vol. I. Engineering and Utilization*. Academic Press. San Diego, CA. 147-194 pp.
38. ROCA, W. y M., MROGINSKI. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de La Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 49-55 pp.
39. RODRIGUEZ, R.; DIAZ-SALA, C.; CUOZZO L. y G. ANCORA (1991): Pear in vitro propagation using a double-phase cultures system. *HortScience* 26: 62-64.
40. SEGHAL, C. (1975): Hormonal control of differentiation in leaf cultures of *Ipomoea batatas*. Poir. *Beitr. Biol. Pflanzen* 51:47-52.
41. SHELDRAKE, A. (1974): The polarity of auxin transport in inverted cuttings. *New Phytol.* 73:637-642.
42. SIHACHAKR, D. (1982): Premiers résultats concernant la multiplication végétative in vitro de la Patata douce (*Ipomoea batatas* L.) *Agr. Trop.* 37: 142-151

43. SIHACHAKR, D.; HAICOUR, R.; CAVALCANTE ALVES, J.M.; UMBOH, D.; SERVAES, A. y G. DUCREUX (1997): Plant Regeneration in Sweet potato (*Ipomoea batatas* L., Convolvulaceae). *Euphytica* 96: 143-152.
44. SMIT, N. (1997): Integrated Pest Management for Sweetpotato in Eastern Africa. Thesis Landbouwniversiteit Wageningen. Holanda.
45. STATHERS, T.; NAMANDA, S.; MWANGA, R.O.M.; KHISA, G. Y R. KAPINGA (2005): Manual for Sweetpotato Integrated Production and Pest Management Farmer Field Schools in Sub-Saharan Africa. International Potato Center. Kampala, Uganda. 168 pp.
46. SUGIYAMA, M. (1999): Organogénesis *in vitro*. *Curr. Opin. Plant Biology* 2:61-64.
47. TAN, F.; LI, K.; LAN, L. y Q. ZHANG. (1993): Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Sweetpotato. *Acta. Agr. Sinica* 19: 372-375.
48. THORPE, T y D. MEIER (1973): The Effect of Gibberellic acid and abscisic on shoot formation in tobacco callus. *Physiologia Plantarum* 29: 121-124
49. THORPE, T (1981): Growth and Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis. En: *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press. Londres. 82-86 pp.
50. USDA. United State Department of Agriculture [En línea]. Natural Resources Conservation System: Plant Database [North Carolina, USA]. Agosto, 2007. [accedido el 04/03/2008]. Disponible en:
<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=IPBA2>
51. WANG,J.; SATO, M.; TAURA, S. y T. KOKUBU (1998): Efficient Embryogenic callus formation and Plant Regeneration in Shoot tip Cultures of Sweetpotato. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.* 34: 61-64
52. WERNER, T.; MOTYKA, V.; SORNAD, M. y T. SCHMULLING. (2001): Regulation of Plant Growth by cCytokinin. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences. USA* 98:10487-92.

53. WOOLFE, J (1992): Sweet Potato: An Untapped Food Resource. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido. 643 pp.
54. ZHANG, D.; CERVANTES, J.; HUAMÁN, Z.; CAREY, E. y M. GHISLAIN (2000): Assessing genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars from tropical America using AFLP. *Genetic Resources and Crops Evolution* 47: 659-665.
55. ZHENG, Q.; DESSAI, A. y C. PRAKASH (1996): Rapid and Repetitive Plant Regeneration in Sweetpotato via Somatic embriogénesis. *Plant Cell Rep.* 15:381-385

IX. ANEXOS

9.1. TABLAS

Tabla N° 1.

Contenido de vitaminas en camote y raíces y cultivos tuberosos

Vitaminas	Camote	Yuca	Papa Irlandesa	Taro	ñame	Oreja elefante	de
Beta-caroteno(ug)	0-20 000	0-120	0-?	43	108	29	
B1 (mg)	0.09	0.05	0.11	0.03	0.05	0.02	
B2 (mg)	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	
Niacina (mg)	0.6	0.6	1.2	0.76	0.41	0.8	
B5 (mg)	0.59		0.3		0.13		
B6 (mg)	0.26		0.25	0.08			
Acido fólico (ug)	14		24				
C	24	20	30	15	20	14	
E	4.6						

Valores por 100 g de peso fresco. Fuente: Adaptado por Woolfe (1992)

Tabla N° 2.

Algunos componentes orgánicos del Agua de Coco

Algunos componentes orgánicos del Agua de Coco	
Aminoácidos	Vitaminas
Aspártico, glutámico	Acido nicotínico
Serina, aminobutírico	Acido pantoténico
Aspargina, Glicina	Biotina, Riboflavina
B-alanina, Treonina	Acido fólico
Histidina, Glutamina	Tiamina
Arginina, Lisina	Piridoxina
Valina, Metionina	Acido ascórbico
Tirosina, Prolina	
Homoserina	Sustancias de crecimiento
Fenilalanina	Auxina
Hidroxiprolina	Giberelina
	1,3- Difenilurea
Otros compuestos nitrogenados	Zeatina
Amonio, Etanolamina	Glucósido de Zeatina
Dihidroxifenilalanina	Zeatina ribósida
Acidos orgánicos	Otros
Shikímico, químico	ARN-Polimerasa
Pirrolidona carboxílico	Uracilo, Adenina
Succínico, málico	Fosfatasa ácida
Cítrico y desconocidos	Diastasa
	Deshidrogenasa
Azúcares	Peroxidasa
Sacarosa, Glucosa	Catalasa
Fructosa	

Fuente: Roca (1991)

Tabla N° 3.

Medio Murashige & Skoog (MS)

Compuestos	mg	mM
Macronutrientes		
KNO ₃	1900	18.8
NH ₄ NO ₃	1650	20.6
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	3.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1.5
KH ₂ PO ₄	170	1.25
Micronutrientes		
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	100
Na ₂ EDTA	37.3	100
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3	100
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	30
H ₃ BO ₃	6.3	100
KI	0.83	5
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25	1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.1
CoCl ₂ .H ₂ O	0.025	0.1
Vitaminas		
M100io-inositol	100	
Tiamina	0.4	

Tabla N° 4.

MPB Store

Reactivos	1 L
Ácido ascórbico	40 g
L-arginina	20 g
Putrescina	4 g
Ácido giberélico	4 g
Pantotenato de Calcio	0.4 g
Agua destilada	1000 ml

Tabla N° 5.

Medios Líquidos de Propagación Basal

Compuestos	1	2	3	4	5
Sucrosa (g)	30	30	25	25	25
Sales MS (g)	4.4	4.4	2.2	2.2	2.2
Vitaminas MPB (ml)	5	2.5	5	2.5	5
Agua de coco (ml)	5	2.5	5	2.5	-

Tabla N° 6.

Medio Sólido de Propagación Basal

Reactivos	1 L
Murashige & Skoog	4.4 g
Sucrosa	30 g
MPB store	5 g
Gelrite	2 g

Tabla N° 7.

Soluciones Concentradas de Reguladores de Crecimiento y Vitaminas

Reguladores de crecimiento y vitaminas	Solvente	Solución concentrada (ppm)
Ácido 2,4 – Diclorofenoxiacético	Etanol	1000
Ácido 4-fluorofenoxiacético	Etanol	1000
Kinetina	NaOH 1N	2000
Zeatina ribosida	NaOH 1N	1000
Acido giberélico-3	Etanol	1000
1-Fenil-3-(1,2,3-Tidiazol-5yl)urea	DMSO	1000
6-bencilaminopurina	HCl 1N	1000
Putrescina	Agua	10000
Pantotenato de Calcio	Agua	1000
L-Arginina	Agua	100000
Acido ascórbico	Agua	100000

Tabla N° 9. Tratamientos de Regeneración en Wagabolige

Hormonas (mg/l)		Tratamientos de Regeneración en Wagabolige																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Primera fase	2,4-D	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01	0.01	0.05	0.05	0.05	0.05				0.05
	4-FA																					0.05	0.05	0.2	
	AG ₃				1		0.1							1											
Segunda fase	KIN	0.1	0.2	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	*	**	***	****	*****	0.2	0.01	0.2	0.4	*****	*****	*****		0.4			
	BAP																				0.05		0.2	0.2	0.2
	TDZ																				0.05				
	2,4-D							0.05																	
	AG ₃					1	0.2	0.2																	
	H ₂ O Coco																								10%

* Cambio de tratamiento de 0.4 a 0.2KIN después de 15 días; ** Cambio de tratamiento de 0.4 a 0.2KIN después de 30 días; *** Cambio de tratamiento de 0.4 a 0.8KIN después de 15 días; **** Cambio de tratamiento de 0.4 a 0.8KIN después de 30 días; ***** Cambio de tratamiento de 0.4 KIN a un medio sin hormonas después de 30 días; ***** Cambio de 0.1//0.2//0.4 KIN cada 5 días; ***** Cambio de 0.1//0.2//0.4 KIN cada 7 días; ***** Cambio de 0.1//0.2//0.4 KIN cada 10 días.

Tabla N° 10. Número de explantes y ensayos en los tratamientos de regeneración de Tanzania

Número de explantes y repeticiones en los tratamientos de regeneración de Tanzania																									
Tratamientos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Nro. de explantes	84	444	78	174	30	54	24	24	30	30	300	30	30	30	60	60	90	30	30	90	30	30	30	30	60
Nro. de ensayos	3	16	3	6	1	2	1	1	1	1	10	1	1	1	2	2	3	1	1	3	1	1	1	1	2

Tabla N° 11. Número de explantes y ensayos en los tratamientos de regeneración de Wagabolige

Número de explantes y repeticiones en los tratamientos de regeneración de Wagabolige																									
Tratamientos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Nro. de explantes	108	216	682	131	30	30	30	30	136	136	30	136	48	30	30	30	90	90	30	30	30	30	30	30	60
Nro. de ensayos	3	6	22	3	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	2

Tabla N° 12. Tratamientos de Regeneración en Raíces

Hormonas (mg/l)		Tratamientos de Regeneración en Raíces				
		1	2	3	4	5
Primera fase	2,4-D	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	AG ₃	1	1	1		
Segunda fase	KIN	0.4	0.1	0.4	0.4	
	2,4-D		0.2	0.05		
	ZR					0.2

Tabla N° 13.

Explantos obtenidos en Tanzania según el medio utilizado

Medios de Micropropagación	Nro. de explantes	% de explantes
1 (MPB: 5ml/l + H ₂ O coco: 5ml/l)	45	37.5
2 (MPB: 2.5ml/l + H ₂ O coco: 2.5ml/l)	36	30
3 (1 + Suc.: 25 g/l + MS: 2.2 g/l)	45	37.5
4 (2 + Suc.: 25 g/l + MS: 2.2 g/l)	54	45
5 (Suc.: 25 g/l + MS: 2.2 g/l + MPB: 5ml/l)	27	22.5

Tabla N° 14.

Explantos obtenidos en Wagabolige según el medio utilizado

Medios de Micropropagación	Nro. de explantes	% de explantes
1 (MPB: 5ml/l + H ₂ O coco: 5ml/l)	35	29.16
2 (MPB: 2.5ml/l + H ₂ O coco: 2.5ml/l)	45	37.5
3 (1 + Suc.: 25 g/l + MS: 2.2 g/l)	33	27.5
4 (2 + Suc.: 25 g/l + MS: 2.2 g/l)	31	25.83
5 (Suc.: 25 g/l + MS: 2.2 g/l + MPB: 5ml/l)	66	55

Tabla N° 15.

Eficiencia de Regeneración en Tanzania

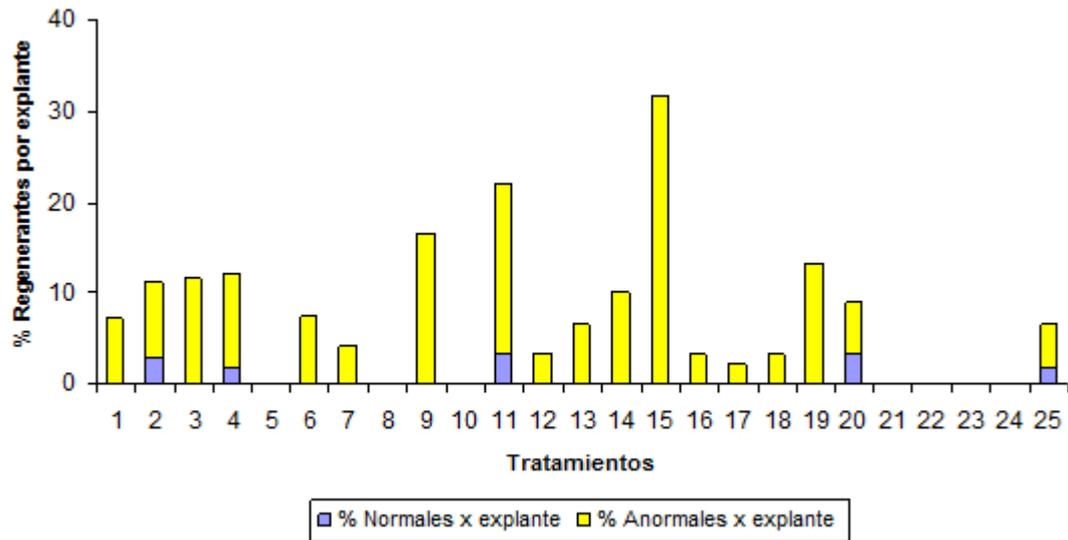


Tabla N° 16.

Rendimiento de Regeneración en Tanzania

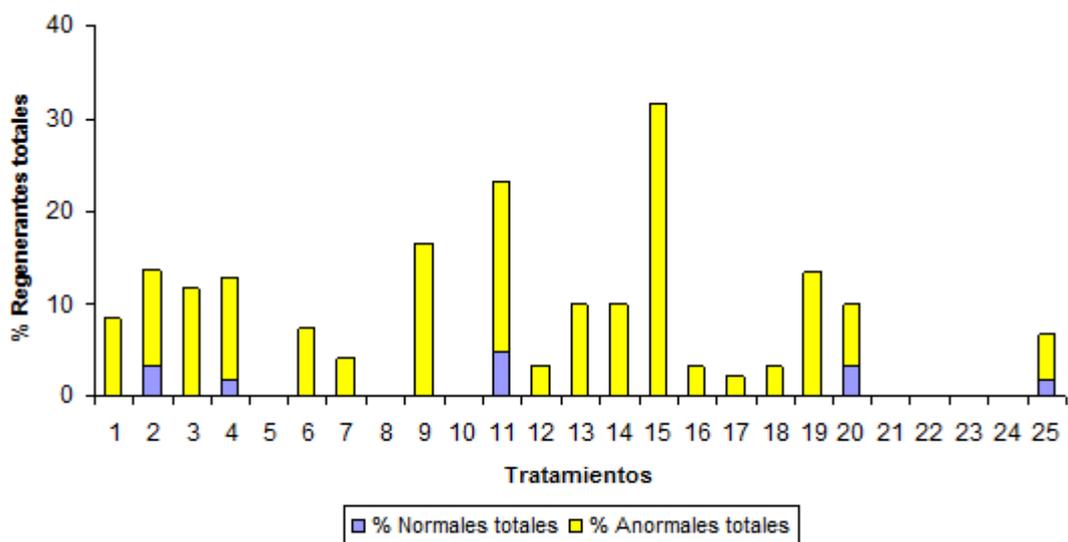


Tabla N° 17.

Eficiencia de Regeneración en Wagabolige

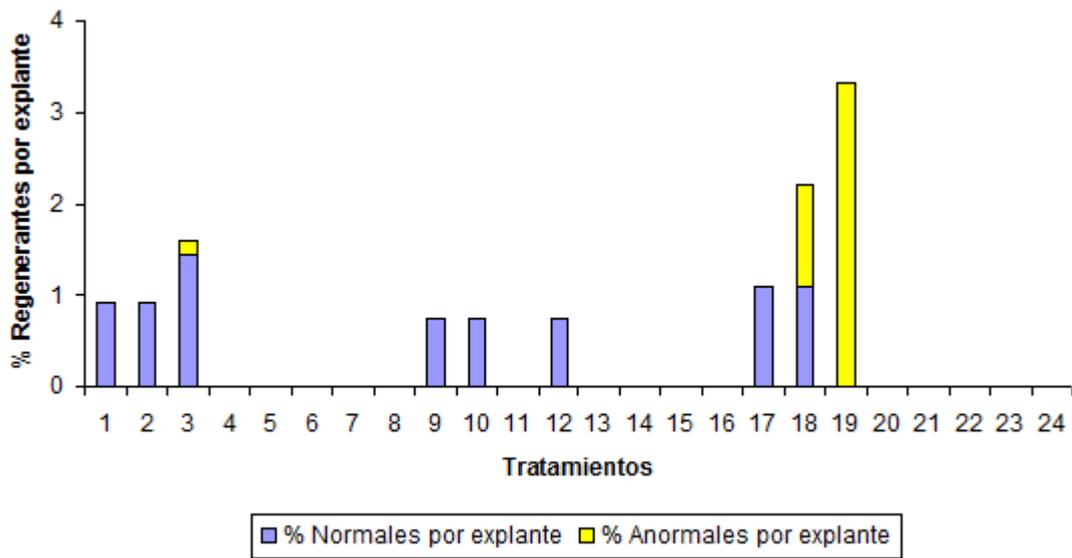


Tabla N° 18.

Rendimiento de Regeneración en Wagabolige

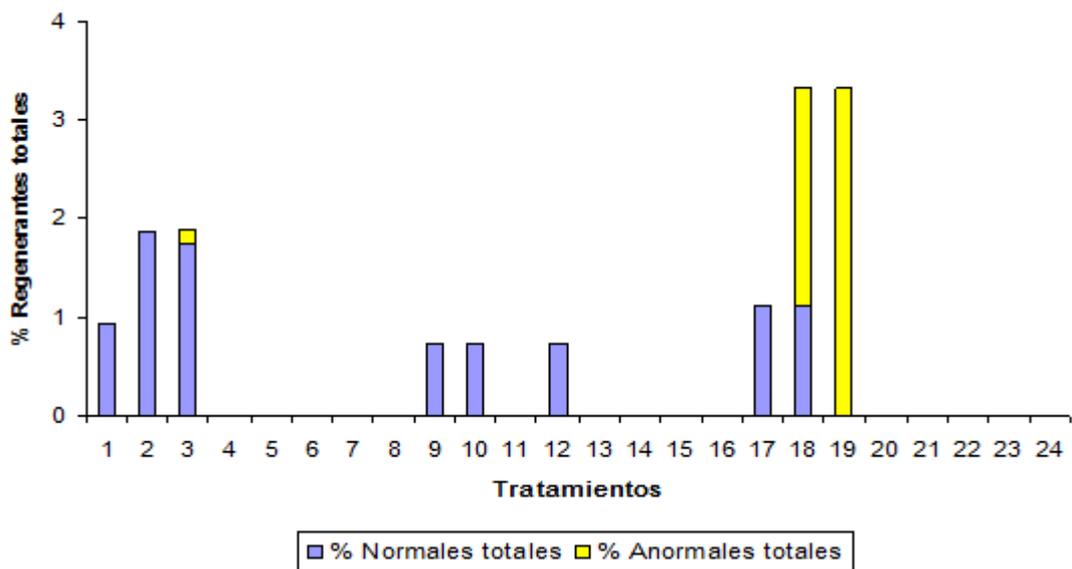


Tabla N° 19.

Efecto del 2,4-D (mg/l) en la eficiencia de regeneración de Tanzania

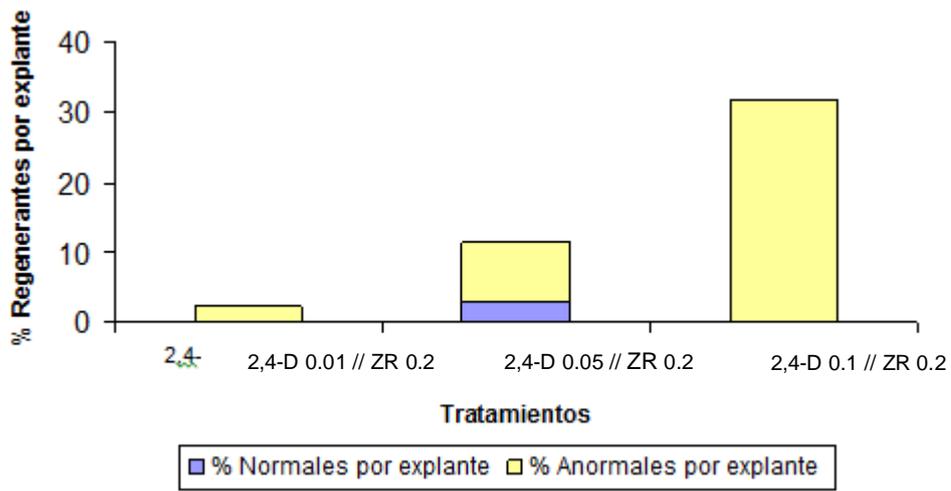


Tabla N° 20.

Efecto del AG₃ (mg/l) en la eficiencia de regeneración de Tanzania

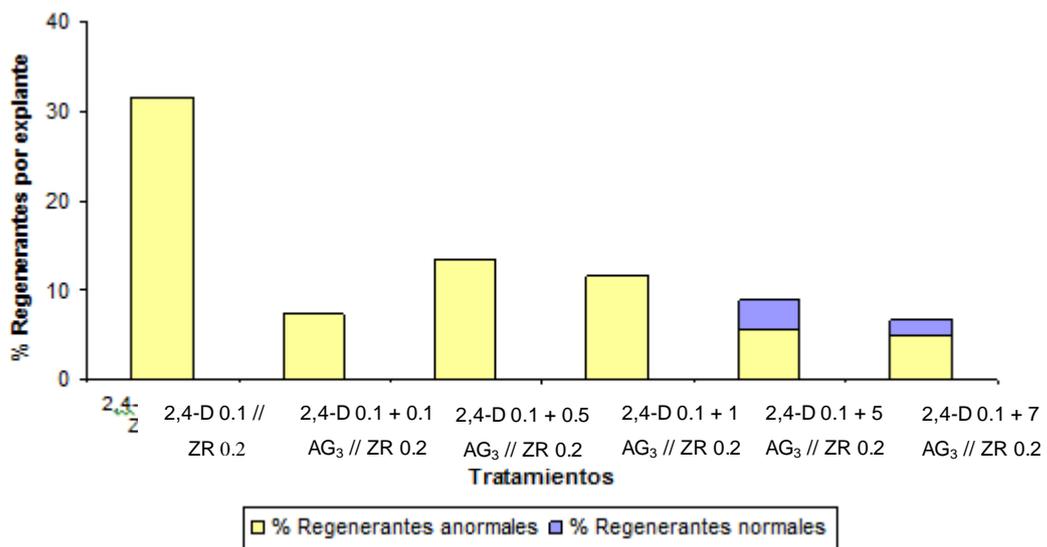


Tabla N° 21.

Efecto de la ZR (mg/l) en la eficiencia de regeneración de Tanzania

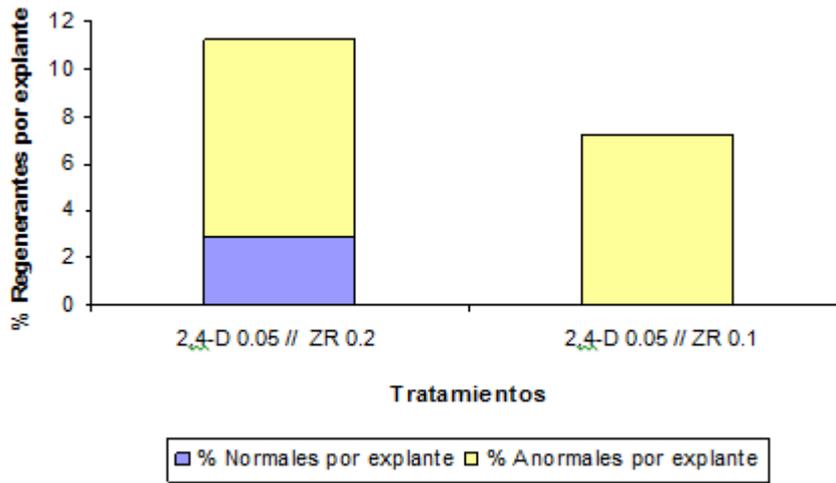


Tabla N° 22.

Efecto de la combinación de 2,4-D y AG₃ (mg/l) en la eficiencia de regeneración de Tanzania

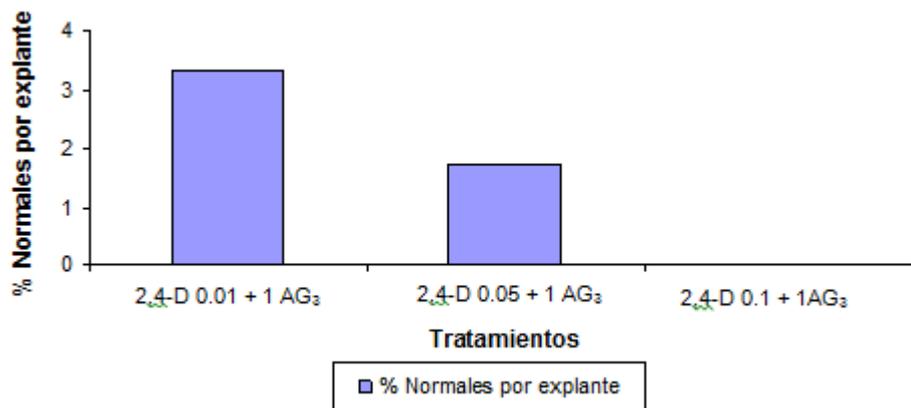


Tabla N° 23.

Efecto del 2,4-D y la KIN (mg/l) en la eficiencia de regeneración de Wagabolige

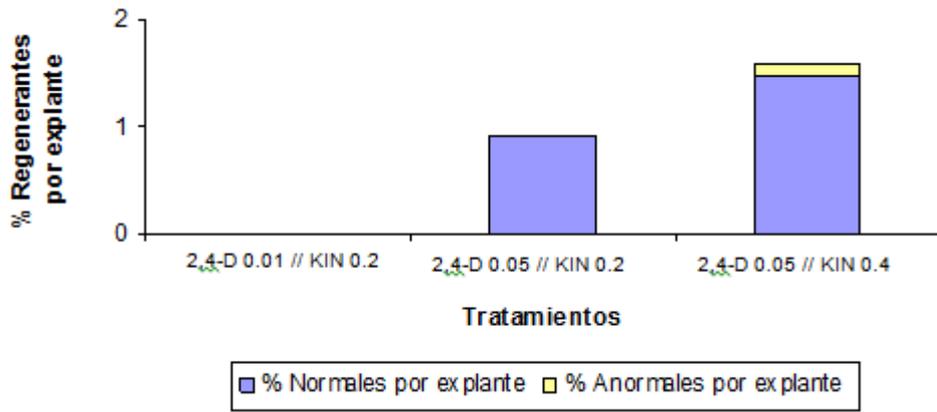


Tabla N° 24.

Callos con raíces en Tanzania

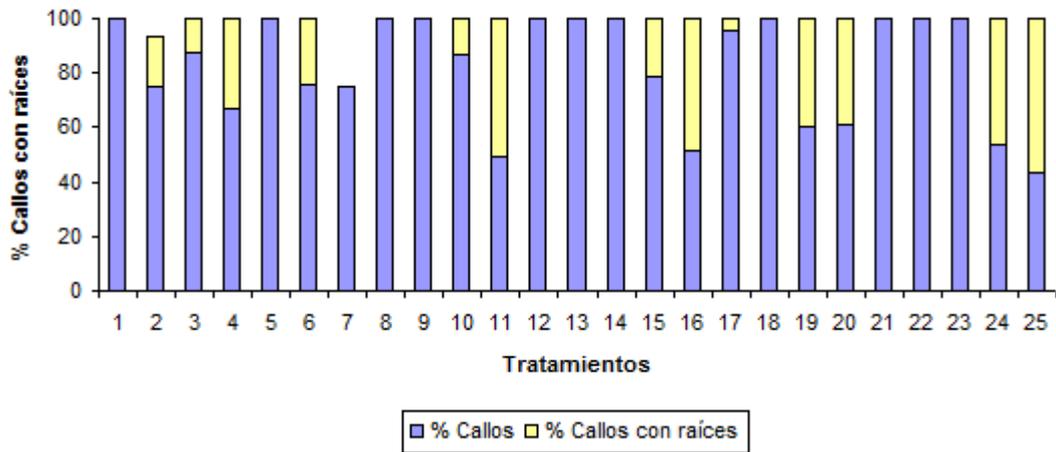
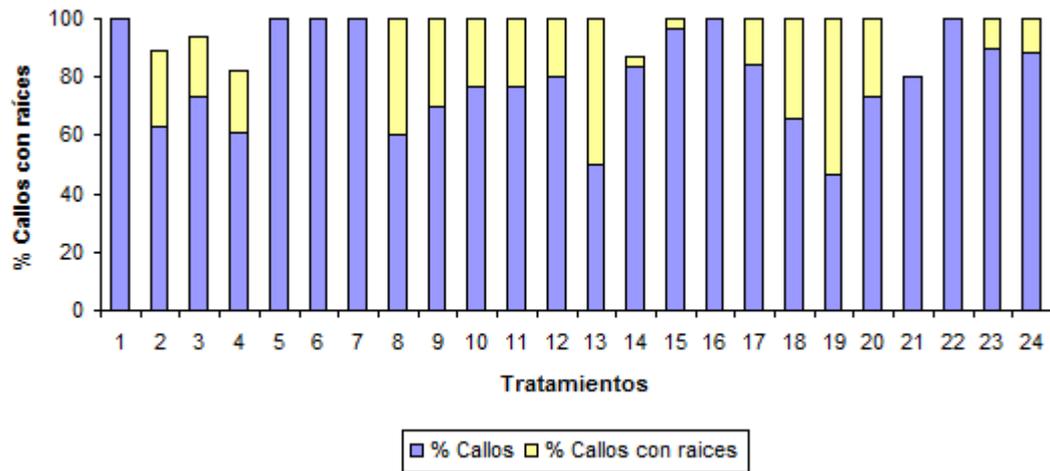


Tabla N° 25.

Callos con raíces en Wagabolige



9.2. FIGURAS

Figura N° 1. Corte transversal de peciolo



Corte transversal del peciolo de (Izq.) Tanzania y (Der.) Wagabolige.

Figura N° 2. Corte transversal y longitudinal de peciolo



Corte transversal y longitudinal de (Izq.) Tanzania y (Der.) Wagabolige.

Figura N° 3. Posición de los explantes



A. Posición vertical (Izq.) y horizontal (Der.) de las hojas de Tanzania



B. Vista superior de la posición horizontal (Izq.) y vertical (Der.) de las hojas de Wagabolige

Figura N° 4. Micropropagación



A. Tallos regenerados a partir de esquejes en el medio 4 de micropropagación en Tanzania



B. Tallos regenerados a partir de esquejes en el medio 5 de micropropagación en Wagabolige.

Figura N° 5. Posición vertical de los peciolos en el medio de cultivo



Posición vertical de los explantes (Izq.) Wagabolige y (Der.) Tanzania en el medio de cultivo cuyo peciolo ha sido escindido transversalmente.

Figura N° 6. Regenerantes normales en Tanzania



Figura N° 7. Regenerantes normales en Wagabolige



Figura N° 8. Regenerantes anormales



Figura N° 9. Brotes múltiples



Regenerantes o brotes múltiples en Tanzania



Regenerantes o brotes múltiples en Wagabolige

Figura N° 10. Regenerantes de Wagabolige obtenidos a partir de raíces



(Izq.): Regenerante anormal, (Der.): Regenerante normal

Figura N° 11. Regeneración en raíces



Cultivo *in vitro* de raíces en pruebas de regeneración.

Figura N° 12. Peciolos en medio TDZ 0.05 mg/l + BAP 0.05 mg/l



Figura N° 13. Ensanchamiento de la base del peciolo



Ensanchamiento de la base del peciolo producido por el mantenimiento del explante en un medio con auxinas por 3 días.

Figura N° 14. Tamaño promedio de callos



En ambos cultivares oscila entre 0.7-0.9 cm; con algunas variaciones de porte según las auxinas y/o citoquininas utilizadas. (Izq.) Tamaño promedio de callo. (Der.) Variación del tamaño promedio de callo.



Tamaño de los callos formados en Tanzania en diferentes tratamientos de regeneración



Tamaño de los callos formados en Wagabolige en diferentes tratamientos de regeneración

9.3. Análisis estadístico RGui

9.3.1. Comparación de los medios de micropropagación en Tanzania

```
> prop.test(c(45,36,45,54,27),c(120,120,120,120,120))
```

```
5-sample test for equality of proportions without continuity correction
data: c(45, 36, 45, 54, 27) out of c(120, 120, 120, 120, 120)
X-squared = 15.5327, df = 4, p-value = 0.003715
alternative hypothesis: two.sided
sample estimates:
prop 1  prop 2  prop 3  prop 4  prop 5
0.375  0.300  0.375  0.450  0.225
```

9.3.2. Comparación de los medios de micropropagación en Wagabolige

```
> prop.test(c(35,45,33,31,66),c(120,120,120,120,120))
```

```
5-sample test for equality of proportions without continuity correction
data: c(35, 45, 33, 31, 66) out of c(120, 120, 120, 120, 120)
X-squared = 30.6227, df = 4, p-value = 3.655e-06
alternative hypothesis: two.sided
sample estimates:
  prop 1  prop 2  prop 3  prop 4  prop 5
0.2916667 0.3750000 0.2750000 0.2583333 0.5500000
```

9.3.3. Posición de los explantes: Horizontal vs. vertical en Tanzania

```
> prop.test(c(0,5),c(30,30))
```

```
2-sample test for equality of proportions with continuity correction
data: c(0, 5) out of c(30, 30)
X-squared = 3.4909, df = 1, p-value = 0.06171
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
-3.333587e-01 2.532434e-05
sample estimates:
prop 1  prop 2
0.0000000 0.1666667
```

9.3.4. Tratamientos de regeneración en Tanzania

9.3.4.1. Eficiencia de regeneración

Proporción de regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 1 y 3

```
> prop.test(c(6,9),c(84,48))
2-sample test for equality of proportions with continuity correction
data: c(6, 9) out of c(84, 48)
X-squared = 3.0146, df = 1, p-value = 0.08252
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
-0.25583153 0.02368867
sample estimates:
  prop 1      prop 2 
0.07142857 0.18750000
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 5 y 8

```
> prop.test(c(0,0),c(30,24))
2-sample test for equality of proportions without continuity correction
data: c(0, 0) out of c(30, 24)
X-squared = NaN, df = 1, p-value = NA
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
0 0
sample estimates:
prop 1 prop 2 
  0      0
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 6 y 16

```
> prop.test(c(4,7),c(54,60))
2-sample test for equality of proportions with continuity correction
data: c(4, 7) out of c(54, 60)
X-squared = 0.2038, df = 1, p-value = 0.6517
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
-0.16731697 0.08213179
sample estimates:
  prop 1      prop 2 
0.07407407 0.11666667
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 7 y 18

```
> prop.test(c(1,1),c(24,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(1, 1) out of c(24, 30)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.1025540 0.1192207  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.04166667 0.03333333
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 9 y 19

```
> prop.test(c(5,4), c(30,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(5, 4) out of c(30, 30)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.1805028 0.2471695  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.1666667 0.1333333
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 10 y 20

```
> prop.test(c(0,6),c(30,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(0, 6) out of c(30, 30)  
X-squared = 4.6296, df = 1, p-value = 0.03142  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.37646886 -0.02353114  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
  0.0   0.2
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 11 y 2

```
> prop.test(c(62,50),c(270,414))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(62, 50) out of c(270, 414)  
X-squared = 13.3584, df = 1, p-value = 0.0002573  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
0.04661805 0.17109532  
sample estimates:  
 prop 1      prop 2  
0.2296296 0.1207729
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 12 y 17

```
> prop.test(c(1,2),c(30,90))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(1, 2) out of c(30, 90)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.07108756 0.09330979  
sample estimates:  
 prop 1      prop 2  
0.03333333 0.02222222
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 13 y 14

```
> prop.test(c(2,3),c(30,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(2, 3) out of c(30, 30)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.2062799 0.1396132  
sample estimates:  
 prop 1      prop 2  
0.06666667 0.10000000
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 21, 22, 23, 24

```
> prop.test(c(0,0,0,0),c(30,30,30,30))
```

```
4-sample test for equality of proportions without continuity correction
data: c(0, 0, 0, 0) out of c(30, 30, 30, 30)
X-squared = NaN, df = 3, p-value = NA
alternative hypothesis: two.sided
sample estimates:
prop 1 prop 2 prop 3 prop 4
  0     0     0     0
```

9.3.4.2. Eficiencia de regeneración de brotes normales

Comparación entre los tratamientos que regeneraron brotes normales: 2, 4, 11, 20 y 25

```
> prop.test(c(13,3,10,3,1),c(444,174,300,90,60))
```

```
5-sample test for equality of proportions without continuity correction
data: c(13, 3, 10, 3, 1) out of c(444, 174, 300, 90, 60)
X-squared = 1.4526, df = 4, p-value = 0.835
alternative hypothesis: two.sided
sample estimates:
  prop 1      prop 2      prop 3      prop 4      prop 5
0.02927928 0.01724138 0.03333333 0.03333333 0.01666667
```

Proporción de los regenerantes normales obtenidos por explante en los tratamientos: 11 y 2

```
> prop.test(c(10,13),c(270,414))
```

```
2-sample test for equality of proportions with continuity correction
data: c(10, 13) out of c(270, 414)
X-squared = 0.0334, df = 1, p-value = 0.855
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
-0.02552421 0.03679635
sample estimates:
  prop 1      prop 2
0.03703704 0.03140097
```

Proporción de los regenerantes normales obtenidos por explante en los tratamientos: 15 y 20

```
> prop.test(c(0,3),c(30,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(0, 3) out of c(30, 30)  
X-squared = 1.4035, df = 1, p-value = 0.2361  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.24068498 0.04068498  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.0 0.1
```

Proporción de los regenerantes normales obtenidos por explante en los tratamientos: 4 y 20

```
> prop.test(c(3,3),c(114,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(3, 3) out of c(114, 30)  
X-squared = 1.6476, df = 1, p-value = 0.1993  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.20603735 0.05866893  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.02631579 0.10000000
```

9.3.4.3. Eficiencia de regeneración de brotes anormales

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos: 11 y 2

```
> prop.test(c(52,37),c(270,414))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(52, 37) out of c(270, 414)  
X-squared = 14.4847, df = 1, p-value = 0.0001413  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
0.04568568 0.16075555  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.19259259 0.08937198
```

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos: 2 y 9

```
> prop.test(c(37,5),c(414,30))
2-sample test for equality of proportions with continuity correction
data: c(37, 5) out of c(414, 30)
X-squared = 1.1532, df = 1, p-value = 0.2829
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
 -0.23132961 0.07674024
sample estimates:
  prop 1      prop 2 
0.08937198 0.16666667
```

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos: 4 y 15

```
> prop.test(c(17,12),c(114,30))
2-sample test for equality of proportions with continuity correction
data: c(17, 12) out of c(114, 30)
X-squared = 7.7998, df = 1, p-value = 0.005225
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
 -0.45903226 -0.04272212
sample estimates:
  prop 1      prop 2 
0.1491228 0.4000000
```

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos: 15 y 20

```
> prop.test(c(12,3),c(30,30))
2-sample test for equality of proportions with continuity correction
data: c(12, 3) out of c(30, 30)
X-squared = 5.6889, df = 1, p-value = 0.01707
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
 0.06110391 0.53889609
sample estimates:
prop 1 prop 2 
 0.4   0.1
```

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos: 1 y 9

```
> prop.test(c(6,5),c(84,30))
```

2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data: c(6, 5) out of c(84, 30)

X-squared = 1.3371, df = 1, p-value = 0.2475

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.26214073 0.07166454

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.07142857	0.16666667

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos: 6 y 19

```
> prop.test(c(4,4),c(54,30))
```

2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data: c(4, 4) out of c(54, 30)

X-squared = 0.2487, df = 1, p-value = 0.618

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.2254560 0.1069374

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.07407407	0.13333333

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos: 13 y 14

```
> prop.test(c(2,3),c(30,30))
```

2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data: c(2, 3) out of c(30, 30)

X-squared = 0, df = 1, p-value = 1

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.2062799 0.1396132

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.06666667	0.10000000

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos:

17 y 20

```
> prop.test(c(2,3),c(90,30))
```

2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data: c(2, 3) out of c(90, 30)

X-squared = 1.7391, df = 1, p-value = 0.1872

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.21158766 0.05603211

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.02222222	0.10000000

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos: 3 y

7

```
> prop.test(c(9,1),c(48,24))
```

2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data: c(9, 1) out of c(48, 24)

X-squared = 1.7565, df = 1, p-value = 0.1851

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.02173778 0.31340445

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.18750000	0.04166667

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos: 16

y 18

```
> prop.test(c(2,1),c(60,30))
```

2-sample test for equality of proportions without continuity correction

data: c(2, 1) out of c(60, 30)

X-squared = 0, df = 1, p-value = 1

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.0786703 0.0786703

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.03333333	0.03333333

**Proporción de los regenerantes anormales por explante obtenidos en los tratamientos:
5,8,10,21,22,23,24**

```
> prop.test(c(0,0,0,0,0,0,0),c(30,24,30,30,30,30,30))  
7-sample test for equality of proportions without continuity correction  
data: c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0) out of c(30, 24, 30, 30, 30, 30, 30)  
X-squared = NaN, df = 6, p-value = NA  
alternative hypothesis: two.sided  
sample estimates:  
prop 1 prop 2 prop 3 prop 4 prop 5 prop 6 prop 7  
0 0 0 0 0 0 0
```

**Proporción de los regenerantes anormales por explante obtenidos en los tratamientos: 12
y 13**

```
> prop.test(c(1,2),c(30,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(1, 2) out of c(30, 30)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.1766370 0.1099704  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.03333333 0.06666667
```

9.3.4.4. Rendimiento de regeneración

Proporción de regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 1 y 3

```
> prop.test(c(7,60),c(84,414))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(7, 60) out of c(84, 414)  
X-squared = 1.777, df = 1, p-value = 0.1825  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.13689580 0.01370740  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.08333333 0.14492754
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 4 y 15

```
> prop.test(c(21,12),c(114,30))
2-sample test for equality of proportions with continuity correction
data:  c(21, 12) out of c(114, 30)
X-squared = 5.0986, df = 1, p-value = 0.02395
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
-0.426039241 -0.005539707
sample estimates:
  prop 1    prop 2 
0.1842105 0.4000000
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 5 y 8

```
> prop.test(c(0,0),c(30,24))
2-sample test for equality of proportions without continuity correction
data:  c(0, 0) out of c(30, 24)
X-squared = NaN, df = 1, p-value = NA
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
 0 0
sample estimates:
prop 1 prop 2
 0
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 6 y 16

```
> prop.test(c(4,8),c(54,60))
2-sample test for equality of proportions with continuity correction
data:  c(4, 8) out of c(54, 60)
X-squared = 0.5239, df = 1, p-value = 0.4692
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
-0.18765584 0.06913732
sample estimates:
  prop 1    prop 2 
0.07407407 0.13333333
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 7 y 18

```
> prop.test(c(1,1),c(24,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(1, 1) out of c(24, 30)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.1025540 0.1192207  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.04166667 0.03333333
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 9 y 19

```
> prop.test(c(5,4),c(30,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(5, 4) out of c(30, 30)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.1805028 0.2471695  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.1666667 0.1333333
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 10 y 20

```
> prop.test(c(0,7),c(30,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(0, 7) out of c(30, 30)  
X-squared = 5.8221, df = 1, p-value = 0.01583  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.41801552 -0.04865114  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.0000000 0.2333333
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 11 y 2

```
> prop.test(c(66,60),c(270,414))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(66, 60) out of c(270, 414)  
X-squared = 10.1178, df = 1, p-value = 0.001468  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
0.03499521 0.16403861  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.2444444 0.1449275
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 12 y 17

```
> prop.test(c(1,2),c(30,90))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(1, 2) out of c(30, 90)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.07108756 0.09330979  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.03333333 0.02222222
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 13 y 14

```
> prop.test(c(3,3),c(30,30))  
2-sample test for equality of proportions without continuity correction  
data: c(3, 3) out of c(30, 30)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.1518182 0.1518182  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
  0.1   0.1
```

Proporción de regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 21, 22, 23, 24

```
> prop.test(c(0,0,0,0),c(30,30,30,30))
```

4-sample test for equality of proportions without continuity correction

data: c(0, 0, 0, 0) out of c(30, 30, 30, 30)

X-squared = NaN, df = 3, p-value = NA

alternative hypothesis: two.sided

sample estimates:

prop 1	prop 2	prop 3	prop 4
0	0	0	0

9.3.4.5. Rendimiento de regeneración de brotes normales

Comparación entre los tratamientos que regeneraron brotes normales: 2, 4, 11, 20 y 25

```
> prop.test(c(14,3,14,3,1),c(444,174,300,90,60))
```

5-sample test for equality of proportions without continuity correction

data: c(14, 3, 14, 3, 1) out of c(444, 174, 300, 90, 60)

X-squared = 3.6647, df = 4, p-value = 0.4533

alternative hypothesis: two.sided

sample estimates:

prop 1	prop 2	prop 3	prop 4	prop 5
0.03153153	0.01724138	0.04666667	0.03333333	0.01666667

Proporción de los regenerantes normales totales obtenidos en los tratamientos: 11 y 2

```
> prop.test(c(14,14),c(270,414))
```

2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data: c(14, 14) out of c(270, 414)

X-squared = 0.9336, df = 1, p-value = 0.3339

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.01668871 0.05275956

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.05185185	0.03381643

Proporción de los regenerantes normales totales obtenidos en los tratamientos: 2 y 20

```
> prop.test(c(14,3),c(414,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(14, 3) out of c(414, 30)  
X-squared = 1.7729, df = 1, p-value = 0.1830  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.19281249 0.06044534  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.03381643 0.10000000
```

Proporción de los regenerantes normales totales obtenidos en los tratamientos: 2 y 4

```
> prop.test(c(14,3),c(414,114))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(14, 3) out of c(414, 114)  
X-squared = 0.0104, df = 1, p-value = 0.9187  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.03224852 0.04724979  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.03381643 0.02631579
```

Proporción de los regenerantes normales totales obtenidos en los tratamientos: 11 y 20

```
> prop.test(c(14,3),c(270,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(14, 3) out of c(270, 30)  
X-squared = 0.4434, df = 1, p-value = 0.5055  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.1772282 0.0809319  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.05185185 0.10000000
```

9.3.4.6. Rendimiento de regeneración de brotes anormales

Proporción de los regenerantes anormales totales obtenidos en los tratamientos: 11 y 2

```
> prop.test(c(52,46),c(270,414))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(52, 46) out of c(270, 414)  
X-squared = 8.1879, df = 1, p-value = 0.004217  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
0.02248588 0.14047709  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.1925926 0.1111111
```

Proporción de los regenerantes anormales totales obtenidos en los tratamientos: 3 y 4

```
> prop.test(c(9,18),c(48,114))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(9, 18) out of c(48, 114)  
X-squared = 0.0533, df = 1, p-value = 0.8174  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.1143199 0.1735304  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.1875000 0.1578947
```

Proporción de los regenerantes anormales totales obtenidos en los tratamientos: 1 y 9

```
> prop.test(c(7,5),c(84,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(7, 5) out of c(84, 30)  
X-squared = 0.8652, df = 1, p-value = 0.3523  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.25182192 0.08515525  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.08333333 0.16666667
```

Proporción de los regenerantes anormales totales obtenidos en los tratamientos: 6 y 15

```
> prop.test(c(4,12),c(54,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(4, 12) out of c(54, 30)  
X-squared = 11.2566, df = 1, p-value = 0.0007934  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.5405602 -0.1112917  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.07407407 0.40000000
```

Proporción de los regenerantes anormales totales obtenidos en los tratamientos: 15 y 20

```
> prop.test(c(12,4),c(30,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(12, 4) out of c(30, 30)  
X-squared = 4.1761, df = 1, p-value = 0.041  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
0.01995948 0.51337385  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.4000000 0.1333333
```

Proporción de los regenerantes anormales totales obtenidos en los tratamientos: 19 y 20

```
> prop.test(c(4,4),c(30,30))  
2-sample test for equality of proportions without continuity correction  
data: c(4, 4) out of c(30, 30)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.1720275 0.1720275  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.1333333 0.1333333
```

Proporción de los regenerantes anormales totales obtenidos en los tratamientos: 7, 12, 18

```
> prop.test(c(1,1,1),c(24,30,30))
```

3-sample test for equality of proportions without continuity correction

data: c(1, 1, 1) out of c(24, 30, 30)

X-squared = 0.0346, df = 2, p-value = 0.9829

alternative hypothesis: two.sided

sample estimates:

prop 1	prop 2	prop 3
0.04166667	0.03333333	0.03333333

Proporción de los regenerantes anormales totales obtenidos en los tratamientos 13 y 14

```
> prop.test(c(3,3),c(30,30))
```

2-sample test for equality of proportions without continuity correction

data: c(3, 3) out of c(30, 30)

X-squared = 0, df = 1, p-value = 1

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.1518182 0.1518182

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.1	

Proporción de los regenerantes anormales totales obtenidos en los tratamientos 19 y 20

```
> prop.test(c(4,4),c(30,30))
```

2-sample test for equality of proportions without continuity correction

data: c(4, 4) out of c(30, 30)

X-squared = 0, df = 1, p-value = 1

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.1720275 0.1720275

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.1333333	0.1333333

9.3.5. Tratamientos de regeneración en Wagabolige

9.3.5.1. Eficiencia de regeneración

Proporción de los regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 1 y 2

```
> prop.test(c(1,2),c(108,216))  
2-sample test for equality of proportions without continuity correction  
data: c(1, 2) out of c(108, 216)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.02212330 0.02212330  
sample estimates:  
 prop 1      prop 2  
0.00925926 0.00925926
```

Proporción de los regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 2 y 3

```
> prop.test(c(2,11),c(216,682))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(2, 11) out of c(216, 682)  
X-squared = 0.1679, df = 1, p-value = 0.682  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.02580894 0.01206939  
sample estimates:  
 prop 1      prop 2  
0.00925926 0.01612903
```

Proporción de los regenerantes totales obtenidos por explante en los tratamientos: 3 y 4

```
> prop.test(c(11,0),c(682,131))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(11, 0) out of c(682, 131)  
X-squared = 1.1039, df = 1, p-value = 0.2934  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
0.002124806 0.030133259  
sample estimates:  
 prop 1      prop 2  
0.01612903 0.00000000
```

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 8, 9, 10, 11 y 12

```
> prop.test(c(0,1,1,0,1),c(30,136,136,30,136))
```

5-sample test for equality of proportions without continuity correction

data: c(0, 1, 1, 0, 1) out of c(30, 136, 136, 30, 136)

X-squared = 0.444, df = 4, p-value = 0.9787

alternative hypothesis: two.sided

sample estimates:

prop 1	prop 2	prop 3	prop 4	prop 5
0.000000000	0.007352941	0.007352941	0.000000000	0.007352941

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 17 y 18

```
> prop.test(c(1,2),c(90,90))
```

2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data: c(1, 2) out of c(90, 90)

X-squared = 0, df = 1, p-value = 1

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.05959086 0.03736864

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.011111111	0.022222222

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 17,18 y 19

```
> prop.test(c(1,2,1),c(90,90,30))
```

3-sample test for equality of proportions without continuity correction

data: c(1, 2, 1) out of c(90, 90, 30)

X-squared = 0.6796, df = 2, p-value = 0.7119

alternative hypothesis: two.sided

sample estimates:

prop 1	prop 2	prop 3
0.011111111	0.022222222	0.033333333

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 2 y 24

```
> prop.test(c(2,0),c(216,60))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(2, 0) out of c(216, 60)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.01277290 0.03129141  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.00925926 0.00000000
```

9.3.5.2. Eficiencia de regeneración de brotes normales

Comparación entre los tratamientos que regeneraron brotes normales: 1, 2, 3, 9, 10, 12, 17 y 18

```
> prop.test(c(1,2,10,1,1,1,1,1),c(108,216,682,136,136,136,90,90))  
8-sample test for equality of proportions without continuity correction  
data: c(1, 2, 10, 1, 1, 1, 1, 1) out of c(108, 216, 682, 136, 136, 136, 90, 90)  
X-squared = 1.3815, df = 7, p-value = 0.9861  
alternative hypothesis: two.sided  
sample estimates:  
prop 1 prop 2 prop 3 prop 4  
0.009259259 0.009259259 0.014662757 0.007352941  
prop 5 prop 6 prop 7 prop 8  
0.007352941 0.007352941 0.011111111 0.011111111
```

Proporción de los regenerantes normales obtenidos por explante en los tratamientos: 1 y 2

```
> prop.test(c(1,2),c(108,216))  
2-sample test for equality of proportions without continuity correction  
data: c(1, 2) out of c(108, 216)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.02212330 0.02212330  
sample estimates:  
prop 1 prop 2  
0.00925926 0.00925926
```

Proporción de los regenerantes normales obtenidos por explante en los tratamientos 2 y 3

```
> prop.test(c(2,10),c(216,682))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(2, 10) out of c(216, 682)  
X-squared = 0.069, df = 1, p-value = 0.7927  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.02408877 0.01328178  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.00925926 0.01466276
```

Proporción de los regenerantes normales obtenidos por explante en los tratamientos 3 y 4

```
> prop.test(c(10,0),c(682,131))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(10, 0) out of c(682, 131)  
X-squared = 0.9251, df = 1, p-value = 0.3361  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
0.001091794 0.028233719  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.01466276 0.00000000
```

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 9, 10 y 12

```
> prop.test(c(1,1,1),c(136,136,136))  
3-sample test for equality of proportions without continuity correction  
data: c(1, 1, 1) out of c(136, 136, 136)  
X-squared = 0, df = 2, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2    prop 3  
0.007352941 0.007352941 0.007352941
```

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 17 y 18

```
> prop.test(c(1,1),c(90,90))  
2-sample test for equality of proportions without continuity correction  
data: c(1, 1) out of c(90, 90)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.03062629 0.03062629  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.01111111 0.01111111
```

9.3.5.3. Eficiencia de regeneración de brotes anormales

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos: 3 y 18

```
> prop.test(c(1,1),c(682,90))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(1, 1) out of c(682, 90)  
X-squared = 0.3466, df = 1, p-value = 0.556  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.03777916 0.01848949  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.001466276 0.01111111
```

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos: 3 y 19

```
> prop.test(c(1,1),c(682,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(1, 1) out of c(682, 30)  
X-squared = 2.1472, df = 1, p-value = 0.1428  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.11356506 0.04983094  
sample estimates:  
  prop 1    prop 2  
0.001466276 0.03333333
```

Proporción de los regenerantes anormales obtenidos por explante en los tratamientos: 18 y 19

```
> prop.test(c(1,1),c(90,30))
```

2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data: c(1, 1) out of c(90, 30)

X-squared = 0, df = 1, p-value = 1

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.1122308 0.0677864

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.01111111	0.03333333

9.3.5.4. Rendimiento de regeneración

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 1 y 2

```
> prop.test(c(1,4),c(108,216))
```

2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data: c(1, 4) out of c(108, 216)

X-squared = 0.0254, df = 1, p-value = 0.8734

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.04168974 0.02317122

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.00925926	0.01851852

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 2 y 3

```
> prop.test(c(4,13),c(216,682))
```

2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data: c(4, 13) out of c(216, 682)

X-squared = 0, df = 1, p-value = 1

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.02178793 0.02070180

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.01851852	0.01906158

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 3 y 4

```
> prop.test(c(13,0),c(682,131))
2-sample test for equality of proportions with continuity correction
data:  c(13, 0) out of c(682, 131)
X-squared = 1.4708, df = 1, p-value = 0.2252
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
 0.004249079 0.033874088
sample estimates:
   prop 1      prop 2 
0.01906158 0.00000000
```

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 8, 9, 10, 11 y 12

```
> prop.test(c(0,1,1,0,1),c(30,136,136,30,136))
5-sample test for equality of proportions without continuity correction
data:  c(0, 1, 1, 0, 1) out of c(30, 136, 136, 30, 136)
X-squared = 0.444, df = 4, p-value = 0.9787
alternative hypothesis: two.sided
sample estimates:
   prop 1      prop 2      prop 3      prop 4      prop 5 
0.000000000 0.007352941 0.007352941 0.000000000 0.007352941
```

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 17 y 18

```
> prop.test(c(1,3),c(90,90))
2-sample test for equality of proportions with continuity correction
data:  c(1, 3) out of c(90, 90)
X-squared = 0.2557, df = 1, p-value = 0.6131
alternative hypothesis: two.sided
95 percent confidence interval:
-0.07627890 0.03183446
sample estimates:
   prop 1      prop 2 
0.01111111 0.03333333
```

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 17,18 y 19

```
> prop.test(c(1,3,1),c(90,90,30))
```

3-sample test for equality of proportions without continuity correction

data: c(1, 3, 1) out of c(90, 90, 30)

X-squared = 1.0927, df = 2, p-value = 0.5791

alternative hypothesis: two.sided

sample estimates:

prop 1	prop 2	prop 3
0.01111111	0.03333333	0.03333333

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 2 y 24

```
> prop.test(c(4,0),c(216,60))
```

2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data: c(4, 0) out of c(216, 60)

X-squared = 0.2036, df = 1, p-value = 0.6518

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

-0.01010862 0.04714566

sample estimates:

prop 1	prop 2
0.01851852	0.00000000

9.3.5.5. Rendimiento de regeneración de brotes normales

Comparación entre los tratamientos que regeneraron brotes normales: 1, 2, 3, 9, 10, 12, 17 y 18

```
> prop.test(c(1,4,12,1,1,1,1,1),c(108,216,682,136,136,136,90,90))
```

8-sample test for equality of proportions without continuity correction

data: c(1, 4, 12, 1, 1, 1, 1, 1) out of c(108, 216, 682, 136, 136, 136, 90, 90)

X-squared = 2.5802, df = 7, p-value = 0.921

alternative hypothesis: two.sided

sample estimates:

prop 1	prop 2	prop 3	prop 4
0.009259259	0.018518519	0.017595308	0.007352941
prop 5	prop 6	prop 7	prop 8
0.007352941	0.007352941	0.011111111	0.011111111

Proporción de los regenerantes normales totales obtenidos en los tratamientos: 1 y 2

```
> prop.test(c(1,4),c(108,216))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(1, 4) out of c(108, 216)  
X-squared = 0.0254, df = 1, p-value = 0.8734  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.04168974 0.02317122  
sample estimates:  
 prop 1   prop 2  
0.00925926 0.01851852
```

Proporción de los regenerantes normales totales obtenidos en los tratamientos: 2 y 3

```
> prop.test(c(4,12),c(216,682))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(4, 12) out of c(216, 682)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.02050874 0.02235516  
sample estimates:  
 prop 1   prop 2  
0.01851852 0.01759531
```

Proporción de los regenerantes normales totales obtenidos en los tratamientos: 3 y 4

```
> prop.test(c(12,0),c(682,131))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(12, 0) out of c(682, 131)  
X-squared = 1.286, df = 1, p-value = 0.2568  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
0.003178048 0.032012567  
sample estimates:  
 prop 1   prop 2  
0.01759531 0.00000000
```

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 9, 10 y 12

```
> prop.test(c(1,1,1),c(136,136,136))
```

3-sample test for equality of proportions without continuity correction

data: c(1, 1, 1) out of c(136, 136, 136)

X-squared = 0, df = 2, p-value = 1

alternative hypothesis: two.sided

sample estimates:

```
prop 1 prop 2 prop 3
0.007352941 0.007352941 0.007352941
```

Proporción de los regenerantes totales obtenidos en los tratamientos: 17 y 18

```
> prop.test(c(1,1),c(90,90))
```

2-sample test for equality of proportions without continuity correction

data: c(1, 1) out of c(90, 90)

X-squared = 0, df = 1, p-value = 1

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

```
-0.03062629 0.03062629
```

sample estimates:

```
prop 1 prop 2
0.01111111 0.01111111
```

9.3.5.6. Rendimiento de regeneración de brotes anormales

Proporción de los regenerantes anormales totales obtenidos en los tratamientos: 3 y 18

```
> prop.test(c(1,2),c(682,90))
```

2-sample test for equality of proportions with continuity correction

data: c(1, 2) out of c(682, 90)

X-squared = 4.299, df = 1, p-value = 0.03813

alternative hypothesis: two.sided

95 percent confidence interval:

```
-0.05763348 0.01612159
```

sample estimates:

```
prop 1 prop 2
0.001466276 0.022222222
```

Proporción de los regenerantes anormales totales obtenidos en los tratamientos: 3 y 19

```
> prop.test(c(1,1),c(682,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(1, 1) out of c(682, 30)  
X-squared = 2.1472, df = 1, p-value = 0.1428  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.11356506 0.04983094  
sample estimates:  
 prop 1   prop 2  
0.001466276 0.033333333
```

Proporción de los regenerantes anormales totales obtenidos en los tratamientos: 18 y 19

```
> prop.test(c(2,1),c(90,30))  
2-sample test for equality of proportions with continuity correction  
data: c(2, 1) out of c(90, 30)  
X-squared = 0, df = 1, p-value = 1  
alternative hypothesis: two.sided  
95 percent confidence interval:  
-0.09330979 0.07108756  
sample estimates:  
 prop 1   prop 2  
0.02222222 0.03333333
```

9.3.6. Comparación de los mejores tratamientos con callos con raíces en Tanzania: 11, 16, 19, 20, 24 y 25

```
> prop.test(c(152,29,12,14,14,12),c(300,60,30,60,30,30))  
6-sample test for equality of proportions without continuity correction  
data: c(152, 29, 12, 14, 14, 12) out of c(300, 60, 30, 60, 30, 30)  
X-squared = 16.0433, df = 5, p-value = 0.006721  
alternative hypothesis: two.sided  
sample estimates:  
 prop 1   prop 2   prop 3   prop 4   prop 5   prop 6  
0.5066667 0.4833333 0.4000000 0.2333333 0.4666667 0.4000000
```

9.3.7. Comparación de los mejores tratamientos con callos con raíces en Wagabolige: 8, 13 y 19

```
> prop.test(c(12,24,16),c(30,48,30))
```

```
3-sample test for equality of proportions without continuity correction
```

```
data: c(12, 24, 16) out of c(30, 48, 30)
```

```
X-squared = 1.1868, df = 2, p-value = 0.5524
```

```
alternative hypothesis: two.sided
```

```
sample estimates:
```

```
   prop 1   prop 2   prop 3  
0.4000000 0.5000000 0.5333333
```

X. APENDICES

10.1. Preparación de las soluciones Stock de Hormonas

Ácido giberélico (AG₃; 1000 mg/l)

Disolver 10 mg en etanol. Agregar agua destilada para un volumen final de 10ml.
Esterilizar por filtración y almacenar entre 2 a 8° C

Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 1000 mg/l)

Disolver 10 mg en etanol. Agregar agua destilada para un volumen final de 10ml.
Esterilizar por filtración y almacenar entre 2 a 8° C.

Ácido 4-fluorofenoxiacético (4-FA; 1000 mg/l)

Disolver 10 mg en etanol. Agregar agua destilada para un volumen final de 10ml.
Esterilizar por filtración y almacenar entre 2 a 8° C.

BAP [6-Benzilaminopurina] (BAP; 1000 mg/l)

Disolver 10 mg en KOH 1N. Agregar agua destilada para un volumen final de 10ml.
Esterilizar por filtración y almacenar entre 2 a 8° C.

Kinetina [6-furfurilaminopurina] (KIN; 2000 mg/l)

Disolver 20 mg en NaOH 1N. Agregar agua destilada para un volumen final de 10ml.
Esterilizar por filtración y almacenar entre 0 y -20° C.

Zeatina ribosida [Zeatina-(trans) ribosida] (ZEA; 1000 mg/l)

Disolver 10 mg en NaOH 1N. Agregar agua destilada para un volumen final de 10ml.
Esterilizar por filtración y almacenar entre 0 y -20° C.

Thidiazuron [1-Phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5yl)urea] (TDZ; 1000 mg/l)

Disolver 10 mg en DMSO hasta alcanzar un volumen final de 10ml. Esterilizar por filtración y almacenar a 2-8° C.

10.2. Compuestos nitrogenados presentes en el AC de Puerto Rico y Filipinas, y su contenido en terminos de μg de aminoácidos y de N por mililitro de agua entera*

Compuestos nitrogenados	Contenido de aminoácidos y N $9\mu\text{g}/\text{ml}$ de muestra)			
	AC de Puerto Rico		AC de Filipinas	
	Aminoácido	N	Aminoácido	N
Acido aspártico	76	0.8	16	1.68
Acido glutámico	327	3.11	112	10.7
Serina	65	8.7	7	0.93
Glicina	22	4.09	2	1.37
Treonina	200	23.52	81	9.53
Alanina	468	73.8	183	28.8
Histidina	25	6.77	trazas	-
Lisina	72	13.8	16	3.07
Arginina	77	24.8	ausente	-
Metionina	18	1.69	5	0.47
Prolina	100	12.17	45	5.48
Valina	41	4.9	89	10.6
Isoleucina	30	3.2	1	0.11
Leucina	30	3.2	4	0.43
Fenilalanina	7	0.59	trazas	-
Tirosina	13	1	2	0.16
Acido aminobutirico	muy alto	-	muy alto	-
Urea (?)	presente	-	presente	-
Desconocido (139ml pico de elución)	alto	-	alto	-
Desconocido (646ml pico de elución)	(?)	-	?	-
Dihidroxifenilalanina (562ml pico de elución)	ausente	-	presente	-
Ornitina (?)	99	21	22	4.68
Amoníaco	presente	-	presente	-
Etanolamina (?)	2	0.46	1	0.23
Total	1672	207.6	586	77.21

* Todas las determinaciones se hicieron en el analizador automático de aminoácidos Spinco. Régimen de análisis de columna larga: pH 3.25 ± 0.01 (Concentración de Citrato de Sodio 0.20N) y pH 4.25 ± 0.02 (Concentración de Citrato de sodio 0.20N); cambio de temperatura (30-50 °C cambio de amortiguación) a las 13 horas y 20 minutos. Régimen de la columna del medio: pH 4.26 ± 0.02 (Concentración de Citrato de sodio 0.38N); cambio de temperatura (30-50 °C) a las 11 horas y 20 minutos.

Fuente: Roca (1991)