



Revista Colombiana de Biotecnología

ISSN: 0123-3475

revcbib_bog@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia

Colombia

Albany de Vilchez, Nilca Rosa; Vilchez Perozo, Jorge Alberto; León de Sierralta, Silvia;
Nava Ferreira, Alba Ruth; Martínez Ferrer, Leonardo Javier; Molina Pulgar, Miguel Ángel
Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe
barbadensis* Mill.)

Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XVII, núm. 1, junio, 2015, pp. 24-31
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77639196004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.)

Liquid medium culture: an approach for the commercial micropropagation of aloe (*Aloe barbadensis* Mill.)

Nilca Rosa Albany de Vilchez*, Jorge Alberto Vilchez Perozo**, Silvia León de Sierralta*, Alba Ruth Nava Fereira***, Leonardo Javier Martínez Ferrer** y Miguel Ángel Molina Pulgar*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50669

Resumen

La micropropagación es una alternativa para la producción comercial de plantas de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.) limitada por los altos costos de producción. Con el objetivo de prescindir de los agentes gelificantes, reduciendo costos, se comparó el medio de cultivo líquido con el medio de cultivo gelificado en las diferentes etapas de micropropagación de la zábila. En la etapa de establecimiento se observó mayor porcentaje de explantes contaminados en el medio de cultivo líquido estático (25.55 %) que en el medio gelificado (11.11 %); y aunque el resto de los explantes se establecieron independientemente de la condición del medio de cultivo, en el medio líquido alcanzaron mayor altura (3.81 cm) que en el medio gelificado (3.03 cm). En la etapa de multiplicación, la altura de los explantes (entre 4.43 y 6.01 cm) fue superior en los recipientes de inmersión temporal automatizado (RITA®) en comparación con el medio gelificado (entre 3.24 y 3.42 cm); sin diferencias significativas entre el número de brotes/explante. Todos los brotes enraizaron a los 30 días independientemente del medio de cultivo empleado (líquido estático y gelificado), sin observar variaciones en la altura del brote y, número y longitud de las raíces. El empleo de los medios de cultivo líquidos y la implementación de los sistemas de inmersión temporal tipo RITA® permiten reducir los costos de producción al prescindir de los agentes gelificantes, lo que representa un avance para la micropropagación comercial de zábila.

Palabras clave: Cultivo de tejidos, agentes gelificantes, RITA®, sistemas de inmersión temporal.

Abstract

Micropropagation is considered a successful alternative for aloe (*Aloe barbadensis* Mill.) plant production. However, it has limited use due to the high production cost. Liquid media were compared to agar-gelled medium during all micropropagation stages of aloe to reduce the cost for gelling agent used. In the establishment stage, there was a higher percentage of contaminated explants in static liquid medium (25.55%) than those cultured in agar-gelled medium (11.11%), although all the explants were established independently of the culture medium used, higher height (3.81 cm) was observed in liquid medium than those growing in agar-gelled medium (3.03 cm). In the multiplication stage, explant height was higher in the recipients used for automated temporary immersion system (RITA®) (4.43 - 6.01 cm) than those cultured in agar-gelled medium (3.24 - 3.42 cm), there was no significant difference for number of shoots/explant. All shoots had roots at 30 days independently of used culture media (static liquid or agar-gelled media). Shoot height, number and root length had similar values in both culture media. The implementation of liquid media and automated temporary Immersion system RITA® may allow to reduce production costs of gelling agent used, it represents an approach for the commercial micropropagation of aloe.

Keys words: Tissue culture, gelling agents, RITA®, temporary immersion system.

Recibido: junio 15 de 2014

Aprobado: abril 13 de 2015

* Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, estado Zulia. (4005ZU), Republica Bolivariana de Venezuela. Autor para correspondencia: nalbany@fa.luz.edu.ve, nilca.albany@fa.luz.edu.ve

** Departamento de Botánica, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, estado Zulia. (4005ZU), Republica Bolivariana de Venezuela.

*** Departamento de Agronomía. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, estado Zulia. (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela.

Introducción

En los últimos años se ha demostrado científicamente que las plantas del género *Aloe*, poseen gran valor nutricional, medicinal y cosmético (Pellizzoni *et al.*, 2012), siendo *Aloe barbadensis* Miller (zábila), la especie de mayor importancia para la industria por la gran cantidad de acíbar que producen sus hojas, cuyo principio activo es la aloína que tiene múltiples propiedades medicinales (Ramachandra y Srinivasa 2008; Añez y Vásquez 2005).

La propagación convencional de zábila se realiza mediante la separación de brotes o hijuelos de la base de las plantas adultas, teniendo una tasa de reproducción estimada de 3 a 4 brotes por planta al año (Aggarwal y Barna 2004) por lo que se considera muy lenta e insuficiente para satisfacer la demanda a nivel comercial (Meyer y Van Staden 1991).

Diversos métodos para la propagación de zábila basados en las técnicas de cultivo de tejidos se han desarrollado con resultados satisfactorios que incrementan el número de plantas y aceleran la tasa de reproducción (Mukherjee y RoyChowdhury 2008; Supe 2007; Hosseini y Parsa 2007; Matos 2007; Albany *et al.*, 2006; Aggarwal y Barna 2004; Liao *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2000). Sin embargo, la implementación de esta tecnología mediante la micropropagación a escala comercial está seriamente limitada por los altos costos de producción (Savangikar 2004).

Entre los factores involucrados que incrementan los costos en la micropropagación de plantas, se destacan: el elevado número de operaciones manuales que implican un costo entre el 40 y 90 % por mano de obra (Pérez *et al.*, 2000; Etienne y Berthouly 2002; Satyahari 2005), el gasto por energía eléctrica estimado entre el 60 y 65 % de los costos de laboratorio (Ahloowalia y Savangikar 2004; Kodym y Zapata 1999) y el uso de agentes gelificantes en los medios de cultivo que representan entre el 70 y 90 % de los costos del medio de cultivo (Prakash *et al.*, 2004; Orellana 1998).

La implementación de metodologías de propagación basadas en el empleo de medios de cultivo líquidos que prescinden del agente gelificante, definitivamente reducen los costos de producción (Preil 2005; Aggarwal y Barna 2004). Además, éstos facilitan la absorción de nutrientes por parte de los tejidos, disminuyen el tiempo requerido para el desarrollo de los cultivos (Alcaraz-Meléndez *et al.*, 2002); simplifican las operaciones de preparación y dispensado del medio, permitiendo establecer métodos de control y muestreo en cada etapa y sustentan el desarrollo propuestas para la automatización de los procesos *in vitro* (Satyahari 2005; Etienne y Berthouly 2002).

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) fueron concebidos para viabilizar la comercialización de la micropropagación, ya que éstos permiten la automatización o semiautomatización de los sistemas de cultivo (Geor-

giev *et al.*, 2014), además el principio someter al tejido de la planta cultivada a ciclos alternos de inmersión temporal (pocos minutos) en el medio líquido seguido del drenaje y la exposición del tejido a un medio ambiente gaseoso renovado mejoran considerablemente la producción y calidad de los cultivos *in vitro* (Georgiev *et al.*, 2014; Etienne y Berthouly 2005).

Aunque la mayoría de los métodos desarrollados para la micropropagación de zábila se basan en el uso de medios de cultivo con diferentes agentes gelificantes (Matos 2007; Liao *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2000; Roy y Sakar 1991), se han obtenido resultados prometedores con el uso de medios de cultivo líquidos empleando diferentes sistemas como son: estáticos, agitados y con inmersión temporal; todos ellos para la etapa de multiplicación *in vitro* de zábila (Vilchez *et al.*, 2007; Albany *et al.*, 2006; Aggarwal y Barna 2004).

Con el propósito de prescindir del uso de agentes gelificantes en los medios de cultivo que encarecen los costos de producción de las plantas y limitan la micropropagación comercial de zábila, se comparó el uso del medio de cultivo líquido estático o de inmersión temporal con el medio gelificado en la etapa de establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de zábila.

Materiales y métodos

Material vegetal

Para iniciar la investigación se seleccionaron hijuelos de zábila sanos de 20 a 30 cm de longitud, de un lote de plantas adultas ubicadas en los canteros del propagador del Vivero de la Universidad del Zulia, Venezuela (10°41'12"LN con 71°38'05"LO a 36 msnm).

Etapa de Establecimiento *in vitro*

Se diseñó un experimento totalmente al azar con un arreglo aleatorizado para evaluar el efecto del medio de cultivo líquido estático con puente Heller (soporte de filtro de papel) y compararlo con el medio gelificado con 4 g L⁻¹ de agargel (SIGMA).

Los hijuelos de zábila seleccionados del vivero universitario se sometieron a un primer lavado con agua corriente y jabón líquido comercial, eliminándoles los restos de sustrato y raíces. Seguidamente se realizó el procedimiento de desinfección descrito por Albany *et al.* (2006) y en condiciones asépticas los vástagos de 3 cm de longitud fueron seccionados hasta obtener el explante, constituido de la yema apical del vástago recubierta en la base por 3 a 4 hojas, con una altura promedio de 1 cm y un diámetro de 0.5 cm, aproximadamente.

Los explantes fueron introducidos en tubos de ensayos de 150 x 20 mm (Bellco Glass) cubiertos con tapones de polipropileno (Bellco Glass INC. Kaputs), que contenían 15 mL de medio de cultivo MS (Mu-

rashige & Skoog 1962) de pH 5.8, suplementado con 100 mg L⁻¹ mioinositol, 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 25 mg L⁻¹ de cisteína y 30 g L⁻¹ de sacarosa; sin adición de reguladores de crecimiento.

Se establecieron 10 repeticiones de 3 unidades experimentales cada repetición, para un total de 30 explantes en cada tratamiento (medio líquido y medio gelificado). La unidad experimental estuvo representada por un tubo de ensayo con un explante y las variables evaluadas fueron el porcentaje de explantes establecidos a los 7, 14 y 21 días de cultivo y el porcentaje de explantes contaminados y la altura del explante al finalizar el periodo de cultivo (21 días).

Multiplicación in vitro de zábila en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®)

Para evaluar el efecto del medio de cultivo líquido en la multiplicación *in vitro* de zábila se seleccionaron los envases comerciales denominados RITA® y se comparó con el medio gelificado, ya que éste es el comúnmente utilizado en la multiplicación *in vitro* de zábila (control).

Se realizaron dos experimentos, en el primero se evaluó la frecuencia de inmersión de cada 6, 8 y 12 h con 1 min de inmersión. En el segundo experimento se evaluó el tiempo de inmersión de 1, 2, 3 y 4 min con la frecuencia seleccionada del primer experimento de cada 8 h.

En cada experimento se utilizó un diseño experimental totalmente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Para los tratamientos líquidos se agregaron 200 mL de medio de cultivo a los RITA® y para el tratamiento control se agregó 50 mL de medio de cultivo gelificado con 4 g L⁻¹ de agargel (SIGMA) en frascos de vidrio de 1 L de capacidad.

Se seleccionaron brotes de zábila *in vitro* que poseían entre 2 y 3 cm de longitud con un mínimo de 3 hojas desarrolladas, del cuarto ciclo de multiplicación. En condiciones asépticas se individualizó cada brote y se decapitó a una longitud promedio de 1 cm desde la base hacia el extremo distal de las hojas y se sembraron diez explantes en cada envase.

En los dos experimentos se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con 100 mg L⁻¹ mioinositol, 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 25 mg L⁻¹ de cisteína, 1 mg L⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP) y 30 g L⁻¹ de sacarosa; a pH 5.8. Las variables evaluadas fueron el número de brotes/explante y la altura del explante a los 30 días de cultivo.

Enraizamiento in vitro de zábila en medio líquido y gelificado

Para comparar el efecto del medio líquido y gelificado en el enraizamiento *in vitro* se seleccionaron brotes de zábila de tamaño comprendido entre 3 y 6 cm de altura, procedentes de un séptimo subcultivo de pro-

pagación *in vitro*. A estos brotes se les eliminó toda brotación de yemas laterales y se les realizó un corte transversal del follaje para reducir la altura de los propágulos a 3 cm aproximadamente.

Los explantes fueron colocados individualmente en tubos de ensayo que contenían 15 mL de medio de cultivo líquido estático con puente Heller o gelificado con 4 g L⁻¹ de agargel (tratamientos). Se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962) con una reducción del 50% de las sales, suplementado con 100 mg L⁻¹ mioinositol, 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 25 mg L⁻¹ de cisteína y 30 g L⁻¹ de sacarosa; a pH 5.8.

A los 10, 20 y 30 días de cultivo se evaluó el porcentaje de brotes enraizados; y al finalizar el cultivo (30 días) se evaluó la altura de la vitroplanta, el número y longitud de raíces. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con ochenta repeticiones por tratamiento.

Condiciones generales de crecimiento in vitro

Las etapas de establecimiento, multiplicación y enraizamiento, se desarrollaron en un cuarto de crecimiento *in vitro* con una temperatura promedio de 26°C±2°C con luz blanca fluorescente continua (40W) y una intensidad de 150 µmol m⁻² s⁻¹.

Para el análisis estadístico los valores porcentuales de las variables dependientes en la etapa de establecimiento y enraizamiento, fueron transformados a través de la ecuación $n^{1/2} + 1/2$, donde n es el valor porcentual.

Los datos de todas las variables dependientes fueron evaluados mediante el análisis de varianza simple y la prueba de comparación de medias por Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa computarizado Statistix versión 8.0 (2003) para ambiente Windows de Microsoft®.

Resultados y discusión

Establecimiento in vitro en medio líquido y gelificado

El porcentaje de explantes contaminados, la altura del explante y el porcentaje de explantes establecidos a los 7 y 14 días, fueron afectados por la condición del medio de cultivo en la etapa de establecimiento *in vitro* de zábila. Sin embargo, todos los explantes que sobrevivieron lograron establecerse independientemente del medio de cultivo a los 21 días (tabla 1).

El porcentaje de explantes contaminados observado en el medio gelificado fue duplicado en el medio líquido. La presencia de microorganismos en los medios líquidos puede ser detectada fácilmente por los colores, texturas, turbidez uniforme o no, películas o sedimentos de las sustancias que estos microorganismos segregan en el medio (Alvarado 1998). En los medios gelificados se observó oscurecimiento del medio pro-

Tabla 1. Efecto del medio líquido estático con puente Heller y gelificado con agargel sobre el porcentaje de explantes contaminados, porcentaje de explantes establecidos y altura del explante en la etapa de establecimiento *in vitro* de zábila.

Condición del medio	Explantes contaminados (%) a los 21 días	Explantes establecidos (%) a los			Altura del explante (cm) a los 21 días
		7 días	14 días	21 días	
Líquido	25.55 a	48.45 a	87.75 a	100 a	3.81 a
Gelificado	11.11 b	24.67 b	71.56 b	100 a	3.03 b

Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$) para la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey.

bablemente por liberación de fenoles que dificultó la detección de los contaminantes, incrementándose el riesgo de obtener pérdidas en etapas posteriores a la del establecimiento, como la multiplicación. En tal sentido, la necesidad de observar los contaminantes para su eliminación oportuna es un aspecto que debe tomarse en cuenta incluso para elegir el agente gelificante (Capote *et al.*, 2002), los que brindan una apariencia traslúcida similar al medio de cultivo líquido (phytagel y gellan gum) son los más costosos.

Se ha evaluado el porcentaje de explantes contaminados en la etapa de establecimiento *in vitro* de zábila en medios de cultivo gelificado; pero para demostrar la influencia del contenido de sacarosa (Tanabe y Horiuchi 2006) y el efecto del método de desinfección superficial empleado (Albany *et al.*, 2006; Matos *et al.*, 2000). No obstante, el resultado obtenido en esta investigación de 11.11 % de explantes contaminados en el medio gelificado fue similar al reportado por Albany *et al.* (2006) de 9.09 % e inferior al obtenido por Matos *et al.* (2000) con el 24 %. En cuanto al medio líquido no hay precedentes para establecer comparaciones apropiadas; y aunque resultó estadísticamente superior al medio gelificado en este estudio, permitió identificar rápidamente el material contaminado y excluir de forma temprana cualquier fuente de contaminación.

El porcentaje de explantes establecidos a los 7 días de cultivo en el medio líquido fue superior que en el medio gelificado (tabla 1), tendencia que se mantuvo hasta los 14 días de cultivo. Sin embargo, todos los explantes lograron establecerse a los 21 días, independientemente de la condición del medio de cultivo.

Estos resultados parecieran estar relacionados con la facilidad que tienen los tejidos de absorber los nutrientes de los medios líquidos y manifestar crecimiento en poco tiempo; mientras que los medios de cultivo gelificados limitan la absorción de los nutrientes (Lorenzo *et al.*, 1998), ya que éstos pasan a formar parte de la matriz del gel y los explantes requieren mayor tiempo para manifestar crecimiento.

Por otra parte, durante los primeros 7 días de cultivo se observó la presencia de compuestos fenólicos en la base de los explantes en ambos medios de cultivo

(líquido y gelificado); sin embargo, en el medio gelificado se evidenció mayor ennegrecimiento en la superficie de contacto con el medio de cultivo debido a la menor tasa de difusión. El alto contenido de estos compuestos fenólicos causa oxidación en el medio de cultivo (Matos 2007), dificultando el establecimiento de la zábila *in vitro*, ya que estas sustancias fenólicas son reconocidas como inhibidores del crecimiento (Roy y Sakar 1991). Estas razones pudieran estar relacionadas con la disminución del crecimiento de los explantes en los medios de cultivo gelificado durante las primeras semanas de cultivo; contrariamente los explantes del medio líquido lograron contrarrestar los efectos negativos de la oxidación, ya que estos compuestos se diluyen con mayor facilidad en el medio líquido; afectando en menor grado el crecimiento de los explantes.

Hasta el momento, sólo se ha utilizado medio gelificado para el establecimiento *in vitro* de zábila con resultados similares en cuanto al tiempo de crecimiento de los explantes; reportándose después de 15 días (Natali *et al.*, 1990; Matos *et al.*, 2000) y de 4 semanas de cultivo (Liao *et al.*, 2004). Los resultados de esta investigación ponen de manifiesto la eficiencia de los medios de cultivo líquido para la etapa de establecimiento *in vitro* de zábila.

Al cabo de 21 días de cultivo se observó mayor altura en los explantes establecidos en el medio de cultivo líquido en comparación con el medio gelificado (tabla 1). Esta respuesta está directamente asociada a la absorción de nutrientes sin mayores restricciones en los explantes cultivados en medio líquido.

Resultados similares a esta investigación fueron reportados por Matos *et al.* (2000), Natali *et al.* (1990) y Aggarwal y Barna (2004) con valores que oscilaron entre 2 y 4 cm de altura de explantes de zábila en la etapa de establecimiento, pero después de 30 días de cultivo.

Multiplicación in vitro de zábila en los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®)

La frecuencia de inmersión durante la multiplicación *in vitro* de zábila, afectó el número de brotes de los

explantes crecidos en los RITA®; resultando mayor cuando se incrementó la frecuencia a 8 y 6 h, sin diferenciarse del número de brotes obtenidos en el medio gelificado. Entre tanto, la altura del explante siempre fue mayor en todas las frecuencias de los RITA® que en el medio gelificado (tabla 2).

El tiempo de inmersión en los RITA® sólo afectó el número de brotes por explante, obteniendo una mayor brotación en el menor tiempo con un valor promedio similar al control (medio gelificado); mientras que la altura del explante no varió entre los tratamientos en los RITA®; pero todas fueron superiores a la alcanzada por los explantes crecidos en el medio gelificado (tabla 3).

Los valores obtenidos para la altura del explante en relación al número de brotes en ambos experimentos de los RITA®, parecieran indicar que los nutrientes del medio líquido son asimilados rápidamente por los explantes, evidenciándose en mayor altura del explante en detrimento de la formación de brotes. Esta hipótesis puede ser corroborada con el comportamiento de los explantes en el medio gelificado (control) los cuales mostraron mayor equilibrio entre el crecimiento del explante y el número de brotes emitidos por éstos; como consecuencia de la absorción de los nutrientes sólo por la base del explante y de forma paulatina, debido a la retención que ejerce la matriz del gelificante;

mientras que en los RITA® el contacto intermitente del medio nutritivo con los explantes le proporciona una capa delgada de medio que se adhiere en toda la superficie del explante por cohesión y se renueva con cada inmersión.

Al respecto se ha demostrado que las condiciones de los sistemas de inmersión temporal (SIT) y de los medios líquidos en agitación orbital favorecen un mayor crecimiento de tallos y hojas que no son aprovechables para la etapa de multiplicación (Albany *et al.*, 2006 y 2005).

En la multiplicación *in vitro* de zábila, se ha señalado una mayor altura del explante en medios de cultivo líquidos en agitación orbital (50 rpm) en comparación al medio gelificado con 3.85 y 2.83 cm, respectivamente y similar coeficiente de multiplicación entre ambos tipos de medio de cultivo con 3.75 brotes por explante (Albany *et al.*, 2006). Mientras que Aggarwal y Barna (2004) compararon el medio de cultivo líquido estático con el medio gelificado; obteniendo 5.1 brotes por explante en los medios líquidos y 4.8 brotes/explante en los medios gelificados.

Cabe destacar que el origen de las diferencias entre el número de brotes obtenidos en esta investigación y los señalados con anterioridad, se debe principalmente a las diferencias entre las formas de cultivo líquido

Tabla 2. Efecto de la frecuencia (6, 8, 12 h) con 1 min de inmersión en los RITA® sobre el número de los brotes/explante y la altura del explante en la etapa de multiplicación *in vitro* de zábila.

Frecuencia de inmersión (h)	Número de brotes/explante	Altura del explante (cm)
12	2.12 b	5.87 a
8	2.86 a	6.01 a
6	2.99 a	5.97 a
Medio gelificado (control)	3.02 a	3.42 b

Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$) para la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey.

Tabla 3. Efecto del tiempo de inmersión (1, 2, 3 y 4 min) con una frecuencia de cada 8 h en los RITA® sobre el número de los brotes/explante y la altura del explante en la etapa de multiplicación *in vitro* de zábila.

Tiempo de inmersión (min)	Número de brotes/explante	Altura del explante (cm)
1	2.93 a	4.86 a
2	2.42 b	5.01 a
3	2.33 b	4.43 a
4	2.16 b	4.56 a
Medio gelificado (control)	3.16 a	3.24 b

Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$) para la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey.

empleado, relacionadas con el RITA®, el medio líquido estático (Aggarwal y Barna 2004) y en agitación orbital (Albany et al., 2006). Además, la composición de los medios de cultivo utilizados y la manera de medir la variable con seguridad afianzaron las diferencias.

Estudios realizados por Vilchez et al. (2007) en la multiplicación *in vitro* de zábila demuestran que una frecuencia de 3 veces al día durante 2 min, permite obtener mayor número de brotes en los RITA® (2.75) y al variar los tiempos de inmersión (1, 2 y 3 min) no se reportaron diferencias para el número de brotes; pero sí mayor longitud del explante (5.01 cm) en los RITA® con 1 min de inmersión tres veces al día. Estos resultados son similares a los mostrados en esta investigación con las frecuencias de 8 y 6 h, que arrojaron los mayores valores de brotes por explante con 2.86 y 2.99, respectivamente; y cuando se variaron los tiempos de inmersión (1, 2, 3 y 4 min) se observó mayor número de brotes (2.93) en inmersiones de 1 min cada 8 h, con similar altura entre los explantes de los RITA®.

Enraizamiento *in vitro* de zábila en medio líquido y gelificado

Transcurridos 30 días de cultivo en la etapa de enraizamiento, las variables altura de la vitroplanta, el número y la longitud de las raíces; no mostraron diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) por efecto del medio líquido en comparación con el medio gelificado. El porcentaje de explantes enraizados, mostró diferencias por efecto de la condición del medio de cultivo sólo a los 10 y 20 días de cultivo (tabla 4).

Durante los primeros días de cultivo fue notoria la diferencia en el crecimiento de los brotes cultivados en el medio líquido; corroborando de esta manera la facilidad que tienen los explantes de absorber los nutrientes del medio líquido en comparación con el medio gelificado.

A los 10 días de cultivo, el porcentaje de brotes enraizados en el medio líquido duplicó el valor porcentual alcanzado en el medio gelificado. Sin embargo, a los 20 días de cultivo disminuyó esta diferencia; pero se mantuvo mayor porcentaje de brotes enraizados en el

medio líquido. Treinta días después, los brotes colocados en medios gelificados (figura 1a) y líquidos (figura 1b) enraizaron casi en su totalidad, eludiendo las diferencias estadísticas existentes entre ellos.

Este comportamiento pudiera estar relacionado con la mayor resistencia que proporciona la matriz del medio gelificado a los brotes sin raíces para absorber los componentes del medio de cultivo, en comparación con el medio líquido. Es evidente que durante los primeros días de cultivo, los brotes colocados en el medio líquido comienzan a absorber rápidamente los nutrientes, por lo que se agotan estos nutrientes del medio de cultivo con la misma velocidad. Razón por la cual a medida que transcurre el tiempo de cultivo, comienza a disminuir la diferencia entre el porcentaje de brotes enraizados en el medio líquido con respecto al medio gelificado.

Al respecto, Tanabe y Horiuchi (2006), señalan que la concentración del gelificante influye en la capacidad de las plántulas de zábila en absorber agua y otros componentes del medio de cultivo. Estos investigadores demostraron que el porcentaje de ganancia de peso de las plántulas aumentó a medida que se disminuyó la concentración del gelificante, obteniendo 74 % de ganancia de peso con 4 g L⁻¹ de gellan gum.

Por otra parte, Orellana (1998) señala que el uso del medio de cultivo líquido permite la difusión de los residuos tóxicos de las vitroplantas, principalmente los compuestos fenólicos que son abundantes durante la iniciación de las raíces en la etapa de enraizamiento y disminuyen el período de las plantas para ser llevadas a la etapa de aclimatación. Además Gangopadhyay et al. (2002), afirman que existe una alta frecuencia de dañar las raíces al momento de extraerlas del medio gelificado para el trasplante, y cuando quedan restos del gelificante sobre las raíces puede favorecer el crecimiento de hongos y bacterias.

En los trabajos del género *Aloe*, se observa una alta capacidad de enraizamiento por parte de los brotes *in vitro* de zábila al utilizar diferentes agentes gelificantes con la adición o no de auxinas al medio de cultivo. Al respecto Meyer y Van Staden (1991), reportaron el

Tabla 4. Efecto del medio líquido-estático y gelificado con agargel sobre el porcentaje de brotes enraizados, altura de la vitroplanta, número y longitud de las raíces en la etapa de enraizamiento *in vitro* de zábila.

Condición del medio	Brotes enraizados (%) a los			A los 30 días de cultivo		
	10 días	20 días	30 días	Altura de la vitroplanta (cm)	Número de raíces	Longitud de las raíces (cm)
Líquido	42.65 a	72.76 a	100 a	7.54 a	1.65 a	3.73 a
Gelificado	21.34 b	59.53 b	98.96 a	7.33 a	1.79 a	3.98 a

Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$) para la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey.

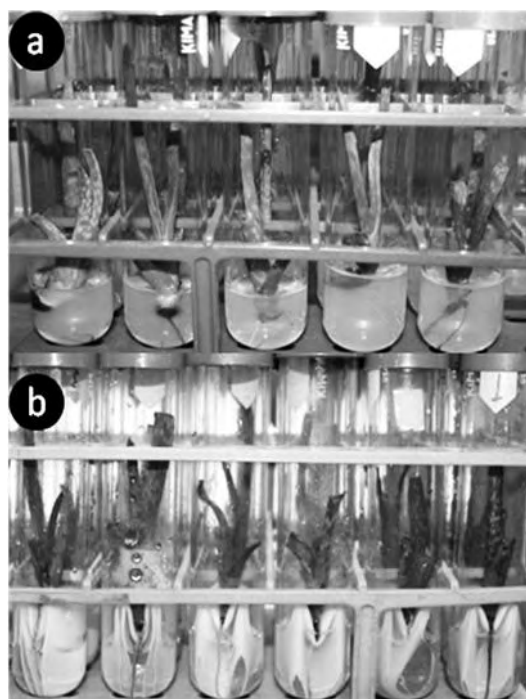


Figura 1. Brotes enraizados *in vitro* de zábila obtenidos a los treinta días de cultivo. En sistemas de medio gelificado con 4 g L⁻¹ de agargel (a). En medio líquido estático con puente Heller (b).

100 % de brotes de zábila enraizados con una altura entre 5 y 6 cm utilizando IBA como fuente auxínica y el gelrite como agente gelificante. A diferencia de Natali *et al.* (1990) quienes utilizaron un medio de cultivo sin auxinas y gelificado con agar, pero igual obtienen el 100 % de enraizamiento a los 7 y 10 días de cultivo; tiempo similar (10 días aproximadamente) en el que Matos *et al.* (2000) en un medio de cultivo sin hormonas y con gellan como agente gelificante lograron el enraizamiento de zábila, mientras que Aggarwal y Barna (2004) después de 15 días de cultivo obtienen 100 % de brotes enraizados de zábila en medios de cultivo gelificados con agar y sin auxinas.

Los resultados anteriormente señalados indican que los brotes de zábila tienen un alto potencial de formar raíces adventicias, corroborándose en esta investigación tanto en los medios de cultivo líquido como en los gelificados. Ahora bien, en función del objetivo de esta investigación en disminuir de los costos de producción es pertinente destacar la eficiencia alcanzada en esta etapa, al obtener el 100 % de los brotes de zábila enraizados en un medio de cultivo sin agente gelificante, reguladores de crecimiento y con una reducción al 50 % de las sales de MS.

Esta investigación constituye el primer aporte científico del uso de medio de cultivo líquido en zábila para la etapa de establecimiento *in vitro* y el segundo señalamiento de empleo de RITA® en la etapa de multiplicación y de medio líquido estático en la etapa de

enraizamiento; con resultados satisfactorios en todos los casos.

Conclusiones

La micropropagación de *Aloe barbadensis* Mill. basada en medio de cultivo líquido es más sencilla y satisfactoria que los medios gelificados, con altas posibilidades de automatizar el proceso *in vitro* para fines comerciales.

El medio de cultivo líquido-estático con puente Heller empleado en la etapa de establecimiento y enraizamiento *in vitro* favorece el crecimiento y regeneración de los brotes de zábila, resaltando la reducción de los costos de los componentes del medio de cultivo que conlleva la omisión del gelificante y la exclusión de reguladores de crecimiento y reducción del 50 % de sales de MS en el medio de cultivo de enraizamiento en ambas etapas.

La multiplicación *in vitro* en los sistemas de inmersión temporal tipo RITA® facilitan la absorción de los nutrientes por parte de los explantes de zábila traduciéndose en mayor crecimiento, al tiempo que se reducen los costos del medio de cultivo y abren la posibilidad de estudiar otros factores para aumentar el número de brotes en esta etapa.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CONDES) de la Universidad del Zulia, Vene-

zuela por el financiamiento otorgado para la ejecución de esta investigación.

Referencias bibliográficas

- Acurero, A. (2007). Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. (Zábila). *Ciencia*, 15(3): 319-330.
- Aggarwal, D., y Barna, K. S. (2004). Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera* Linn. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 13(1), 77-79.
- Ahloowalia B., y Savangikar V. (2004). Plant tissue culture. En Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. (pp. 41-45). Austria: Impreso por International Atomic Energy Agency (IAEA)
- Albany, N. R., Vilchez, J. A., García, L., y Jiménez, E. (2005). Comparative study of morphological parameters of Grand Nain banana (*Musa AAA*) after *in vitro* multiplication with growth retardants. *Plant cell, tissue and organ culture*, 83(3), 357-361.
- Albany, N., Vilchez, J., de Sierralta, S. L., Molina, M., y Chacín, P. (2006). Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23(2), 213-222.
- Alcaraz-Meléndez, L., Real-Cosío, S., y Robert, M. L. (2002). Morphological comparison of damiana (*Turnera diffusa*, Willd.) regenerated *in vitro* from leaves cultured in solidified medium and liquid cultures. *Scientia horticultrae*, 96(1), 293-301.
- Alvarado Y. (1998). Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En J.N. Pérez-Ponce (Ed.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología* (pp. 81-104). Santa Clara, Cuba: Ediciones GEO.
- Añez, B., y Vásquez, J. (2005). Efecto de la densidad de población sobre el crecimiento y rendimiento de la zábila (*Aloe barbadensis* Mill.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 22(1), 1-12.
- Rodríguez, A. C., Villanueva, F. Á., Mayor, Z. F., de la Torre, Y. R. S., Díaz, O. P., y Acosta, D. F. (2002). Evaluación de un agente gelificante cubano, Natugel, en el cultivo *in vitro* de plántulas de tomate. *Biotechnología Aplicada*, 19(1), 37-40.
- Etienne, H., y Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231.
- Etienne, H., y Berthouly, M. (2005). Temporary immersion systems: a new concept for used liquid medium in mass propagation. En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Compilado por: Hvorslef-Eide A. y Preil W. Fifth edition. Dordrecht, The Netherlands. pp 165-195. Springer.
- Gangopadhyay, G., Das, S., Mitra, S. K., Poddar, R., Modak, B. K., y Mukherjee, K. K. (2002). Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. *Plant cell, tissue and organ culture*, 68(3), 301-310.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., y Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 607-621.
- Hosseini, R., y Parsa, M. (2007). Micropropagation of *Aloe vera* L. grown in south Iran. *Pakistan journal of biological sciences: PJBs*, 10(7), 1134-1137.
- Kodym, A., y Zapata-Arias, F. J. (1998). Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55(2), 141-145.
- Liao, Z., Chen, M., Tan, F., Sun, X., y Tang, K. (2004). Micropropagation of endangered Chinese aloe. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(1), 83-86.
- Lorenzo, J. C., González, B. L., Escalona, M., Teisson, C., y Borroto, C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54(3), 197-200.
- Matos, A., Molina, J., y Acosta, D. (2000). Establecimiento de una metodología eficiente para el cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. *Ciencia*, 8(3), 280-284.
- Meyer, H. J., y Van Staden, J. (1991). Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 26(3), 167-171.
- Mukherjee, A., y RoyChowdhury, B. (2008). The *in vitro* propagation of *Aloe vera*. *Techno India Group Research Journal*, 1(2), 116-119.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Natali, L., Sanchez, I. C., y Cavallini, A. (1990). *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill.: Micropropagation from vegetative meristems. *Plant cell, tissue and organ culture*, 20(1), 71-74.
- Orellana P. (1998). Propagación vía organogénesis. En J.N. Pérez-Ponce (Ed.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología* (pp. 151-178). Santa Clara, Cuba: Ediciones GEO.
- Pellizzoni, M., Kalhotka, L., y LUCINI, L. (2012). Antimicrobial activity of different *Aloe barbadensis* Mill. and *Aloe arborescens* Mill. leaf fractions. *Journal of Medicinal Plant Research*, 6(6), 1975-1981.
- Pérez, J. N., Suárez, M., y Orellana, P. (2000). Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. *Biotechnología Vegetal*, 1, 3-12.
- Prakash S., Hoque M. y Brinks T. (2004). Culture media and containers. En Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture (pp. 29-40). Austria: Impreso por International Atomic Energy Agency (IAEA).
- Preil W. 2005. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. En A.K. Hvorslef-Eide y W. Preil (Eds.). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 1-18). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Ramachandra, C. T., y Rao, P. S. (2008). Processing of *Aloe vera* leaf gel: a review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3(2), 502-510.
- Roy, S. C., y Sarkar, A. (1991). *In vitro* regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. *Scientia Horticultrae*, 47(1), 107-113.
- Satyahari D. (2005). Cost-effective mass cloning of the plants in liquid media using a novel growtek bioreactor. En A.K. Hvorslef-Eide y W. Preil (Eds.). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 127-141). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Savangikar V. (2004). Role of low cost options in tissue culture. En Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture (pp. 11-15). Austria: Impreso por International Atomic Energy Agency (IAEA).
- Statistix, 8. 2003. Statistix 8: Analytical Software User's Manual. Tallahassee, Florida, U.S.A.
- Supe, U. J. (2007). *In vitro* regeneration of *Aloe barbadensis*. *Biotechnology*, 6(4), 601-603.
- Tanabe, M. J., y Horiuchi, K. (2006). *Aloe barbadensis* Mill. ex vitro autotrophic culture. *Journal of Hawaiian and Pacific Agriculture*, 13, 55-59.
- Ujjwala J. 2007. *In vitro* regeneration of *Aloe barbadensis*. *Biotechnology* 6: 601-603.
- Vilchez, J., Ferrer, O., y Albany, N. (2007). Multiplicación *in vitro* de zábila en sistema de inmersión temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 24(01), 78-82.

Optimización de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea spp* por crecimiento mínimo

Optimization of *in vitro* conservation of *Dioscorea spp* germplasm by minimal growth

Lucía Candelaria Díaz Narváez*, Oscar Elías Carmona Wilches**,
Javier Darío Beltrán Herrera***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50842

Resumen

El ñame Criollo (*Dioscorea alata*) y el ñame Espino (*Dioscorea rotundata*) se constituyen como las dos especies mayormente cultivadas en el departamento de Sucre, Colombia. Por esta razón en la Universidad de Sucre se han implementado técnicas para lograr su conservación mediante la propagación *in vitro*, sin embargo esta metodología conserva las accesiones por un periodo no mayor a los 4 meses, provocando continuos subcultivos, aumento de costos y mano de obra. Por ello la presente investigación tuvo como objetivo establecer medios de cultivo óptimos para la conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de diferentes accesiones (*D. alata* y *D. rotundata*) pertenecientes al banco de germoplasma de la Universidad de Sucre, durante un periodo de 8 meses. Esto mediante la modificación del medio de cultivo base MS; con los siguientes osmolitos: sacarosa, manitol y sorbitol. Se evaluaron 8 tratamientos (T) en los siguientes porcentajes T₁ (control) (3:0:0), T₂ (0:1,5:0), T₃ (0:0:2), T₄ (0:1,5:2), T₅ (0:0:1) y T₆ (0:0:3), T₇ (0:1,5:1) y T₈ (0:1,5:3). Cada 30 días se evaluó: supervivencia (%), hojas expandidas (%), longitud del tallo y raíz, número de nudos y raíces, oxidación (%), senescencia foliar (%) y callo (%). Los resultados mostraron que las especies *D. alata* y *D. rotundata*, se conservan de forma óptima, en la combinación T₄ (0:1,5:2), donde se evidencia un alto porcentaje de supervivencia, un mínimo porcentaje de senescencia foliar y un desarrollo restringido en el resto de variables. Garantizando así la disponibilidad y el desarrollo normal de las accesiones en un periodo superior a 4 meses.

Palabras clave: ñame, manitol, sorbitol, sacarosa.

Abstract

Dioscorea alata cv. "Criollo" and *Dioscorea rotundata* cv. "Espino" are constituted as the two cultivars mostly cultivated in the department of Sucre, Colombia. For this reason the University of Sucre has been implementing tissue culture techniques for their multiplication throughout *in vitro* propagation. However, this methodology support accessions for a period about 4 months, causing continuous subcultures, increased costs and labor. Therefore the objective of the present investigation was to establish an optimal culture media for *in vitro* minimal growth conservation of different accessions (*D. alata* and *D. rotundata*) from the University of Sucre yam's genebank, for a period of 8 months by modifying the basic MS culture medium. The following osmolytes were used: sucrose, mannitol and sorbitol in different percentages (S:M:S). Eight treatments (T) in the following percentages were evaluated: T₁ (control) (3:0:0), T₂ (0:1,5:0), T₃ (0:0:2), T₄ (0:1,5:2), T₅ (0:0:1) y T₆ (0:0:3), T₇ (0:1,5:1) y T₈ (0:1,5:3). Every 30 days data was recorded for: survival (%), expanded leaves (%), length of stem and roots, number of leaves and roots, phenolization (%), leaf senescence (%) and callus presence (%). The best results for *D. alata* and *D. rotundata*, were observed in treatment T₄ (0:1,5:2), where a high percentage of survival evidence, a minimum percentage of leaf senescence and a limited response for the other variables. Therefore, these results indicate the potential of this media, to increase 100% *in vitro* growth conservation over the conventional media, and ensuring the viability and normal development of the accessions for more than four months period.

Key words: yam, mannitol, sorbitol, sucrose.

Recibido: junio 10 de 2014

Aprobado: marzo 26 de 2015

* Bióloga. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre. lucadina@537hotmail.com

** Biólogo. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre. menfis2226@hotmail.com

*** Phd. Fitopatología. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre. darbelt2003@yahoo.com

Introducción

Dioscorea es uno de los seis géneros pertenecientes a la familia *Dioscoreaceae* que comprende más de 650 especies distribuidas en las zonas tropicales de alta pluviosidad (Thurston, 1998). El ñame *Dioscorea* sp, es un tubérculo de gran importancia para los pequeños productores de la región caribe colombiana, de este cultivo dependen numerosas familias de agricultores de esta región (Reina, 2012), y desarrollo de mercados en el marco de los tratados de libre comercio (TLC). Por lo cual desarrollar investigaciones orientadas a la comprensión de sus características y a buscar soluciones a los problemas presentados por el cultivo es de vital relevancia.

En el departamento de Sucre las especies más cultivadas son el ñame “Espino” (*Dioscorea rotundata*) y el ñame “Criollo” (*Dioscorea alata*), con un 75% de la cantidad total cultivada (Reina, 2012). En esta zona del país el ñame se produce de forma vegetativa mediante el fraccionamiento de los tubérculos, ocasionando, en algunos casos, la transferencia de enfermedades de un ciclo a otro y de una localidad a otra. (Rodríguez, et al., 2008). Por ello surgió la iniciativa de implementar nuevas metodologías para la conservación de estas especies, tal como el cultivo *in vitro*. A través de esta metodología la Universidad de Sucre estableció un banco de germoplasma en el cual se resguardan las especies anteriormente mencionadas.

La conservación de este cultivo en un banco de germoplasma constituye la solución a los problemas presentados por el cultivo en campo. Existen reportes sobre micropropagación de algunos ñames comestibles como *D. rotundata* cv. “Espino” (Acosta y Beltrán, 2001); *D. alata* cv “Pico de Botella” (Rodríguez y Beltrán, 2001); embriogénesis somática en *D. alata* cv “Diamante 22” (Espitia y Quintero, 1999) (citados en Salazar, 2002). Sin embargo, el cultivo *in vitro* de *Dioscorea* spp presenta desventajas tales como períodos cortos entre subcultivos (3 a 4 meses), que traen como consecuencia el aumento de costos y uso de mano de obra, afectando la estabilidad genética de las accesiones y comprometiendo la asepsia de las mismas (Acedo y Arradoza, 2006).

En este sentido fue necesario aplicar un nuevo método de conservación que permitiera extender los periodos de subcultivo y así evitar la pérdida del material, el aumento de costos y mano de obra. Este método es denominado conservación bajo crecimiento mínimo, con el cual se logra restringir de forma directa el crecimiento y desarrollo de una planta mediante el estrés osmótico controlado que generan algunos componentes del medio de cultivo, tales como los azúcares y azúcares de alcohol en combinación con parámetros ambientales controlados (Neiva y Jiménez, 2010). Existen reportes de conservación en *Dioscorea*, spp como “*Dioscorea alata* L, clon “Cara-

queño” (Borges et al., 2009), en este estudio lograron conservar y regenerar plantas *in vitro* a partir de segmentos uninodales de *D. alata* L clon caraqueño durante 9 y 12 meses, con diferentes concentraciones de manitol, sacarosa y BAP, también se han realizado estudios en otras especies como “*Dioscorea alata*, *D. rotundata*, *D. bulbifera* y *D. trifida*” (Carmona, et al., 2013), lograron conservar cuatro especies *in vitro* de ñame a partir de la combinación de sacarosa, manitol y sorbitol por un periodo superior a seis meses. Estos métodos han sido exitosos, sin embargo en esta última investigación las especies respondieron de forma distinta a los diferentes tratamientos, de tal manera que cada especie tenía un medio en el cual se mantuvo bajo las condiciones de conservación adecuadas durante la investigación.

Por las razones anteriormente expuestas este trabajo tuvo como objetivo establecer medios de cultivo óptimos para la conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de diferentes accesiones pertenecientes al Banco de Germoplasma de ñame de la Universidad de Sucre. Esto durante un periodo de 8 meses y con base en la modificación del medio de cultivo con distintos niveles de manitol y sorbitol de forma individual y combinada.

Materiales y métodos

Ubicación geográfica

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, sede Puerta Roja. Esta se ubica en la ciudad de Sincelejo, cuya posición geográfica en Colombia es 9° 18' de latitud norte y 75° 23' de longitud oeste del meridiano de Greenwich. Ortega et al. (2011).

Técnicas y procedimientos generales

Obtención del material vegetal

Se prepararon medios de micropropagación para el establecimiento de las plantas madre. Estos consistieron en sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), sacarosa 30 g/L, carbón activado 2 g/L, ANA 0,5 mg/L, BAP 4 mg/L, tiamina 1mg/L, mioinositol 0,1g/L, agar 8 g/L, para *Dioscorea alata*. Para *Dioscorea rotundata* se prepararon medios con las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), sacarosa 30 g/L, carbón activado 2 g/L, ANA 0,1 mg/L, BAP 0,3 mg/L, tiamina 1 mg/L, mioinositol 0,1g/L, y agar 3,25 g/L.

El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 y se distribuyó en frascos de 182 cm³, a razón de 20 ml por frasco. Finalmente se esterilizó por 20 min. a 15 psi y 121 °C. Los medios se observaron 7 días, antes de su uso, para descartar contaminación preliminar.