

# LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Ipomoea*: UNA POSIBILIDAD PARA LA MULTIPLICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS VEGETALES

*Orlando S. González Paneque, Juan J. Silva Pupo, Ángel Espinosa Reyes, Carlos Ros Araluce, Leonardo Acosta Pompa, Silvio Meneses Rodríguez, María M. Hernández Espinosa*

CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL  
UNIVERSIDAD DE GRANMA  
GRANMA (CUBA)

## INTRODUCCIÓN

El cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) ofrece diversas ventajas económicas para muchos países, ya que se puede emplear en la alimentación humana y animal, así como en la industria (López *et al.*, 1995).

El aprovechamiento racional y conservacionista de los ecosistemas y las especies vegetales constituye uno de los retos más importantes de la sociedad moderna. Las tendencias mundiales abren un espacio cada vez mayor al cuidado de la biodiversidad mientras que el crecimiento urbano, la agricultura intensiva y el desarrollo industrial han puesto totalmente en riesgo la supervivencia de especies de las

que depende el futuro de la agricultura. Durante los últimos decenios se han desarrollado los métodos de cultivo de tejidos vegetales, lo que ha permitido un rápido avance en este sentido (CICY, 1990).

Las técnicas de cultivo aséptico han contribuido a elevar la productividad y se justifica su inclusión en programas agrícolas (Villegas *et al.*, 1990). Desde el punto de vista de la propagación, la embriogénesis somática es el sistema más eficiente, si se considera el número de plantas regeneradas por unidad de tiempo, la reducción de los costos de labor (Cantliffe *et al.*, 1988) y su aplicación en el desarrollo de la semilla artificial (Redenbaugh *et al.*, 1988 y Redenbaugh, 1990). Teniendo en consideración que, el cultivo del boniato constituye uno de



los de mayor extensión a escala mundial, se hace necesario conocer la embriogénesis somática como una posibilidad para la multiplicación y conservación de los recursos vegetales.

## DESARROLLO, ORIGEN, CARACTERÍSTICAS E IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL BONIATO

Se considera oriundo del continente americano (México y Centroamérica), en virtud de la división del material genético y por la evidencia arqueológica de la antigüedad de su cultivo. Aunque otras hipótesis plantean su origen en Asia, fundamentalmente en China (Montaldo, 1972; Jones *et al.*, 1986), en la actualidad se acepta que es originario de América porque se producen variedades con un alto potencial de rendimiento y el desarrollo vegetativo alcanzado es superior, favoreciendo la floración y la fructificación (Andrey *et al.*, 1994).

Es una planta anual, herbácea, rastrera, glabra o pubescente, con raíces adventicias y tuberosas (Scott, 1992). Se propaga vegetativamente por segmentos de tallos y raramente por las raíces tuberosas y semillas (Scaramuzzi, 1986; Jarret, 1993). Se destaca por su alta productividad por unidad de área y tiempo (FAO, 1979; Yen, 1982; Howard y Holloway, 1988; Trognitz *et al.*, 1995). Según Wambugu (1995) es un cultivo rico en vitaminas y minerales y en Cuba constituye uno de los más importantes en la alimentación de la población (Cuba. Minagri, 1998). Según Mortley (1993) no se conocen efectos de toxicidad.

## PRINCIPALES RESULTADOS OBTENIDOS EN CUBA

La indudable importancia económica y social, e incluso el valor estratégico de los sectores agroalimentarios y medio ambiental, justifican la creciente evolución que se ha producido y se produce en la obtención de nuevas variedades a escala mundial. En nuestro país, la variabilidad de las especies se enriqueció a partir del empleo de los clones existentes mediante los programas de mejoramiento genético. En los últimos años se han introducido en la producción agrícola nacional, mediante el

empleo de métodos tradicionales de mejora, un grupo de clones comerciales de elevado potencial de rendimiento.

En los trabajos de hibridación realizados en el INIVIT por Rodríguez Nodal (1972), citado por López *et al.* (1995), se obtuvo el primer clon precoz cubano de boniato y a partir de entonces se continúan los trabajos de selección y evaluación de clones cubanos, siendo necesario en la actualidad emplear las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para contar con un método rápido y eficiente que permita seleccionar nuevos clones y ser introducidos en la producción. En este sentido se llevan a cabo trabajos en el INIVIT y en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Granma, ubicada en el oriente cubano.

## ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS “IN VITRO”

El cultivo de tejidos vegetales “*in vitro*” consiste en cultivar pequeños segmentos de la planta (explantos) sobre medios sintéticos en condiciones controladas, con el propósito de regenerar plantas enteras. Para el cultivo de material vegetal separado de la planta es necesario adicionar al medio los nutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento que las células, tejidos u órganos recibirían a través de las raíces o de los órganos fotosintetizadores de la planta (López, 1990).

Los cultivos “*in vitro*” pueden iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta. Sin embargo, la fuente inicial de material vegetal es determinante para el éxito en el establecimiento de los mismos y se aconseja utilizar plantas sanas y vigorosas (Jiménez, 1998a). En general, el cultivo “*in vitro*” resuelve una serie de problemas que serían difíciles por la vía tradicional (Mkumbira, 1995) y esta técnica ha trascendido con éxito de los ámbitos experimentales a la aplicación práctica.

## SELECCIÓN DE LAS PLANTAS DONANTES

La iniciación de un proceso “*in vitro*” sólo tiene sentido cuando se emplea un material de partida adecuado. Por tanto, uno de los cuidados especiales que se deben de tener al iniciar el proceso es la selección del material

de partida; debiendo asegurarse que el mismo provenga de una correcta selección individual. El material inicial es una planta élite seleccionada por sus características fenotípicas especiales, que corresponden con el clon o variedad a propagar. A tales efectos, se establecen bancos donantes con individuos bien caracterizados mediante clasificadores morfológicos y marcadores bioquímicos o moleculares (Jiménez, 1998).

El estado fisiológico de la planta donante es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos provienen de plantas con diferentes edades fisiológicas. Generalmente, se utilizan plantas en estado de crecimiento activo que muestran un desarrollo vigoroso y sano.

## DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La contaminación por microorganismos provoca cuantiosas pérdidas en la propagación masiva de plantas y hace ineficientes económicamente muchos procesos. Existen vías para prever y controlar la contaminación, pero es necesario conocer los microorganismos y las fuentes que los introducen. Las plantas, normalmente, se encuentran contaminadas por microorganismos que no son patógenos bajo condiciones normales. Sin embargo, cuando el tejido o el órgano se cultiva *“in vitro”*, el crecimiento de los microorganismos limita el desarrollo de las células (Villegas *et al.*, 1990).

Existen evidencias que indican que se dan diferentes respuestas entre especies, órganos o tejidos y aún dentro de una misma parte de la planta (Villegas, 1990). Por otro lado, la época del año en que se colecta el material juega un papel importante en la desinfección de los mismos. Para la desinfección se utiliza hipoclorito de calcio o sodio, peróxido de hidrógeno, agua de bromo, nitrato de plata y dicloruro de mercurio. Otro método frecuentemente empleado es el lavado con alcohol al 70% y luego colocarlos en el desinfectante (Navarro y Perea, 1996).

## MEDIOS DE CULTIVO

El éxito del cultivo de tejidos está muy influenciado por la composición química del me-

dio, el cual contiene macronutrientes (sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo y otros); micronutrientes (manganeso, cobalto y otros); carbohidratos (usualmente sacarosa) y vitaminas. Se sabe también que se obtienen mejores resultados al incluir compuestos orgánicos en pequeñas cantidades, como aminoácidos y reguladores del crecimiento. El agua constituye otro elemento presente en los medios de cultivo y si falta alguno de estos componentes, lo normal es que no se produzca crecimiento y desarrollo y el tejido u órgano aislado muera.

Para establecer un sistema de cultivo de tejidos se elabora un medio que se ajuste a los principios requeridos nutricionalmente por la especie vegetal, tipo de explante y sistema de cultivo (Szabados *et al.*, 1993). En los diferentes cultivos agrícolas se manifiesta particular exigencia por la composición del medio de cultivo y en el boniato se han probado diferentes hormonas del crecimiento y las respuestas encontradas han sido diferentes en cuanto al comportamiento en la inducción de callos y la regeneración de plantas a partir de los mismos.

## CONDICIONES DE INCUBACIÓN

En contraste con la cantidad de información que se ha divulgado sobre la optimización de los medios de cultivo y sustancias de crecimiento, poca atención se ha dedicado a los parámetros físicos que influyen en el crecimiento y el desarrollo *“in vitro”* (Litz y Jarret, 1993). El área de incubación o crecimiento *“in vitro”* debe proporcionar un buen control de la temperatura (20-28°C), la iluminación (1000 a 5000 lx) y la humedad relativa (70-80%). Según Mroginski y Roca (1993) los factores físicos juegan un papel determinante y es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados de luz, temperatura y humedad relativa.

## CALOGÉNESIS. INICIACIÓN Y MANTENIMIENTO

Utilizando las técnicas *“in vitro”*, la formación de callos puede ser incluida en muchos tejidos vegetales y órganos en los que normalmente no era costumbre observar callos aún con lesión (Street, 1979). La más importante característica de los callos, desde



el punto de vista funcional, es su crecimiento para formar raíces, tallos y embriones capaces de regenerar plantas completas. El gran problema en el uso del callo es la inestabilidad genética que da como resultado variaciones fenotípicas en las células. Los cambios fenotípicos pudieran atribuirse a una base genética o epigenética (Binns, 1981; citado por Dodds, 1985).

Después del crecimiento del callo, se hace necesario subcultivarlo en un medio de cultivo fresco ya que el crecimiento en el mismo medio puede ocasionar que se agoten algunos elementos nutritivos. El callo embriogénico puede ser identificado fácilmente por sus características morfológicas y citológicas: éste es de apariencia compacta, superficie nodular, de color blanco amarillo pálido y con cierto aspecto organizado (Vasil y Vasil, 1984). El mismo se encuentra rodeado frecuentemente por un callo no embriogénico de apariencia suave, friable y semitraslúcido. En muchos casos se observan porciones de callos embriogénicos distribuidos al azar en la superficie del callo no embriogénico.

El callo embriogénico crece de forma más lenta que el callo no embriogénico, pero puede ser mantenido en cultivo por largos períodos de tiempo mediante la selección cuidadosa y el subcultivo de los sectores embriogénicos.

## MORFOGÉNESIS. ORGANOGÉNESIS Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La morfogénesis conduce a: la embriogénesis somática y la organogénesis (Zapata, 1994) y es el resultado de una organizada división y diferenciación celular con patrones definidos y que dependen básicamente de la actividad y expresión de ciertos genes (Santana, 1993). Cuando se realiza el cultivo de tejidos, el control de la morfogénesis se realiza a través de la incorporación exógena de compuestos hormonales y otros elementos nutricionales. Al ser colocado un fragmento de tejido en un medio de cultivo posibilita la liberación de las células del control a que están sometidas en el organismo vivo y se readquiere la capacidad de división celular.

Es factible obtener embriones somáticos de células cultivadas, los cuales no están rodeados por tejidos maternos y pueden ser propagados en gran

número. Por consiguiente, el uso de embriones somáticos facilita el estudio de la embriogénesis, la propagación a gran escala y más recientemente, la transformación genética de los cultivos (Parrot, 2002).

Se ha obtenido la embriogénesis somática en más de 130 especies de plantas. Sin embargo, todavía quedan varias especies para las cuales nunca se ha reportado. Aun para aquellas especies en las cuales es posible la embriogénesis somática, los embriones generalmente sólo se pueden obtener de ciertos tejidos en etapas de desarrollo o de ciertos genotipos dentro de la especie. La embriogénesis somática puede producir un número ilimitado de propágulos con la capacidad de germinar y producir plantas completas sin necesidad de etapas adicionales para el enraizamiento. Esta tecnología puede ser útil para la propagación de genotipos élite que no se pueden producir por semilla botánica.

## LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN LA MULTIPLICACIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES

Como embriones somáticos o adventicios se han definido a los originados a partir de células, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1980; citado por Litz y Jarret, 1993). Son estructuras bipolares con un eje radical-apical y la capacidad de crecer y formar plantas normales.

Los primeros trabajos sobre el cultivo y desarrollo de embriones somáticos fueron reportados a partir de callos de raíces de zanahoria y desde entonces se han incrementado considerablemente los estudios sobre todos los sucesos que encierran la embriogénesis somática. El embrión somático es producido por cualquier órgano o tejido de la planta, tanto vegetativo como reproductivo, siendo capaz de dar una planta completa mediante el crecimiento simultáneo de brotes y raíces, y este fenómeno no es observado cuando las plántulas se forman por la vía organogénica, donde el crecimiento de brotes y raíces se excluye entre sí (Darias, 1993).

La embriogénesis somática es sin duda el medio más poderoso de micropropagación y explota una de las totipotencialidades de las células vegetales que es la de generar embriones idénticos a los embrio-

nes cigóticos sin pasar por la fecundación (Zapata, 1994). Morfológicamente, un embrión somático es muy similar a uno cigótico, sobre todo en su desarrollo evolutivo desde proembrión hasta la fase cotiledonar o embrión maduro (Darias, 1993). El tamaño y forma de los embriones somáticos es muy variable en dependencia de la especie y se pueden formar de las más variadas formas y tamaños.

La embriogénesis somática es una alternativa dentro de los métodos de propagación debido a su alto índice de multiplicación, y es considerada una eficiente forma de multiplicación clonal, aunque con algunos inconvenientes: la callosidad implícita en el proceso y la falta de sincronización en la diferenciación y madurez de los embriones. El uso de la embriogénesis somática para la propagación seguirá aumentando según haya protocolos más avanzados y refinados capaces de producir embriones morfológicamente normales, sin variación somaclonal y con capacidad para germinar y convertirse en plantas.

## EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL BONIATO

El uso de la embriogénesis somática como un método de regeneración de plantas puede facilitar el desarrollo de técnicas mecánicas que permitirían la siembra directa de este cultivo a diferencia de la propagación vegetativa convencional (Cantliffe *et al.*, 1988; Shultheis *et al.*, 1990; Harrel *et al.*, 1992; Desamero *et al.*, 1994; Bieniek *et al.*, 1995). Según Chée *et al.* (1992), la embriogénesis somática en el boniato ofrece una oportunidad para la integración y automatización de la multiplicación clonal rápida y la siembra. Ha sido reportada a partir de explantes de anteras (Tsai y Tseng, 1979), ápices de renuevo (Jarret *et al.* 1984; Liu y Cantliffe, 1984), hojas, peciolo, tallos y raíces (Liu y Cantliffe, 1984a).

## CONVERSIÓN EN PLANTAS

Los embriones se trasplantan a un medio de germinación hasta convertirse en plántulas, momento en que se consideran aptas para trasplantarlas de condiciones ambientales controladas en la fase de aclimatación a condiciones naturales (Atree *et al.*,

1991; citados por Pilgrim, 2000). Según Hamidah *et al.* (1995) la germinación se refiere al desarrollo de la raíz y/o el brote mientras que la conversión es la supervivencia y desarrollo en condiciones ambientales “*ex vitro*” o en suelo. La regeneración de plantas directamente de los explantes o a partir de callos y de embriones somáticos se ha utilizado como una alternativa en los métodos de propagación. Sin embargo, su aplicación ha sido limitada a causa de la poca estabilidad genética de los cultivos de callos. Varios autores al pasar embriones directamente de las condiciones de maduración a germinación han alcanzado pobres resultados y esto sugiere del empleo de tratamientos postmaduración para mejorar la germinación de los embriones somáticos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andrey, H., M. Ensminger, J. Konlande y J. Robson. (1994). Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). En: Foods & Nutrition Encyclopedia. 2<sup>nd</sup> Edition. Vol. 2. I-Z. CRC: 2087-2090.
- Bieniek, M., R.C. Harrel y D. Cantliffe. (1995). Enhancement of somatic embryogenesis of *Ipomoea batatas* in solid cultures and production of mature somatic embryos in liquid cultures for application to a bioreactor production system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41: 1-8.
- Cantliffe, D., J.R. Liu y J.R. Schultheis. (1988). Development of artificial seeds of sweet potato for clonal propagation through somatic embryogenesis. En: Methane from biomass a systems approach. Smith W. y J. Frank (Eds.). Elsevier, New York: 183-195.
- CICY. (1990). Limpieza del material para la plantación. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). México. 21 p.
- Cuba. Minagri. (1988). Instructivo técnico del cultivo del boniato. CIDA. La Habana. 5 p.
- Chée, R.P., J.R. Schulthesis y D.J. Cantliffe. (1992). Micropropagation of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *High-Tech and Micropropagation III*. FL. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 19: 107-117.
- Darias, R. (1993). Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos. En: Recopilación de temas





- sobre técnicas del cultivo “*in vitro*”. Oruro. Universidad técnica de Oruro. p. 115.
- Desamero, N., B. Rodees, D. Decoteau y W. Bridges. (1994). Picolinic acid induced direct somatic embryogenesis in sweet potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37: 103-111.
- Dodds, J.H. (1985). *Experiments in Plant Tissue Culture*. 2<sup>de</sup> Edition. New York. 232 p.
- FAO. (1979). Raíces y Tubérculos. Serie: Mejores cultivos. Editorial Española. 60 p.
- Hamidah, M., P. Debergh y Abdulkarim. (1995). Somatic embryogenesis in *Anturium*. En: IX Forum for Applied Biotechnology of Belgique. 60 (4): 1671-1673.
- Harrel, C., M. Bieniek y D. Cantliffe. (1992). Noninvasive evaluation of somatic embryogenesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 39: 378-383.
- Howard, B.J. y W. Holloway. (1988). *Chemistry of Tropical crops: significance for nutrition and agriculture in the pacific*. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR). Camberra. 201 p.
- Jarret, R.L., S. Salazar y R. Fernandez. (1984). Somatic Embryogenesis in Sweet Potato. *HortScience*, 19 (3): 397-398.
- Jarret, R.L. (1993). Cultivo de tejidos de Camote. En: W. Roca y L.A. Mroginski (Eds). *Cultivo de Tejidos Vegetales en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Cap. 18. Parte B. CIAT. Colombia: 421-446.
- Jiménez, G.E. (1998). Cultivo de Ápices y Meristemas. En: J. Pérez Ponce (Ed). *Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología*. Cap. 3. Vol. 1. IBP, Santa Clara. La Habana: 45-56.
- Jiménez, G.E. (1998a). Generalidades del Cultivo *in vitro*. En: J. Pérez Ponce (Ed). *Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología*. Cap.1.Vol.1. IBP,Santa Clara: 13-24.
- Jones, A., P. Dukes y J. Schalk. (1986). Sweet potato breeding. En: M. J. Basseett (Ed). *Breeding vegetable crops*. AVI Publ. Westport. C.T. E.V.: 1-35.
- Litz, R.E. y R.L. Jarret. (1993). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis. En: W. Roca y L.A. Mroginski (Eds). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Cap. 7. CIAT. Colombia: 143-172.
- Liu, J.R. y D. Cantliffe. (1984). Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of Sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.) *HortScience*, 19: 589.
- Liu, J.R. y D. Cantliffe. (1984a). Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). *Plan Cell Reports*, 3: 112-115.
- López, P.Cr. (1990). Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos. En: V.M. Villalobos (Ed). *Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales*. FAO (105): 15-19.
- López, Z.M., E. Vázquez y R. López. (1995). Raíces y Tubérculos. Editorial Pueblo y Educación. La Habana: 163-225.
- Mkumbira, J. (1995). The benefits of Applying tissue culture based crop. *Roots. Sarnnet/ Earnnet*. 2(1): 7-9.
- Montaldo, C. (1972). *Manual del cultivo de la Batata*. CIP. Perú: 16-18.
- Mortley, D.G. (1993). Manganese toxicity and tolerance in Sweet potato. *Hort Sciences Soil Nutrition and Fertilizer*, 28(8): 812-813.
- Mroginski, L.A. y W.M. Roca. (1993). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: W. Roca y L.A. Mroginski (Eds). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Cap. 2. CIAT. Colombia: 19-40.
- Navarro, W. y M. Perea. (1996). *Técnicas in vitro para la producción y mejoramiento de las plantas*. EUNA. Editorial Universidad Nacional de Costa Rica: 15-42.
- Parrot, W. (2002). La embriogénesis somática en las angiospermas. Conferencia. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Libro Resúmenes. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara: 7-17.
- Pilgrim, D.M. (2000). Propagación “*in vitro*” de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Tesis de Doctor en Ciencias. La Habana. 120 p.
- Redenbaugh, K. (1990). Application of Artificial Seed to Tropical Crops. *HortScience*, 25(3): 251-255.
- Redenbaugh, K., J.A. Fujii y D. Slade. (1988). Encapsulated Plant Embryos. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Bajaj S. (Ed.): 251-255.
- Santana, B.N. (1993). Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea sp.*). Tesis de Grado

- (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 155 p.
- Scaramuzzi, F. (1986). Sweet Potato (*Ipomoea batata* Poir.). Crops I. En: Biotechnology in Agriculture and Forestry, 2: 455-461.
- Scott, G.J. (1992). Transformación de los cultivos alimenticios tradicionales: desarrollo de productos a base de raíces y tubérculos. En: Desarrollo de productos de raíces y tubérculos. Volumen II-América Latina. CIP. ICTA: 3-22.
- Shultheis, J.R., D. Cantliffe y R. Chee. (1990). Optimizing sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) root and plantlet formation by selection of proper embryo developmental stage and size, and gel type for fluidized sowing. Plant Cell Reports 9: 356-359.
- Street, H.E. (1979). Embryogenesis and chemically induced organogenesis. En: Plant Tissue and Cell Culture. Principals applications. Columbus University: 127-153.
- Szabados, L., L.A. Mroginski y W.M. Roca. (1993). Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. En: W. Roca y L.A. Mroginski (Eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Cap. 8. CIAT. Colombia: 174-210.
- Tsai, S. y M. Tseng. (1979). Embryos formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. Bot. Bul. Acad. Sinica, 20: 117-122.
- Trognitz, B., G. Forbes y B. Hardy. (1995). La Batata sale del frío en Mongolia. Circular CIP. Vol. 21. No. 1. Abril. P. 9.
- Vasil, V. y I. Vasil. (1984). Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of gramineae. En: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. I. Vasil (Ed.). Academic Press Inc. New York. 1: 36-41.
- Villegas, L., M. Santana y V. Cherubini. (1990). Uso de plantas producidas *in vitro* para la producción de cultivos. En: Mejoramiento de cultivos a partir de material *in vitro*. Corporación Andina de Fomento (CAF). Programa Andino de Biotecnología de la CAF. Cap. 1: 25-45.
- Villegas, M.A. (1990). Métodos asépticos. En: V.M. Villalobos (Ed.). Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO (105): 21-23.
- Wambugu, F. (1995). Control of Africa Sweet Potato virus diseases through biotechnology and technology transfer. En: J. Komen; J. Cohen and Z. Ofir (Eds). Turninig Priorities into Feasible Programs. Agricultural Biotechnology Policy Seminars, 2: 75-76.
- Yen, D.E. (1982). Sweet Potato in Historical Perspective. En: R. Villarreal and T. Griggs (Eds). Sweet Potato. Proceedings of the first International Symposium. Asian Vegetable Research & Development Center. Taiwan: 17-30.
- Zapata, F.B. (1994). Estudio morfohistológico y bioquímico de la embriogénesis somática en *Coffea canephora* var. Robusta. Trabajo de Diploma. UNAH. La Habana. 48 p.