

**Almidones usados como agentes gelificantes
en reemplazo de Phytigel[®] en medios de
cultivo para tejidos vegetales**

Franz Richelieu Grandes Navarro

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Almidones usados como agentes gelificantes en reemplazo de Phytigel[®] en medios de cultivo para tejidos vegetales

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Franz Richelieu Grandes Navarro

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Almidones usados como agentes gelificantes en reemplazo de Phytigel® en medios de cultivo para tejidos vegetales

Franz Richelieu Grandes Navarro

Resumen. Una gran cantidad de cultivos de alto valor comercial son reproducidos por micropropagación. Es importante la búsqueda de alternativas para reducir costos en reactivos para la producción de plantas *in vitro* como compuestos que puedan sustituir a los gelificantes. Existen gelificantes usados como Agar, Agarosa, Carregina, Alginato, Phytigel® y Gelrite® que pueden ser reemplazados por gomas y almidones. Los almidones tienen un menor costo y son accesibles por la disponibilidad en mercados locales. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de almidones como reemplazo parcial de Phytigel® en la multiplicación *in vitro* de yuca y camote. En el cultivo de camote se evaluaron los almidones de yuca, maíz y arroz en cantidades de 100, 90 y 80 g/L mezclados con 0.5 g/L de Phytigel®. Para el cultivo de yuca se evaluaron almidones de yuca (100 g/L) y maíz (90 g/L) + Phytigel® (0.5 g/L). Los tratamientos se compararon con 1.8 g/L de Phytigel® (testigo). Se evaluó el número de meristemos por plántula a los días 7, 14 y 21 y sobrevivencia al día 21. El número de meristemos más alto en los dos cultivos se observó en el medio solidificado con almidón de yuca, dando resultados similares al testigo. El almidón de yuca tiene menor porcentaje de amilosa, por lo tanto permite una mayor difusión de los nutrientes para la planta. Los almidones de yuca y maíz permiten reducir la cantidad de Phytigel® a 0.5 g/L es decir el 72%.

Palabras clave: Almidón de arroz, almidón de maíz, almidón de yuca, gelatinización, efecto en pH, Phytigel®.

Abstract. A large amount of high commercial value crops are reproduced by micropropagation. It's important to search for alternatives to reduce reagent's costs for *in vitro* plants production in compounds that can replace gelling agents. Some gelling agents are Agar, Agarose, Alginate, Phytigel® and Gelrite® which can be replaced by gums and starches. Starches have lower costs and are accessible because of their availability in local markets. The objective of this study was to evaluate the effect of starches as partial replacement of Phytigel® in the *in vitro* multiplication of yucca and sweet potato. In the sweet potato crop, the yucca, maize and rice starches were evaluated in 100, 90 and 80 g/L quantities mixed with 0.5 g/L of Phytigel®. For yucca crop, both, yucca and maize starches used the same amounts of starch and Phytigel® like in cassava crop. The treatments were compared with a medium with 1.8 g/L of Phytigel®. The number of meristems per explant and survival explants were evaluated. The highest meristem number in both crops was observed in the solidified medium with cassava starch, giving similar results to the control. This starch is the one with the least amylose percentage, thus allowing a greater diffusion nutrients towards the plant. Yucca and maize starches allow to reduce the amount of Phytigel® to 0.5 g/L or 72%.

Key words: Gelatinization, maize starch, pH effect, Phytigel®, rice starch, yucca starch.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4. CONCLUSIONES.....	14
5. RECOMENDACIONES.....	15
6. LITERATURA CITADA.....	16

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para multiplicación <i>in vitro</i> de camote (<i>Ipomoea batatas</i> L.).....	5
2. Medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para multiplicación <i>in vitro</i> de yuca (<i>Manihot esculenta</i>)	7
3. Tratamientos gelificantes en combinaciones de almidón más 0.5 g/L de Phytigel [®] , para multiplicación <i>in vitro</i> de camote y contenido de amilosa de cada almidón ..	8
4. Tratamientos gelificantes en combinaciones de almidón más 0.5 g/L de Phytigel [®] , para multiplicación <i>in vitro</i> de yuca y contenido de amilosa de cada almidón	8
5. Meristemas en <i>in vitro</i> -plantas de camote, en etapa de multiplicación subcultivo tres, usando almidones y Phytigel [®] como agentes gelificantes.....	10
6. Meristemas en <i>in vitro</i> -plantas de camote en etapa de multiplicación subcultivo cuatro usando almidones y Phytigel [®] como agentes gelificantes	11
7. Meristemas en <i>in vitro</i> -plantas de yuca, en etapa de multiplicación subcultivo dos, usando almidones y Phytigel [®] como agentes gelificantes.....	12
8. Meristemas en <i>in vitro</i> -plantas de yuca, en etapa de multiplicación subcultivo tres, usando almidones y Phytigel [®] como agentes gelificantes.....	13

Figuras	Página
1. Multiplicación <i>in vitro</i> de camote -variedad Bush Bock-	4
2. Multiplicación <i>in vitro</i> de yuca -variedad Valencia-	6

1. INTRODUCCIÓN

Año tras año la tecnología avanza en las diferentes ramas de la ciencia. Lo mismo sucede en el campo agrícola, la tecnología progresa con el fin de ayudar a la gente a ser más productiva y eficiente, por ejemplo, en el ámbito de la biotecnología específicamente en el cultivo de tejidos vegetales. A esta rama se puede definir como un grupo de diversas técnicas en las cuales usan explantes, partes de una planta (tejidos, hojas, órganos, células), que se cultivan en un medio que contiene ingredientes químicos y se controla las condiciones ambientales para obtener plantas libres de virus (Bhojwani y Dantu 2013).

Una gran cantidad de cultivos de alto valor comercial como ornamentales, frutales y agronómicos son reproducidos por micropropagación. Pero el problema se encuentra en que este tipo de propagación tiene un costo mayor que la propagación convencional de plantas, ya que la micropropagación es una operación de capital intensivo (Bhojwani y Dantu 2013). Por lo que es importante la búsqueda de alternativas para reducir costos en los materiales que se usan para la producción de plantas *in vitro*, por ejemplo, un compuesto que pueda sustituir a los gelificantes para reducir los costos de producción de las plántulas y que de esta manera sean más accesibles.

Uno de los aspectos más importantes que se debe tomar en cuenta al realizar un medio de cultivo es elegir el componente gelificante a usar ya que estos son de los componentes más costosos. Existen distintos gelificantes usados para medios *in vitro* tales como Agar, Agarosa, Carregina, Alginato, Phytigel® y Gelrite® (Herrera et al. 2013). Estos gelificantes pueden ser reemplazados parcialmente por almidones.

Los gelificantes deben tener algunas propiedades deseables para uso en medios de cultivo. Entre estos se encuentran que deben ser inertes para no afectar el desarrollo de los explantes, soportar la esterilización por el autoclave, debe ser líquido cuando el medio de cultivo este caliente para poder dispensar en los recipientes (Bhojwani y Dantu 2013). Además no debe reaccionar con los compuestos del medio y debe solidificar el medio de cultivo a temperatura ambiente (Sharry et al. 2015).

Investigaciones indican que sí existen compuestos que pueden sustituir el gelificante para la producción de plántulas *in vitro*. Algunos ejemplos de las sustancias que se han usado como sustitutos son los almidones de yuca, maíz, papa, arroz y falso banano (*Ensete ventricosum*) (Martín et al. 2012). Igualmente se ha usado harina y sémola de papa (Sharifi et al. 2010), almidón de papa y maíz (Martín et al. 2013) (Mohamed et al. 2009), harina de sagú (*Metroxylon sagu*) (Rodríguez y Hechevarría 2006) y almidón modificado de yuca (Rueda et al. 2006).

Existen artículos e investigaciones que obtuvieron buenos resultados al usar almidones y algunas gomas como agentes gelificantes alternativos. Los almidones en comparación al agar, tienen un menor costo y son accesibles debido a la disponibilidad local. El implemento de estos materiales en cultivo de tejido vegetal, puede tener una reducción de un 70% en los costos de producción por lo tanto se pueden reducir los precios en las plántulas producidas (Martín et al. 2012).

El almidón modificado de yuca (AIM TF-351) es uno de los componentes el cual tiene un costo aproximado de \$ 0.15/L de medio de cultivo comparado con el gelificante Phytigel® con un costo de \$ 1.17/L. En una relación entre los dos costos es casi ocho veces más que el almidón. De acuerdo a los resultados investigadores concluyen que el almidón modificado de la yuca puede servir como una alternativa para reducir costos (Rueda et al. 2006).

Los almidones están compuestos por amilosa y amilopectina. Estos homoglicanos están conformados solo por enlaces α -D-glucosa. La amilosa es un polímero lineal de glucosa enlazado con α -1,4 y la amilopectina está unida por enlaces α -1,6-ramificado de oligómeros de glucosa lineal la cuales están enlazadas con α -1,4 y / o polímeros. Cuando un almidón se encuentra mezclado con agua y se aplica calor, los enlaces intermoleculares se rompen. Esto permite que los sitios que están enlazados con hidrógeno, hidroxilo, hidrógeno y oxígeno, se puedan unir con el agua (Yamamoto y Buckow 2016).

Los almidones pueden variar su temperatura de gelatinización según del cultivo que provengan. El almidón de maíz contiene un 25% de amilosa y su temperatura de gelatinización es de 62-72°C y el de arroz que tiene un 22% de amilosa tiene un rango de 68-78°C (Joly y Anderstein 2009). El almidón de yuca llega a tener la temperatura de gelatinización a los 65.2°C con 17% de amilosa (Hernández et al. 2008). Una vez que los almidones alcanzan su temperatura de gelatinización el proceso es irreversible, además al dejar los almidones gelificados en un tiempo prolongado mantienen sus características. Un incremento en la presión o temperatura causa que el tiempo para gelatinización sea más rápido (Baks et al. 2007).

Las moléculas de amilopectina del gránulo de almidón son parcialmente cristalinas. A temperatura ambiente estos polímeros son vítreos en condiciones secas. Los cambios que son irreversibles ocurren al momento de la gelatinización. Esto se debe a la mezcla de almidón con agua y altas temperaturas arriba de la temperatura crítica que depende de cada almidón. Unas de las características que se pierden al momento de la gelatinización son la birrefringencia (que produce doble refracción de un rayo luminoso) (RAE 2017) y la cristalinidad. Además, una vez realizado este proceso el resultado se considera como un material de gránulos hinchados dispersados en la matriz del biopolímero (Anandha Rao 2014).

El objetivo del estudio fue:

- Evaluar el efecto de reemplazar parcialmente Phytigel® por almidones en el medio de cultivo utilizado para la multiplicación *in vitro* de camote y yuca.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio.

El estudio se realizó dentro del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales perteneciente al Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

Preparación de los medios de cultivo.

Se utilizaron los cultivos de camote y yuca. Para la siembra de los dos cultivos se usó el medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS) modificado. En el cultivo de camote se usó el medio modificado por Jarret (1991) (Cuadro 1) y para yuca el medio modificado por Roca et al. (1991) (Cuadro 2).

Los medios de cultivo se prepararon siguiendo el procedimiento general el cual indica agregar los compuestos inorgánicos y luego los orgánicos, después de aforar al volumen necesario se ajustó el pH a 5.8 usando KOH o HCL. Posteriormente se agregó una dosis de Phytigel[®] menor a la normal mezclada con una cantidad de almidón para cada cultivo según el tratamiento a evaluar.

Para el testigo se usó la dosis estándar de Phytigel[®] 1.8 g/L. Se calentó cada medio en microondas para disolver el Phytigel[®]. Una vez dispensado el medio en frascos o tubos de acuerdo al cultivo, se taparon los contenedores con papel aluminio o un tapón plástico. Se esterilizó en la autoclave a 120 °C por 20 minutos a 15 PSI.

Mezcla de almidones con medio de cultivo. Para cada tratamiento se mezcló almidón con 0.5 g/L de Phytigel[®]. Para poder realizar esta mezcla primero se disolvió el Phytigel[®] en el 25% del volumen final del medio de cultivo de cada tratamiento. Se calentó en microondas en tiempos de 30 segundos alternados con agitación hasta lograr una solución homogénea y transparente. En el resto de medio de cultivo a temperatura ambiente y mientras estaba en agitación constante, se agregó la cantidad de almidón designado por tratamiento. Esta solución se calentó en el microondas en tiempos de 30 segundos alternados con agitación para intentar obtener la misma temperatura que la solución con Phytigel[®]. Es importante tener el medio con almidón caliente para que al colocar el medio con Phytigel[®] este no se gelatinice, pero hay que tomar en cuenta no exceder la temperatura de gelatinización del almidón. El medio de cultivo con almidón se mantuvo en agitación constante mientras se agregaba el medio con Phytigel[®]. El medio de cultivo se distribuyó en frascos o tubos de ensayo con una pipeta de 10 mL.

Medición de pH de los medios de cultivo después de esterilización. Se escogieron dos muestras de cada tratamiento para medir el pH. A los frascos que contienen un volumen de

20 mL de medio de cultivo se les adicionó 20 mL de agua destilada. La mezcla de 40 mL se mantuvo en agitación hasta tener una solución homogénea y se midió el pH tres veces para sacar un promedio de pH por tratamiento.

Preparación y manejo de segmentos nodales.

Los dos cultivos se encontraban en fase de multiplicación. Las siembras de los segmentos nodales se realizaron en el área de transferencia dentro de cámaras de flujo laminar con ayuda de pinzas y bisturí esterilizados con calor seco a una temperatura de 250-300 °C.

Multiplicación *in vitro* de camote (*Ipomoea batatas* L.) -variedad Bush Bock-. Para la multiplicación del cultivo se usaron plantas *in vitro* en fase de multiplicación subcultivo dos. La planta se dividió en segmentos nodales para poder obtener los *in vitro*-esquejes (Figura 1). Estos *in vitro*-esquejes se plantaron en el medio de cultivo (Cuadro 1). La siembra se realizó en tubos de ensayo con 10 mL de medio de cultivo.



Figura 1. Multiplicación *in vitro* de camote -variedad Bush Bock-. A- Plántulas de multiplicación. B- Plántula separada de medio. C- Cortes en segmentos nodales. D- Segmentos nodales.

Cuadro 1. Medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para multiplicación *in vitro* de camote (*Ipomoea batatas* L.).

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1,900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1,650.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNaEDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiamino tetra acético	50.000
Compuestos Orgánicos		Inositol	100.000
		Tiamina	1.000
		Sacarosa	70,000.000

Fuente: Jarret (1991)

Multiplicación *in vitro* de yuca (*Manihot esculenta*) -variedad Valencia-. Para la multiplicación del cultivo se usaron plantas *in vitro* en fase de multiplicación subcultivo uno de las cuales se obtuvo los segmentos nodales (Figura 2). La siembra se realizó en tubos de ensayo con 10 mL de medio de cultivo (Cuadro 2).

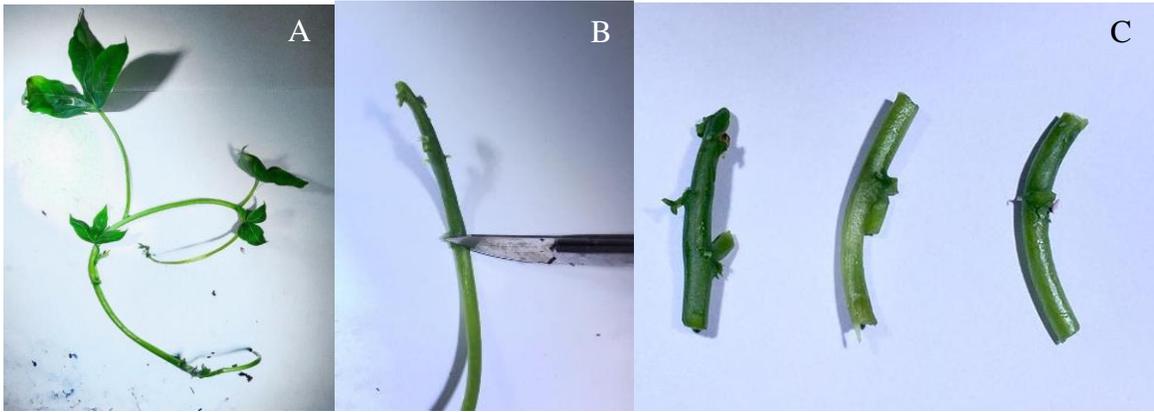


Figura 2. Multiplicación *in vitro* de yuca -variedad Valencia-. A- Esqueje en etapa de multiplicación. B- Cortes en segmentos nodales. C- Segmentos nodales.

Cuadro 2. Medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para multiplicación *in vitro* de yuca (*Manihot esculenta*).

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1,900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1,650.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	50.000
Componentes Orgánicos		Myo-inositol	100.000
		Tiamina-HCL	0.400
		Piridoxina	0.500
		Ácido Nicotínico	0.500
Carbohidrato		Sacarosa	20,000.000

Fuente: Roca et al. (1991)

Refreshamiento de medios y subcultivos.

Los cultivos de camote y yuca se volvieron a multiplicar a los 21 días con los mismos tratamientos (refreshamiento de medio) pero se cambiaron los envases de tubos a frascos sembrando dos segmentos nodales por frasco con 20 mL de medio de cultivo.

Incubación.

Los cultivos se desarrollaron en el área de crecimiento a 24 °C, humedad relativa de 70% y un fotoperiodo de 16 horas luz de focos fluorescentes de intensidad lumínica de 2000 lux.

Evaluación de tratamientos.

Se evaluaron tres tratamientos para el cultivo de camote y dos tratamientos para el cultivo de yuca. Cada uno de ellos lleva almidón utilizado para reemplazar un 72% del gelificante Phytigel® y un medio testigo con 1.8 g/L de Phytigel® (100%). Los Cuadros 3 y 4 muestran la cantidad de almidón + Phytigel® usadas en cada tratamiento para cada cultivo.

Cuadro 3. Tratamientos gelificantes en combinaciones de almidón más 0.5 g/L de Phytigel[®], para multiplicación *in vitro* de camote y contenido de amilosa de cada almidón.

Almidón	% amilosa	Cantidad (g/L)
Yuca	17	100
Maíz	25	90
Arroz	22	80

Cuadro 4. Tratamientos gelificantes en combinaciones de almidón más 0.5 g/L de Phytigel[®], para multiplicación *in vitro* de yuca y contenido de amilosa de cada almidón.

Almidón	% amilosa	Cantidad (g/L)
Yuca	17	100
Maíz	25	90

Variables evaluadas.

Las observaciones se hicieron cada siete días, hasta el día cuarenta y dos. Las variables medidas fueron:

- Supervivencia
- Número de meristemos por plántula en camote y yuca.

Diseño experimental.

Se usó un Diseño Completo al Azar (DCA), en el cual se probaron los tratamientos de almidón más Phytigel[®] y el testigo. Cada contenedor es una repetición y cada segmento nodal por contenedor es una unidad observacional. Cada cultivo fue tomado como un experimento independiente.

Análisis estadístico.

Para cada cultivo se realizó un análisis de varianza con separación de medias por el método de Duncan con un alfa de 0.05 para el cultivo de camote y LSD con un alfa de 0.01 para el cultivo de yuca. Se usó el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS[®] V9.4).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de medio de cultivo usando almidones como gelatinizantes.

Sustituir el Phytigel® por almidones tiene algunas desventajas en cuanto a la preparación y manipulación al momento de siembra. Se requirió de una mayor cantidad de tiempo para poder preparar los medios de cultivo debido a que el Phytigel® se debe calentar en otro recipiente para poder diluirlo y luego calentar el almidón para poder mezclarlo y prevenir que se formen grumos.

Además al no mantener la mezcla de almidón con Phytigel® en constante movimiento el almidón se precipita dificultando la distribución del medio de cultivo en los contenedores. Al no presentar el medio de cultivo una consistencia similar a la que tiene el Phytigel® fue necesario tener mayor cuidado en la siembra ya que los segmentos nodales no se mantenían en la posición que fueron colocados.

Una de las mayores desventajas es que el almidón al gelatinizarse perdió transparencia por lo que es más difícil poder evaluar el desarrollo radicular de los cultivos. Por la misma razón, al no ser transparente, no se pudo observar si los cultivos estaban infectados por microorganismos.

Cambio de pH después de esterilización en medios de cultivo suplementados con Phytigel® y almidones como agentes gelatinizantes.

El pH inicial de los medios de cultivo fue de 5.8 antes de la esterilización. Una vez fuera del autoclave el pH de todos los medios se vio alterado. El Phytigel® presentó un pH de 5.93, el almidón de yuca disminuyó el pH a 5.71 (el más cercano al pH inicial), el almidón de maíz se redujo a 5.42 y por último el pH del almidón de arroz se redujo a 5.25 (el pH más bajo de todos los tratamientos).

Multiplicación *in vitro* de camote.

Sobrevivencia. La sobrevivencia de las *in vitro*-plantas de camote fue de 100% en todos los tratamientos.

Número de meristemos por plántula en microesquejes de camote subcultivo tres. En el día 14 existió diferencia significativa entre todos los tratamientos y se pudo observar que el almidón de yuca presenta una mayor cantidad de meristemos en promedio (Cuadro 5). Este resultado puede presentar una diferencia por la cantidad de amilosa y amilopectina que contiene cada almidón.

La amilosa y el contenido de este compuesto en los almidones es importante para la gelatinización y la temperatura de gelatinización de cada almidón (Joly y Anderstein 2009). El almidón de yuca fue el que mejor resultados presentó al día 14 y esto pudo atribuirse a que este es el almidón que menos porcentaje de amilosa tiene. De acuerdo con Sharifi et al. (2010) esto es mejor porque al tener una menor consistencia y mayor difusión en el medio de cultivo la planta puede absorber mejor los nutrientes.

Los resultados al día 21 muestran que solo el almidón de arroz tuvo una diferencia significativa comparada con los otros tratamientos por lo tanto este es el tratamiento con resultados menos favorables. El tratamiento de Phytigel® con almidón de yuca y almidón de maíz no presentaron una diferencia significativa en cuanto al número de meristemos (Cuadro 5).

El resultado de almidón de yuca fue similar a los resultados presentados por Rueda et al. (2006) usando almidón modificado de yuca en cultivo de yuca. El almidón de maíz tampoco presentó una diferencia significativa con Phytigel® al igual que los resultados de Mohamed et al. (2009) para el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) con almidón de maíz y almidón de papa mezclados con agar a distintas dosis y Daud et al. (2011) para el cultivo de *Celosia sp.* con almidones de maíz y papa.

Cuadro 5. Meristemos en *vitro*-plantas de camote, en etapa de multiplicación subcultivo tres, usando almidones y Phytigel® como agentes gelificantes.

Tratamientos	Unidades observacionales (n)	Días		
		7	14	21
Phytigel®	34	1.08 a	5.85 b	10.68 a
Almidón de yuca	37	1.51 a	7.08 a	12.24 a
Almidón de maíz	31	0.48 b	4.16 c	10.52 a
Almidón de arroz	37	0.49 b	2.81 d	6.38 b
Prueba F		14.20	33.57	23.09
Coefficiente de Varianza		87.52	39.12	31.93
Grados de libertad		138	138	138
Probabilidad		0.000	0.000	0.000

El resultado de almidón de arroz presentó una diferencia significativa al resto de los tratamientos. Esto puede ser porque el pH del medio de cultivo se ve afectado por el autoclavado (Mohamed et al. 2009). El almidón de arroz presentó un pH de 5.25 cuando el pH del medio de cultivo es de 5.80 antes de autoclavado y el pH del Phytigel® después de autoclavado fue de 5.93. El bajo pH presentado por el almidón de arroz pudo ser una de las principales razones para que la *vitro*-planta no tenga un buen desarrollo. Este resultado difiere con el resultado de Daud et al. (2011) que usaron harina de arroz 60 g/L con 1-2 g/L de agar encontrando que no hubo diferencia significativa con el testigo.

Mohamed et al. (2009) igual observaron un decrecimiento del pH con el almidón de maíz a 5.49 usando 60 g/L de almidón con 2g/L de agar. Por esta razón es posible que el almidón de yuca presentó mejores resultados en comparación al almidón de maíz y de arroz.

Número de meristemas por plántula en microesquejes de camote subcultivo cuatro.

Para la multiplicación subcultivo cuatro el almidón de yuca no presentó una diferencia significativa al día 14 en comparación con el Phytigel®. Mientras que el almidón de maíz y de arroz muestran una diferencia significativa con los resultados del Phytigel® y almidón de yuca (Cuadro 6). Entre estos dos tratamientos el que presentó resultados menos favorables fue el de almidón de arroz.

Los resultados al día 21 todos los tratamientos presentaron diferencia significativa (Cuadro 6) siendo el almidón de yuca el que más se acerca al resultado del Phytigel® y el almidón de arroz el tratamiento con resultados menos favorables.

Cuadro 6. Meristemas en *in vitro*-plantas de camote en etapa de multiplicación subcultivo cuatro usando almidones y Phytigel® como agentes gelificantes.

Tratamientos	Unidades observacionales (n)	Días		
		7	14	21
Phytigel®	64	1.56 a	5.64 a	11.67 a
Almidón de yuca	66	1.67 a	5.29 a	10.20 b
Almidón de maíz	64	0.64 b	3.61 b	7.61 c
Almidón de arroz	58	0.45 b	1.36 c	2.50 d
Prueba F		26.07	90.15	121.40
Coefficiente de Varianza		87.90	56.86	54.52
Gados de libertad		251	251	251
Probabilidad		0.00	0.00	0.00

Multiplicación *in vitro* de yuca.

Sobrevivencia. La sobrevivencia de las *in vitro*-plantas de yuca fue de 100% en todos los tratamientos.

Número de meristemas por plántulas en microesquejes de yuca subcultivo dos. Los resultados en el subcultivo dos no presentaron diferencia significativa con el Phytigel® en ningún día (Cuadro 7). Estos resultados son similares a los presentados por Mohamed et al. (2009), Daud et al. (2011) y Rueda et al. (2006). Los mejores resultados entre almidones se presentaron con el almidón de yuca y esto puede ser debido a la menor variación del pH y la cantidad de amilosa y amilopectina que tiene cada almidón.

Cuadro 7. Meristemas en *in vitro*-plantas de yuca, en etapa de multiplicación subcultivo dos, usando almidones y Phytigel® como agentes gelificantes.

Tratamientos	Unidades observacionales (n)	Días		
		7	14	21
Phytigel®	36	1.56	2.25 ab	3.67
Almidón de yuca	36	1.47	2.31 a	3.86
Almidón de maíz	36	1.39	1.81 b	3.42
Prueba F		0.41	2.73	1.58
Coefficiente de Varianza		53.20	46.94	29.19
Grados de libertad		107	107	107
Probabilidad		0.66	0.07	0.21

Número de meristemas por plántula en microesquejes de yuca subcultivo tres. Los resultados de la multiplicación del subcultivo tres (Cuadro 8) fueron similares a los resultados obtenidos en el subcultivo dos exceptuando al almidón de maíz ya que este sí presentó una diferencia significativa con el Phytigel al día 14 y 21 siendo menor que los demás (Cuadro 7). Es posible que exista una influencia al ser un subcultivo que viene igual de un tratamiento de almidones por lo que presentó diferencia entre el subcultivo dos y tres. El almidón de yuca tiene niveles de amilosa menores lo que le permite obtener mejores resultados que el almidón de maíz. El pH del medio de cultivo se vio menos afectado por el almidón de yuca que por el almidón de maíz.

El resultado de almidón de yuca fue similar a los resultados presentados por Rueda et al. (2006) en el cual el almidón que se usa es un almidón modificado de yuca más Phytigel® en cultivo de yuca y en este experimento se usó un almidón comercial sin ninguna modificación.

Cuadro 8. Meristemas en *vitro*-plantas de yuca, en etapa de multiplicación subcultivo tres, usando almidones y Phytigel® como agentes gelificantes.

Tratamientos	Unidades observacionales (n)	Días		
		7	14	21
Phytigel®	70	0.96 a	2.06 a	3.57 a
Almidón de yuca	68	0.76 a	1.87 a	3.51 a
Almidón de maíz	62	0.73 a	1.52 b	2.90 b
Prueba F		3.56	12.22	7.14
Coefficiente de Varianza		65.85	34.71	34.21
Grados de libertad		199	199	199
Probabilidad		0.030	0.000	0.001

4. CONCLUSIONES

- Los almidones de yuca y maíz pueden reemplazar en un 72% la dosis de Phytigel® en el subcultivo tres de camote.
- Los almidones de yuca y maíz pueden reemplazar en un 72% la dosis de Phytigel® en el subcultivo dos en el cultivo de yuca.
- El almidón de yuca puede reemplazar en un 72% la dosis de Phytigel® en el subcultivo tres en el cultivo de yuca.

5. RECOMENDACIONES

- Probar las dosis de almidones y Phytigel® en volúmenes más grandes de medios de cultivo.
- Hacer pruebas regulando el pH de los medios con almidones antes de la esterilización (mayor a 5.8) para obtener un pH cercano a 5.8 después de la esterilización y observar si existe una mejora en el crecimiento de las *vitro*-plantas.
- Probar almidones con Phytigel® en una mayor cantidad de subcultivos provenientes de tratamientos con almidón.
- Probar el efecto de amilosa y amilopectina de cada almidón en el desarrollo de las *vitro*-plantas.
- Realizar un estudio económico para observar si usar almidones de yuca y maíz reducen el costo por plántula.

6. LITERATURA CITADA

- Anandha Rao M. 2014. Rheology of food gum and starch dispersions. Rheology of fluid, semisolid, and foods. New York (EE.UU): Editorial Springer US. P. 161-229.
- Baks T, Marieke EB, Anja EMJ, Remko B. 2007. Effect of pressure and temperature on the gelatinization of starch concentrations. Biomacromolecules; [Consultado 2017 jun 16]. 9(1): 296-304. https://www.researchgate.net/publication/5781565_Effect_of_Pressure_and_Temperature_on_the_Gelatinization_of_Starch_at_Various_Starch_Concentrations
- Bhojwani SS, Dantu PK. 2013. Micropropagation. Plant tissue culture: an introductory text. Uttar Pradesh (India): Editorial Springer India. p. 245-274.
- Daud N, Mat Taha R, Mohd Noor N, Alimon H. 2011. Potential of alternative gelling agents in media for the *in vitro* Micro-propagation of Celosia sp..International Journal of Botany; [consultado 2017 ago 10]. 7(2): 183-188. <http://scialert.net/qredirect.php?doi=ijb.2011.183.188&linkid=pdf>
- Hernández M, Torruco JG, Chel L, Betancur D. 2008. Food science and technology (Campinas). [Consultado 2017 may 01]. 28(3): 718-726. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000300031>
- Herrera Toledo S, Silva Acuña R, Sánchez Cuevas M. 2013. Evaluación de diferentes dosis de Maizina Ameriacana® y sagú (*Maranta sp.*) como agentes gelificantes sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani Kuhn*. Revista científica UDO Agrícola. [Consultado 2017 junio 08]. 13(1): 7-75. <http://www.bioline.org.br/pdf?cg13009>
- Jarret LR. 1991. Cultivo de tejidos de camote. In: Tabares E, Pachón J. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali (Colombia). p. 422-446.
- Joly G, Anderstein B. 2009. Starches. In: Tarté R. Ingredients in meat products. New York (EE.UU): Editorial Springer New York. p. 25-55.
- Martin DA, Cárdenas O, Pacheco JC. 2012. Sustancias utilizadas como agente gelificante alternativas al agar en medios de cultivo para propagación *in vitro*. Revista de Investigación Agraria y Ambiental; [consultado 2016 jun 29]. 3(2): 49-62. https://www.researchgate.net/publication/257835724_Sustancias_utilizadas_como

_agente_gelificante_alternativas_al_agar_en_medios_de_cultivo_para_propagacion_in_vitro

- Martín D, Cárdenas O, Cárdenas A. 2013. Almidón de papa, agente gelificante alternativo en medios de cultivo para propagación in-vitro de lulo *Solanum quitoense* Lam. Revista de Ciencias agrícolas; [consultado 2016 ago 18]. 30(1): 3-11. revistas.udenar.edu.co/index.php/rfacia/article/download/965/118
- Mohamed M, Alsadon A, Al Mohaidib M. 2009. Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation. African Journal of Biotechnology; [consultado 2016 ago 18]. 9(1): 12-16. https://www.researchgate.net/publication/279956372_Corn_and_potato_starch_as_an_agar_alternative_for_Solanum_tuberosum_micropropagation
- RAE (Real Academia Española). 2017. Diccionario de la lengua española. 23^a ed. Madrid; [consultado 2017 Jun 26]. <http://dle.rae.es/?id=5avxk06>
- Roca WM, Nolt B, Mafla G, Roa J, Reyes R. 1991. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In: Tabares E, Pachón J ed. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali (Colombia). p. 403-420.
- Rodríguez H, Hechavarría I. 2006. Gel de Aloe vera (*L.*) *N.L.* Burm. y harina de sagú como soporte sólido de medio de cultivo para plantas medicinales. Revista Cubana Plant Med; [consultado 2016 sep 10]. 11(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000100007
- Rueda R, Santana M, Gerstl A, Matehus J, Romay G. 2006. Almidón modificado de yuca como sustituto económico del agente solidificante para medios de cultivo de tejidos vegetales. Interciencia; [consultado 2016 ago 08]. 31(9):686-689. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000900012&lng=es&tlng=es.
- Sharifi A, Moshtaghu N, Bagheri A. 2010. Agar alternatives for micropropagation of African violet (*Saintpaulia ionantha*). African Journal of Biotechnology; [consultado 2016 sep 17]. 6(54): 9199-9203. file:///D:/Downloads/Agar_alternatives_for_micropropagation_of_African_.pdf
- Sharry S, Adema M, Abedini W. 2015. Plantas de probeta Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. 1^{era} ed. Buenos Aires (Argentina): UNLP. 241 p. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo__pdf-PDFA.pdf?sequence=1
- Yamamoto K, Buckow R. 2016. Pressure gelatinization of starch. In: Balasubramaniam VM, Gustavo V, Huub LM. High pressure processing of food. New York (EE.UU): Editorial Springer New York. P. 433-459.