

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Uso de Matrices de Almidón como Sustituto de Agar en Medios
de Cultivo *In Vitro*

por:

JOSELINNE PAMELA SÁNCHEZ GONZÁLEZ.

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2025.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE AGRONOMIA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Uso de Matrices de Almidón como Sustituto de Agar en Medios
de Cultivo *In Vitro*

Por:

JOSELINNE PAMELA SÁNCHEZ GONZÁLEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGRICULTURA

Aprobada por el Comité de Asesora:

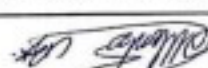
Dra. Aida Isabel Leal Robles
Asesor Principal



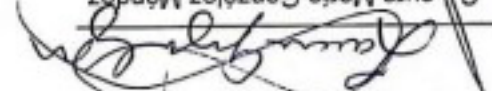
Dra. Silvia Yudit Martínez Amador
Coasesor



Dra. María Montserrat Cruz Benítez
Asesor Principal Externo



M. C. Laura María González Méndez



Saltillo, Coahuila, México.
Diciembre, 2025.

DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



Joseline Pamela Sánchez González

Firma y nombre

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fuerza, fortaleza, paciencia e inteligencia para concluir una etapa importante de mi vida, por sus cuidados y detalles durante el proceso, por sus constantes bendiciones, por qué, a pesar de las adversidades, nunca me dejó sola y me sostuvo en su mano con mucho amor. *-Salmos 94:18-*.

A mi alma mater la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por proporcionarme las herramientas necesarias para crecer académica, personal y profesionalmente, por fortalecer mi formación ética, por enriquecer mi vida con amistades, compañeros, y experiencias inolvidables que siempre llevaré conmigo.

Al departamento de botánica y todos los que forman parte de él por enriquecer el conocimiento, estimular el amor y pasión por el estudio de especies, y el impacto generado en mí para conocer el maravilloso mundo de la agrobiología.

Al laboratorio de alimentos y a la M. C. Mónica por proporcionar el texturometro para el análisis de medios de cultivo y por la asesoría para el uso adecuado del mismo.

Al centro de investigación en química aplicada (CIQA) por la donación de materia prima para la elaboración de medios de cultivo.

A la Dra. Aida Isabel Leal Robles por apoyarme en la realización de este trabajo, por la confianza, el tiempo, paciencia y conocimiento que compartió conmigo, por no desistir y motivarme a culminar esta etapa.

A la Dra. María Montserrat Cruz Benítez, por la confianza, por todo el tiempo que dedicó a lo largo de este proyecto, por el conocimiento que me brindó, en el área fisicoquímica, por la disposición y por su gran paciencia y persistencia en la realización de este trabajo.

Al M. C. Nelson Eduardo Ríos Hernández por el tiempo y paciencia dedicado para el análisis estadístico de los datos en el programa Rstudio y resolución de dudas.

A mis padres Germán Sánchez Cortez y Alejandra González Peña, por confiar en mí y permitirme alzar vuelo para cumplir mis sueños, por su amor y apoyo incondicional, por qué a pesar de la distancia están pendientes de mí, me siguen abrazando con sus muestras de amor y sus sabios consejos, para poder ser la mujer que soy hoy día, los amo profundamente.

A mis hermanos Miguel Ángel Sánchez González y Daniela Sánchez González, por el amor que me han brindado a lo largo de nuestra vida, por hacerme sentir querida y cobijada cada que volvemos a encontrarnos, por los consejos y por el apoyo de todo tipo, por ser parte de mi vida y permitirme ser parte de la suya.

A mis amigos que la universidad me brindó, Everardo, Raúl, Mary Cruz, Abigail Sánchez, Juan Carlos Rodas, por las experiencias y momentos inolvidables que vivimos juntos durante la estancia universitaria, agradezco de una manera especial a Carolina Curiel, José Jiménez, Zdenko Arellano, por la amistad, consejos y apoyo que me brindaron en esta etapa de mi vida por los momentos que me permitieron compartir y por los aprendizajes que vivimos juntos, a Ameyali Cepeda por su amistad y apoyo incondicional por estar cuando mi ánimo se vio decaído.

A mi novio Beni, por la relación tan bonita que hemos construido, por su amor, apoyo paciencia y motivación en este proceso. Su comprensión en los momentos de dificultad, sus palabras de aliento y su constante compañía hicieron posible que pudiera mantenerme enfocada y culminar este proyecto, este logro también es reflejo de su amor y confianza en mí, gracias por ser el hombre tan especial que es conmigo, le amo inmensamente.

A la familia de mi novio porque desde que me conocen, me han hecho sentir cobijada, y apreciada, por el apoyo brindado y por siempre tratarme con amabilidad.

A la iglesia Príncipe de paz por el apoyo a distancia por sus plegarias para que mis metas pudieran cumplirse.

DEDICATORIA

A mis padres Alejandra González Peña y Germán Sánchez Cortez quienes son mi sostén, mi guía y mi mayor ejemplo. Dedico este trabajo a ustedes, que con esfuerzo paciencia y amor incondicional han acompañado cada paso de mi formación. Gracias por enseñarme que la disciplina, la perseverancia y la fe son caminos seguros hacia cualquier meta, por brindarme palabras de aliento en momentos difíciles y por celebrar conmigo cada pequeño logro.

Su confianza en mí ha sido la fuerza que me impulsó a continuar incluso cuando el camino parecía incierto. Todo lo que he logrado es fruto del esfuerzo que ustedes han hecho a lo largo de mi vida, de los sacrificios silenciosos y del amor que me ha sostenido en cada etapa. Esta tesis es un testimonio del impacto profundo que han tenido en mi vida y un sincero agradecimiento por todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos Daniela Sánchez González y Miguel Ángel Sánchez González, quienes han sido compañeros de vida y una fuente constante de apoyo. Gracias por su cariño por sus palabras de ánimo y por estar presentes en cada etapa de este camino. Su compañía ha hecho más ligeros los momentos difíciles y más felices los logros alcanzados

Este trabajo es también para ustedes, porque cada uno ha contribuido de manera especial a mi crecimiento personal y profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE NO PLAGIO.....	I
AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA.....	III
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE ANEXOS	XI
RESUMEN	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1.Objetivo General.....	16
1.2.Objetivos Específicos	16
1.3.Hipótesis.....	16
1.4.Justificación	17
II. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1.Relevancia De La Biotecnología En El Desarrollo Agrícola.....	18
2.2.Antecedentes Del Cultivo <i>In Vitro</i>	18
2.3.Técnica <i>In Vitro</i>	20
2.3.1.Selección y/o Preparación De La Planta Madre/Donante	22
2.3.2.Obtención Y Desinfección De Explantes O Semillas De La Planta	23
2.3.3.Introducción Del Material Seleccionado Al Medio De Cultivo (Siembra).....	24
2.3.4.Multiplicación De Brotes	26
2.3.5.Enraizamiento	26
2.3.6.Aclimatación.....	27
2.4.Cultivo <i>In Vitro</i> En Nuestros Días	29

2.5.Composición Y Consideraciones De Los Medios De Cultivo <i>In Vitro</i>	31
2.6.Agentes Gelificantes.....	37
2.7.Características De Los Agentes Gelificantes.....	38
2.8.Agentes Gelificantes Alternativos Al Agar	43
2.9.Almidón.....	45
2.9.1.Composición Química Del Almidón.....	45
2.9.1.1.Amilosa.....	46
2.9.1.2.Amilopectina.....	47
2.9.2.Tratamientos Térmicos Del Almidón	51
2.9.2.1.Gelatinización.....	51
2.9.2.2.Gelación	52
2.9.2.3.Retrogradación.....	55
2.9.3.Antecedentes Del Uso De Almidón Como Matriz Gelificante....	55
2.10.Generalidades De La Familia Asparagaceae	56
2.10.1.Importancia Ecológica Del Género <i>Agave</i>	57
2.10.2.La Técnica <i>In Vitro</i> Para La Propagación De Especies Del Género <i>Agave</i>	58
III. METODOLOGÍA.....	61
3.1.Formulación De Matrices Gelificantes	62
3.1.1.Concentración Mínima De Gelificación	62
3.2.Elaboración De Medios De Cultivo	63
3.2.1.Caracterización De Las Matrices Gelificantes (Almidón De Maíz Y Papa)	66
3.2.1.1.Contenido De Humedad	66
3.2.1.2.Análisis De Perfil De Textura (TPA) De Los Agentes Gelificantes	67
3.3.Siembra E Incubación De Explantes	69

	3.4.Análisis Estadístico.....	72
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	73
	4.1.Capacidad Mínima De Gelificación.....	73
	4.2.Caracterización De Los Agentes Gelificantes.....	76
	4.2.1.Contenido De Humedad.	76
	4.2.2.Análisis De Perfil De Textura De Los Geles (TPA)	77
	4.3.Evaluación De Los Efectos De La Sustitución Parcial De Agar	83
	4.3.1.Porcentaje De Germinación	83
	4.3.2.Longitud Del Hipocótilo (Altura)	88
	4.3.3.Peso Fresco De Las Plántulas.....	90
	4.3.4.Longitud De Raíz	92
	4.4.Comparación De Costos En Insumos Utilizados Para La Elaboración De Medios Para Cultivo <i>In Vitro</i>	94
V.	CONCLUSIONES.....	97
VI.	RECOMENDACIONES	99
VII.	BIBLIOGRAFÍA	100
VIII.	ANEXOS	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas madre en diferentes estados de desarrollo selectas para la obtención de segmentos vegetales. A) plantas juveniles completas de olivo. Adaptada de Vidoy-Mercado, 2014. B) plántulas en crecimiento. Adaptada de Guzmán-González, 2015	23
Figura 2. Obtención de explantes de olivo, de una planta juvenil completa, tipo de explante: de un solo nudo (Bayraktar, <i>et al.</i> , 2020).....	24
Figura 3. Siembra de explantes de un solo nudo en el medio de cultivo estéril, inicio de ciclo de cultivo <i>in vitro</i> (Vidoy-Mercado, 2014).....	25
Figura 4. Generación de brotes <i>in vitro</i> . A) regeneración de brotes de de explantes nodales, 30 días después de iniciado el ciclo de cultivo <i>in vitro</i> , B) explantes nodales regenerados 45 días después de inicio de cultivo. Adaptada de Bayraktar, 2020.....	26
Figura 5. Enraizamiento de explantes A) enraizamiento <i>in vitro</i> , B) enraizamiento <i>ex vitro</i> . Adaptada de Vidoy-Mercado, 2014.	27
Figura 6. Aclimatación de plántulas, A) trasplante de explantes a charolas germinadoras, B) acondicionamiento de plántulas a condiciones naturales de forma gradual, cubriendo con un plástico. Adaptada de Vidoy-Mercado, 2014.	29
Figura 7. Problemas en explantes relacionados con el potencial hídrico del agente gelificante durante el proceso <i>in vitro</i> . A) <i>Aloe polyphylla</i> , a la izquierda es una planta saludable que se extrae del cultivo de tejidos, a la derecha la planta presenta síntomas hiperhídricos. Adaptada de: Ivanova y Van-Staden, 2011. B) explantes que presentan hiperhidricidad y vitrificación. Adaptada de: Veitía, <i>et al.</i> , 2012. C) explante con necrosis. Adaptada de: Bayraktar, 2020.....	40
Figura 8. Estructura de la amilosa con enlaces α -(1→4)-glucano. La molécula lineal puede presentar algunas cadenas moderadamente largas con enlaces α -(1→6). (Tester, <i>et al.</i> , 2004).....	46
Figura 9. Estructura de Amilopectina: con enlaces glucosídicos A) α -(1→6) y B) α -(1→4). Tanto A) como B) varían según el origen botánico. Adaptada de Meneses, <i>et al.</i> , 2007.....	47
Figura 10. Representación esquemática de la estructura laminar de un gránulo de almidón (A) pilas de laminillas microcristalinas separados por anillos de	

crecimiento amorfos. (B) vista ampliada de las regiones amorfa y cristalina. (C) estructuras de doble hélice (Adaptado de Tester y Xin-Qi, 2004).	48
Figura 11. Micrografías (SEM) de almidones obtenidos de diversas fuentes botánicas: A) arroz, B) trigo, C) papa, y D) maíz. Adaptada de: Singh, <i>et al.</i> , 2003.	49
Figura 12. Representación gráfica del hinchamiento y la gelatinización de los gránulos de almidón en presencia de agua. Adaptado de Acosta-Guizado, 2023	52
Figura 13. Transiciones de fase (gelatinización y gelación) en almidón sometido a procesos hidrotérmicos. Adaptado de Fernández-Ocegeda, 2018.	54
Figura 14. Metodología general para el desarrollo del proyecto de Uso de matrices de almidón como sustituto de agar en medios de cultivo <i>in vitro</i>	61
Figura 15. Determinación de capacidad mínima de gelificación.....	62
Figura 16. Elaboración de medio de cultivo.	64
Figura 17. Determinación de porcentaje de humedad de almidones, (A-B) proceso para recipientes a peso constante, (C) Registro de masa inicial del recipiente y (D) Peso del almidón.	67
Figura 18. Preparación de geles para el análisis de perfil de textura.	68
Figura 19. Obtención de fragmentos de gel para análisis TPA, A) desmoldado de geles, B) flagelación de gel para obtener muestras adecuadas a los requerimientos del análisis, C) fragmentos de gel obtenidos D) medición de las dimensiones de los fragmentos de gel.....	68
Figura 20. Gel de almidón sometido a prueba de análisis de perfil de textura.	69
Figura 21. Tratamiento pre siembra de semillas. A) remojo de semillas por 24 horas, B) lavados de desinfección el día de siembra, C) vaciado de semillas en cajas Petri para evitar contaminación en la siembra.	71
Figura 22. Procedimiento siembra e incubación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Agave potatorum</i> Zucc. A) siembra de semilla en tubo de ensaye, B) etiquetado, y sellado con aluminio y emplaye, de tubos post-siembra, C) incubación de semillas post-siembra, bajo condiciones controladas.	71
Figura 23. Evaluación de efectos de la sustitución parcial y total de agar en plántulas de <i>Agave potatorum</i> Zucc. A) extracción de plántulas <i>in vitro</i> B) lavado de raíces para quitar residuos de gelificante C) medición de altura de planta D)	

medición de raíces de plántulas obtenidas <i>in vitro</i> E) pesado de plántulas obtenidas <i>in vitro</i> (peso fresco).....	72
Figura 24. Concentración mínima de gelificación (A - E almidón de maíz, F – J almidón de papa) A) almidón al 2 % muy líquido B) formación de gel suave al 4 %, C) almidón gelificado al 6 %, D) obtención de gel firme al 8 %, E) gel firme al 10 %, F) almidón de textura viscosa al 2 % G) almidón de textura viscosa al 4 % H) formación de gel suave 6 % I) almidón gelificado al 8 % J) obtención de gel firme al 10 %.....	76
Figura 25. Germinación de semillas de <i>Agave potatorum</i> Zucc. en medios gelificados con 3 tipos de agentes gelificantes, A)-F) almidón de maíz a diferentes concentraciones, G)-L) almidón de papa a diferentes concentraciones, M) y N) agar (control).....	84
Figura 26. Porcentaje de germinación para <i>Agave potatorum</i> Zucc. <i>in vitro</i> usando diferentes matrices gelificantes como medio de cultivo, A) Medio de cultivo: almidón de maíz. B) Medio de cultivo: almidón de papa.....	87
Figura 27. formación de callos en semillas de <i>Agave potatorum</i> Zucc., A) Formación de callo en semilla con medio gelificado con almidón de maíz, B) formación de callo en medio gelificado con agar C)-E) formación de callo en medios gelificados con almidón de papa.	88
Figura 28. Altura de plantas de <i>Agave potatorum</i> Zucc. usando diferentes matrices gelificantes como medio de cultivo, A Medio de cultivo: almidón de maíz. B Medio de cultivo: almidón de papa.	90
Figura 29. Peso fresco de plántulas de <i>Agave potatorum</i> Zucc.	91
Figura 30. Longitud de raíz para plantas de <i>Agave potatorum</i> Zucc., cultivadas en medios de cultivo <i>in vitro</i> gelificados con almidones; A medios gelificados con almidón de maíz, B medios gelificados con almidón de papa.....	94

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición orgánica de los medios de cultivo.	32
Cuadro 2. Componentes inorgánicos en medios de cultivo más utilizados.	34
Cuadro 3. Contenido de microsales en medios de cultivo más utilizados en la técnica <i>in vitro</i>	36
Cuadro 4. Composición química de diferentes almidones botánicos. Adaptación de Avérous y Halley, 2009.	50
Cuadro 5. Características del perfil térmico de almidones de diferentes fuentes botánicas.	54
Cuadro 6. Estudios de propagación <i>in vitro</i> de diferentes especies del género Agave. Adaptado de Domínguez-Rosales, <i>et al.</i> , 2008.	59
Cuadro 7. Diseño de experimentos seguido para la elaboración de los medios de cultivo.	65
Cuadro 8. Concentración mínima de gelificación de los agentes gelificantes sustitutos en medios de cultivo.	75
Cuadro 9. Parámetros calculados para el análisis de perfil de textura por compresión.	82
Cuadro 10. Costos de insumos utilizados en medios de cultivo para genero Agave.	96

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Grafica de dureza de los agentes gelificantes en sus distintas concentraciones utilizados en la elaboración de medios de cultivo.	116
Anexo 2. Grafica de adhesividad de los agentes gelificantes en sus distintas concentraciones utilizados en la elaboración de medios de cultivo.	117
Anexo 3. Grafica de elasticidad de los agentes gelificantes en sus distintas concentraciones utilizados en la elaboración de medios de cultivo.	117
Anexo 4. Grafica de cohesividad de los agentes gelificantes en sus distintas concentraciones utilizados en la elaboración de medios de cultivo.	118
Anexo 5. Grafica de fracturabilidad de los agentes gelificantes en sus distintas concentraciones utilizados en la elaboración de medios de cultivo.	118
Anexo 6. Germinación de semillas de Agave potatorum Zucc. en medios de cultivo gelificados con almidón de maíz a diferentes concentraciones: A) Ag_M740 B) Ag_M760 C) M7100 D) Ag_M1040 E) Ag_M1060 F) M10100. .	119
Anexo 7. Germinación de semillas de Agave potatorum Zucc. En medios gelificados con almidón de papa a diferentes concentraciones: A) Ag_P740 B) Ag_P760 C) P7100 D) Ag_P1040 E) Ag_P1060 F) P10100.....	119
Anexo 8. Germinación de semillas de Agave potatorum Zucc. en medio control (Agar).....	120

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar una matriz gelificante funcional a partir de almidones naturales (papa y maíz) como sustitutos del agar en medios de cultivo *in vitro*, y evaluar su eficiencia en la germinación y desarrollo de semillas de *Agave potatorum* Zucc. El proyecto se dividió en tres etapas: (I) formulación de las matrices gelificantes, (II) caracterización fisicoquímica y mecánica de los geles, y (III) siembra e incubación de los explantes.

Los resultados demostraron que el **almidón de papa** proporcionó condiciones significativamente favorables para la germinación y el crecimiento de las plántulas en comparación con el almidón de maíz y el agar. Los medios elaborados con almidón de papa formaron geles de textura adecuada, baja fracturabilidad y alta retención de agua, lo que permitió una liberación gradual de nutrientes y un soporte físico adecuado para los explantes. Los tratamientos con almidón de papa al 10 % (P10100, Ag40_P1060) alcanzaron los mayores porcentajes de germinación (superiores al 80 %), alturas de plántulas de hasta 140 mm, peso fresco de 2.17 g y elongación radicular cercana a 40 mm. En contraste, los medios con almidón de maíz mostraron mayor dureza y rigidez, limitando la absorción de agua y nutrientes, con valores de germinación y crecimiento considerablemente menores.

Se estableció una correlación directa entre la consistencia del medio y el desarrollo vegetal: los geles más suaves y menos fracturables favorecieron la expansión celular, la absorción de agua y la disponibilidad de nutrientes. Los resultados, sugieren que el almidón de papa es un insumo que puede utilizarse como un sustituto funcional y económico del agar en el cultivo *in vitro* de *Agave potatorum* Zucc., al optimizar la estructura del medio, mejorar la eficiencia nutricional y reducir los costos de producción por litro de medio.

Palabras clave:

Cultivo *in vitro*, almidón de papa, almidón de maíz, *Agave potatorum* Zucc., gelificantes alternativos, germinación.

I. INTRODUCCIÓN

Debido al incremento poblacional a nivel mundial ha surgido especial interés por la biotecnología vegetal debido a que ofrece la posibilidad de potenciar la producción de alimentos mediante el mejoramiento de cultivos, permitiendo su adaptación a diversas condiciones climáticas y edáficas de esa forma abastecer las demandas de diversas plantas de interés económico y cultural (Amaro-Rosales y Villavicencio-Carbajal, 2014).

En la actualidad, la biotecnología vegetal es un área importante para el desarrollo tecnológico, gracias a esta ciencia, se han llevado a cabo diversos avances en el ámbito agrícola, uno de ellos, es la propagación de plantas utilizando el método de cultivo *in vitro* (Tafolla-Rodríguez, 2018).

La técnica de cultivo *in vitro* consiste en introducir, multiplicar y regenerar, material vegetal, este método es muy valioso en la conservación y rescate de especies amenazadas, pues mediante esta técnica, se pueden propagar de manera eficiente especies de lento crecimiento, carentes de semillas, o de semilla tardía a fin de obtener un mayor número de ejemplares para perpetuar la especie de interés (Cañal, *et al.*, 2001).

Es crucial para el desarrollo de la planta mantener controlado el ambiente donde se desarrolla el explante, pues de esto depende su supervivencia, (Borges-García, 2009). Para un desarrollo eficiente de los cultivos *in vitro* se requiere de medios compuestos por sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, carbohidratos y aminoácidos, que aporten a los explantes los elementos necesarios para mejorar la calidad y viabilidad de la planta (Szabados, *et al.*, 1991), estos medios de cultivo pueden ser semisólidos o líquidos.

Los medios de cultivo líquidos presentan nutrientes distribuidos homogéneamente lo que mejora su disponibilidad y permite un crecimiento rápido (Grandes-Navarro, 2017). Sin embargo, este tipo de medios presenta algunos inconvenientes a diversas especies, principalmente leñosas, tales como, vitrificación, necrosis, hiperhidratación, succulencia y cristalización, afectando a procesos importantes realizados por las hojas, como la fotosíntesis e intercambio

gaseoso (Jiménez-Bonilla y Abdelnour, 2017; Perugorría-Larroque, 2012), por lo que es necesario el uso de una matriz gelificante en el medio de cultivo.

El gelificante suele ser un sólido que se disuelve por calentamiento a altas temperaturas (cerca de los 100 °C) y al enfriarse adquiere la consistencia de gel necesaria para que el medio de cultivo confiera sostén a los explantes (Loaiza-Alanis, 2008). Los gelificantes deben cumplir con una serie de requisitos: (I) no ser asimilado por el explante (para evitar que el medio regrese a estado líquido), (II) no interferir en la absorción de los nutrientes del medio de cultivo, y (III) permanecer estable durante el tiempo de cultivo (Sharry, *et al.*, 2015). Uno de los mejores agentes gelificantes disponibles para realizar cultivos *in vitro* de tejidos vegetales es el agar, también conocido como agar-agar.

El agar es el agente gelificante más utilizado en los medios de cultivo *in vitro*, sin embargo, el principal inconveniente que presenta es su costo tan elevado, ya que se ha generado una sobreexplotación de algas para su elaboración, incrementando hasta un 70 % del costo total del medio (Mohamed, *et al.*, 2010). Debido a ello, diversos estudios se han propuesto desarrollar matrices gelificantes de fuentes alternativas que además de presentar las propiedades necesarias para la propagación de cultivos vegetales permitan reducir los costos de procesamiento.

Entre las fuentes alternativas estudiadas, está, el uso de exudados bacterianos (goma xantana) (Lima-Ribeiro, *et al.*, 2022), y gomas extraídas de algunas plantas (goma guar) (López-Escamilla, *et al.*, 2016), sin embargo, ha destacado el uso de almidones, gracias a que provienen de fuentes renovables y es de bajo costo.

El almidón está integrado por dos polisacáridos, amilosa y amilopectina; sus características estructurales y químicas difieren de acuerdo con la botánica utilizada para su obtención, gracias a su conformación estructural, presenta propiedades fisicoquímicas (gelación-gelificación) similares al agar, que permiten su implementación como gelificante en procesos de propagación vegetativa (Martínez-Ortiz, 2007).

Kuria, *et al.* (2008), reportaron que el almidón de yuca funciona como soporte en la proliferación de segmentos nodales de papa (*Solanum tuberosum*). En otro estudio, se compararon cuatro concentraciones diferentes de almidón de papa para la propagación *in vitro* de Lulo o naranjilla (*Solanum quitoense*), evaluando la influencia del agente gelificante, en el crecimiento de los explantes, obteniendo diferencias estadísticas en los explantes cultivados en medios de agar modificado (Martín-Gordo, *et al.*, 2017).

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se desarrollaron matrices gelificantes a partir de almidón de diferentes fuentes botánicas (maíz y papa), además, se evaluaron los requerimientos necesarios para emplearse en la elaboración de medios de cultivo, con la finalidad de sustituir total o parcialmente el uso de agar y de esta forma, reducir costos, así como emplearse en la propagación de especies vegetales de interés económico, ecológico y/o cultural.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollo de una matriz gelificante óptima, a partir de almidón de papa o maíz, para la elaboración de medios de cultivo y su evaluación en la germinación *in vitro* de semillas de la familia Asparagaceae.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar las características físicas del agar y los almidones seleccionados para emplearse en la elaboración de una matriz gelificante.
2. Determinar las condiciones óptimas de gelificación del almidón (temperatura, tiempo, concentración), necesarias para formar una matriz gelificante.
3. Analizar la respuesta de germinación de semillas de *Agave potatorum* Zucc. al utilizar una matriz de almidón en el medio de cultivo *in vitro*.

1.3. Hipótesis

La capacidad gelificante del almidón permitirá desarrollar una matriz gelificante capaz de soportar un explante y que además permita la liberación gradual de nutrientes, representando un sustituto de agar en la elaboración de los medios de cultivo *in vitro*.

1.4. Justificación

La agricultura moderna depende en gran medida de la tecnología y las ciencias físicas y biológicas por ello se tiene el interés de descubrir alternativas eficientes y menos costosas para el correcto desarrollo de estas ciencias, así como respaldo de esta noble profesión, potenciando sus ingresos y producción de una manera sustentable y económica.

El método de cultivo *in vitro* es muy importante en la agricultura ya que mediante esta técnica se puede incrementar la producción de muchas plantas de interés comercial y ecológico. Para realizar esta técnica se requieren diversos insumos, siendo uno de los más importantes el gelificante, la matriz gelificante por excelencia es el agar, este material vital para esta técnica resulta muy eficiente, sin embargo, es costoso.

Debido a que se utilizarán almidones de diferentes fuentes botánicas como agente gelificante se puede llegar a la independencia de alguna marca o casa comercial pues su adquisición en estos establecimientos es más costosa y eleva la inversión total en los proyectos de propagación *in vitro* de plantas en laboratorio. Además de que el almidón es una fuente renovable, de bajo costo y fácil adquisición.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Relevancia De La Biotecnología En El Desarrollo Agrícola

El descubrimiento de la biotecnología trajo consigo un gran impacto en el desarrollo de la investigación de ciencias biológicas. Los resultados de esta ciencia, han influido en diversos sectores, por ejemplo, en ciencias de la salud, con la creación de antibióticos y vacunas, en la industria de alimentos, con el uso de microorganismos como las levaduras para el proceso de fermentación, o la creación de enzimas catalizadoras para degradar o generar componentes químicos, entre otras aplicaciones (Chawla, 2000).

Sin embargo, en el campo de la agricultura, las aplicaciones de la biotecnología son inmensurables, pues el desarrollo de insumos y técnicas de reproducción y rendimiento han permitido potenciar los ingresos económicos, además, con la creación de variedades resistentes a distintas plagas, enfermedades o condiciones climáticas desfavorables, se ha logrado mitigar los efectos adversos al ambiente y obtener una rápida producción de plantas nuevas, de esta forma, se ha incrementado la comercialización, reintroducción y/o preservación (para especies que se encuentran amenazadas o de crecimiento y desarrollo tardío) (Melgarejo, *et al.*, 2014).

Una de las innovaciones más importantes de la biotecnología, ha sido, sin duda, el desarrollo de tecnologías que permiten obtener plantas nuevas en un laboratorio, mediante la selección *in vitro*, esta técnica consiste en la obtención de nuevos individuos a partir de un segmento de la planta madre (explantes), como puede ser raíz, hoja, tallo, yema o entrenudo.

2.2. Antecedentes Del Cultivo *In Vitro*

La técnica de cultivo *in vitro* también conocida como cultivo de tejidos vegetales tiene sus orígenes en el siglo XIX, con el descubrimiento de la teoría celular, que establece que la célula es la unidad estructural básica de todas las criaturas vivientes, fue muy rápida en ganar aceptación, aunque carecía de pruebas puesto que los científicos Schleiden y Schwann no pudieron demostrar la totipotencia de la célula en un laboratorio (Vasil, 2008). Fue hasta 1902 que el

fisiólogo vegetal German Gottlieb Haberlandt (1854-1945) intento cultivar células de tejidos *in vitro* y lo logró, por ello se le considera el padre del cultivo de tejidos vegetales. Los experimentos de Haberlandt comenzaron en 1898 utilizando células individuales aisladas del tejido empalizado de las hojas, estos tejidos fueron cultivados en sales observando un crecimiento en las células empalizadas, pero no se dividió ninguna celda (Krikorian & Berquam, 2003).

A inicios de 1921 Milliard demostró un éxito limitado con el cultivo de embriones de plantas, posteriormente, Kotte, un estudiante de Haberlandt en Alemania e, independientemente, Robbins tuvieron éxito en el establecimiento de puntas de raíz de plantas cortadas *in vitro*. En 1934 White cultivó raíces de tomates *in vitro* usando un medio que contenía sales inorgánicas, extractos de levaduras y azúcares, tiempo después las levaduras fueron sustituidas por vitaminas del complejo B (Calva-Calva y Pérez-Vargas, 2005). En 1939 se publicaron estudios independientes de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* de diversas raíces entre las cuales resaltaron las de zanahoria y tabaco por Gautheret, Nobecourt y White, siendo estos los primeros cultivos verdaderos de tejidos vegetales (Pierik, 1997).

Los medios de cultivo utilizados en la actualidad son modificaciones de los establecidos por estos grandes pioneros. Años más tarde Steward trabajo con explantes de zanahoria utilizando como fuente de nutrientes leche de coco, que dio lugar al descubrimiento de la embriogénesis (Long, 1969).

En 1946 Ball cultivo exitosamente plantas trasplantables utilizando puntas de brotes obteniendo plantas enteras con un par de primordios de hojas. Morel y Martín en 1956 obtuvieron por primera vez ejemplares de *Dalia* sp. libres de patógenos, siendo este aporte de vital importancia en la técnica *in vitro* pues se pueden conseguir explantes con mayor probabilidad de sobrevivir a la aclimatación al medio natural (Aguirre, *et al.*, 2016).

En 1960 Bergmann desarrollo una importante técnica de clonación de un gran número de células individuales de plantas superiores, es decir mediante esto podemos diferenciar plantas enteras en cultivos de tejidos a través de brotes y raíces o bien las plantas pueden experimentar un desarrollo de embriones

somáticos mediante la embriogénesis. En este mismo año Cocking informo sobre los beneficios de la implementación de celulasa fúngica en sacarosa 0.6 M obteniendo la liberación de protoplastos de las células de la punta de la raíz por acción de las enzimas degradantes (Chawla, 2000).

Fue en el año 1962 cuando Toshio Murashige y Folke K. Skoog crean un medio de cultivo mediante investigación de las hormonas de crecimiento de tabaco, identificando la concentración de minerales que permitían a esta especie tener gran tamaño, aplicando los conocimientos adquiridos en este estudio desarrollaron el medio de cultivo para nutrir las plantas propagadas mediante la técnica *in vitro*, al que se le dio el nombre de medio MS o Murashige y skoog en honor a sus descubridores (Rodríguez y Chacón, 2014).

2.3. Técnica *In Vitro*

El termino cultivo *in vitro* consiste en mantener y desarrollar plantas dentro de frascos de vidrio, donde las condiciones de luz, temperatura y nutrientes son cuidadosamente controladas (Tiza-Arias, 2010), esta técnica es muy valiosa ya que puede utilizarse para acelerar el proceso de producción en plantas pobres de propágulos o plantas de semilla tardía, y de esta forma preservar la especie, además de obtener ejemplares libres de patógenos e incrementar su variabilidad genética, esto gracias a la totipotencia de las células vegetales que almacenan la información genética de la planta madre (planta donadora de yemas) y crean una planta con características idénticas a la madre (Segretín, 2006).

El cultivo *in vitro*, implica el manejo de material vegetal para su establecimiento, multiplicación y regeneración en un medio estéril, donde se controlan factores como la temperatura, la luz y los nutrientes, es decir, para poder realizar la propagación de material vegetal y obtener plantas sanas y de buena calidad, es de vital importancia contar con un área aséptica, libre de contaminantes como hongos, bacterias o levaduras, ya que, en caso de que el medio de cultivo se contamine, el material vegetal (explantes) no sería viable para su trasplante y posterior desarrollo en el medio natural (Cañal, *et al.*, 2001).

La propagación de tejidos vegetales mediante cultivo *in vitro* puede establecerse a partir de múltiples partes de la planta o tejidos. Factores como el tipo de tejido utilizado, su tamaño y el momento en que se recolecta influyen de manera decisiva en la respuesta posterior del explante (Adema, 2015).

Esta técnica debe cubrir dos condiciones fundamentales, I) se debe desarrollar en condiciones estériles, es decir en una superficie libre de gérmenes, bacterias o microorganismos que pudieran contaminar el medio de cultivo y las plantas a propagar, de igual modo se deben usar materiales previamente esterilizados, II) se debe mantener en un ambiente controlado, es decir, controlar los períodos de luz (fotoperiodo), humedad y temperatura, que básicamente son los requerimientos esenciales para un óptimo desarrollo de los explantes.

Antes de iniciar el cultivo *in vitro* de cualquier especie, es necesario tener conocimiento de las propiedades de los medios de cultivo (composición del medio y pH), así como conocer las condiciones y/o requerimientos para un buen crecimiento y desarrollo de la especie vegetal (temperatura, luz, fotoperiodo y humedad) que se quiere propagar (Cedres-Gazó y Sharry, 2015).

De igual forma, es indispensable conocer y diferenciar las etapas en las que se desarrolla la técnica *in vitro* y de esta manera, atender correctamente cada una de ellas.

La técnica *in vitro* consiste en las siguientes fases:

1. Selección y/o preparación de la planta madre/donante
2. Obtención y desinfección de explantes o semillas de la planta
3. Introducción del material seleccionado al medio de cultivo (siembra)
4. Multiplicación de brotes
5. Enraizamiento
6. Aclimatación

Esta serie de fases comprende de manera general el ciclo completo de reproducción de especies vegetales mediante el sistema *in vitro*, el cual puede aplicarse a distintas plantas, pudiendo incluir simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de la especie que se busque propagar, en especial,

las etapas 4, 5 y 6 varían dependiendo de la respuesta que se busca obtener en los explantes cultivados (Castillo, 2004).

2.3.1. Selección y/o Preparación De La Planta Madre/Donante

La selección de plantas donantes es fundamental para el éxito en la multiplicación de plantas, puesto que debe tenerse en cuenta diversos factores fenotípicos y la constitución genética de la planta madre, dado que las plantas obtenidas serán genéticamente idénticas a la planta madre, a consecuencia de que se tomará un segmento de ella, en otros términos, se refiere a que la planta se reconstruirá a partir de ese fragmento vegetal (Adema, 2015).

Al elegir una planta para obtener segmentos vegetales y su posterior multiplicación, es importante considerar el aspecto y sanidad vegetal de la planta madre, es decir, que presente un desarrollo adecuado, libre de organismos patógenos, como insectos, bacterias u hongos, y que no presente deficiencias nutricionales (Adema, 2015). Comúnmente, esto puede lograrse si la planta proviene de un invernadero o vivero, donde su crecimiento se da bajo condiciones controladas y asépticas, sin embargo, la obtención de un ejemplar joven puede realizarse en campo durante los periodos de primavera o verano, coincidiendo con la fase de brotación activa de las yemas vegetativas, revisando minuciosamente la sanidad vegetal del mismo.

En la Figura 1, se observan plantas de olivo en diferentes estados de desarrollo, (A) plantas juveniles y (B) plántulas en crecimiento, que se seleccionaron como planta madre para la obtención de plántulas.

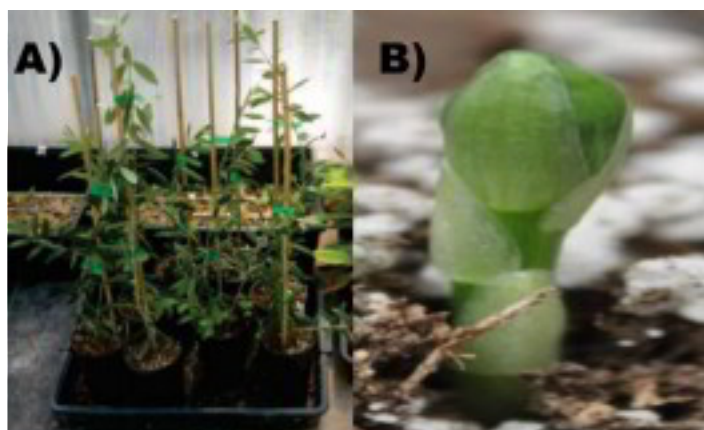


Figura 1. Plantas madre en diferentes estados de desarrollo selectas para la obtención de segmentos vegetales. A) plantas juveniles completas de olivo. Adaptada de Vidoy-Mercado, 2014. B) plántulas en crecimiento. Adaptada de Guzmán-González, 2015.

2.3.2. Obtención Y Desinfección De Explantes O Semillas De La Planta

Otro aspecto de cuidado para una propagación *in vitro* exitosa está estrechamente relacionado con la eficacia en las medidas de prevención y control de agentes microbianos contaminantes, ya que el mayor porcentaje de contaminación de medios de cultivo y explantes se debe mayormente a microorganismos debido al mal manejo de los materiales y asepsia deficiente o nula en el espacio de trabajo, debido a ello debe seguirse un estricto protocolo antes de la obtención y siembra de los segmentos vegetales (Castillo, 2004).

Antes de obtener una sección vegetal de la planta madre (ápice, segmento de hoja, tallo, meristemo, embrión, nudo o semilla), se debe desinfectar la superficie de la planta elegida (en caso de que la planta se haya obtenido a campo), posteriormente y con previo conocimiento de la morfología vegetal de la especie a propagar, (tallo, hoja, raíz, meristemos, fruto, etc.), se extrae un fragmento vegetal, generalmente los segmentos vegetales se extraen de las yemas vegetativas, dado que en esta parte existe una mayor concentración de células con capacidad de división, este será el explante, en la Figura 2 se muestra el proceso ilustrativo con respecto a la selección y obtención de explantes a partir de plantas completas, los explantes obtenidos de plantas jóvenes o de zonas de crecimiento activas, presentan mejor desarrollo en comparación con los explantes tomados de plantas adultas o yemas en dormancia (Adema, 2015; Castillo, 2004).



Figura 2. Obtención de explantes de olivo, de una planta juvenil completa, tipo de explante: de un solo nudo (Bayraktar, *et al.*, 2020).

Una vez obtenidos los explantes nuevamente deben ser desinfectados superficialmente, dicho procedimiento permite eliminar contaminantes con el menor daño posible a los tejidos de los explantes, para este procedimiento no existe un protocolo general, dado que para establecerse se debe considerar la especie vegetal y el tipo de explante, así como su tamaño, pues entre más grande el segmento vegetal mayor es el riesgo de contaminación un ejemplo de ello son las plantas que provienen de invernadero, dado a que su crecimiento se dio en condiciones controladas, la desinfección de los explantes obtenidos de estas plantas es relativamente más fácil que los explantes obtenidos de plantas colectadas a campo (Adema, 2015).

La desinfección superficial se efectúa en varios pasos, como el lavado de los explantes con agua corriente, una inmersión breve en etanol al 70 %, posteriormente concentraciones variables de hipoclorito de sodio con gotas de tensoactivos para una mayor efectividad (Olmos, *et al.*, 2010). Al finalizar el proceso de desinfección, es necesario efectuar varios enjuagues sucesivos con agua destilada para eliminar los residuos de agentes químicos utilizados, terminado el enjuague de los explantes, estos deberán permanecer en condiciones de asepsia hasta su siembra.

2.3.3. Introducción Del Material Seleccionado Al Medio De Cultivo (Siembra)

Esta fase consiste básicamente en transponer el material vegetal o semillas, previamente desinfectado en el medio de cultivo estéril previamente establecido.

Para obtener un buen desarrollo de los explantes, se deben mantener condiciones óptimas de incubación controlando la temperatura, humedad, intensidad lumínica, u oscuridad dependiendo de la especie. El proceso de regeneración de tejidos vegetales, así como la germinación en el caso de las semillas, suele iniciar en un periodo estimado de siete a quince días. Este evento marca el comienzo del ciclo del cultivo *in vitro*, en el cual se desarrollan las fases subsecuentes de crecimiento y diferenciación celular. (Figura 3) (Castillo, 2004).



Figura 3. Siembra de explantes de un solo nudo en el medio de cultivo estéril, inicio de ciclo de cultivo *in vitro* (Vidoy-Mercado, 2014).

2.3.4. Multiplicación De Brotes

En este proceso se espera que los explantes sobrevivientes a la desinfección e introducción a los medios de cultivo generen brotes (organogénesis), con varias hojas, en la base de cada hoja se desarrolla una yema, que al entrar en contacto con el medio se podrá desarrollar (Figura 4A). Los nuevos brotes deben sub cultivarse periódicamente en medios de cultivo nuevos, mediante la división y sembrar en nuevos tubos o frascos con medios de cultivo estéril (Figura 4B) (Castillo, 2004).

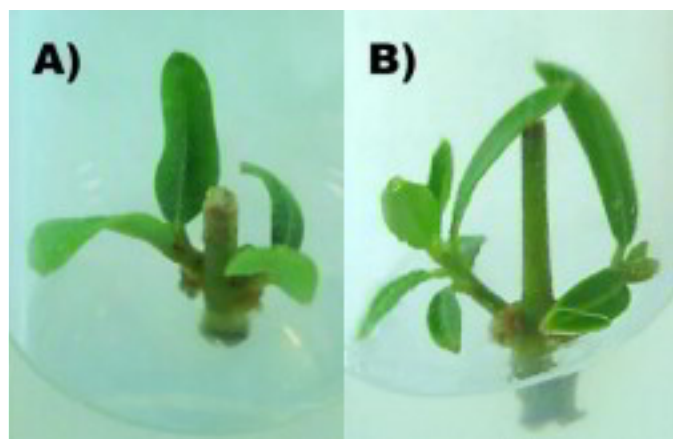


Figura 4. Generación de brotes *in vitro* . A) regeneración de brotes de de explantes nodales, 30 días después de iniciado el ciclo de cultivo *in vitro*, B) explantes nodales regenerados 45 días después de inicio de cultivo. Adaptada de Bayraktar, 2020.

2.3.5. Enraizamiento

Durante esta etapa inicia la formación y desarrollo de raíces, este proceso puede ser *in vitro* o *ex vitro* (después del cultivo *in vitro* o fuera de los medios de cultivo), en el caso de *in vitro* se logra gracias a la administración de auxinas (hormona vegetal) y/o reguladores de crecimiento al medio de cultivo para promover la rizogénesis, el uso de estas depende de la especie y tipo de tejido que se esté propagando, puesto que para especies herbáceas es relativamente fácil la formación de raíces y puede suceder de manera simultánea con el proceso de multiplicación de brotes (yemas nuevas) en cambio en especies leñosas es más complejo debido a su limitada capacidad rizogénica por lo tanto, es importante recurrir al enraizamiento *ex vitro* (Briones, 2017).

Para inducir el enraizamiento *in vitro* (Figura 5A) los brotes obtenidos en la fase de multiplicación son transferidos a un medio de cultivo con una composición modificada, generalmente sin reguladores de crecimiento o con la presencia únicamente de auxinas, lo que permite la formación de raíces y prepara las plántulas para su posterior aclimatación (Castillo, 2004).

En el enraizamiento *ex vitro* (Figura 5B) se emplean sustratos esterilizados, comúnmente formados por combinaciones de tierra y arena o abonos orgánicos. Este método requiere que los brotes dispongan de hojas funcionales y bien desarrolladas, indispensables para llevar a cabo la fotosíntesis y así mantener su metabolismo energético para así poder enraizar y desarrollarse. Este tipo de enraizamiento tiene la ventaja de que sucede a la par de la aclimatación, en este proceso es raro que se formen callos (células somáticas no diferenciadas), de este modo se puede garantizar una conexión vascular continua entre vástago y raíz (Briones, 2017).

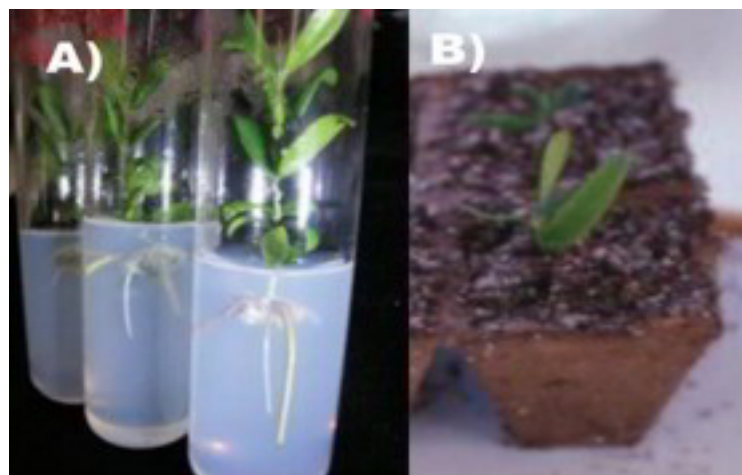


Figura 5. Enraizamiento de explantes A) enraizamiento *in vitro*, B) enraizamiento *ex vitro*.
Adaptada de Vidoy-Mercado, 2014.

2.3.6. Aclimatación

Si bien el cultivo *in vitro* permite obtener plántulas a partir de segmentos vegetales, bajo condiciones controladas, estas plántulas resultan ser muy sensibles a los cambios ambientales a los que se enfrentan durante su adaptación en condiciones naturales (Briones, 2017 y Castillo, 2004).

Este período de adaptación es la aclimatación, sin embargo, en este proceso no todas las plantas sobreviven y durante este periodo muchas de ellas mueren debido a que su desarrollo se dio en condiciones controladas, como humedad relativa alta las plántulas *in vitro* presentan estomas que, aunque están presentes, no son completamente funcionales ante disminuciones en la humedad relativa. Esta limitada capacidad de regulación de la transpiración provoca que la respuesta frente a la pérdida de agua sea lenta, incrementando el riesgo de deshidratación del explante (Briones, 2017), aunque también al crecer en ambientes muy húmedos puede provocar la carencia de una cutícula cerosa desarrollada lo que implica una menor capacidad de la planta para evitar la deshidratación, dado que dicha estructura constituye una barrera física que restringe la pérdida de agua superficial, favoreciendo su adaptación (Castillo, 2004).

La aclimatación de plantas se logra disminuyendo los niveles de humedad relativa e incrementando de manera progresiva la intensidad lumínica, estas plántulas deberán sembrarse en charolas germinadoras o almacigueras (Figura 6A), con un sustrato adecuado (con buenas características físicas, de acuerdo con los requerimientos de la especie) y cubiertas con plástico para mantener la humedad relativa alta. Antes de la siembra se debe retirar cuidadosamente el agar de las raíces, evitando dañarlas y enjuagar (Figura 6B) (Castillo, 2004).

Debido a las condiciones del cultivo *in vitro*, las plantas pueden presentar cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos, por ello es que los cambios durante el proceso de aclimatación deben ser graduales para minimizar el estrés y aumentar la tasa de sobrevivencia (Castillo, 2004).

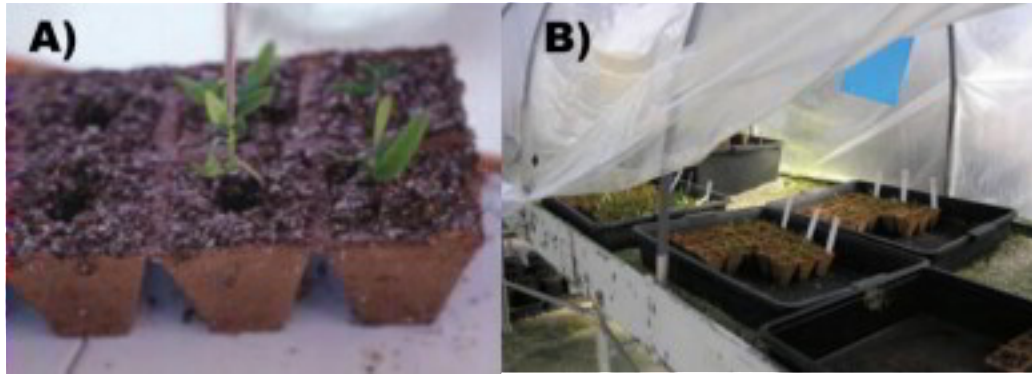


Figura 6. Aclimatación de plántulas, A) trasplante de explantes a charolas germinadoras, B) acondicionamiento de plántulas a condiciones naturales de forma gradual, cubriendo con un plástico. Adaptada de Vidoy-Mercado, 2014.

2.4. Cultivo *In Vitro* En Nuestros Días

Durante las últimas décadas, se ha observado un crecimiento significativo en la utilización de la técnica *in vitro* como herramienta para el cultivo y mejoramiento de órganos, células y tejidos, debido a su eficiencia, practicidad y confiabilidad. Siguiendo el protocolo establecido para este método, se pueden obtener plantas vigorosas y sanas, además con el uso de la técnica *in vitro* se adquiere un mayor número de plantas al mismo tiempo y de una sola sección vegetal de algún órgano de las plantas, en comparación con métodos tradicionales de reproducción vegetal (Rivas-Cancino, 2016).

Algunas de las aplicaciones donde se ha hecho uso de la técnica *in vitro* es en la producción de plantas y metabolitos tal como lo menciona Rodríguez-Amaro, (2018) en su trabajo de propagación de plantas medicinales donde obtuvo mayor eficiencia usando el método *in vitro* que utilizando las técnicas tradicionales de producción hortícola.

Otra aplicación del cultivo *in vitro* es en el área de investigación pues se pueden efectuar cultivos de suspensiones vegetales que a su vez se utilizan en estudios fisiológicos y genéticos para realizar regulaciones en los ciclos celulares, inserciones de genes para mejorar la resistencia, calidad y productividad de las plantas (Mroginski, *et al.*, 2010).

El cultivo *in vitro* también se usa con fines comerciales un ejemplo de ello es la micropropagación para potenciar la reproducción y eficacia de las plantas de

interés hortícola, ornamental y cultural, con la ventaja que se puede asegurar ejemplares libres de patógenos, ciclos de desarrollo más cortos (Morales-Rubio, 2000; Olmos, *et al.*, 2010) y mejoramiento genético como la inserción de un gen para tolerar altas temperaturas, crear nuevas variedades, cambiar la pigmentación de los pétalos en el caso de las ornamentales, o bien hacerlas tolerantes a plagas y enfermedades (Escandón, 2010).

El cultivo *in vitro* representa una herramienta clave en la obtención y regeneración de plantas con modificaciones genéticas, mediante la ingeniería genética. De esta manera se evidencia la interdependencia entre la biotecnología actual y las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. El procedimiento generalmente inicia con el establecimiento de cultivos de células o tejidos, que posteriormente dan origen a plantas totalmente regeneradas y la manifestación de los genes introducidos. (Meléndez, 2021).

Por otra parte, la técnica *in vitro* es esencial en la conservación, propagación y rescate de especies amenazadas (Miguel-Luna, *et al.*, 2013), pues por medio de ella pueden producirse en gran escala ejemplares adaptables a las condiciones naturales, así como la propagación vegetativa de especies silvestres o de cultivos complejos en campo, para la preservación del germoplasma de ejemplares en vía de extinción (Ghasemi, *et al.* 2012; Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

Esta técnica puede efectuarse por organogénesis directa o indirecta, como el caso de *Coryphantha retusa* que, debido a su sobreexplotación e incapacidad de generar brotes de manera natural, se encuentra amenazada bajo protección, además de que la reproducción por semilla es ineficiente, debido a estas condiciones, la propagación *in vitro* constituye una estrategia útil para asegurar la reproducción y conservación de esta especie (Ruvalcaba-Ruiz, *et al.*, 2010).

Otro uso de la técnica *in vitro* es la germinación de algunas especies de interés comercial como las heliconias, que representan un valor comercial importante en el sureste de México, y no se tienen suficientes cultivos establecidos de esta especie, por lo cual se sustrae de su hábitat natural y la reproducción de sus semillas por el método *in vitro* puede potenciar su multiplicación para desalentar

la depredación de ejemplares de su hábitat natural (Hernández-Meneses, *et al.*, 2018).

Esta técnica es muy eficiente para preservación, y germinación de semillas de especies con estatus, como el género *Orchidaceae* según Damon, *et al.* (2004), por la practicidad, eficiencia y rapidez de este método inclusive pueden germinarse semillas, aunque no estén maduras.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una técnica muy noble, pues por sus atribuciones es aplicable en casi cualquier rama de las ciencias, sin embargo, para lograr el crecimiento de plantas adecuado, es importante tener en cuenta diversas consideraciones al realizar esta técnica.

2.5. Composición Y Consideraciones De Los Medios De Cultivo *In Vitro*

Es necesario hacer énfasis en cuanto a propagación de tejidos vegetales se trata, puesto que comprende diversas metodologías que permiten el mantenimiento aséptico de células, tejidos y órganos en medios de cultivo con composición química específica, sometidos a condiciones ambientales reguladas (Roca y Mroginski, 1991) de estas consideraciones depende el éxito de la obtención de plantas funcionales y adaptables a las condiciones naturales.

A lo largo del tiempo se han propuesto distintos medios nutritivos que han demostrado ser adecuados para el cultivo *in vitro* de vegetales, los más utilizados son: Kudson (1946) (KC), White (1964), WPA y Murashige y Skoog (1962) (MS), cada uno de ellos presenta los compuestos necesarios para el establecimiento de los cultivos de tejido y son imprescindibles para desarrollar el cultivo *in vitro*.

Los medios de cultivo son indispensables para el crecimiento y desarrollo de las plantas, pues proveen los nutrientes necesarios para un apropiado crecimiento de los explantes, anclaje y soporte para el desarrollo de raíces, y posteriormente la formación de órganos. Estos medios están constituidos por compuestos orgánicos e inorgánicos.

Los compuestos orgánicos (Cuadro 1), pueden ser: vitaminas (ej. complejo B, esencial para el crecimiento de células vegetales y crecimiento radical debido a

que promueve la síntesis de citoquininas), carbohidratos (sacarosa, agarosa, Mio-inositol, como fuente de energía y reguladores osmóticos), aminoácidos (contribuyen al desarrollo de callos y a la organogénesis presentando variaciones en su efecto según la especie y el tipo de morfogénesis), reguladores de crecimiento (ej. giberelinas, ácido abscísico, auxinas y citoquininas) (Krikorian, 1991).

Existen medios de cultivo líquidos que solo necesitan los insumos anteriormente citados, pero también existen medios semisólidos, que además requieren un soporte inerte, el cual ayudará a los explantes a tener anclaje de raíces y soporte para la planta en general (Segretín, 2006).

Generalmente este soporte se obtiene a partir de agentes gelificantes, quienes se emplean en combinación con los nutrientes necesarios para el desarrollo de los cultivos de tejidos vegetales y germinación de semillas. La composición de los soportes o matriz gelificante está influenciada por la concentración y fuente a utilizar, nutrientes y pH del medio de cultivo (Loaiza-Alanís, 2008).

Cuadro 1. Composición orgánica de los medios de cultivo.

Compuestos orgánicos en medios de cultivo				
Carbohidratos	Vitaminas	Aminoácidos	Reguladores de crecimiento	Soporte inerte (medios semisólidos)
Sacarosa	Tiamina (B1)	Glicina	Auxinas	Agar (0.7-1 %)
Glucosa	Piridoxina		Citocininas	Gelrite
Mio-inositol	Ácido nicotínico		Giberelinas	
	Biotina			

Sin embargo, los tejidos vegetales de cultivo *in vitro* precisan de una fuente continua de compuestos inorgánicos; además de C, H y O. Principalmente compuestos de nitrógeno (N), fosforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), tal como se muestra en el Cuadro 2.

Los compuestos inorgánicos son sales minerales diseñadas con macro y microelementos que suministrados en concentraciones adecuadas contribuyen al crecimiento de órganos y tejidos, estos nutrientes se dividen en dos tipos: macronutrientes, aquellos requeridos en cantidades mayores por las plantas, encontrándose los iones de N, P, K, Ca, Mg y S y micronutrientes que son requeridos en menor concentración por las plantas, pero que también son indispensables para que la actividad metabólica de las células vegetales sea adecuada, entre ellos se encuentran el hierro (Fe), cloro (Cl), níquel (Ni), zinc (Zn), manganeso (Mn), cobre (Cu), boro (B) y molibdeno (Mo).

Macroelementos: generalmente, las necesidades de nitrógeno se proporcionan mediante la utilización de mezclas específicas de amonio y nitrato en concentraciones variables entre 3 mmoles y 50 mmoles. Cuando estas fuentes son complementadas por separado afectan negativamente el crecimiento del cultivo y la producción de metabolitos (Llorente, 2000).

El nitrógeno es suministrado en dosis mayores, se encuentra en el medio en forma de iones de amonio o nitrato o bien una mezcla de ambos. El fósforo se puede añadir en diversas formas tales como: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ o KH_2PO_4 . El potasio se encuentra en grandes concentraciones en la naturaleza; es un catión que se incorpora en forma de KCl, KNO_3 , o KH_2PO_4 . El calcio se suministra como $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ o en forma anhidra de cualquier sal. El magnesio y azufre suplen sus requerimientos con $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. El sodio no es requerido en grandes dosis por las plantas superiores; en cambio, puede ser un compuesto indispensable para plantas C4 (vía de 4 carbonos en el proceso de fotorespiración). El cloro se incluye en forma de KCl o CaCl_2 (Cruz-Pizarro, 2012).

Cuadro 2. Componentes inorgánicos en medios de cultivo más utilizados.

Compuestos inorgánicos	Medio de cultivo						
	Konop (188)	Knudson C (1946)	Heller (1953)	Nitsch (1972)	B5 Gamborg <i>et al.</i> (1976)	SH Schenck y Hildebrandt (1972)	MS Murashige y Skoog (1962)
Nitrato de potasio KNO_3	250			950	2.50	2.50	1.90
Nitrato de sodio NaNO_3			600				
Nitrato de calcio tetrahidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.00	1.00					
Nitrato de amonio NH_4NO_3				720			1.65
Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		500			134		
Fosfato monoamónico $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$						300	
Fosfato de Sodio Monobásico Monohidratado $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$			125		150		
Fosfato monopotásico KH_2PO_4	250	250		68			170
Cloruro de potasio KCl			750				
Cloruro de calcio dihidratado $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			75	220	150	200	440
Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	250	250	185	250	400	370

Microelementos: su presencia favorece una adecuada actividad metabólica en las células vegetales, su concentración depende del papel que tengan dentro de reacciones fisiológicas clave. Microelementos como el Zn, B, Cu, y Mo son esenciales en la síntesis de clorofila y el funcionamiento de cloroplastos. El hierro (Fe) interviene en la generación de precursores de clorofila, en tanto que el manganeso (Mn) resulta necesario para mantener la integridad de la estructura celular y para la realización de la fotosíntesis. El cobre (Cu) y zinc (Zn) participan en reacciones de oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos. Por su parte el molibdeno (Mo) y Fe constituyen componentes estructurales de las enzimas nitrato reductasa y nitrogenasa. El boro (B) se asocia con la conservación de la actividad meristemática y con la formación de bases nitrogenadas, entre ellas el uracilo (Cruz-Pizarro, 2012).

Las microsales (Cuadro 3) son necesarias en concentraciones más bajas (micromolar μM) que los macroelementos las típicas incluyen boro (H_3BO_3), cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), hierro (un complejo de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y Na_2EDTA , o raramente, $\text{Fe}_2[\text{SO}_4]_3$), manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), molibdeno (NaMoO_3), cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Además de los nutrientes (micro y macroelementos), otro factor a considerar en el desarrollo y calidad deseada de los medios de cultivo es el soporte que ayudara al crecimiento de los explantes y la planta en general, ese soporte se obtiene a partir de los agentes gelificantes. Los agentes gelificantes actúan como una barrera física, para controlar la liberación de los macro y micronutrientes adicionados en el medio de cultivo, encapsulándolos en la matriz de gel, liberándose al alcanzar una temperatura de los $25\text{ }^\circ\text{C}$ (Sim, *et al.*, 2021).

Cuadro 3. Contenido de microsales en medios de cultivo más utilizados en la técnica *in vitro*.

Contenido de microsales (en $mg\ l^{-1}$)							
Compuestos inorgánicos	Medio de cultivo						
	Konop (188)	Knudson C (1946)	Heller (1953)	Nitsch (1972)	B5 Gamborg <i>et al.</i> (1976)	SH Schenck y Hildebrandt (1972)	MS Murashige y Skoog (1962)
Cloruro férrico hexahidratado $FeCl_3 \cdot 6H_2O$			1.0				
Sulfato de hierro heptahidratado $FeSO_4 \cdot 7H_2O$		25		27.8	27.8	15	27.8
Sulfato de magnesio tetrahidratado $MnSO_4 \cdot 4H_2O$		7.5	0.1	25	13.12	13.12	22.3
Sulfato de zinc heptahidratado $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$			1.0	10	2.0	1.0	8.6
Ácido bórico H_3BO_3			1.0	10	3.0	5.0	6.2
Yoduro de potasio KI			0.01		0.75	1.0	0.83
Sulfato de cobre pentahidratado $CuSO_4 \cdot 5H_2O$			0.3	0.025	0.025	0.2	0.025
Molibdato de sodio dihidratado $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$				0.25	0.25	0.1	0.25
Cloruro de cobalto hexahidratado $CoCl_2 \cdot 6H_2O$					0.25	0.1	0.025
Cloruro de níquel hexahidratado $NiCl_2 \cdot 6H_2O$			0.03				

2.6. Agentes Gelificantes

Diversos factores influyen en la calidad de los explantes obtenidos, entre ellos, la técnica empleada para su obtención, condiciones de procesamiento (luz, temperatura, humedad) y el origen del explante, sin embargo, la elección del agente gelificante y la concentración empleada constituyen factores tan relevantes como la selección adecuada de los nutrientes en el medio de cultivo (Calva-Calva y Pérez-Vargas, 2005).

Se denomina agentes gelificantes a los compuestos incorporados al medio de cultivo con el propósito de conferirle una consistencia semisólida y ofrecer soporte al explante (López-Escamilla, *et al.*, 2016). Se considera fundamental que los agentes gelificantes no interfieran en los procesos de crecimiento y desarrollo del material inoculado.

La elección de los agentes gelificantes dependerá de sus características, así como, del tipo de planta a replicar y los requerimientos de esta, puesto que algunas plantas (como las leñosas) se desarrollan mejor en medios sólidos, ya que si el medio es muy líquido corren riesgo de hiperhidratación, vitrificación, entre otros efectos perjudiciales para la viabilidad de los explantes (Veitía, *et al.*, 2012; Jiménez-Bonilla y Abdelnour, 2017).

Tradicionalmente, los agentes gelificantes se emplean en la industria alimentaria, química y farmacéutica. Sin embargo, también son comúnmente utilizados en la elaboración de cultivos *in vitro*, pues en ellos se desarrollan los explantes, mejorando la consistencia de los medios con un incremento en la viscosidad y de esta manera dar estabilidad al medio de cultivo y posteriormente a los explantes (Martín-Gordo, *et al.*, 2012).

Una gran cantidad de compuestos han sido evaluados por su capacidad de espesar o gelificar soluciones acuosas, destacando polisacáridos como: gomas, agarosa y agar, también se han empleado exudados de bacterias, estas fuentes son las más comúnmente utilizadas en la formulación de medios de cultivo sólidos y semisólidos,

resaltado el uso del agar como base gelificante, por su composición de polisacáridos naturales.

El agar es un polisacárido con propiedades hidrocoloides, soluble en agua a altas temperaturas (~100 °C), se caracteriza por ser incoloro, inodoro e insípido, es termorreversible lo que le permite gelificar entre 35 °C y 43 °C (enfriamiento) y disolverse al calentar entre 85 °C y 95 °C; además de tolerar temperaturas de esterilización (Loaiza-Alanís, 2008). Sus propiedades fisicoquímicas, como fuerza de adhesión, formación de geles claros y alta viscosidad hacen del agar el material de soporte más empleado para el cultivo de microorganismos y tejidos vegetales.

Sin embargo, pese a las atribuciones del agar, se ha reportado que no es fisiológicamente inerte, su composición puede variar de acuerdo con la fuente de origen y la calidad depende del proceso de purificación pudiendo contener compuestos orgánicos residuales que altere las propiedades fisicoquímicas de los medios de cultivo, causando daños en los tejidos vegetales (Szabados, *et al.*, 1991). Aunado a ello, tal vez la principal limitante del empleo de agar en la preparación de medios de cultivo es el incremento significativo del costo total del medio (hasta un 70 %) (Mohamed, *et al.*, 2010). Es por ello por lo que se ha evaluado el uso de agentes gelificantes alternativos al agar.

2.7. Características De Los Agentes Gelificantes

Como se mencionó anteriormente, los agentes gelificantes tienen como función dar estabilidad a los medios de cultivo, así como soporte a los explantes, esto se logra debido a las características que poseen. La principal característica que tienen los gelificantes es que se disuelven o dispersan fácilmente en el agua (hidrocoloides), por calentamiento (cerca a los 100 °C) (Loaiza-Alanís, 2008), efectuando un aumento significativo de la viscosidad y consistencia del medio al enfriarse a temperaturas menores, sin cambiar significativamente sus propiedades (Martín-Gordo, *et al.*, 2013). Entre las características principales que deben presentar los agentes gelificantes, se encuentran las siguientes:

Gelificación: proceso en el que se incrementa la viscosidad del sistema, ocurre cuando el polímero alcanza un nivel crítico de entrecruzamiento, conocido como punto gel (Spotti, 2013). Un gel puede formarse en presencia de un monómero que polimeriza, o bien por la presencia de biopolímeros que evolucionan de un estado líquido (sol.) a un estado de gel por un cambio químico o térmico, este proceso se debe básicamente a que las cadenas del hidrocoloide están rodeadas de moléculas de agua que solvatan sus grupos funcionales a través de puentes de hidrógeno. Esta capa de hidratación crea una barrera entre las cadenas poliméricas evitando el contacto entre sí. Al reducir la hidratación molecular la barrera de agua que separa las cadenas poliméricas también disminuye. Cuando el nivel de hidratación es bajo, las cadenas tienden a atraerse y unirse mediante fuerzas de Van Der Waals (González-Montiel, *et al.*, 2019), debido a esto las cadenas se acortan, volviéndose filamentosas, se entrecruzan y aumenta la viscosidad del sistema hasta alcanzar un estado semisólido o gelatinoso, en esta etapa gran parte del medio dispersante queda atrapado entre los filamentos del polímero por capilaridad dando lugar a la formación de un gel. Las características de los geles resultan de las interacciones complejas entre el solvente (agua) y la red molecular, mientras que del solvente depende la integridad de la red de polímero pues este retiene el agua, evitando su fluidez (Spotti, 2013).

En cuanto a las características fisicoquímicas que los agentes gelificantes pueden presentar, se encuentran las siguientes:

Potencial hídrico: esta característica influye en gran manera en la absorción de agua y nutrientes de los explantes, reflejándose en la fisiología y características morfológicas del explante, de no ser el adecuado, podría ocasionar diferentes problemas (Chacón, *et al.*, 2000; Cárdenas-Lara y Villegas-Monter, 2002). A una humedad relativa alta podría provocar hiperhidratación (Figura 7A) o vitrificación (Figura 7B), dando una apariencia translúcida (color verde pálido), brillante y tejidos quebradizos lo que limita la propagación y enraizamiento *ex vitro* perdiendo entre 60% y 80% del total de plantas obtenidas (García-Osuna, 2008). Por otro lado, la necrosis (Figura 7C) es la muerte prematura de las células vegetales, y ocurre por

toxicidad en los tejidos de los explantes causados por radicales libres ocasionando oscurecimiento del tejido vegetal, dando una apariencia cafésosa-negrizca y acuosa, esta afección ocasiona retraso en el crecimiento y desarrollo de los explantes, pudiendo llegar incluso a la muerte del explante (Azofeifa, 2009).



Figura 7. Problemas en explantes relacionados con el potencial hídrico del agente gelificante durante el proceso *in vitro*. A) *Aloe polyphylla*, a la izquierda es una planta saludable que se extrae del cultivo de tejidos, a la derecha la planta presenta síntomas hiperhídricos. Adaptada de: Ivanova y Van-Staden, 2011. B) explantes que presentan hiperhidricidad y vitrificación. Adaptada de: Veitía, *et al.*, 2012. C) explante con necrosis. Adaptada de: Bayraktar, 2020.

Potencial osmótico: hace referencia a la fuerza que requiere el agua para moverse, depende de la cantidad de sales presentes en una solución. Cuando este potencial presenta valores negativos, disminuye la absorción hídrica de los explantes, lo que limita la multiplicación de brotes debido a la menor disponibilidad de nutrientes (Avila, *et al.*, 2023). Por lo tanto, el potencial osmótico depende principalmente de los componentes mayoritarios del medio, tales como la fuente de carbono, macronutrientes (N y K principalmente), y el agente gelificante.

Fuerza de adhesión: esta característica ayuda a aglutinar los medios de cultivo, evitando la disgregación de los componentes del medio y que de esa forma sean aprovechados por los propágulos, evitando la pérdida de agua, también da estabilidad al medio durante el crecimiento y desarrollo de los explantes (Veitía, *et al.*, 2012).

pH del medio: el pH interviene en la gelificación de los medios, siendo un pH 4 - 5.7 óptimo para este proceso y para el medio en general, el pH del medio de cultivo

suele ajustarse a 5.7 antes de añadir el gelificante, por lo cual la gelificación se efectúa bien, en el caso del agar al agregarlo al medio de cultivo, absorbe una cantidad de agua que va de 200 - 300 veces su peso, de esta manera se forma un gel translucido, característica que permite el seguimiento del ciclo de propagación *in vitro*. Algunos autores han reportado el efecto que tiene el pH en la formación de geles, así como la concentración y tipo de cationes, mediante pruebas de perfil de textura. (Casas-Alencáster y Pardo-García, 2005).

Fuerza de gel: es una propiedad importante en los agentes gelificantes ya que esta es la que determina la resistencia y la capacidad de una dispersión coloidal para desarrollar y retener una forma de gel. La fuerza de gel es la medición de la fuerza máxima que se aplica a un gel para que se fracture (López-Escamilla, *et al.*, 2016) de aquí derivan las diferencias en la germinación, desarrollo y cantidad de clorofila de los explantes obtenidos *in vitro*. Esta característica puede determinarse mediante una prueba llamada Bloom (Grados Bloom) que consiste básicamente en determinar la concentración requerida para lograr la dureza deseada, (Guzmán-Girón y Molina-Violantes, 2013; Acosta-Dávila, 2014).

Otra técnica empleada para determinar la dureza de un gel es mediante un análisis de perfil de textura (TPA) con el cual se pueden obtener diferentes parámetros tales como:

Fracturabilidad: pico máximo inicial en la curva fuerza-tiempo obtenido durante la primera compresión, medido en unidades de fuerza (Newtons).

Dureza: máximo de fuerza obtenida durante el primer ciclo de compresión, se expresa en unidades de fuerza generalmente Newtons.

Cohesividad: representa la relación entre el área positiva medida en la segunda compresión y la correspondiente a la primera; este valor hace referencia a la fuerza de unión que mantienen las partículas del material tras la deformación inicial.

Cohesividad = área 2 / área 1

Adhesividad: Área negativa registrada durante la primera compresión y representa el trabajo requerido para retirar el pistón de la muestra; se mide en unidades de trabajo (Joule).

Gomosidad: Producto de la dureza por la cohesividad y es expresada en Newtons.

Gomosidad = Dureza \times Cohesividad

Masticabilidad: corresponde al valor obtenido de multiplicar la gomosisidad por la elasticidad; matemáticamente, este parámetro equivale a la dureza \times cohesividad \times elasticidad.

Masticabilidad = Dureza \times Cohesividad \times Elasticidad

(González, *et al.*, 2015; Cruz-Benítez, 2016).

Viscosidad: resistencia que presentan los líquidos al fluir o deformarse, depende de la fuerza de cohesión entre sus moléculas (Avendaño-Romero, *et al.*, 2013). A medida que las fuerzas de atracción entre moléculas se vuelven más intensas, la viscosidad y resistencia del sistema también se incrementa. Las propiedades reológicas de una solución están estrechamente relacionadas con su comportamiento durante el procesamiento, y esa viscosidad se ve influida por variables como la concentración, la temperatura y el valor Bloom del gelificante utilizado.

Elasticidad: propiedad que posee un material para reestablecer su forma o dimensiones originales después de haber experimentado una deformación temporal (Castro-Montero y Hombre-Morgado, 2007). Los agentes gelificantes pueden ser termorreversibles gracias a la elasticidad, esta propiedad dependerá de la naturaleza del gelificante en cuestión. La firmeza y elasticidad son propiedades de los geles que indican que pueden utilizarse como gelificantes, estabilizantes y espesantes (Hernández-Medina, *et al.*, 2008).

Según Ospina-Casas, 2016 la viscosidad y elasticidad se pueden determinar mediante un barrido de deformación, esta técnica permite conocer información sobre la magnitud del comportamiento elástico y/o viscoso de fluidos a frecuencias y temperaturas constantes.

2.8. Agentes Gelificantes Alternativos Al Agar

Como se ha mencionado anteriormente, los agentes gelificantes permiten la inoculación aséptica de plantas en medios sólidos y semisólidos, y de esta manera obtener nuevas plantas idénticas a la planta madre, libres de patógenos.

Debido a los altos costos que representa el uso del agar, se ha llegado a la necesidad de estudiar y proponer agentes gelificantes alternativos al agar, que mantengan las propiedades necesarias para el desarrollo de plantas *in vitro* y, además, reduzcan los costos de producción.

Entre los agentes gelificantes que han reportado como alternativa al agar, se encuentra el isubgol, que es un polisacárido compuesto de xilosa, ácido galacturónico y arabinosa, presente en el mucilago de semillas de *Plantago*. También se ha utilizado gomas, como, gellan (Chacón, *et al.*, 2000), guar, cassia (Lucyszyn, *et al.*, 2006.) y xantana (Jain y Babbar, 2006), además de alginatos (ácido algínico) obtenidos de diferentes tipos de algas marinas (*Macrocystis*, *Fucus* y *Laminaria*, principalmente), empleados para cultivar protoplastos vegetales (Pierik, 1997).

Existen otros agentes gelificantes usados en la técnica *in vitro* como el gelrite, que es básicamente una goma de polisacárido, baja en acetil gellan, que tiene la capacidad de generar geles transparentes al interactuar con cationes de carga simple (monovalentes) o doble (divalentes) (Lin y Casida, 1984), phytigel que corresponde a heteropolisacáridos sintetizados por microorganismos pertenecientes al género *Sphingomonas* (Bajaj, *et al.*, 2007).

Se ha reportado el uso de diversos tipos de agentes gelificantes alternos al agar que se implementan en el medio de cultivo de forma proporcional con agar y/o solos, tal como demuestran Saglam y Ciifci, (2010) quienes sustituyeron parcialmente al agar con isubgol en medios de cultivo para la regeneración *in vitro* de planta pelusa (*Isatis tinctoria*), obteniendo mayor regeneración de brotes en los medios de sustitución parcial de agar en comparación con el testigo, reduciendo el costo total de producción .

López-Escamilla, *et al.*, (2016) y Loaiza-Alanis, (2008), probaron el efecto de diversos agentes gelificantes, entre ellos gelrite, agar bixon, agar-agar y bacto-agar, en los procesos de germinación y crecimiento *in vitro* de biznaga burra (*Echinocactus Platyacanthus*), encontrando que estos agentes solidificantes cumplen con la función del agar dando soporte y anclaje a la raíz de los explantes.

Por otro lado, en 2011, Daud *et al.*, evaluaron mezclas de agar con diferentes almidones comerciales (yuca, arroz, maíz y papa), como agentes gelificantes alternativos, los resultados mostraron que la combinación de un agente gelificante alternativo con agar o agente gelificante solo regeneraba con éxito los brotes de los explantes del segmento de tallo de *Celosia* sp. no se observaron efectos fisiológicos sobre la regeneración de brotes en *Celosia* sp.

Recientemente, Wilson y Tenkouano (2020), sustituyeron agar por almidón de yuca (*Manihot esculenta*), para la multiplicación y regeneración de brotes de un híbrido de plátano (*Musa* sp), concluyendo que la implementación de almidón en proporción con agar o gelrite puede ser un compuesto gelificante de alta eficacia en medios empleados en el cultivo de tejidos vegetales.

De acuerdo con los antecedentes revisados en la literatura científica, se comprende la importancia de utilizar agar al preparar medios de cultivo, puesto que nos garantiza éxito en el desarrollo de explantes viables, sin embargo, el uso del agar incrementa los costos de la propagación *in vitro*, lo que motiva la búsqueda de alternativas rentables y accesibles para la multiplicación de plantas a partir de tejidos vegetales. El uso de almidón solo o en mezcla con agar, como agente

gelificante alternativo en el cultivo de tejido puede lograr un beneficio óptimo para la regeneración de brotes *in vitro*.

2.9. Almidón

El almidón es un carbohidrato natural, de alto peso molecular presente principalmente en los órganos de almacenamiento de las plantas, tales como tubérculos, raíces (rizomas) y endospermo de las semillas, sirve de almacén de nutrientes como reserva (Tovar-Benítez, 2008; Alemán, 2014).

Su composición química, morfología y estructura dependen de la fuente botánica de obtención (Patel y Seetharaman, 2006), el almidón es un polisacárido producido únicamente por las plantas superiores, que lo sintetizan utilizando el dióxido de carbono presente en la atmosfera y agua absorbida del suelo.

Durante la síntesis de almidón, los vegetales captan la energía solar y la convierten en glucosa, uniendo estas moléculas para formar largas cadenas de almidón que pueden llegar a tener desde 2000 hasta 3000 unidades de glucosa (Aristizábal, *et al.*, 2007).

Está constituido por dos polisacáridos: amilosa y amilopectina, organizadas en anillos concéntricos dando origen a una estructura granular. La amilosa se encuentra distribuida dentro de los gránulos de almidón, ocupando los espacios disponibles después de la síntesis de amilopectina (Tetlow, *et al.*, 2004). Su estructura lo hace relativamente denso y poco soluble en agua fría, sin embargo, en agua caliente dan lugar a suspensiones, cuyas propiedades varían en función de su origen.

2.9.1. Composición Química Del Almidón

El almidón es un polisacárido formado por la unión de numerosas moléculas de glucosa a través de enlaces α (1-4) y α (1-6), dando origen a la formación de amilosa y amilopectina organizadas en forma de dobles hélices (Aristizábal, *et al.* 2007).

La relación amilosa-amilopectina varía según la fuente botánica donde se obtiene el almidón, los porcentajes promedio de amilosa en almidón están entre 20 % - 25 %, cuando los porcentajes son inferiores, son considerados almidones cerosos (Fernández-Ocegueda, 2018). Además, pueden contener otro tipo de elementos tales como proteína y pequeñas cantidades de minerales como fósforo (P), este se presenta principalmente en forma de monoéster de fosfato (selectivo para amilopectina), fosfato inorgánico y fosfolípidos (Cruz-Benítez, 2016).

2.9.1.1. Amilosa

La amilosa (Figura 8) es un polímero lineal constituido por unidades de glucosa enlazada mediante enlaces glucosídicos α -D-(1 - 4) (Hernández- Medina, *et al.*, 2008 y Singh, *et al.*, 2003), es la molécula de menor proporción en los almidones (15 % – 30 %). Esta molécula es parcialmente insoluble en agua fría, en soluciones neutras tiene una estructura helicoidal debido a su capacidad de establecer puentes de hidrogeno entre moléculas cercanas formando micelas hidratadas. Compuesta por aproximadamente 6 – 8 unidades de glucosa por giro (Hernández-Medina, *et al.*, 2008). Una forma de cuantificar la amilosa presente en los almidones es formando un complejo con yodo, observando una tonalidad azul (Fernández-Ocegueda, 2018).

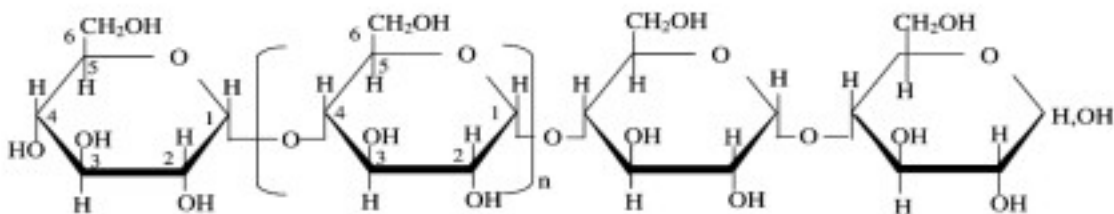


Figura 8. Estructura de la amilosa con enlaces α -(1→4)-glucano. La molécula lineal puede presentar algunas cadenas moderadamente largas con enlaces α -(1→6) (Tester, *et al.*, 2004).

La amilosa posee propiedades hidrofílicas que favorecen su interacción con el agua, dicho comportamiento se atribuye a la abundancia de grupos hidroxilo en sus unidades de glucosa, capaces de establecer enlaces de hidrogeno con las moléculas de agua, debido a la estructura lineal, a su movilidad y a que cuenta con

grupos hidroxilo en toda la estructura del polímero, las moléculas de amilosa se orientan de forma paralela y se produce un acercamiento, formando puentes de hidrógeno (Cruz-Benítez, 2016).

Dentro de los gránulos de almidón, la distribución de la amilosa varía entre el núcleo y la periferia, ya que esta molécula ocupa principalmente los espacios disponibles tras la organización de la amilopectina durante la síntesis (Tetlow, *et al.*, 2004).

2.9.1.2. Amilopectina

La amilopectina es una molécula ramificada, presenta cadenas lineales de unidades de glucosa unidas por enlaces α - (1 \rightarrow 4), y un 5 % - 6 % de enlaces α -(1 \rightarrow 6), que dan lugar a las ramificaciones (Figura 9), debido a su estructura tiene poca movilidad en solución, lo que disminuye la posibilidad de interacción entre hidrógenos. Usualmente, la amilopectina posee un punto de ramificación ordenado aproximadamente cada 20 a 25 residuos de glucosa (Cruz-Benítez, 2016).

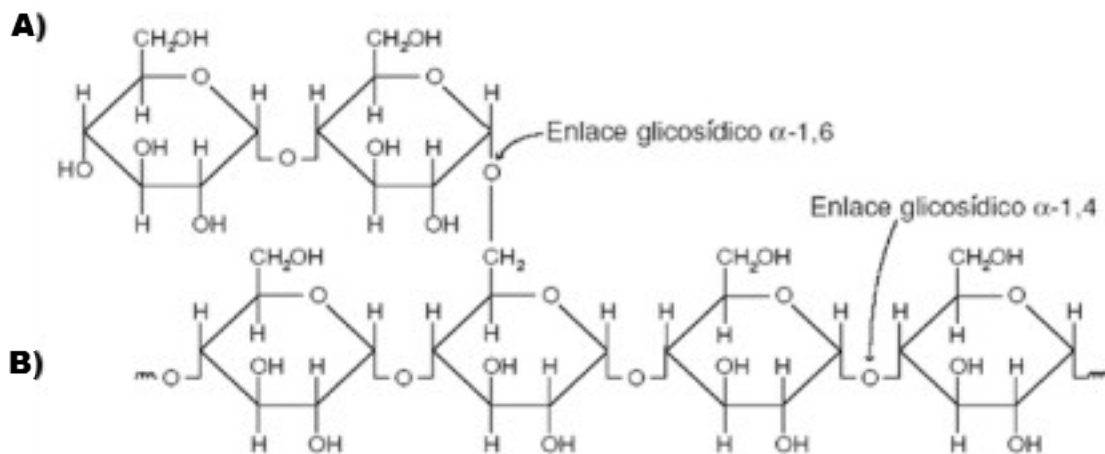


Figura 9. Estructura de Amilopectina: con enlaces glucosídicos A) α -(1 \rightarrow 6) y B) α -(1 \rightarrow 4). Tanto A) como B) varían según el origen botánico. Adaptada de Meneses, *et al.*, 2007.

Los gránulos de almidón conforman una matriz polimérica semicristalina, en la que el porcentaje de cristalinidad oscila entre el 15 % y 45 %, dependiendo de su origen botánico y condiciones de formación, esta propiedad se atribuye a las cortas

cadenas lineales de la amilopectina, puesto que estas cadenas forman dobles hélices organizadas en una estructura cristalina (Hernández-Medina, *et al.*, 2008).

Dependiendo de su fuente botánica, la amilopectina es el polisacárido predominante, con una proporción que oscila entre 70 % y 85 %, lo que permite que el gránulo mantenga su estructura organizada en anillos concéntricos (Figura 10 A-B), ya que las moléculas de amilopectina se organizan a lo largo de un eje conceptual, que se extiende desde el origen del gránulo hasta las regiones externas de este forma dos regiones, una cristalina (constituida por racimos de cadenas de amilopectina, Figura 10 C) y una amorfa (compuesta por puntos de ramificación que involucran amilopectina y amilosa), otorgando al gránulo una propiedad cristalina y su típica birrefringencia o cruz de malta (Tovar-Benítez, 2008).

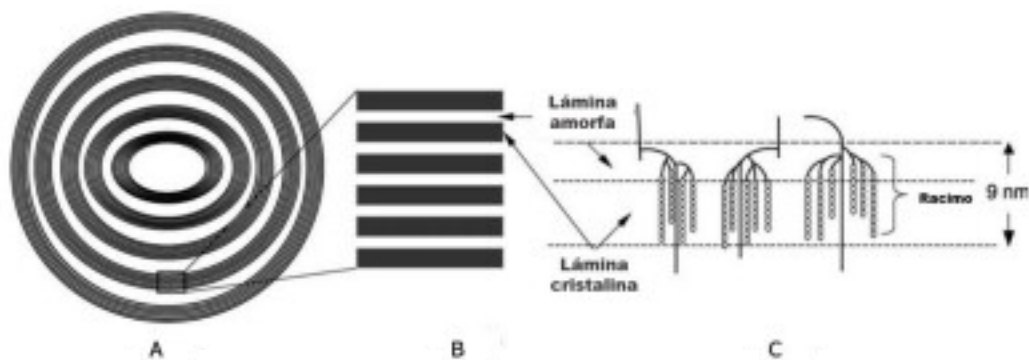


Figura 10. Representación esquemática de la estructura laminar de un gránulo de almidón (A) pilas de laminillas microcristalinas separados por anillos de crecimiento amorfo. (B) vista ampliada de las regiones amorfa y cristalina. (C) estructuras de doble hélice (Adaptado de Tester y Xin-Qi, 2004).

Como se mencionó anteriormente, el almidón está constituido principalmente de dos moléculas: amilosa, que es un polímero lineal y amilopectina, un polímero ramificado, organizadas en anillos concéntricos dando origen a la característica forma granular (Agama-Acevedo, *et al.*, 2013), ambas moléculas presentan diferentes grados de organización a nivel molecular y visible hasta formar el gránulo de almidón, la morfología que presentan estos gránulos depende directamente de la fuente botánica, variando en forma y tamaño, de igual forma, la relación de amilosa - amilopectina se encuentra influenciada por la genética y podría depender

de las técnicas de reproducción de la especie vegetal de origen (Villarroel, *et al.*, 2018).

Se pueden observar gránulos de almidón simples, compuestos, semicompuestos y en diversos tamaños y formas, esto dependerá de la fuente botánica, en la Figura 11 se presentan algunas micrografías correspondientes a gránulos de almidón de diferente especie vegetal de origen, aquellos con mayor concentración de amilosa tienden a ser más alargados e irregulares, el sitio en que se almacene el gránulo y la edad de estos influirán en el tamaño del gránulo (Fernández-Ocegueda, 2018).

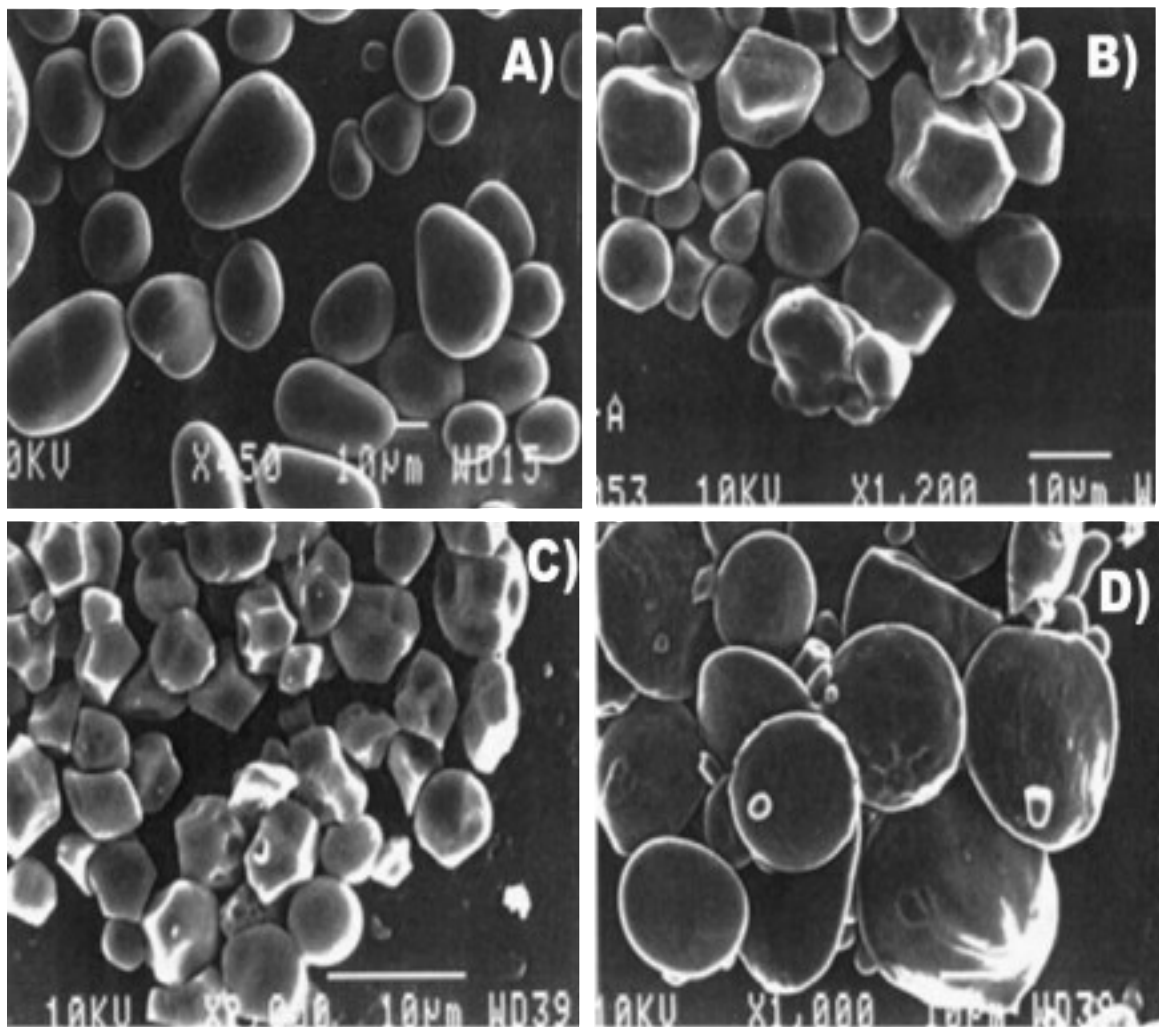


Figura 11. Micrografías (SEM) de almidones obtenidos de diversas fuentes botánicas: A) arroz, B) trigo, C) papa, y D) maíz. Adaptada de Singh *et al.*, 2003.

De igual forma, en el cuadro 4 se enlistan algunos tipos de almidón de diferentes fuentes botánicas, mostrando variaciones en tamaño, forma y composición química.

Cuadro 4. Composición química de diferentes almidones botánicos. Adaptación de Avérous y Halley, 2009.

	Almidón			
	Papa	Maíz	Trigo	Yuca
Amilosa (%) *	20-25	26-28	26-27	17
Amilopectina (%) *	79-74	71-73	72-73	83
Lípidos (%) *	0.03	0.63	0.63	0.2
Proteína (%) *	0.05	0.3	0.3	0.06
Fósforo (%) *	0.08	0.02	0.06	0.32
Humedad (%) **	18-19	12-13	13	9.48
Diámetro de granulo (micrones)	40-100	15	25	8-22
Cristalinidad (%)	25	39	36	NR
Morfología	Oval-esférica	Poligonal	Lenticulares-esféricos	Esférica-truncada

*Determinado en base seca

**Determinado después del equilibrio a 65 % de HR, 20 ° C.

NR; no reportado

2.9.2. Tratamientos Térmicos Del Almidón

Una manera de analizar la calidad y vida de anaquel de los almidones es mediante su comportamiento termo mecánico y propiedades reológicas. Los perfiles térmicos de acuerdo con Prieto-Méndez, *et al.* (2009) se puede conocer con un equipo de calorimetría diferencial de barrido (DSC), mediante el cual se determinan las transiciones endotérmicas a bajas temperaturas (menores a 90 °C) revelando el efecto calor-humedad que induce el fenómeno orden-desorden de los cristales de la amilopectina, y poder evaluar el efecto de la amilosa, amilopectina, azúcares y agua sobre la gelatinización.

2.9.2.1. Gelatinización

Al calentar almidones nativos con exceso de agua, generalmente por encima de 60 °C, cambia la estructura del gránulo de almidón, a este proceso se le conoce como gelatinización y se ve afectado por la cantidad de agua, el tipo y concentración de almidón sus posibles modificaciones físicas o químicas y la presencia de soluto. En esencia la gelatinización representa la desorganización de los gránulos de almidón provocando cambios irreversibles como pérdida de la estructura cristalina debido a la disociación de dobles hélices, hinchamiento granular, la pérdida de birrefringencia, junto con el aumento de viscosidad y solubilidad (Cruz-Benítez, 2016).

Al alcanzar la temperatura de gelatinización, los gránulos de almidón pierden su birrefringencia, la amilosa se lixivia en el medio y aumenta la viscosidad, mientras que la amilopectina se mantiene en el interior del gránulo hasta que su estructura tridimensional se desorganiza (Figura 12). Durante esta transición, los enlaces entre los puentes de hidrogeno e hidrófobos del almidón se rompen, y se generan enlaces de hidrogeno entre las moléculas de agua y el almidón, como resultado el granulo se hidrata totalmente y la estructura micelar se desintegra, dispersándose en el

medio acuoso, una vez que los gránulos se destruyen, la viscosidad del sistema tiende a reducirse (Canónico-Franco, 2003; Chávez-Murillo, 2008).

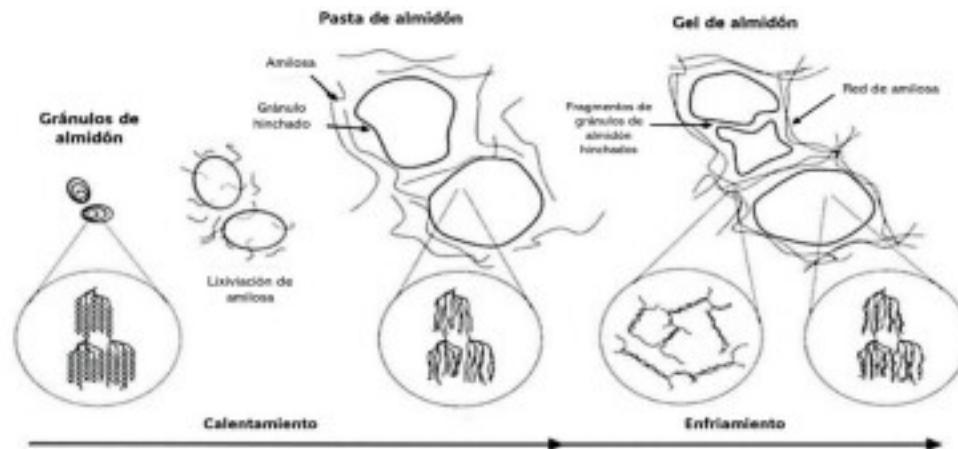


Figura 12. Representación gráfica del hinchamiento y la gelatinización de los gránulos de almidón en presencia de agua. Adaptado de Acosta-Guizado, 2023

Existen múltiples técnicas empleadas para estudiar y observar el fenómeno de la gelatinización del almidón, por ejemplo, la microscopía óptica y electrónica de barrido con la cual se puede conocer el grado y duración de hinchamiento de los gránulos, así como su tamaño. Otra técnica es la calorimetría diferencial de barrido (DSC) que permite medir la temperatura de inicio y finalización, así como la entalpía asociada al proceso de gelatinización, detectando los cambios del flujo de calor que se asocian con transiciones de primer y segundo grado en los polímeros de almidón. Por otro lado, la técnica de difracción de rayos X se utiliza en el estudio del cambio de cristalinidad y caracterización en la transición de la estructura cristalina, durante la gelatinización (Cruz-Benítez, 2016; Hoover, 2001).

2.9.2.2. Gelación

Durante el tratamiento térmico del almidón el flujo de los gránulos se modifica notablemente, pasando de una suspensión a una dispersión compuesta en gránulos hinchados y parcialmente desintegrados, el material resultante de este proceso se conoce como pasta de almidón, este proceso se define como gelación (Figura 13). En términos generales la pasta de almidón es un sistema compuesto por una fase

dispersa (gránulos hinchados) y una fase continua (amilosa lixiviada del gránulo) (Chávez-Murillo, 2008).

El proceso de gelación de la amilosa es más rápido que la retrogradación de la amilopectina esto se debe a que en la gelación, la amilosa tiende a reasociarse mediante enlaces de hidrogeno entre moléculas adyacentes dando lugar a la formación de redes tridimensionales. Cuando ocurre la agregación entre las moléculas de amilosa con algunos segmentos lineales de la amilopectina, se obtiene la formación de un gel fuerte (Cruz-Benítez, 2016). Estas propiedades están determinadas por el tipo y la concentración de almidón, así como por la temperatura, la presencia de solutos adicionales y la intensidad de la agitación durante el calentamiento.

Cuando la temperatura aumenta y se mantiene constante, los gránulos se desintegran y las cadenas poliméricas se reorganizan, lo que conduce a una reducción de la viscosidad de la pasta, fenómeno denominado etapa de disociación. La viscosidad en esta fase denota la estabilidad de la pasta. Al enfriarse el sistema, se produce la reasociación de las moléculas de almidón principalmente la amilosa. Usualmente se forma un gel cuya consistencia depende de la concentración de almidón, siendo el incremento de viscosidad en este punto denominada como viscosidad final (Chávez-Murillo, 2008).

En algunos almidones, la textura y la viscosidad de la pasta pueden experimentar variaciones al enfriarse. La formación de pasta o gel está condicionada por el contenido de amilosa, ya que a mayor proporción de amilosa mayor es la firmeza del gel. Por su parte la amilopectina determina la absorción de agua y, en consecuencia, el grado de hinchamiento de los gránulos (Cruz-Benítez, 2016).

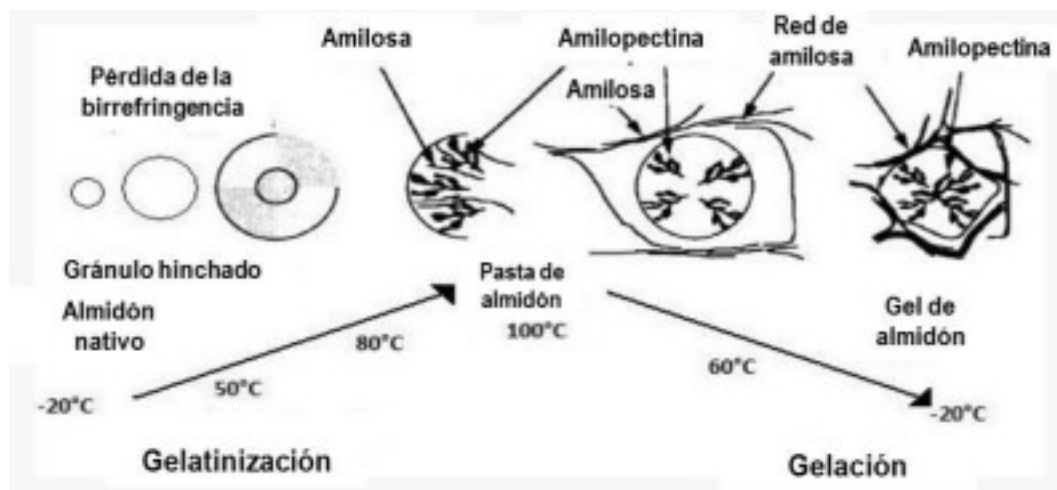


Figura 13. Transiciones de fase (gelatinización y gelación) en almidón sometido a procesos hidrotérmicos. Adaptado de Fernández-Ocueda, 2018.

En el cuadro 5 se muestran diferentes tipos de almidón, así como algunas características de su perfil térmico, de acuerdo con el origen botánico.

Cuadro 5. Características del perfil térmico de almidones de diferentes fuentes botánicas.

Almidón	Temperatura de gelatinización (°C)	Temperatura de gelación (°C)	% Hinchamiento		% Solubilidad		Propiedades físicas
			60 °C	90 °C	60 °C	90 °C	
Papa	59-68	64	5.18	58.9	2.37	25.61	Claro, cohesivo con tendencia a gelificar
Maíz	62-72	80	2.46	9.23	0.31	1.65	Gel opaco
Trigo	52-63	77	2.03	8.36	2.27	3.41	Gel opaco

2.9.2.3. Retrogradación

Debido al enfriamiento lento de las pastas gelatinizadas de almidón, las moléculas de amilosa disponen de tiempo suficiente para alinearse, formando múltiples enlaces por puentes de hidrogeno entre cadenas paralelas y adyacentes, este fenómeno se conoce como retrogradación.

La retrogradación se ve influenciada por el origen del almidón, la distribución y longitud de las cadenas de la molécula de amilopectina, contenido de agua, temperatura de almacenamiento, presencia de otros compuestos y proporción amilosa-amilopectina del granulo. La relación amilosa-amilopectina condiciona la velocidad de retrogradación, ya que la amilosa interviene principalmente en los cambios estructurales y reológicos de los geles de almidón durante las primeras 24 horas, mientras que la amilopectina contribuye a las modificaciones que se producen a largo plazo (Cruz-Benítez, 2016; Chávez-Murillo, 2008).

La retrogradación se desarrolla durante el enfriamiento, en dos fases. La fase inicial, se lleva a cabo en corto tiempo e involucra la generación de regiones cristalinas a partir de la amilosa retrogradada. La segunda fase se encarga de la formación de una estructura organizada dentro de la amilopectina. Cada almidón tiene diferente tendencia a retrogradarse dependiendo del contenido de fracciones de amilosa (Chávez-Murillo, 2008; Canónico-Franco, 2003).

2.9.3. Antecedentes Del Uso De Almidón Como Matriz Gelificante

Desde hace tiempo se han realizado estudios para la creación de agentes gelificantes alternativos al agar resaltando el uso de almidones derivados principalmente de maíz, trigo y papa (Romay, *et al.*, 2006). Obteniendo resultados favorables. En un estudio Kuria *et al.*, (2008), mediante micropropagación de segmentos nodales de papa (*Solanum tuberosum*) en medios de cultivo solidificados con almidón de yuca (*Manihot esculenta*) al 10 % (p / v), concluyeron que el almidón de yuca puede proporcionar un soporte medio a un bajo costo.

En el año 2014, Lalitha *et al.*, evaluaron tres agentes gelificantes a base de harina de maíz (*Zea mays* var. *Amylacea*), polvo de mandioca (*Manihot esculenta*) y arrurruz (*Maranta arundinacea*) para la propagación *in vitro* de mora (*Morus indica* L.), obteniendo brotes más largos en comparación con el agar convencional, concluyendo que el agente gelificante derivado de plantas, es eficiente como gelificante alternativo al agar y de bajo costo. Otro estudio donde se evaluó una matriz gelificante a base de papa (*Solanum tuberosum*) se encontró una mayor variabilidad estadística y cantidad de las longitudes en biomasa fresca y número de nodos, para los explantes cultivados en medios de matriz de papa en comparación con los cultivados en agar puro (Martin-Gordo, *et al.*, 2017).

En un estudio reciente a cargo de Jiménez-Rivera y Montero-Carmona en 2019, se sustituyó el gelificante por almidón de maíz en la propagación de tejidos vegetales de raicilla (*Psychotria ipecacuanha*) obteniendo un medio de cultivo eficiente y de bajo costo sin afectar la calidad y producción de explantes de raicilla.

Romay, *et al.* (2006) sugieren el uso de matrices de almidón extraído de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en comparación con el gelificante Phytigel®, dicho estudio concluye que no hay diferencias significativas entre las variables evaluadas, de modo que la matriz de almidón propuesta puede sustituir al agar.

En base a la literatura consultada, se considera que los agentes gelificantes alternativos al agar son rentables, puesto que los costos disminuyen debido a que los tubérculos y cereales empleados como materia prima son accesibles y renovables en contraste con el agar proveniente de algas rojas, por lo que el presente estudio, se planteó el objetivo de evaluar mezclas de agar con almidón de diferente fuente botánica, para el crecimiento *in vitro* de una planta de la familia Asparagaceae.

2.10. Generalidades De La Familia Asparagaceae

La familia Asparagaceae está compuesta por plantas que pueden carecer de tallos visibles (acaules) o presentarlos con hojas suculentas, coriáceas o herbáceas

dispuestas en rosetas, flores bisexuales y semillas de color negro (García-Mendoza, 2007).

El género *Agave* se distribuye ampliamente en México, abarcando más del 75 % del territorio; sin embargo, su presencia no es uniforme, con regiones más ricas en especies que otras. La mayor diversidad se registra en las provincias áridas y semiáridas del centro y norte, reduciéndose considerablemente hacia las áreas húmedas y cálidas del sur (García-Mendoza, 2007).

Los *Agaves* son plantas que se desarrollan en una amplia variedad de hábitats, desde valles y planicies hasta cerros y laderas rocosas, incluyendo regiones montañosas de gran altitud, soportan pH ligeramente alcalino (Cervantes-Dueñas, 2016). Los agaves se desarrollan perfectamente en poblaciones o individuales, se ha considerado a México como centro de origen y diversidad del género *Agave*, es así porque en México se encuentran alrededor del 75 % del total de las especies descritas y 55 % crecen exclusivamente en territorio mexicano (García-Herrera, *et al.*, 2010). Esta especie habita desde zonas con altitudes de 300 msnm hasta lugares con elevaciones mayores a 300 msnm.

La reproducción de los agaves generalmente se da por semilla, vástagos vegetativos, o propágulos. Otro método de reproducción consiste en “deshijar” la planta madre, quitando los propágulos derivados del rizoma que nacen en torno a la planta para posteriormente trasplantarlos a su lugar definitivo (García-Herrera, *et al.*, 2010).

2.10.1. Importancia Ecológica Del Género *Agave*

Los agaves han estado ligados a la vida de los pobladores desde tiempos milenarios y en México todavía tienen una gran importancia económica.

“Sistemas socio-ecológicos: Cualquier ecosistema del mundo que presente influencia de las actividades humanas es considerado un socio-ecosistema o sistema socioambiental” (Escalante, 2017).

Dentro de los ecosistemas semiáridos y áridos, el género *Agave* tiene gran relevancia ecológica al contribuir en la reducción de la erosión, la captura de carbono y proporcionar refugio y alimento a una amplia diversidad de especies desde insectos hasta mamíferos. Son especies resilientes con la capacidad de tolerar y responder a las alteraciones causadas por el cambio climático. El género *Agave* tiene múltiples usos que abarca la producción de alimentos, fibras, productos medicinales, leña, materiales para construcción, bebidas alcohólicas tradicionales (como tequila, mezcal, sotol, pulque, entre otros) y recientemente se ha considerado como una alternativa forrajera (Espinosa-Barrera, 2015).

2.10.2. La Técnica *In Vitro* Para La Propagación De Especies Del Género *Agave*

A pesar de la importancia socio-ecológica que el género *Agave* representa, su estudio en cuanto a propagación confiere es muy pobre. En este sentido la biotecnología vegetal tiene un papel importante, pues por las muchas aptitudes que esta ciencia tiene se pueden implementar técnicas y métodos para su reproducción (Domínguez-Rosales, *et al.*, 2008).

El método de reproducción por hijuelos es muy poco rentable, pues el proceso de crecimiento y por ende producción es muy largo (García-Herrera, *et al.*, 2010), por ello se buscan formas de mayor eficacia para la producción de agave, una de estas formas es implementando el método de micropropagación de yemas laterales, tal como lo demostraron Villalobos, *et al.*, (1991), que mediante micropropagación, reprodujeron las yemas laterales de una especie de agave utilizando el medio MS, obteniendo un promedio de seis brotes.

Se han descrito estudios destacados respecto a la propagación *in vitro* de diversas especies del género *Agave*, en el cuadro 6 podemos apreciar los resultados de cada investigación, especie en cuestión y medios de cultivo utilizados en cada trabajo. Podemos observar resultados importantes en la implementación de cultivo *in vitro* para el género *Agave*, concluyendo que la propagación de agaves por cultivo vegetal es eficiente, para la producción de especies de este género.

Cuadro 6. Estudios de propagación *in vitro* de diferentes especies del género *Agave*. Adaptado de Domínguez-Rosales, *et al.*, 2008.

Especie de <i>Agave</i>	Avance reportado	Medio de cultivo/Reguladores de crecimiento utilizados	Referencia
<i>Agave</i> sp.	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta	Linsmaier y Skoog (1 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 1mg L ⁻¹ de cinetina) para generación de tejido calloso. Mismo medio (0.2 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L ⁻¹ de cinetina) para generación de brotes a partir del callo.	Groenewald <i>et al.</i> (1977)
<i>A. fourcroydes</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta	SH adicionado con BA en un rango de 2.2 a 22.2 µM	Robert <i>et al.</i> (1987)
<i>A. arizonica</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta	MS (1.4 µM de 2,4-D) para generación de tejido calloso. Diferenciación de brotes en medio (44.4 µM de BA y 0.5 o 5.4 µM de ANA).	Powers y Backhaus (1989)
<i>A. cantal</i> <i>A. fourcroydes</i> <i>A. sisalana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta	MS con 0.1 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 0.1 mg L ⁻¹ de BA para generación de tejido calloso y brotación.	Binh <i>et al.</i> (1990)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales (rizomas)	MS o SH con BA (22.2 µM).	Das (1992)
<i>A. victoriae-reginae</i>	Embriogénesis somática directa en explantes de hojas	MS con vitaminas L2 y 2,4-D (1,4 µM) para generación de embriones, MS o SH al 50 % para su germinación.	Rodríguez-Garay <i>et al.</i> (1996)

Especie de Agave	Avance reportado	Medio de cultivo/Reguladores de crecimiento utilizados	Referencia
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales y organogénesis indirecta	MS, SH, Gamborg y de White adicionados con diversas concentraciones de BA, de cinetina, de NAA, de IAA y de 2,4-D en combinación o solos.	Nikam (1997)
<i>A. amaniensis</i>	Cultivo de tejido calloso y producción de sapogeninas	MS con Cinetina (23.2 µM) y 2,4-D (2.26 µM).	Andrijany <i>et al.</i> (1999)
<i>A. angustifolia</i>	Generación de brotes de a través de organogénesis directa a partir de segmentos de médula de tallo.	MS con 1 mg L ⁻¹ de BA.	Enríquez del Valle <i>et al.</i> (2005)
<i>A. salmiana</i>	Generación de brotes a partir de meristemos.	MS con 2.0 mg l ⁻¹ BA y 0.25 mg l ⁻¹ AIA.	Silos-Espino <i>et al.</i> (2007)

2,4-D: amina

SH: medio descrito por Schenk & Hildebrandt 1972

BA: Benciladenina

MS: medio descrito por Murashige y Skoog, 1962,

ANA: ácido naftalenacético

Vitaminas L2: según Phillips y Collins (1997) (Inositol 250 mg/l, tiamina 2.0 mg/l, piridoxina 0.5 mg/l)

NAA: ácido naftalenacético

IAA: ácido indolacético

III. METODOLOGÍA

Este proyecto se dividió en tres etapas principales, I) formulación de las matrices gelificantes, II) caracterización de las matrices gelificantes y III) preparación de medios de cultivo, en la Figura 14, se describe de manera general la metodología realizada en este proyecto.



Figura 14. Metodología general para el desarrollo del proyecto de uso de matrices de almidón como sustituto de agar en medios de cultivo *in vitro*.

3.1. Formulación De Matrices Gelificantes

Para elaborar los medios de cultivo, se sustituyó de manera parcial y/o total el agente gelificante convencional (agar-agar), por almidón de dos fuentes botánicas, almidón de maíz (marca Ingredion lote: 03005018) y almidón de papa (marca Roquette™ lote: VN552), debido a su capacidad de gelificación y retención de agua. Las formulaciones se establecieron con base a la concentración mínima de gelificación de los almidones empleados.

3.1.1. Concentración Mínima De Gelificación

La concentración mínima a la cual se gelifica el almidón se determinó empleando el método de Sathe y Salunkhe (1981), con algunas modificaciones. Se prepararon suspensiones de almidón al 2 %, 4 %, 6 %, 8 % y 10 % (p/v) en tubos de ensayo con 5 ml de agua destilada, posteriormente se mezclaron en un vortex durante 5 min y se mantuvieron en ebullición a baño maría durante 1 h, enseguida se enfriaron con agua corriente del grifo y finalmente se refrigeraron a 4 °C durante 2 horas (figura 15). La prueba se realizó colocando los tubos de manera invertida y registrando el comportamiento que presentó la muestra (líquida, viscosa, gel suave, gel, o gel firme). La concentración mínima de gelificación es la concentración en la que se observó la formación de un gel.



Figura 15. Determinación de capacidad mínima de gelificación.

3.2. Elaboración De Medios De Cultivo

En el cuadro 7 se presenta el diseño de experimentos seguido para la elaboración de los medios de cultivo. Se establecieron 4 mezclas: 100 / 0, 60 / 40, 40 / 60, y 0 / 100, agente gelificante convencional (agar, marca DIBICO®) / agente gelificante alternativo (almidón de maíz o papa), en todos los casos se agregó solución nutritiva al medio. De tal forma que la mezcla 1 estuvo compuesta 100 % de agar y solución nutritiva (medio de cultivo convencional), definida como control positivo del experimento; mezcla 2: compuesta por 60 % de agar y 40 % almidón + solución nutritiva; mezcla 3: 40 % de agar, 60 % almidón + solución nutritiva y finalmente mezcla 4: 100 % almidón + solución nutritiva.

La solución nutritiva empleada fue la descrita por Murashige y Skoog (1962), primero se pesó en una balanza analítica (marca AND® modelo HR-200) 0.663 g de medio de cultivo Murashige & Skoog (marca PhytoTech Labs®) y 4.5 g de sacarosa (azúcar estándar de marca Soriana®) dentro de un vaso de precipitado y se agregaron 50 ml de agua destilada, se mantuvo en agitación constante hasta diluir y se aforó a un volumen de 150 ml. Posteriormente se estabilizó el pH de la solución a 5.8 - 6.0 con un potenciómetro (marca pHep® by HANNA®). Primero se calibró el potenciómetro con soluciones buffer (pH 4.01 HI7004 y pH 7.01 HI5004) después de calibrado, se midió el pH de la solución nutritiva y se ajustó al pH deseado agitando y añadiendo gota a gota, soluciones tampón de NaOH 0.5 M, si el pH se encontraba por debajo de 5.7 o HCl 0.5 M (marca Analytyka®) si el pH era superior a 5.8.

Para la elaboración del medio, se pesaron las cantidades necesarias de agar y/o almidón establecidas en el diseño de experimentos (Cuadro 7) posteriormente se fue agregando lentamente el agar al matraz que contenía la solución nutritiva, y fue puesto en agitación constante de manera vigorosa en una parrilla de agitación (marca CIMAREC™ y CORNING® modelo PC 320), para la incorporación y disolución del agar y/o almidón, una vez disuelto el agar, se añadió el almidón manteniendo la agitación hasta observarse una solución homogénea,

posteriormente, se inició una rampa de calentamiento incrementando 10 °C / 10 min, hasta alcanzar la temperatura óptima de gelatinización del almidón (90 °C) manteniendo esta temperatura durante 10 min más para asegurar la completa gelatinización del almidón (figura 16).



Figura 16. Elaboración de medio de cultivo.

Una vez obtenido el medio de cultivo, se identificó cada matraz de acuerdo con el tipo de almidón y concentración, como se observa en el cuadro 7. Finalmente, la solución se esterilizó en una autoclave (marca OLizee), a 120 °C y 1 kgf / cm² de presión durante 20 minutos.

Cuadro 7. Diseño de experimentos seguido para la elaboración de los medios de cultivo.

Agente gelificante	Concentración de almidón (%)	Mezcla agar/ almidón (%)	Mezcla agar: almidón (g)	MS	Sacarosa	Temperatura	ID muestra
Agar	-	100 / 0	1.05 - 0	0.663	4.5	Ebullición	Control
Almidón de maíz	7	60 / 40	0.63 - 4.2	0.663	4.5	90 °C	Ag60_M740
		40 / 60	0.42 - 6.3				Ag40_M760
		0 / 100	0 - 10.5				M7100
Almidón de maíz	10	60 / 40	0.63 - 6	0.663	4.5	90 °C	Ag60_M1040
		40 / 60	0.42 - 9				Ag40_M1060
		0 / 100	0 - 15				M10100
Almidón de papa	7	60 / 40	0.63- 4.2	0.663	4.5	90 °C	Ag60_P740
		40 / 60	0.42- 6.3				Ag40_P760
		0 / 100	0 - 10.5				P7100
Almidón de papa	10	60 / 40	0.63 - 6	0.663	4.5	90 °C	Ag60_P1040
		40 / 60	0.42 - 9				Ag40_P1060
		0 / 100	0 - 15				P10100

Donde:

MS= solución nutritiva (Murashige y Skoog)

Ag= agar

M7= almidón de maíz al 7 %

M10= almidón de maíz al 10 %

P7= almidón de papa al 7 %

P10= almidón de papa al 10 %

3.2.1. Caracterización De Las Matrices Gelificantes (Almidón De Maíz Y Papa)

3.2.1.1. Contenido De Humedad

El contenido de humedad de los almidones se determinó de acuerdo con el método 925.09 descrito por la AOAC (1990). Se pesaron 2 g de almidón (W_2) en recipientes de aluminio, previamente llevados a peso constante (W_1) en una estufa de cultivo (felisa[®]), las muestras se colocaron en estufa a 100 °C durante 24 h, posteriormente se enfriaron en un desecador para luego pesarse (W_3) (figura 17). Los análisis se realizaron por triplicado. Los cálculos se determinaron con la Ecuación 1:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100$$

Ecuación 1.

Donde:

W_1 : masa del recipiente vacío (g).

W_2 : masa del recipiente con la muestra antes del secado (g).

W_3 : masa del recipiente con la muestra después del secado (g).



Figura 17. Determinación de porcentaje de humedad de almidones, (A-B) proceso para recipientes a peso constante, (C) Registro de masa inicial del recipiente y (D) Peso del almidón.

3.2.1.2. Análisis De Perfil De Textura (TPA) De Los Agentes Gelificantes

Los geles se prepararon de acuerdo con la metodología descrita por Molavi y Razavi (2018) con ligeras modificaciones siguiendo las formulaciones establecidas en el cuadro 7 del presente trabajo. Las proporciones necesarias de almidón y agar fueron pesadas para cada tratamiento, se formó una dispersión con agua destilada en un vaso de precipitado, después de mezclar a temperatura ambiente, la dispersión se calentó manteniendo agitación magnética constante hasta 90 °C, se utilizó una tapa de aluminio para evitar la evaporación de agua, posteriormente la pasta caliente fue puesta dentro de contenedores cilíndricos de plástico de 17 mm de diámetro (jeringas marca Plastipak™ de 20 ml) y se mantuvieron en baño maría con agitación manual constante a 90 °C durante 10 minutos, transcurrido este tiempo se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente (figura 18), y se almacenaron en refrigeración por un periodo de tiempo de 24 - 48 h antes de su análisis. Se obtuvieron geles por quintuplicado para cada tratamiento.



Figura 18. Preparación de geles para el análisis de perfil de textura.

Los geles de cada tratamiento se desmoldaron minutos antes de realizar el análisis (figura 19 A) y cortados (figura 19 B, C) para obtener fragmentos de 10 mm de alto y 17 mm de diámetro, las dimensiones se midieron y registraron con un micrómetro (Mitutoyo Digimatic Micrometer) (figura 19 D).



Figura 19. Obtención de fragmentos de gel para análisis TPA, A) desmoldado de geles, B) flagelación de gel para obtener muestras adecuadas a los requerimientos del análisis, C) fragmentos de gel obtenidos D) medición de las dimensiones de los fragmentos de gel.

Para el análisis de perfil de textura (TPA), se empleó un texturómetro (AMETEK® BROOKFIELD) con una celda de carga de 4500 g, equipado con el software TexturePro CT v1.9 Bulld 35 para adquirir las curvas fuerza-tiempo de las muestras. La sonda empleada fue un cilindro de acrílico de 12.7 mm de diámetro y longitud de 35 mm (TA5 Cylinder), lubricado con aceite vegetal (marca capullo®) para evitar que las muestras se pegaran a la sonda. Todas las muestras se comprimieron con una fuerza de contacto de 0.05 N, velocidad de 0.2 cm/s y una deformación del 43%,

se realizaron dos ciclos de compresión con un tiempo de espera entre ciclos de 5 s (figura 20).

Los parámetros cuantificados fueron: dureza (fuerza máxima en el primer ciclo de compresión, N), adhesividad (área de fuerza negativa entre los dos ciclos, N/s), índice de elasticidad (la relación entre la elasticidad y la deformación total, unidad adimensional), cohesividad (relación del área de fuerza positiva durante el segundo ciclo sobre el área positiva del primer ciclo, A_2/A_1) y fuerza de fractura o fracturabilidad (fuerza requerida para producir la primer fractura, N), los resultados reportados fueron las medias de experimentos por quintuplicados.



Figura 20. Gel de almidón sometido a prueba de análisis de perfil de textura.

3.3. Siembra E Incubación De Explantes

Los medios de cultivo empleados para la siembra e incubación de explantes, se prepararon conforme a lo descrito en la sección 7.2, cada medio de cultivo se

preparó al momento de requerirse para la siembra, para evitar el uso de almidón retrogradado.

Previamente a la siembra, se esterilizaron todos los materiales a utilizar en una autoclave (marca UL modelo 25X-1), a 120 °C y 1 kgf/cm² de presión durante 15 minutos. Las semillas utilizadas de *Agave potatorum* Zucc., fueron donadas por colaboradores del laboratorio, quienes las colectaron el 11 de mayo del 2021, dentro de la comunidad de San Miguel Piedras, Nochixtlán, Oaxaca, con coordenadas 17°02'25.5"N 97°13'20.9"W. Previo a la siembra, las semillas se colocaron en agua destilada por 24 horas, (Figura 21 A), después de este tiempo se lavaron con detergente líquido (marca salvo®) y agua destilada, además se adicionó una gota de SORBITÁN Mono – Laurato para retener humedad.

Para la desinfección del material vegetal (semillas) se realizaron 3 lavados utilizando cloro comercial (marca CLOROX®) al 40 % y alcohol etílico marca Jalmek® al 70 % como desinfectantes y agua destilada estéril como diluyente. El área de trabajo se desinfectó con cloro comercial, antes de comenzar la desinfección y siembra del material vegetal, posteriormente se colocaron mecheros en el área de trabajo, para evitar contaminación; para el primer lavado, se utilizó una solución de 20 ml cloro + 30 ml agua destilada estéril, manteniendo las semilla en remojo y agitación manual durante 5 minutos, para el segundo lavado, se utilizó 35 ml de alcohol y 15 ml de agua destilada estéril repitiendo lo anterior, y por último se realizó un enjuague con agua destilada estéril por 3 minutos (Figura 21 B).

Las semillas previamente desinfectadas, se colocaron en una caja Petri (Figura 21 C) y posteriormente, se realizó la siembra dentro de una campana de flujo laminar marca ECOSHELL.

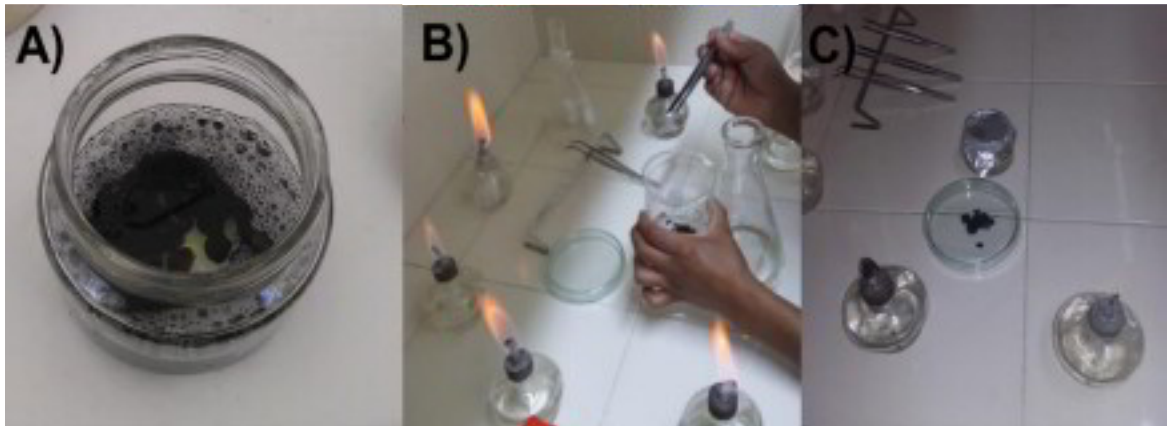


Figura 21. Tratamiento pre siembra de semillas. A) remojo de semillas por 24 horas, B) lavados de desinfección el día de siembra, C) vaciado de semillas en cajas Petri para evitar contaminación en la siembra.

Se sembró una semilla por cada tubo de ensaye con medio de cultivo previamente esterilizado (Figura 22 A), posterior a ello los tubos de ensaye se sellaron para evitar contaminación durante el proceso del cultivo *in vitro* y se etiquetaron para poder identificar los diferentes tratamientos (Figura 22 B). Los tubos se mantuvieron a una temperatura aproximada de 25 °C, con fotoperiodo de 16 h luz /8 h oscuridad (incubación) (Figura 22 C). La Figura 22 representa el procedimiento de siembra e incubación de explantes en el medio de cultivo, para su posterior crecimiento, desarrollo y evaluación.

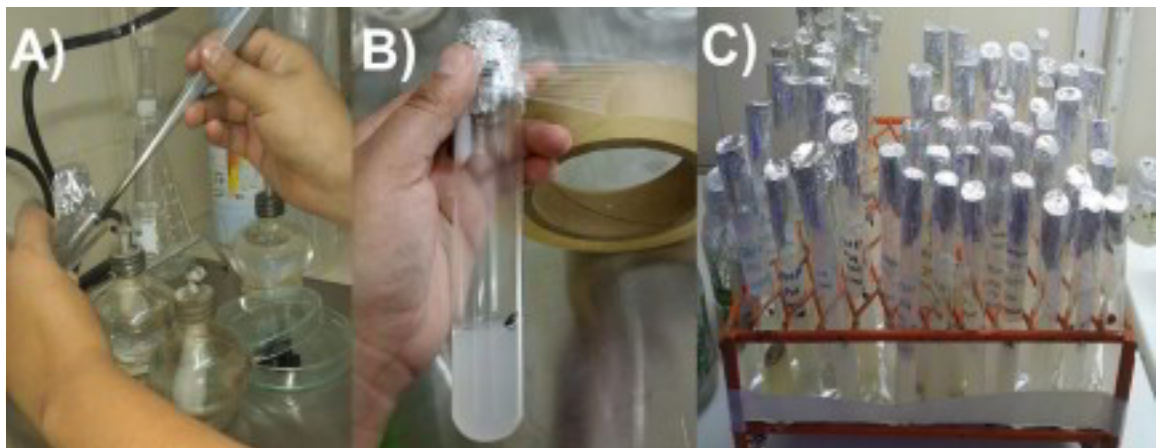


Figura 22. Procedimiento siembra e incubación *in vitro* de semillas de *Agave potatorum* Zucc. A) siembra de semilla en tubo de ensaye, B) etiquetado, y sellado con aluminio y empleye, de tubos post-siembra, C) incubación de semillas post-siembra, bajo condiciones controladas.

7.3.1 Evaluación de los efectos de la sustitución parcial de agar

Para evaluar la sustitución de agar por almidón se comparó el número de semillas germinadas por cada tratamiento en relación con el control positivo. Cuando se observó el crecimiento de las plántulas, éstas se extrajeron y se lavaron sus raíces (Figura 23 A y B) para registrar con un vernier digital la longitud de hipocótilo (tallo), midiendo desde la base del tallo hasta la parte más alta de las hojas (figura 23 C), de igual forma se midió la longitud de radícula tomando medida desde el comienzo de la radícula hasta la punta de la raicilla más larga por cada plántula de los diferentes tratamientos (figura 23 D), finalmente se obtuvo el peso fresco de cada plántula (figura 23 E) con una balanza analítica (marca AND® modelo HR-200).



Figura 23. Evaluación de efectos de la sustitución parcial y total de agar en plántulas de *Agave potatorum* Zucc. A) extracción de plántulas *in vitro* B) lavado de raíces para quitar residuos de gelificante C) medición de altura de planta D) medición de raíces de plántulas obtenidas *in vitro* E) pesado de plántulas obtenidas *in vitro* (peso fresco).

3.4. Análisis Estadístico

Para el análisis de perfil de textura de los agentes gelificantes se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor y una prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $p = 0.05$, $n=5$.

Para la evaluación de los efectos de la sustitución parcial de agar en la siembra *in vitro* de explantes, y debido a la distribución de los datos, el análisis de las variables

del presente estudio se realizó mediante un modelo estadístico lineal generalizado (GLM) en el programa estadístico Rstudio 2024.04.2+764.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Capacidad Mínima De Gelificación

Para determinar la concentración adecuada a ser empleada en la formulación de los medios de cultivo, se determinó la capacidad mínima de gelificación de cada almidón, debido a que la gelificación de los medios de cultivo, juega un papel fundamental en el sostén, germinación y desarrollo de plántulas, ya que los medios de cultivo semisólidos, brindan a las plantas mayor estabilidad y anclaje para sus raíces, permitiendo también la liberación paulatina de los nutrientes adicionados en el medio de cultivo, durante el proceso de propagación vegetal *in vitro*, así como de la humedad (López-Escamilla, *et al.*, 2016). Por otro lado, si el medio no es estable, o bien la gelificación no es adecuada (gel débil, viscoso) los explantes pueden presentar hiperhidratación por exceso de humedad en el medio, causando daños morfológicos en los explantes, o necrosis por la abrupta disponibilidad de nutrientes (Veitía, *et al.*, 2012).

Los porcentajes de la capacidad mínima de gelificación de los almidones a 90 °C se muestran en el cuadro 8. A una concentración del 2 %, el almidón de maíz permanece líquido mientras que el almidón de papa presenta una textura viscosa (Figura 24 A y F, respectivamente), en ambos casos esta textura no es funcional para siembra *in vitro*, debido a que no cumple con la función de soporte inerte. Para el caso del almidón de maíz al 4 %, se observa la formación de un gel suave (Figura 24 B) mientras que la consistencia del almidón de papa a esa misma concentración permanece viscosa (Figura 24 G). A pesar de observarse un gel con mayor consistencia, no presenta la estabilidad necesaria para utilizarlo en un medio de cultivo, debido a que la disponibilidad de humedad y nutrientes no estarían regulados para su asimilación por los explantes, por lo que no es apto para emplearlo en siembra *in vitro*.

En general, puede apreciarse la formación de un gel suave a partir de una concentración de 4 % y 6 % para almidón de maíz y almidón de papa, respectivamente, resultados similares reportaron Klaochanpong *et al.* (2015) quienes observaron actividad de gelificación a partir de 5% de concentración para almidón de papa y de maíz.

En este estudio se observó la formación de un gel con más firmeza (Figura 24 D) a partir de 6 % para el almidón de maíz y 8 % en el caso del almidón de papa (Figura 24 J). Estos resultados muestran un indicio de la concentración óptima para emplear geles de almidón como medio de cultivo, definiendo que concentraciones menores a 6 % para el caso de maíz y 8 % en el caso de almidón de papa no son eficientes.

Sin embargo, si la concentración del agente gelificante es muy alta, afecta directamente la siembra y potencial matricial del medio de cultivo (Cárdenas-Lara y Villegas-Monter, 2002; López-Escamilla, *et al.*, 2016), debido a que el gel podría quedar muy duro, por lo tanto, la disponibilidad de humedad podría ser menor, inhibiendo la germinación, el anclaje de las raíces de los explantes, o bien la deshidratación de estos.

Con base a los resultados obtenidos en esta prueba se estableció que la concentración de almidón para la formulación de medios para cultivo *in vitro* debe ser superior al 6%, de esta forma se aseguran los requerimientos nutricionales de la especie a propagar. Se determinó que las concentraciones experimentales serían 7 y 10 %, esto con la finalidad de que la matriz gelificante pueda brindar el soporte necesario a las plántulas.

Diversos autores indican que la capacidad de hinchamiento del almidón está relacionada con el tamaño de sus gránulos que pueden medir entre 10 y 100 μm de diámetro (Pardo, *et al.*, 2013; Mejía-Cabezas, *et al.*, 2022;); este fenómeno se entiende como la cantidad de agua que el almidón es capaz de retener por unidad de peso a una temperatura específica, dicho comportamiento ocurre porque el aumento de la energía cinética del agua caliente debilita los enlaces de hidrógeno, permitiendo su penetración en la estructura granular y ocasionando el hinchamiento

y posterior gelatinización (Pozo-Chamorro, *et al.*, 2022). La organización del gránulo de almidón está determinada por la manera en que las moléculas de amilosa y amilopectina se agrupan mediante enlaces de hidrógeno entre cadenas (Cruz-Benítez, 2016).

La relación amilosa - amilopectina en los almidones es de prioritaria importancia debido a que la concentración de ambos define la consistencia, estabilidad, claridad y dureza del gel, estos polímeros en los almidones son influenciados por factores genéticos y el origen botánico de los mismos (Lunarejo-Polo y Jiraldo-Torres, 2021). El almidón normal, como el maíz, arroz, trigo y patata normales, contiene alrededor de un 70 % - 80 % de amilopectina y un 20 % - 30 % de amilosa. (Horstmann, *et al.*, 2017). Específicamente en los almidones de maíz y papa normales el contenido de amilosa y amilopectina varía de entre 20 % - 25 % de amilosa y 79 % - 74 % amilopectina en papa y 26 % - 28 % de amilosa y 71 % - 73 % de amilopectina en maíz (Cuadro 4) (Zakaria, *et al.*, 2017).

Cuadro 8. Concentración mínima de gelificación de los agentes gelificantes sustitutos en medios de cultivo.

Concentración (%)	Almidón	
	Papa	Maíz
2	Viscoso	Líquido
4	Viscoso	Gel suave
6	Gel suave	Gel
8	Gel	Gel firme
10	Gel firme	Gel firme

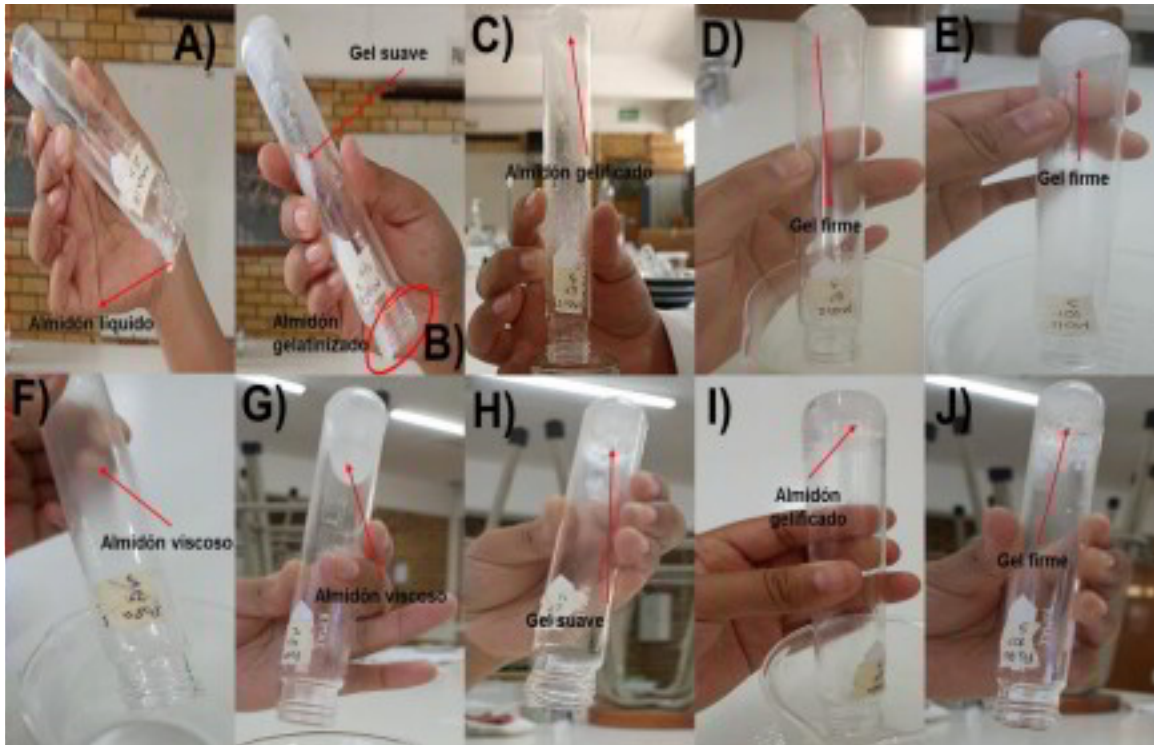


Figura 24. Concentración mínima de gelificación (A-E almidón de maíz, F – J almidón de papa) A) almidón al 2 % muy líquido B) formación de gel suave al 4 %, C) almidón gelificado al 6 %, D) obtención de gel firme al 8 %, E) gel firme al 10 %, F) almidón de textura viscosa al 2 % G) almidón de textura viscosa al 4 % H) formación de gel suave 6 % I) almidón gelificado al 8 % J) obtención de gel firme al 10 %.

4.2. Caracterización De Los Agentes Gelificantes

4.2.1. Contenido De Humedad.

El porcentaje de humedad para el almidón de papa fue de 6.34 ± 0.39 % coincidiendo con lo obtenido por Pardo *et al.* (2013), quienes reportaron rangos de humedad de entre 5.8 % y 6 % en siete variedades de papa (criolla R12, parda pastusa, ICA Huila, ICA Puracé, ICA Única y Tuquerreña); no obstante, Peña-Carrasco (2017), reportó un contenido de humedad de 9.03 %- 10.25 % en cinco variedades de papa (IB, IN, LK, Ob y PÑ).

Por otro lado, el almidón de maíz presentó un contenido de humedad de 8.41 ± 0.61 % lo cual coincide con lo reportado por Agama-Acevedo *et al.* (2005), quienes

determinaron porcentajes de humedad entre 6.6 % - 9.8 % en tres variedades de maíz (blanco, azul y negro), siendo el maíz azul el de mayor contenido de humedad (9.8 %). Sin embargo, Utrilla-Coello (2009) reportó porcentajes de humedad entre 6.33 % - 7.45%, en dos variedades de maíz (azul y blanco), lo que difiere ligeramente con los resultados obtenidos.

Estas diferencias en el contenido de humedad pueden deberse a diversos factores, tales como, el método utilizado para la extracción del almidón, fuente botánica, variedad y madurez fisiológica de la especie utilizada, proceso de secado y clima (Peña-Carrasco, 2017; Abegunde *et al.*, 2013). El contenido de humedad en los almidones influye en la calidad y estabilidad durante el almacenamiento, Przetaczek-Rożnowska (2017), afirma que el límite superior de humedad de los almidones comerciales es < 20 %; sin embargo, para un almacenamiento seguro, estable e inocuo de los almidones los rangos de humedad deben estar por debajo de 16%; pues a mayor humedad es susceptible a daños microbianos durante su almacenamiento, lo que se traduce en un subsecuente deterioro de la calidad, afectando su funcionalidad (Abegunde *et al.*, 2013).

Las muestras analizadas en este estudio mostraron un contenido de humedad inferior al 20% (6.34 % \pm 0.39 % y procesarse para almidón de papa y maíz, respectivamente) y un porcentaje muy por debajo del 16 % sugerido para un adecuado almacenamiento industrial, con base en lo anterior, se puede afirmar que los almidones utilizados en este estudio cumplen con estas recomendaciones, por lo tanto los insumos empleados en el desarrollo de este experimento cuentan con la calidad necesaria para ser procesados.

4.2.2. Análisis De Perfil De Textura De Los Geles (TPA)

Como ya se ha mencionado, el agar-agar representa el agente gelificante más usado en la elaboración de medios de cultivo para propagación, sin embargo, su costo es alto, por lo que llega a limitar su uso. Propiedades gelificantes, como la claridad, textura y toxicidad deben ser consideradas antes de elegir un agente gelificante. La claridad se refiere a la transparencia del agente gelificante, y es vital

para monitorear el desarrollo de las raíces durante el cultivo de tejidos. Mientras que la textura del medio se considera como adecuada cuando el agente gelificante puede ayudar al explante a mantenerse en posición vertical incluso en temperaturas cambiantes (Ebile, *et al.*, 2022).

Ya que el agar-agar cumple con las propiedades necesarias para la propagación de tejidos vegetales, en el presente estudio se evaluaron parámetros texturales como respuesta al uso de almidones de diferentes fuentes botánicas en la sustitución del agar-agar, en diferentes proporciones. Los resultados obtenidos para los diferentes parámetros de textura se muestran en el cuadro 9, de igual forma en el apartado de Anexos se muestra la representación gráfica de cada parámetro.

Con respecto a la dureza de los geles obtenidos, el agar (control) presentó una dureza de 0.338 ± 0.043 N, comparando esto con las mezclas, observamos que las combinaciones de agar con almidón de papa (por ejemplo, P10100, Ag40_P1060) generalmente redujeron la dureza del gel. En particular, la combinación Ag40_P760 resultó en una dureza significativamente menor (0.086 ± 0.005 N), lo cual indica un efecto notable del almidón de papa para suavizar la textura del gel.

Mientras que las mezclas con mayor proporción de almidón de maíz (M) mostraron un aumento en la dureza del gel, como se observa en M10100 (1.356 ± 0.156 N). Este incremento podría deberse a la estructura más rígida que proporciona el almidón de maíz en comparación con los otros componentes (Madege, *et al.*, 2015).

Con respecto a la adhesividad los resultados muestran que los tratamientos de agar-almidón (independientemente de la fuente botánica) presentaron diferencias significativas con respecto al control (0.036 ± 0.009 N/s). Es interesante observar que los tratamientos que involucran el almidón de maíz como M10100 (0.074 ± 0.005 N/s), mostraron un aumento en la adhesividad comparado con las combinaciones de almidón de papa, como P10100 (0.048 ± 0.008 N/s). Este aumento en adhesividad puede atribuirse a la consistencia más pegajosa del almidón de maíz (Qiao, *et al.*, 2022).

La adhesividad puede influir en el crecimiento de los explantes, afectando la formación de brotes y raíces. Un medio con la adhesividad adecuada puede promover un desarrollo más uniforme y saludable. A pesar de las diferencias significativas entre los tratamientos, podemos observar que los tratamientos con almidón de papa son semejantes al control.

El siguiente parámetro evaluado, fue la elasticidad, en el cuadro 9 se observa que el control presentó una elasticidad de 0.298 ± 0.079 , el análisis ANOVA y la prueba Tukey demostró que existen diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) con respecto al control. Principalmente se puede observar que aquellos tratamientos que contienen mayor proporción de almidón de maíz muestran una elasticidad significativamente mayor en comparación con los tratamientos de almidón de papa y el control. Esta respuesta podría atribuirse a la estructura molecular del almidón de maíz, que aporta mayor flexibilidad y capacidad de recuperación tras la deformación (Pérez & Bertoft, 2010). Una mayor elasticidad en el medio de cultivo puede proporcionar un entorno más favorable para el crecimiento de los explantes, permitiendo una mejor expansión y desarrollo. Sin embargo, una elasticidad excesiva podría dificultar el soporte adecuado de los explantes. Por tanto, es importante encontrar un equilibrio adecuado en la elasticidad del medio para optimizar el desarrollo de los explantes.

Con respecto a la cohesividad, la muestra control presentó un valor de 0.062 ± 0.015 , nuevamente los tratamientos que contenían almidón de maíz en su formulación presentaron una mayor cohesividad, tales como M10100 (0.362 ± 0.053) y Ag60_M1060 (0.362 ± 0.044), esto se puede atribuir a las propiedades intrínsecas del almidón de maíz, quien tiende a formar redes más estructuradas y estables, proporcionando una mayor cohesividad.

Un resultado interesante es observar como a mayor contenido de almidón de papa, la cohesividad tiende a disminuir, por ejemplo, los tratamientos P10100 y Ag40_P1060 presentaron valores negativos (-0.120 ± 0.024 y -0.142 ± 0.044 , respectivamente). La cohesividad mide la capacidad de un material para

mantenerse unido, y valores negativos pueden indicar que el gel se desintegra o se rompe fácilmente bajo ciertas condiciones de prueba (Casas-Alencaster & Pardo-García, 2005).

Finalmente, se calculó la fracturabilidad de todas las muestras. Los resultados muestran que el tratamiento control presentó una fracturabilidad de 2.138 ± 0.115 . Solo un tratamiento de almidón de maíz presentó valores similares al control (M10100 = 0.052 ± 0.140), el resto de los tratamientos con almidón de maíz disminuyeron los valores de fracturabilidad, sin embargo, las combinaciones de almidón de papa, como Ag40_P1060 (0.005 ± 0.005), y el tratamiento con almidón de papa puro (P10100= 0.058 ± 0.015) presentaron una fracturabilidad significativamente menor.

Las combinaciones con almidón de maíz tienden a mantener una fracturabilidad alta, similar al control. Esto sugiere que el almidón de maíz contribuye a la rigidez y fragilidad del gel, haciendo que sea más fácil de fracturar. Por otro lado, las mezclas con almidón de papa tienden a tener una fracturabilidad mucho menor, lo que indica una estructura más flexible y menos propensa a fracturarse. Una menor fracturabilidad en el medio de cultivo puede proporcionar un entorno más estable y menos propenso a romperse, lo que es beneficioso para el soporte de los explantes. Sin embargo, una fracturabilidad excesivamente baja podría dificultar la manipulación del medio.

De manera general podemos observar como el almidón de maíz tiende a presentar valores superiores a los del control en los parámetros evaluados (dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad y fracturabilidad). Un gel más duro y cohesivo tiende a ser más fracturable, lo que puede facilitar la manipulación, pero podría comprometer la estabilidad a largo plazo del medio.

Los resultados obtenidos pueden estar relacionados directamente con la composición química de los agentes gelificantes propuestos, es decir, la composición de los almidones. En este sentido, los componentes principales son la amilosa y amilopectina. El almidón de maíz nativo tiene un mayor porcentaje de amilosa, en

comparación con el almidón de papa. Un mayor contenido de amilosa resulta en un gel más duro, debido a su estructura lineal, además las moléculas de amilosa muestran una tendencia más fuerte a asociarse y cristalizarse. Por el contrario, un mayor contenido de amilopectina permite obtener geles con mayor flexibilidad debido a que las ramificaciones en su estructura permiten la formación de una red densa y compacta. Además, la amilopectina tiene una mayor capacidad de retención de agua debido a su estructura ramificada, lo que lleva a una mayor hidratación y, por tanto, a una textura más suave y menos dura del gel (Qiao, *et al.*, 2022).

Anteriormente se ha reportado que mezclas de agar-almidón han mostraron efectos notables en el comportamiento de las cadenas de almidón durante el almacenamiento y, finalmente, en las propiedades de los materiales obtenidos, sin embargo, todavía hay un conocimiento insuficiente sobre las influencias de diferentes factores (por ejemplo, la relación amilosa/amilopectina, el contenido de agar y la humedad relativa del acondicionamiento) en la microestructura y el rendimiento de las mezclas acuosas de agar-almidón (Qiao, *et al.*, 2022).

Cuadro 9. Parámetros calculados para el análisis de perfil de textura por compresión.

Muestra	Parámetros				
	Dureza (N)	Adhesividad (N/s)	Elasticidad	Cohesividad (A ₂ /A ₁)	Fracturabilidad (N)
Control	0.338 ± 0.043 ^{cd}	0.036 ± 0.009 ^{ef}	0.298 ± 0.079 ^c	0.062 ± 0.015 ^f	2.138 ± 0.115 ^a
P10100	0.220 ± 0.029 ^{cdef}	0.048 ± 0.008 ^{cdef}	0.136 ± 0.017 ^d	-0.120 ± 0.024 ^g	0.058 ± 0.015 ^b
Ag40_P1060	0.224 ± 0.011 ^{cdef}	0.040 ± 0.007 ^{def}	0.184 ± 0.052 ^{cd}	-0.142 ± 0.044 ^g	0.005 ± 0.005 ^b
Ag60_P1040	0.220 ± 0.051 ^{cdef}	0.052 ± 0.008 ^{cde}	0.236 ± 0.022 ^{cd}	0.130 ± 0.046 ^{def}	0.013 ± 0.013 ^b
Ag40_P760	0.086 ± 0.005 ^f	0.060 ± 0.007 ^{bc}	0.178 ± 0.026 ^{cd}	0.260 ± 0.042 ^c	0.078 ± 0.011 ^b
Ag60_P740	0.198 ± 0.044 ^{def}	0.062 ± 0.008 ^{bc}	0.426 ± 0.088 ^b	0.228 ± 0.038 ^c	0.134 ± 0.057 ^b
M10100	1.356 ± 0.156 ^a	0.074 ± 0.005 ^{ab}	0.848 ± 0.090 ^a	0.362 ± 0.053 ^b	2.052 ± 0.140 ^a
Ag40_M1060	0.366 ± 0.043 ^b	0.088 ± 0.008 ^a	0.932 ± 0.041 ^a	0.362 ± 0.044 ^b	0.144 ± 0.028 ^b
Ag60_M1040	0.112 ± 0.035 ^{ef}	0.054 ± 0.005 ^{cd}	0.242 ± 0.049 ^{cd}	0.196 ± 0.019 ^{cd}	0.118 ± 0.015 ^b
M7100	0.522 ± 0.131 ^b	0.086 ± 0.009 ^a	0.850 ± 0.046 ^a	0.460 ± 0.041 ^a	0.106 ± 0.011 ^b
Ag40_M760	0.248 ± 0.041 ^{cde}	0.034 ± 0.009 ^f	0.460 ± 0.034 ^b	0.108 ± 0.011 ^{de}	0.110 ± 0.025 ^b
Ag60_M740	0.122 ± 0.044 ^{ef}	0.042 ± 0.008 ^{def}	0.206 ± 0.059 ^{cd}	0.144 ± 0.023 ^{ef}	0.178 ± 0.041 ^b

Las medias con las mismas letras en cada columna representan que no existe diferencia estadística significativa, mediante una prueba Tukey. P ≤0.05, n=5

4.3. Evaluación De Los Efectos De La Sustitución Parcial De Agar

4.3.1. Porcentaje De Germinación

La germinación se considera cuando una semilla comienza una serie de cambios metabólicos y fisiológicos al recibir las condiciones ambientales necesarias tales como; humedad, temperatura e iluminación que a su vez estimulan la formación de la estructura denominada radícula, el éxito en la germinación de las semillas también dependerá de la viabilidad de la semilla (Ruiz-González, *et al.*, 2011). Para germinar en cultivos *in vitro* también se requiere de un medio de cultivo que sirva de sustrato o soporte y permita el establecimiento de la planta en formación (Trunjauren, *et al.*, 2023). En el presente trabajo de investigación se evaluó el uso de almidón de papa y maíz como candidatos para sustituir el agar comúnmente utilizado en el cultivo *in vitro*.

La germinación de las semillas se consideró como dato positivo, al momento de emerger la radícula de la semilla, la germinación de semillas de *Agave potatorum* Zucc. se observó, en promedio a los 14 días después de la siembra (figura 25).

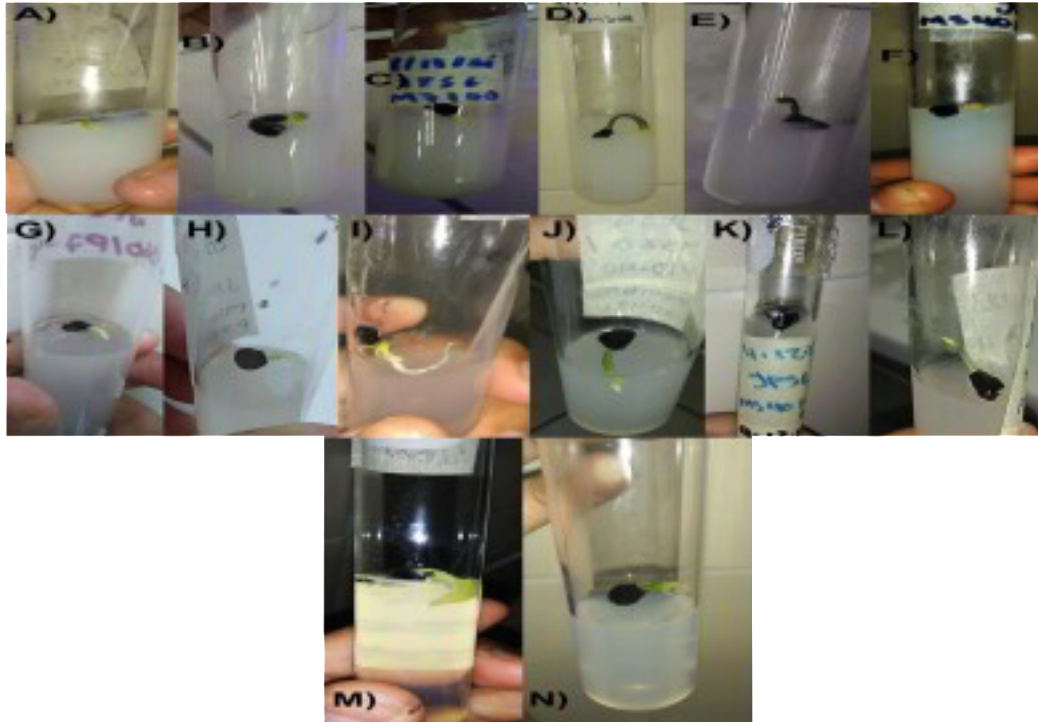


Figura 25. Germinación de semillas de *Agave potatorum* Zucc. en medios gelificados con 3 tipos de agentes gelificantes, A)-F) almidón de maíz a diferentes concentraciones, G)-L) almidón de papa a diferentes concentraciones, M) y N) agar (control)

El porcentaje de germinación de las semillas y parámetros de desarrollo de las plántulas obtenidas al utilizar las diferentes matrices gelificantes se evaluaron mediante un modelo lineal generalizado (GLM), debido a la distribución de los datos; en la Figura 26, se observa el porcentaje de germinación de semillas de *Agave potatorum* Zucc., en medios de cultivo gelificados con dos distintos tipos de gelificantes; almidón de maíz (A) y almidón de papa (B).

En el caso de almidón de maíz los resultados como agente gelificante se presentan en la Figura 26A, obteniendo porcentajes máximos del 80 %. Los bajos porcentajes de germinación coinciden con lo reportado en otro estudio realizado por Ariza *et al.*, (2018) quienes evaluaron diferentes concentraciones de almidón de maíz para la germinación *in vitro* de orquídeas *Prosthechea sp.* obteniendo porcentajes de germinación de hasta 50 - 67 % utilizando 10 g / litro de almidón de maíz. En el presente estudio, los tratamientos de almidón de maíz al 7 % presentaron una respuesta similar al almidón de papa, donde el porcentaje de germinación incrementó respecto al contenido de almidón en la formulación. Caso contrario se

observó para almidón de maíz al 10 % donde a mayor contenido de almidón en la formulación menor fue el porcentaje de germinación observado.

Por otro lado, el porcentaje de germinación de los tratamientos donde se usó almidón de papa como agente gelificante (figura 26 B) se observó una gran variabilidad entre tratamientos siendo P10100 quien demostró el mayor porcentaje de germinación con la menor variación entre replicas, de igual forma P7100 obtuvo un porcentaje de germinación superior al 80 % con baja variabilidad, caso contrario se observó para Ag40_P760 donde la variabilidad entre muestras fue mayor con porcentajes de germinación que iban desde 55 % hasta 100 %. Por su parte el control (agar) presentó porcentajes de germinación por debajo del 60 % con una gran variabilidad, resultados similares se observaron para Ag60_P740. De manera general se observó que el porcentaje de germinación incrementa en proporción de la concentración de almidón de papa (7 % y 10 %), es decir, a mayor contenido de almidón mayor fue el porcentaje de germinación observado.

Al comparar los tratamientos evaluados con almidón de papa y maíz en las diferentes proporciones se observó que el almidón de papa presentó una mejor respuesta al porcentaje de germinación. Resultados similares reportaron Ullah *et. al.* (2015) quienes evaluaron la respuesta de germinación de semillas de orquídea *Dendrobium sonia* cultivada en diferentes medios de cultivo con gelificantes sustitutos del agar, reportando mayor germinación y generación de brotes en medios gelificados con agar y almidón de papa, en comparación con el almidón de maíz.

Después de evaluar los parámetros de respuesta en el análisis de textura donde se observó que los tratamientos que contenían almidón de maíz presentaron un mayor índice de fracturabilidad, rigidez y fragilidad del gel debido a la estructura lineal que aporta las moléculas de amilosa, se esperaba una respuesta negativa en el porcentaje de germinación al usar este tipo de almidón. Caso contrario a lo observado en el almidón de papa donde el polisacárido dominante es la amilopectina quien por su estructura ramificada promueve una mayor retención de

agua con un gel suave y menos propenso a la fracturabilidad, proporcionando un medio de soporte más estable. Anteriormente Solarte-Montúfar, *et al.*, (2019) reportaron que la dureza, viscosidad, fuerza de gel y cantidad de amilosa, influyen en la cantidad de agua disponible en el medio de cultivo, sin embargo, Lucyszyn, *et al.*, 2006; Mohamed, *et al.*, 2010 señalan que el almidón puede ser degradado fácilmente por las amilasas presentes en el medio de cultivo y/o los explantes, provocando una disminución progresiva en su consistencia a lo largo del tiempo. Esta característica limita su aplicación como agente gelificante en el cultivo de tejidos vegetales; no obstante, en el presente estudio se observó que las plántulas de *Agave potatorum* Zucc. Mostraron un mejor desarrollo y características morfológicas superiores cuando se utilizaron medios solidificados con almidón.

Por otro lado, diversos autores (Ivanova & Van-Staden, 2011; Veitía *et al.*, 2012; Mohamed, *et al.*, 2010; Tsay, *et al.*, 2006) señalan que la concentración del agente gelificante influye directamente en la disponibilidad de agua en el medio de cultivo, así como el microambiente fisicoquímico de los recipientes de cultivo.

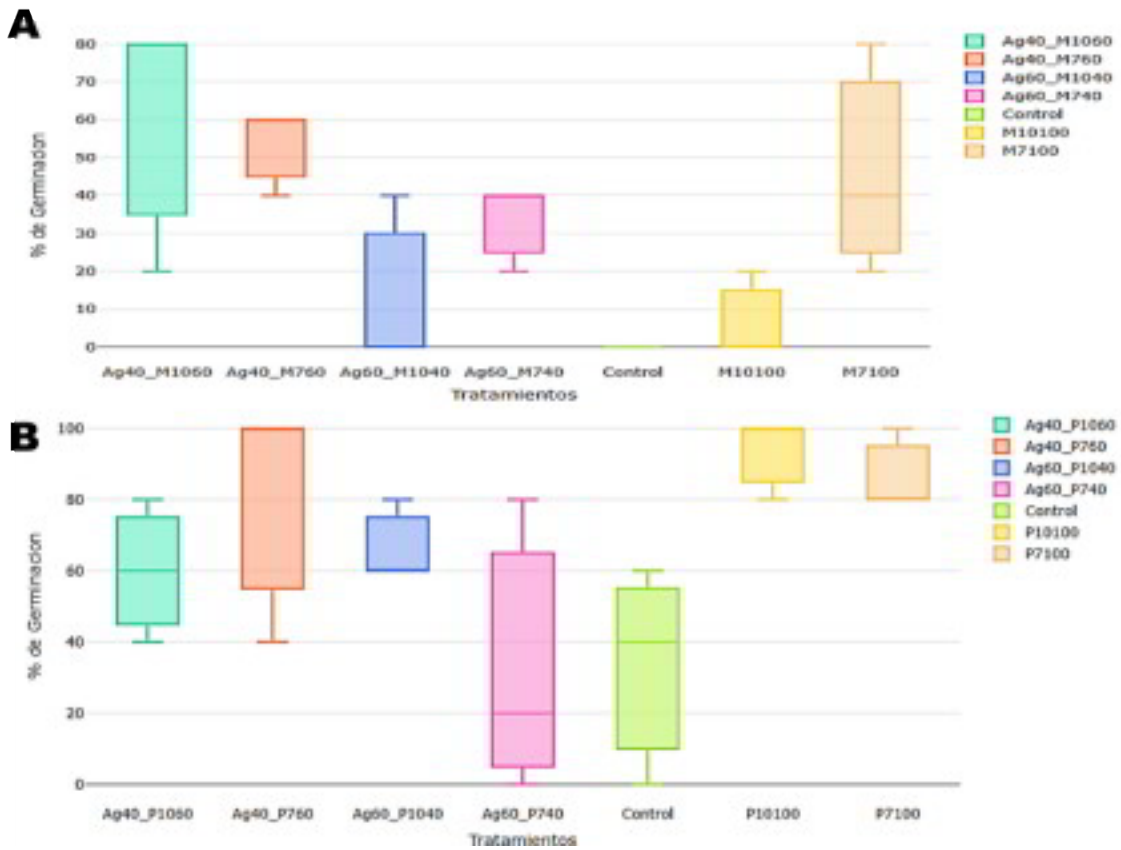


Figura 26. Porcentaje de germinación para *Agave potatorum* Zucc. *in vitro* usando diferentes matrices gelificantes como medio de cultivo, A) Medio de cultivo: almidón de maíz. B) Medio de cultivo: almidón de papa.

Por otro lado, López-Escamilla, *et al.* (2016), obtuvieron resultados de germinación de semillas de *Echinocactus platyacanthus* link Et otto., cultivadas en medios utilizando diferentes agentes gelificantes, obteniendo el mayor porcentaje (98 %) en el tratamiento gelificado con agar-agar, los agentes gelificantes tuvieron influencia en el desarrollo y morfología de las plántulas como epicótilo más largo, areolas apicales y laterales más largas, espinas blancas y desarrollo de raíces secundarias en lugar de una raíz principal, dichos autores también reportaron que la fuerza de gel del medio, puede ser una causa de la variación entre germinaciones y/o desarrollo de plántulas. Cabe destacar que, en las semillas germinadas de *A. potatorum*, del presente trabajo, se presentó la formación de callos de color beige y verde en raíces (figura 27), en un 50 % en los tratamientos con almidón de papa a diferentes concentraciones, es decir por cada 26 semillas germinadas 13 formaron callo, en el caso de los tratamientos con almidón de maíz a diferentes

concentraciones se obtuvo un 14 % de formación de callos en raíces lo que puede decirse que por cada 16 semillas germinadas 2 formaron callo, lo cual puede estar asociado a la concentración de auxinas presentes en el embrión y/o endospermo de las semillas (Rodríguez-Beraud, *et al.*,2014), puesto que los medios utilizados, no están adicionados con reguladores de crecimiento como lo refirieron López-Escamilla, *et al.* (2016).

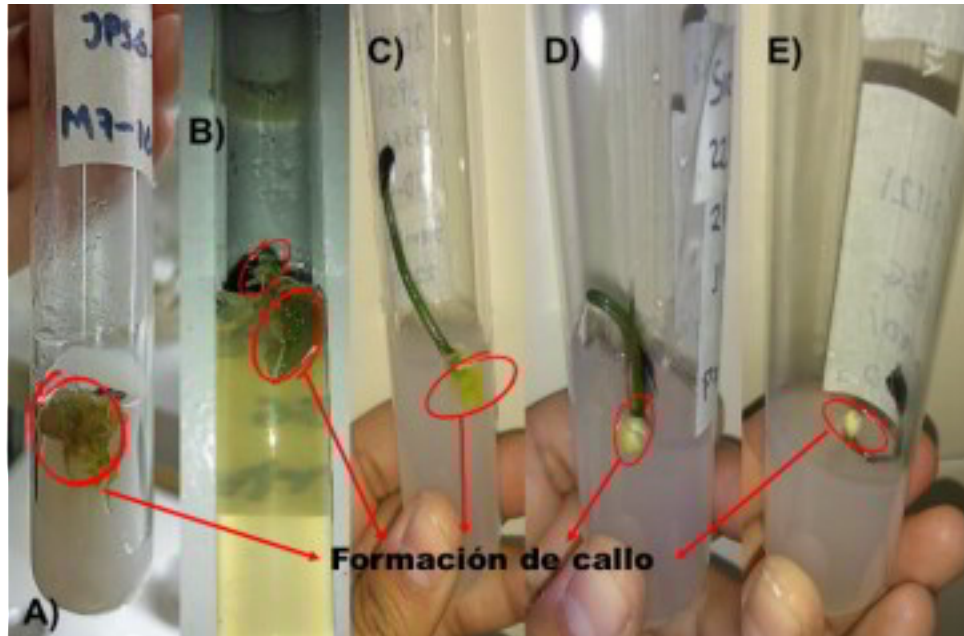


Figura 27. formación de callos en semillas de *Agave potatorum* Zucc., A) Formación de callo en semilla con medio gelificado con almidón de maíz, B) formación de callo en medio gelificado con agar C)-E) formación de callo en medios gelificados con almidón de papa.

4.3.2. Longitud Del Hipocótilo (Altura)

Los datos de altura de las plántulas de *Agave potatorum* Zucc. se tomaron a partir del día 14 y hasta los 30 días, como resultado de la evaluación de los datos se obtuvo que, en los tratamientos de agar con almidón de maíz (Figura 28A), la altura máxima fue de 106.1 mm para Ag40_M760, seguido de Ag40_M1060 con una longitud de 90.8 mm, sin embargo, en más del 66 % de los explantes el crecimiento fue limitado en este tipo de medio observando alturas por debajo de 20 mm (Ag40_M740, Ag60_M1040, M7100). Estos resultados sugieren que los tratamientos donde se usa almidón de maíz como agente gelificante no son efectivos para estimular el crecimiento de los agaves, esto puede deberse a la

consistencia de los medios, derivada de las propiedades fisicoquímicas de este tipo de almidón, como se observó anteriormente en TPA.

Con respecto a los tratamientos de almidón de papa (Figura 28B) los resultados muestran un mejor desarrollo de las plantas, alcanzando alturas de hasta 140 mm (Ag40_P760) seguido de P10100 con 100 mm de altura. Resultados similares obtuvieron Amlesom *et.al.* (2021) en medios gelificados con almidón de papa reportando alturas de 11.56 cm, mayores a las obtenidas con medios gelificados con almidón de maíz y agar. De igual forma se observó que tratamientos como Ag40_P1060 presentaron alturas consistentes entre 50 y 60 mm, coincidiendo con lo reportado por Lunarejo-Polo y Jirald-Torres (2021) quienes evaluaron los efectos de la concentración de almidón de papa, yuca y camote como agente gelificante en el crecimiento y desarrollo de micropropagación de segmentos nodales de plantas de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) en cultivo *in vitro* observando alturas de 2.5 cm a 5 cm en medios de cultivo con almidón de papa al 10 %.

Debido a los resultados observados, se puede sugerir que los medios gelificados con almidón de papa promueven un mayor crecimiento en los agaves, ya que, las alturas se incrementaron respecto a los medios gelificados con almidón de maíz. Se ha reportado que el crecimiento y desarrollo de las plántulas *in vitro* se ve influenciado por la consistencia de los medios lo que está directamente relacionado con el tipo de gelificante empleado ya que dependiendo de su composición fisicoquímica (como el contenido de amilosa en el caso de los almidones), la difusión de los nutrientes puede ser menor o mayor (Grandes-Navarro, 2017); por otro lado, Rondón-Asuaje *et.al.* (2018) intuyen que el agar puede tener efectos inhibitorios en la elongación celular.

Un aspecto importante en esta evaluación es que, derivado de la germinación asincrónica, no se observó un crecimiento homogéneo en las plantas, razón por la que existe una mayor variabilidad en las medidas registradas, por otra parte, se tiene el registro de datos denominados “outliers” refiriéndose a datos atípicos que

se pueden atribuir al proceso de muestreo (acceso a las instalaciones limitado por el periodo de confinamiento por COVID-19).

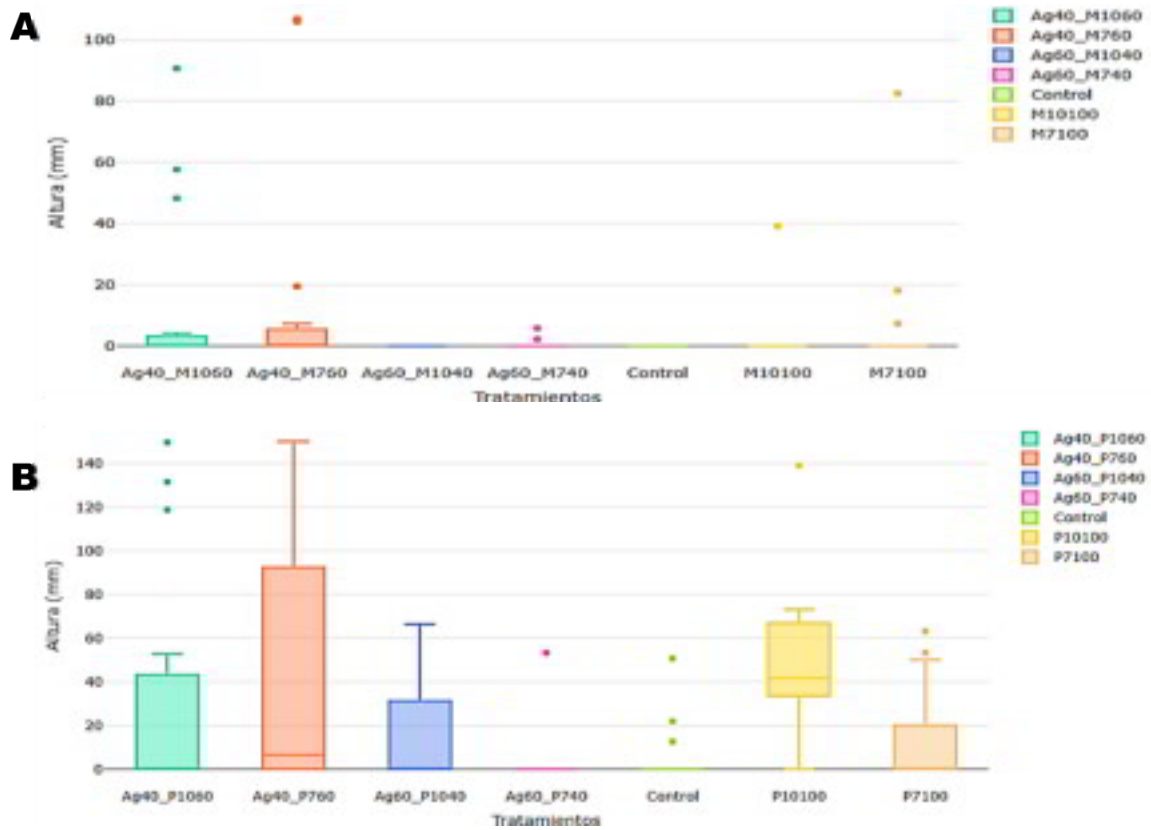


Figura 28. Altura de plantas de *Agave potatorum* Zucc. usando diferentes matrices gelificantes como medio de cultivo, A Medio de cultivo: almidón de maíz. B Medio de cultivo: almidón de papa.

4.3.3. Peso Fresco De Las Plántulas

El peso fresco de las plántulas se registró de manera simultánea durante el registro de altura, después del período establecido para el crecimiento de las plantas. En la Figura 28 se muestran los gráficos obtenidos del análisis de datos del peso fresco de plantas con los diferentes tratamientos, utilizando almidón de almidón de maíz (Figura 29 A) y papa (Figura 29 B) como agentes gelificantes.

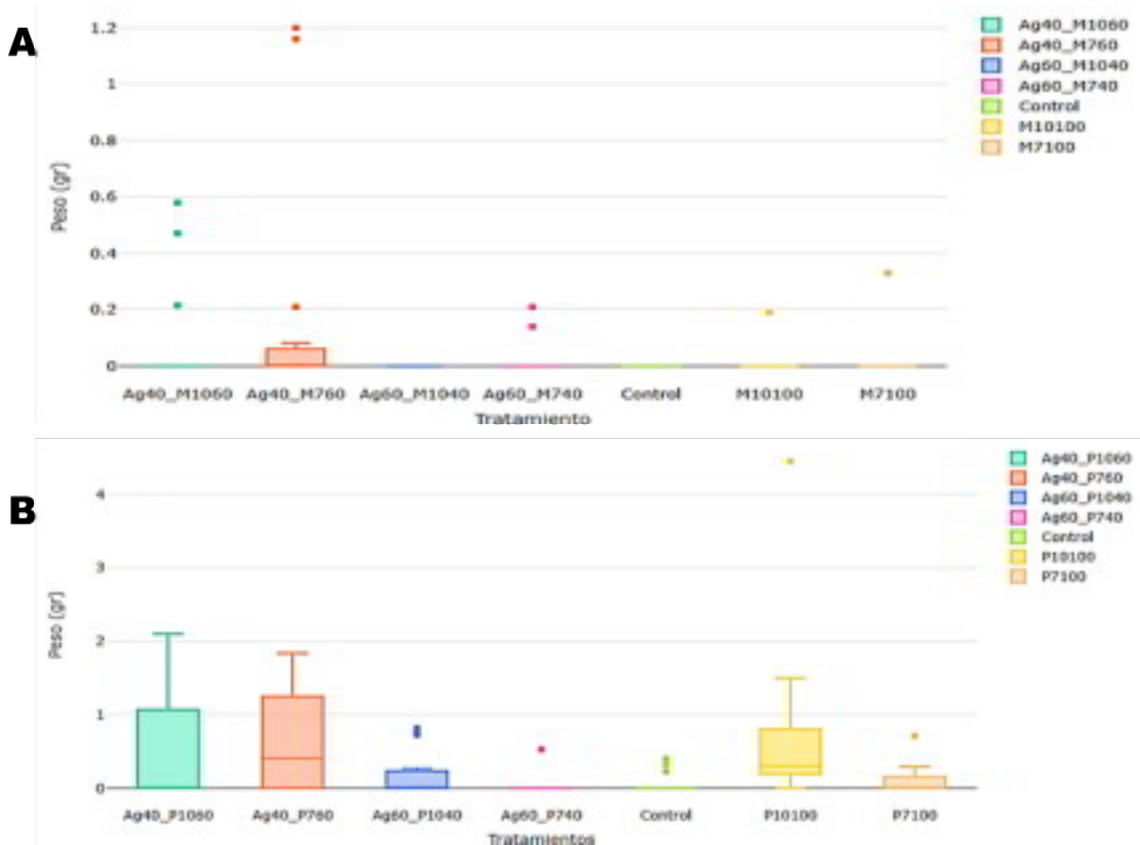


Figura 29. Peso fresco de plántulas de *Agave potatorum* Zucc.

Para los tratamientos con almidón de maíz en general todos presentaron un peso fresco superior al control (0.31 g), para Ag40_M1060 y Ag60_M740, los pesos promedio fueron 0.4 g y 0.58 g respectivamente, mientras que Ag40_M760 alcanzó valores de hasta 1.2 g. Estos resultados muestran una tendencia clara, los tratamientos que promovieron un mayor crecimiento (altura) estuvieron asociados con un incremento en peso fresco, lo que evidencia la relación directa entre ambas variables en este caso.

Por otro lado, las plántulas que se desarrollaron en medios donde se utilizó almidón de papa como agente gelificante, se registraron pesos frescos promedio de 2.17 g y 1.3 g para Ag40_P1060 y Ag40_P760, respectivamente seguido de P10100 con 0.85 g. Era de esperarse que estos tratamientos presentarán los mejores pesos ya que, de igual forma fueron los que crecieron más. Es interesante observar que el desarrollo de la planta (altura y peso) en el control (agar) fue considerablemente

inferior a algunos de los tratamientos, principalmente en donde se empleó almidón de papa como agente gelificante. Sin embargo, esta respuesta no solo depende del gelificante empleado. Otros factores que pueden interferir son el requerimiento y disponibilidad de nutrientes, así como el tipo de cultivo, por ejemplo, Madege & Msemwa, (2015) obtuvieron explantes de batata en medios de cultivo gelificados con almidón de papa registrando un peso fresco inferior respecto al agar. Anteriormente se ha reportado que el peso fresco podría estar relacionado con la consistencia de los medios de cultivo, pues dependiendo de la fuerza de gel del medio de cultivo, la disponibilidad de agua y nutrientes puede ser mayor o menor (Madege, *et al.* 2015).

De manera general se observa que los tratamientos donde se emplea almidón de papa como agente gelificante muestran mejor respuesta en los diferentes parámetros evaluados (porcentaje de germinación, altura y peso fresco) con respecto al control y a los tratamientos con almidón de maíz. Estos resultados en conjunto con el análisis de perfil de textura, proporciona información que indica que, bajo las condiciones experimentales de este proyecto, los medios con almidón de papa brindan mejores condiciones para el crecimiento de las plántulas de *Agave potatorum* Zucc.

4.3.4. Longitud De Raíz

Los resultados de la medición de la longitud de la raíz de plantas cultivadas en distintos medios de cultivo gelificados con almidón de maíz y almidón de papa se muestran en la Figura 30. Los tratamientos con almidón de maíz (Figura 30A) mostraron elongación radicular reducida, con medianas entre los 2-9.6 mm en la mayoría de los casos, sin embargo, en el tratamiento Ag40_M760 se observa un valor atípico cercano a 100 mm, no obstante, este comportamiento no es representativo, por lo tanto, estos resultados sugieren que el almidón de maíz, utilizado en las concentraciones asignadas para este experimento, no genera un medio favorable para el desarrollo de raíces.

En la (Figura 30B) se muestra la gráfica de la longitud de raíces de plantas cultivadas en medios con almidón de papa como gelificante. El tratamiento Ag40_P1060 destaca con una longitud radicular promedio de ~40 mm seguido de Ag40_P760 y Ag60_P1040 con longitudes de ~30 mm y ~20 mm respectivamente, lo cual indica que el almidón de papa a estas concentraciones proporciona un medio adecuado para el cultivo de plantas, propiciando la absorción de agua y por ende la disposición de nutrientes y la expansión celular radicular. Sin embargo, el control y los tratamientos P10100 y P7100, presentan menores longitudes radiculares y más variabilidad. Es notorio observar una diferencia significativa respecto a los resultados obtenidos en medios con almidón de maíz, lo que indica un crecimiento radicular más eficaz en las plántulas de los tratamientos con almidón de papa al 10%. Según Amlesom *et. al.* (2021) sugieren que la elongación de raíz podría deberse a la viscosidad de los agentes gelificantes dado que, a menor viscosidad, hay mayor disponibilidad de nutrientes y humedad, por el contacto directo con el medio de cultivo.

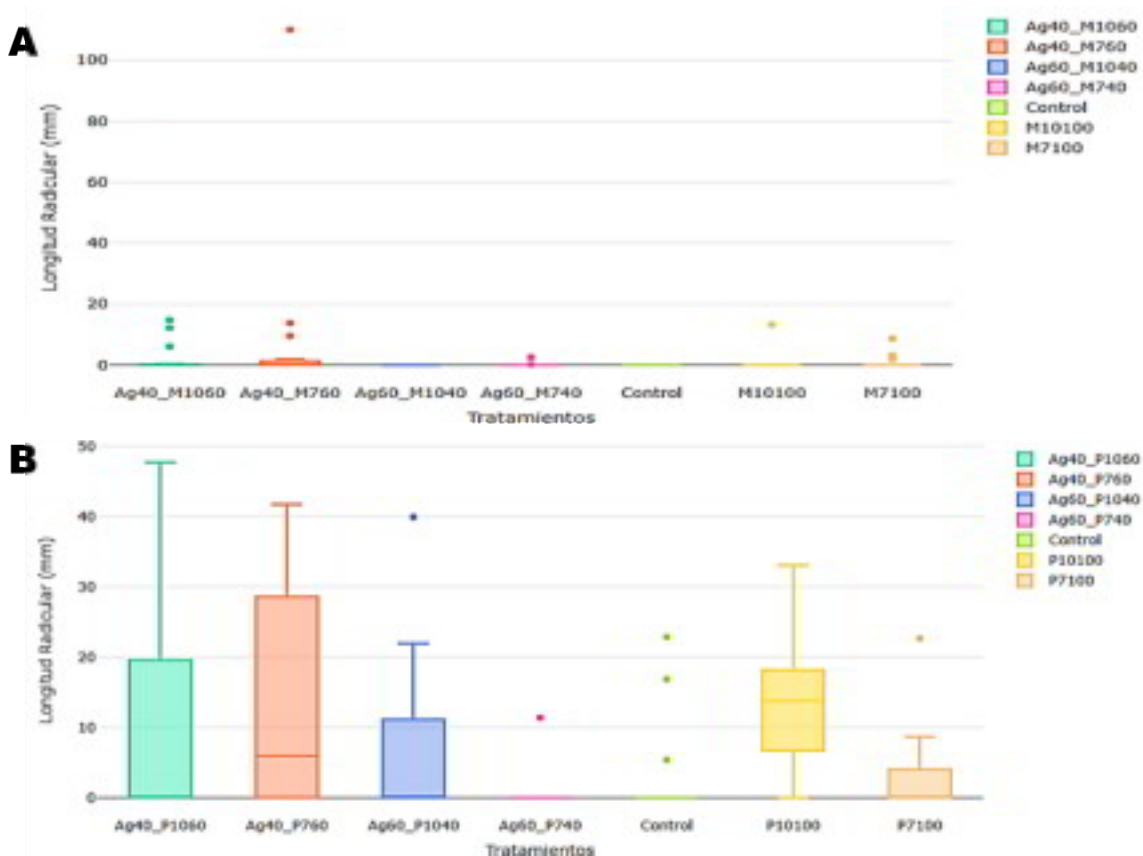


Figura 30. Longitud de raíz para plantas de *Agave potatorum* Zucc., cultivadas en medios de cultivo *in vitro* gelificados con almidones; A medios gelificados con almidón de maíz, B medios gelificados con almidón de papa.

4.4. Comparación De Costos En Insumos Utilizados Para La Elaboración De Medios Para Cultivo *In Vitro*.

Se han mencionado anteriormente, diferentes materias primas necesarias en la elaboración de medios de cultivo para propagación *in vitro*, sin embargo, cabe resaltar que, a pesar de los resultados obtenidos, es importante conocer los costos de cada uno de ellos. En el cuadro 10 se observa un análisis de costo para cada insumo utilizado en la elaboración de medios de cultivo del presente estudio.

Se puede observar que el agar es el insumo que se requiere en menor cantidad en comparación con los almidones, sin embargo, debido a su alto precio es el responsable del incremento en los costos para la elaboración de los medios de cultivo, por otro lado, el almidón es un insumo con mayor disponibilidad debido a

que las especies vegetales de donde se obtiene se cultivan con frecuencia en el país, por lo que su costo es relativamente económico, haciendo que su empleo en la elaboración de medios nutritivos disminuya el costo total de producción.

Cuadro 10. Costos de insumos utilizados en medios de cultivo para genero *Agave*.

Insumo	Costo (\$)	Contenido	Costo por unidad (\$/g o ml)	Concentración requerida	Cantidad requerida (g)	Costo por cantidad requerida (\$)
Agar	4,605.2 1	500 g	9.21	-	1.5	14.00
Almidón de papa	1,385	25 kg	0.55	7 %	10.5	6.00
				10 %	15	8.31
Almidón de maíz	878.50	25 kg	0.35	7 %	10.5	3.68
				10 %	15	5.27
Murashige and Skoog medium with /vitamins	2,463.6 1	50 L	0.05	-	0.66	0.32
Sacarosa	59	2 kg	0.02	-	4.5	0.13
Agua destilada	751	19 L	0.39	-	150 ml	6.00

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el almidón de papa, utilizado como agente gelificante en medios de cultivo *in vitro*, ofrece condiciones significativamente más favorables para la germinación, crecimiento y desarrollo de plántulas de *Agave potatorum* Zucc. en comparación con el almidón de maíz y el agar. A partir de las formulaciones establecidas, el almidón de papa forma geles con firmeza adecuada, baja fracturabilidad y alta retención de agua, lo que permite una liberación gradual y eficiente de nutrientes, además de proveer un soporte físico estable para los explantes. Las propiedades fisicoquímicas que presentaron los medios de cultivo de este estudio, se encuentran estrechamente relacionadas al contenido de amilopectina y su estructura ramificada, lo que influye directamente en los parámetros biológicos evaluados: los tratamientos con almidón de papa al 10 % (P10100, Ag40_P1060) presentaron los mayores porcentajes de germinación (superiores al 80 %), mayor altura de plántulas (hasta 140 mm), mayor peso fresco (hasta 2.17 g) y elongación radicular más eficaz (hasta ~40 mm), con baja variabilidad entre réplicas. En contraste, las formulaciones con almidón de maíz mostraron mayor dureza, cohesividad y fracturabilidad durante el TPA lo que generó medios más rígidos y menos propicios para la absorción de agua y nutrientes, disminuyendo el porcentaje de germinación, así como un crecimiento y elongación radicular reducida, especialmente en concentraciones elevadas (M10100). El control con agar presentó los resultados más bajos en todos los parámetros evaluados, incluso con porcentajes de germinación cercanos a 0 %, lo que confirma que su uso exclusivo no es adecuado para esta especie bajo las condiciones experimentales. Además, se observó una correlación directa entre la consistencia del medio y el desarrollo vegetal: los geles más suaves y menos fracturables favorecieron la expansión celular, la absorción de agua y la disponibilidad de nutrientes, mientras que los medios más rígidos limitaron el crecimiento radicular y la elongación del hipocótilo. Estas observaciones coinciden con estudios previos que señalan que la textura del medio, influenciada por la proporción de amilosa y

amilopectina en el gelificante, afecta la difusión de nutrientes y la retención hídrica. Aunque se registraron datos atípicos y variabilidad en algunos tratamientos, la tendencia general respalda el uso del almidón de papa como sustituto funcional del agar, siempre que se emplee en concentraciones adecuadas, optimizando así la estructura del medio, la eficiencia nutricional y el soporte físico para el cultivo exitoso de *Agave potatorum* Zucc. Finalmente se puede concluir que, se alcanzaron los objetivos establecidos en el presente proyecto, al obtener medios de cultivo aptos para la germinación, crecimiento y desarrollo de plantas usando almidón como agente gelificante alternativo y reduciendo los costos por litro de los medios de cultivo.

VI. RECOMENDACIONES

A pesar de establecer protocolos estrictos durante la siembra e incubación de explantes, el porcentaje de germinación obtenido para los controles (agar) fue significativamente menor, por lo que se recomienda optimizar este proceso, implementando el uso de frascos para siembra, aumentar la cantidad de semillas sembradas, inclusive evaluar el proceso de lavado y desinfección de semillas.

De igual forma se recomienda estandarizar las condiciones experimentales como temperatura, fotoperiodos y humedad, esto con la finalidad de reducir los factores que puedan estar influyendo en la respuesta biológica durante la germinación y desarrollo de las plántulas y de esta forma promover la reproducibilidad de los resultados.

Finalmente se recomienda medir parámetros fisicoquímicos de los agentes gelificantes evaluados tales como pH, viscosidad y potencial osmótico para correlacionar estos datos con las respuestas al desarrollo biológico de las plantas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abegunde, O. K., Mu, T., Chen, J., & Deng, F. (2013). Physicochemical characterization of sweet potato starches popularly used in Chinese starch industry. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.005>
- Acosta-Dávila, S. (2014). Propiedades de films de almidón de Yuca y gelatina. Incorporación de aceites esenciales con efecto antifúngico. [Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Instituto Universitario de ingeniería de alimentos para el desarrollo, Departamento de Tecnología de alimentos]. Repositorio institucional UPV. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/3589>.
- Acosta-Guizado, N. (2023). Efecto de la modificación física por recocido del almidón nativo de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) variedad amarilla, en sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. [Tesis licenciatura, Universidad Nacional José María Arguedas, Facultad de Ingeniería, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial]. Repositorio institucional. <https://hdl.handle.net/20.500.14168/795>.
- Adema, M. (2015). Capítulo 5. ¿Por dónde empezamos?: Establecimiento de cultivos *in vitro*-plantas madre. Sharry, S. Adema, M., y Abedini, W. (coord.), Explantes. Plantas de probeta, manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Edulp. Pp. 81-91. <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/407>.
- Agama-Acevedo, E., Juárez-García, E., Evangelista-Lozano, S. Rosales-Reynoso, O. L. y Bello-Pérez, L. A. (2013). características del almidón de maíz y relación con las enzimas de su biosíntesis. *Agrociencia*. 47(1). 1-12. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30225619001>.
- Agama-Acevedo, E., Ottenhof, M. A., Farhat, I. A., Paredes-López, O., Ortiz-Cereceres, J., y Bello-Pérez, L. A. (2005). Aislamiento y caracterización del almidón de maíces pigmentados. *Agrociencia*, 39(4), 419-429. <https://www.agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/405>.
- Aguirre, G., Calle, M. y Baudoin, J. P. (2016). Capítulo 1 Aspectos generales del cultivo *in vitro*. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. *Comisión Universitaria para el Desarrollo, Consejo Interuniversitario de la Comunidad Francesa de Bélgica*. Pp. 29-30. <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Baudoin%2C%20Leigue%20UMSS%202016.pdf>.

- Alemán, S. (2014). Propiedades químicas y funcionales del almidón de topocho (*Musa ABB*). uso en geles de mora (*Rubus glaucus* Benth). [Tesis Maestría, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias]. Repositorio Institucional de la Universidad de Venezuela. <http://hdl.handle.net/10872/5872>.
- Amaro-Rosales, M., y Villavicencio-Carbajal, D. H. (2014). Incentivos a la innovación de la biotecnología agrícola alimentaria en México. *Estudios sociales Hermosillo, Sonora*. 23(45), 33-45. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?lng=pt&nrm=iso&pid=S0188-45572015000100002&script=sci_abstract.
- Amlsom, W. S., Mehari, T., & Saleh, B. K. (2021). Evaluation of different starches as gelling agents for micropropagation of potato. *Journal of Agricultura Science*, 13(5). 144-152. DOI:[10.5539/jas.v13n5p144](https://doi.org/10.5539/jas.v13n5p144).
- Aristizábal, y Sánchez, T. (2007). Capítulo 5 características del almidón de yuca. Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. Mejía-Lorío, D. (Coord.). Boletín de servicios agrícolas de la FAO. FAO, 63. 33-36. <https://www.fao.org/4/a1028s/a1028s00.htm>.
- Ariza, C., Deaza, E., Gil, A., y Orjuela, C. (2018). Efecto del almidón y dos fitorreguladores sobre la germinación de *Prosthechea* sp. *Revista Mutis*, 8(2), 37–46. <https://doi.org/10.21789/22561498.1403>.
- Avendaño-Romero, G. C., López-Malo, A., y Palou, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*. 7(1). 87-96. <https://silo.tips/download/propiedades-del-alginato-y-aplicaciones-en-alimentos>.
- Avérous, L., & Halley, P. J. (2009). Biocomposites based on plasticized starch. *Biofuels, Bioproducts. & Biorefining*. 3. 329-343. <https://doi.org/10.1002/bbb.135>.
- Avila, C., ArgenteL-Martínez, L., Campos-Posada, R., Campos-Posada, G., Eichler-Löbermann, B., y Lopez, R. (2023). Efecto del estrés salino en el régimen hídrico, concentración de compuestos osmóticamente activos y pigmentos fotosintéticos en cultivares de tomate. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 49(1), 32-40. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86474931008>.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1). 153-155. DOI:[10.15517/am.v20i1.4990](https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990).

- Bajaj, I. B, Survase, S. A., Saudagar, P. S., & Singhal, R. S. (2007). Gellan gum: fermentative production, downstream processing and applications. *Review, Food Technology. Biotechnology.* 45(4), 341-359. https://www.researchgate.net/publication/255609992_Gellan_Gum_Fermentative_Production_Downstream_Processing_and_Applications.
- Bayraktar, M., Hayta-Smedley, S., Unal, S., Nurhan, V., & Aynur, G. (2020). Micropropagation and prevention of hyperhydricity in olive (*Olea europea* L.) cultivar 'Gemlik'. *South African Journal of Botany*, (128). 264-273. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.022>.
- Bergmann, L. (1960). Growth and division of single cells of higher plants *in vitro*. *The Journal of General Physiology.* 43(4), 841-851. <https://doi.org/10.1085/jgp.43.4.841>.
- Borges-García, M., Estrada-Abeal, E., Pérez-Rodríguez, I., y Meneses-Rodríguez, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 11(2). 127-135. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000200013&lng=en&tlng=es.
- Briones, M. V. (2017). Optimización de un Sistema de modificación genética de *Populus* sp Para la incorporación de genes inductores de floración temprana y androesterilidad. [Tesis doctorado, Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales]. Repositorio Institucional de la UNLP. <https://doi.org/10.35537/10915/134115>.
- Calva-Calva, G. C., y Pérez-Vargas, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista digital universitaria UNAM.* 6(11), 2-16. <https://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm>.
- Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Temes, R., y Majada, J. P. (2001). Fisiología del cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal.* 1(1), 3-9. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/59>.
- Canónico-Franco, M. (2003). Agregación en gránulos de almidón. [Tesis Doctorado, Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de ingeniería]. Repositorio institucional. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/4597>.
- Cárdenas-Lara M. A., y Villegas-Monter, A. (2002). Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia mexicana.* 25(2), 213-217. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61025213>.
- Casas-Alencáster, N. B, Pardo-García, D. G. (2005). Análisis de perfil de textura y propiedades de distensión de geles de mezclas almidón de maíz ceroso

entrecruzado-galana *Revista Mexicana de Ingeniería Química*.4(1). 107-121.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62040109>.

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA*, 8.
<https://ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>.

Castro-Montero, E., y Hombre-Morgado, R. A., (2007) Parámetros mecanismos y textura de alimentos. Repositorio Académico de la Universidad de Chile.
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/121381>.

Cedres-Gazó, M., y Sarry, S. (2015). Introducción. Sharry, S. Adema. M., y Abedini, W. (Coord.), Explantes. Plantas de probeta, manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Edulp. Pp. 06-12.
<https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/407>.

Cervantes-Dueñas, A. (2016). Presencia de saponinas en *Agave* spp. De México. *BIOZ Revista electrónica de Biología*, Universidad Autónoma de Zacatecas.1(1),1-4. Z
<http://editorial-uaie.uaz.edu.mx/index.php/bioz>.

Chacón, A. G., Saborío, F., Gómez, L., Torres, S., y Valverde, R. (2000). El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatización de plantas de Yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Costarricense*. 24(2), 57-64. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43624206>.

Chávez-Murillo, C. E. (2008). Caracterización morfológica, fisicoquímica y estructural de almidón de cebada modificado por oxidación. [Tesis Maestría, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos].

Chawla, H. S. (2000). Plant tissue culture.

Cruz-Benítez, M. M. (2016). Propiedades fisicoquímicas y funcionales de mezclas de almidones de yuca (cerosa y normal), químicamente modificados y su posible aplicación como material pared. [Tesis maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias]. UAEH Biblioteca Digital.
<http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/5024>.

Cruz-Pizarro, F. (2012). Cultivo de tejidos vegetales (Manual de prácticas). *Ediciones UNAM FESC*. 01-42.
https://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/cultivosdetejidosvegetales_manualprac

Damon, A., Aguilar-Guerrero, E., Rivera, L., y Nikolaeva, V. (2004). Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 10(2), 195-203. DOI:[10.5154/r.rchsh.2002.05.025](https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2002.05.025).

- Daud, N., Mat Taha, R., Mohd Noor, N. N., & Alimon, H. (2011). Potential of alternative gelling agents in media for the *in vitro* micro-propagation of *Celosia* sp. *International Journal of Botany*, 7: 183-188. DOI: 10.3923/ijb.2011.183.188.
- Domínguez-Rosales, Manuel-Salvador, González-Jiménez, M. L., Rosales-Gómez, C., Quiñones-Valles, C., Delgadillo-Díaz de León, S., Mireles-Ordaz, S. J., Pérez-Molphe, B. E. (2008). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia*. 16(41), 53-62. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67404109>.
- Ebile, P. A., Opata, J. & Hegele, S. (2022). Evaluating suitable low-cost agar substitutes, clarity, stability, and toxicity for resource-poor countries' tissue culture media. *in vitro Cellular & Developmental Biology-plant*. 58. 989-1001. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10285-6>.
- Escalante, A. E. (2017). Sistemas productivos: microorganismos, suelos y sostenibilidad. Eguiarte, L E., Equihua, C., y Espinosa-Azuar, L. (Eds.) Los agaves y el campo mexicano. *OIKOS*. (8): 24-27. <http://web.ecologia.unam.mx/oikos3.0/>
- Escandón, A. S., Marinangeli, P. A. y Pérez de la Torre, M. (2010). Parte V: Capítulo 4 Avances de la biotecnología en cultivos ornamentales. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., y Mroginski, L. (Eds.), *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. Pp. 421-433. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotecnologiayMejoramientovegetalII.pdf>.
- Espinosa-Barrera, L. A. (2015). Generalidades e importancia de los agaves en México. *Desde el Herbario CICY*. 7, 161-164. https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2015/2015-10-22-Espinosa_Barrera-Generalidades_e_importancia_de_los_agaves_en_Mexico.
- Fernández-Ocegeda, Y. (2018). Obtención de almidón resistente tipo III a partir de una modificación dual del almidón de malanga (*Colocasia esculenta* Schott) y plátano (*Musa paradisiaca* L.): Caracterización de digestibilidad, propiedades térmicas y molecular. [Tesis Maestría, Universidad de Papaloapan, Campus Tuxtepec]. Unpa.edu.mx. https://www.unpa.edu.mx/tesis_Tux/tesis_digitales/maestria_biotecnologia/MB24-Yoel_Fern%C3%A1ndez_Ocegeda.
- García-Herrera, E. J., Méndez-Gallegos, S. J., y Talavera-Magaña, D. (2010). El género *Agave* Spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición*, (Edición especial, 5). 109-129.
- García-Mendoza, J. A. (2007). Los agaves de México. *Red de Revistas Científicas de América Latina*, (087), 14-23. <http://redalyc.uaemex.mx/>

- García-Osuna, H. T. (2008). Control de hiperhidricidad en brotes de cultivo *in vitro* por promotores de endurecimiento fisiológico en *Turbinicarpus valdezianus* (moller) G & F. [Tesis maestría, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. Repositorio UAAAN. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/7002>.
- Ghasemi, Y., Nematzadeh, G. A., Omran, V. G., Dehestani, A., & Hosseini, S. (2012). The effects of explant type and phytohormones on African violet (*Saintpaulia ionantha*) micropropagation efficiency. *Biharean Biologist*. 6(2), 73-76. <https://biozoojournals.ro/bihbiol/cont/v6n2/bb.121109.Omran.pdf>.
- González, A., Alvis, A., y Arrázola, G. (2015). Efecto del recubrimiento comestible en las propiedades de trozos de batata (*Ipomoea Batatas* Lam) fritos por Inmersión: Parte 1: Textura. *Información tecnológica*, 26(1), 95-102. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642015000100011>.
- González-Montiel, L., Miranda-Altamirano D., Bautista-Marcial, A.S, Güémes-Vera, N., Soto, S., Franco, J., Sánchez-Hernández C., y Campos-Pastelin, J. (2019). Análisis de perfil de textura y color en gomitas elaboradas a partir de una decocción de plantas medicinales. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4(1). 756-760. https://www.researchgate.net/publication/331210143_Analisis_de_perfil_de_textura_y_color_en_gomitas_elaboradas_a_partir_de_una_decoccion_de_plantas_medicinales.
- Grandes-Navarro, F. R. (2017). Almidones usados como agentes gelificantes en reemplazo de Phytigel® en medios de cultivo para tejidos vegetales. [Tesis licenciatura, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras]. Zamorano <https://bdigital.zamorano.edu/items/6df9e245-5150-486d-8e67-5d8a5dd65c44>.
- Guzmán-Girón, R. N., y Molina-Violantes, Y.S. (2013). Formulación de una mezcla en polvo para preparar postre de gelatina a base de almidón de maíz. [Tesis licenciatura, Escuela especializada en ingeniería, ITCA-FEPADE, Escuela de ingeniería química]. Repositorio digital de la Ciencia y cultura de el Salvador REDICES. <https://core.ac.uk/download/47264499>.
- Guzmán-González, C. (2015). Efecto del tipo de explante aéreo en la regeneración *in vitro* de *Alstroemeria* Spp. [Tesis de grado, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Escuela de Postgrado]. Repositorio académico de la Universidad de Chile. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/148016>.
- Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L. y Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciencia E Tecnología De Alimentos – Food Science and Technology (Campinas)*. 28(3). 718-726. DOI:[10.1590/S0101-20612008000300031](https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000300031).

- Hernández-Meneses, E., Rangel-Estrada, S. E., López-Peralta, M. C. G., Guerrero-Hilario, A., Ortiz-Gil, G., y Martínez-Bolaños, L. (2018). Germinación, viabilidad y regeneración *in vitro* de plantas de *Vriesea heliconioides* (Kunth) Hook. Ex Walp. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 41(2), 99-106. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.99-106>.
- Hoover, R. (2001). Molecular structure and properties of tuber starches-a review. *Carbohydrate Polymers*. 45. 253-267. https://www.researchgate.net/publication/237918604_Molecular_structure_and_properties_of_tuber_starches-a_review.
- Horstmann, S. W., Lynch, K. M., & Arendt, E. K. (2017). Starch characteristics linked to gluten-free products. *Foods*. 6(4), 29. <https://doi.org/10.3390/foods6040029>.
- Ivanova, M., y Van-Staden, J. (2011). Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104(1). 13-21. DOI: 10.1007/s11240-010-9794-5.
- Jain, R., Babbar, S.B. (2006). Xanthan gum: an economical substitute for agar in plant tissue culture media. *Plant Cell Reports*. 25:81–84. DOI: [10.1007/s00299-005-0039-8](https://doi.org/10.1007/s00299-005-0039-8)
- Jiménez-Bonilla, V., y Abdelnour-Esquivel, A. (2017). Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguineum*). *Revista Tecnología en Marcha*, 31(1), 144-15. DOI: 10.18845/tm.v31i1.3504.
- Jiménez-Rivera, A; Montero-Carmona, W. (2019) Efecto de la sustitución de insumos en el crecimiento *in vitro* de Raicilla. *Tecnología en Marcha*. 32-4. 28-38. <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/263/2631190003/index.html>.
- Klaochanpong, N., Puttanlek, C., Rungsardthong, V., Puncha-Arnon, S., y Uttapap, D. (2015). Physicochemical and structural properties of debranched waxy rice, waxy corn and waxy potato starches. *Food Hydrocolloids* 45. 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.010>.
- Krikorian, A. D. (1991). Parte A Principios básicos, metodologías y técnicas del cultivo de tejidos vegetales: Capítulo 3 Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. Roca, M. W., y Mroginski, L. A. (Eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Turrialba. Pp. 41-77. http://ciatlibrary.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.
- Krikorian, A.D., Berquam, D.L. (2003). Plant cell and tissue cultures: The role of Haberlandt. in: Laimer, M., Rücker, W. (eds) *Plant Tissue Culture*. Springer, Vienna. Pp 59-60. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6040-4_2.

- Kuria, P., Demo, P., Nyende, A. B., & Kahangi, E. M. (2008). Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the *in vitro* micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 7(3), 301-307. <https://doi.org/10.5897/AJB07.389>.
- Lalitha, N., Devi L. M., Banerjee, R., Chatto-Padhyay, S., Saha, A. k., & Bindroo, B. B. (2014). Effect of plant derived gelling agents as agar substitute in micropropagation of mulberry (*Morus indica* L. cv. S-1635) *International Journal of Advanced Research*. 2(2), 683-690. https://www.researchgate.net/publication/333018110_Effect_of_plant_derived_gelling_agents_as_agar_substitute_in_micropropagation_of_mulberry_Morus_indica_L_cv_S-1635.
- Lima-Ribeiro, B., Martins-Ribeiro, J., Lopes-Teixeira, S., Nunes-Oliveira, A. B., Peixoto, A. R., Passos-Menezes, A.C., Cardoso-Souza, J., & Domingos da Paz. C. (2022). Xanthan gum and sodium hypochlorite *in vitro* rooting of *Genebra hybrida* cv Essandre. *Research, Society and Development*, 11(4) DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i4.25143>.
- Lin, C. C., & Casida, L. E. (1984). Gelrite as a gelling agent in media for the growth of thermophilic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(2), 427-429. DOI: [10.1128/aem.47.2.427-429.1984](https://doi.org/10.1128/aem.47.2.427-429.1984)
- Llorente, B. E. (2000). Aislamiento, purificación, caracterización y producción *in vitro* de peptidasas de Alcahuizil coagulantes de leche. [Tesis Doctorado, Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Exactas]. Repositorio Institucional de la UNLP. <https://doi.org/10.35537/10915/2211>.
- Loaiza-Alanís, C. (2008). Análisis fisiológico del efecto de tres marcas de agar y gelrite en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto (Cactaceae). [Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, México]. UAEH Biblioteca Digital <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/298>.
- Long, P. P. (1969). Callus and organized growth in the gramineae. [Master's Thesis. University of Hawaii]. Pp. 51. Scholarspace. <https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/server/api/core/bitstreams/a1040d83-5e4f-4fa8-8d71-d7295c61ee0e/content>.
- López-Escamilla, A. L., López-Herrera, M., & Loaiza-Alanís, C. (2016). Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto (Cactaceae). *Polibotánica*, (42), 153-166. DOI: 10.18387/polibotanica.42.8.

- Loyola-Vargas, V.M., y Ochoa-Alejo, N. (2018). An introduction to plant tissue culture: Advances and perspectives. *Methods in molecular biology (Clifton, N. J.)*, 1815. 3-13. DOI:[10.1007/978-1-4939-8594-4_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1).
- Lucyszyn, N., Quorin, M., Koehler, H. S., Reicher, F., & Sierakowski, M-R. (2006). Agar/galactomannan blends for strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchensne) cv. Pelican micropropagation. *Scientia Horticulture*, 107. 358-364. DOI:[10.1016/j.scienta.2005.11.005](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.11.005).
- Lunarejo-Polo, y Jirald-Torres, K. B. (2021). Efecto de las diferentes concentraciones de almidón de cascaras de papa (*Solanum tuberosum* L.), yuca (*Manihot esculenta* C.) y camote (*Ipomoea batatas*) como agente gelificante en la micropropagación *in vitro* de segmentos nodales de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.). [Tesis licenciatura, Universidad Nacional del Santa Facultad de Ciencias Escuela Profesional de Biotecnología] Repositorio institucional digital <https://hdl.handle.net/20.500.14278/3942>.
- Madege, R. R., & Msemwa, J. (2015). Evaluation cassava, sweet potato and Irish potato starches as cheap alternative gelling agents for micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 12(2). 390-398. <https://ijias.issr-journals.org/abstract.php?article=IJIAS-15-096-10>.
- Madege, R., Mneney, E., Misangu, R., & Maere, A. (2015). Characterisation of botanical starches as potential substitutes of agar in tissue culture media. *African Journal of Biotechnology*, 14(8). 702-713. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.14289>
- Martínez-Ortiz, L. (2007). *Obtención y caracterización de almidones de malanga, arroz y maíz ceroso modificados por extrusión termoplástica para su uso como encapsulantes de aceite esencial de naranja*. [Tesis maestría, Universidad Veracruzana, instituto de ciencias básicas]. Cdigital. <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/46987>.
- Martin-Gordo D. A., Cárdenas-González O., y Constantino-Pacheco J. (2012). Sustancias utilizadas como agente gelificante alternativos al agar en medios de cultivo para propagación *in vitro*. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 3(2), 49-62. DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.972>.
- Martin-Gordo, D. A., Cárdenas-González, O. E, Pacheco, J., Echevarría, M. J. & Gómez-Castaño, J. A. (2017). Efficiency of the partial substitution of agar with potato starch on the growth and phytochemical parameters of lulo (*Solanum quitoense*) cultured *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*. 16(13), 623-630. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15646>.
- Martín-Gordo, D., Oswaldo-Cárdenas, G., y Agobardo-Cárdenas, C. (2013). Almidón de papa, agente gelificante alternativo en medios de cultivo para propagación *in vitro*

de LULO *Solanum quitoense* Lam. Revista de ciencias agrícolas. 30(1): 3-11.
https://www.researchgate.net/publication/257835717_ALMIDON_DE_PAPA_AGE_NTE_GELIFICANTE_ALTERNATIVO_EN_MEDIOS_DE_CULTIVO_PARA_PROPAGACION_in-vitro_DE_LULO_Solanum_quitoense_Lam.

Mejía-Cabezas, N., Zavala-Cuadrado, A., Samaniego-Maigua, I. y Arguello-Hernández, P. (2022). Composición química, morfología y propiedades tecnológicas de los almidones nativos de origen andino: una revisión sistemática. *Reciena*. 2(1). 45-57. DOI:[10.47187/reciena.v1i2.20](https://doi.org/10.47187/reciena.v1i2.20).

Meléndez, L. A. (2021). Cómo el cultivo de tejidos vegetales ayuda a la conservación y desarrollo de plantas de interés económico. *Recursos Naturales y Sociedad*. 7(3). 147-155. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2021.07.07.03.0011>.

Melgarejo, P.; Romagosa, I. y Durán, N. (2014). Biotecnología agrícola. *Arbor*, 190 (768):1-13. DOI: 10.3989/arbor.

Meneses, J., Corrales, C. M., y Valencia, M. (2007). Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir de almidón de yuca. *Revista EIA*, 8. 57-67. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=149216950005>.

Miguel-Luna, M. E., Enríquez- del Valle, J. R., Velasco-Velasco, V. A., Villegas-Aparicio, Y., Carrillo-Rodríguez, J. C., Rodríguez-Ortíz, G. (2013). Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brote de *Agave*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. (6), 1151-1159. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342013001000007&lng=es&tlng=es.

Mohamed, M. A. H., Alsadon, A. A., & Al-Mohaidib, M. S. (2010). Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation. *African Journal of Biotechnology*. 9(1), 12-16. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.03.002>.

Molavi, H., & Razavi, S. (2018). Dynamic rheological and textural properties of acorn (*Quercus brantii* Lindle.) starch: Effect of single and dual hydrothermal modifications: Rheology of native and modified acorn starches. *Starch - Stärke*. 70(11). 1800086. DOI:[10.1002/star.201800086](https://doi.org/10.1002/star.201800086)

Morales-Rubio, M. E. (2000). Inducción de germinación, crecimiento de plántula y cultivo *In vitro* de pitahaya *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton and Rose. [Tesis de maestría. Universidad autónoma de Nuevo León. Facultad de ciencias biológicas. División de estudios de postgrado. San Nicolás de los Garza N. L.]. Colección digital UANL. <https://cd.dgb.uanl.mx/bitstream/handle/201504211/2277/1067.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

- Mroginski, L., Sansberro, P. y Flaschland, E. (2010). Parte I Herramientas básicas: Capítulo 1 Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., y Mroginski, L. (Eds.), *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. Pp. 17-25. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotecnologiayMejoramientovegetalII.pdf>.
- Murashige T & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15, 473-97.
- Olmos, S., Luciani, G. y Galdeano, E. (2010). Parte IV métodos de propagación y conservación de germoplasma: Capítulo 1 Micropropagación. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., y Mroginski, L. (Eds.), *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. Pp. 353-362. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotecnologiayMejoramientovegetalII.pdf>.
- Ospina-Casas, K. G. (2016). Estudio de la interacción de hidrocoloides empleado en alimentos y su efecto en las propiedades reológicas y de textura sensorial e instrumental. [Tesis Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Bogotá, Colombia]. Repositorio.unal.edu.co <https://repositorio.unal.edu.co/items/44be25d2-4c23-441e-88ff-422e27fac07d>.
- Pardo, O. H., Castañeda, J. C., y Ortiz, C. A. (2013). Caracterización estructural y térmica de almidones provenientes de diferentes variedades de papa. *Acta Agronómica*, 62(4), 289-295. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169930016002>.
- Patel, B. K. y Seetharaman, K. (2006). Effect of heating rate on starch granule morphology and size. *Carbohydrate polymers (in press)*. *Carbohydrate polymers*. 65. 381-385. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.01.028.
- Peña-Carrasco, E. F. (2017). Extracción y caracterización fisicoquímica y funcional de almidones de cinco variedades de papas nativas procedentes de ilave (puno). [Tesis licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio institucional. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/items/8aa332db-ae26-4779-b62c-aa44f6601fab>.
- Pérez, S., & Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch/Stärke*, 62. 389-420. <https://doi.org/10.1002/star.201000013>
- Perugorría Larroque, M. (2012). Desarrollo de una técnica para micropropagación de especies leñosas en biorreactores. [Tesis maestría, Universidad de la República, Facultad de Ciencias] COLIBRI. <http://hdl.handle.net/20.500.12008/3974>.

- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro* culture of higher plants. *Springer Science & Business Media*. Pp. 21-27. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-011-5750-6>.
- Pozo-Chamorro, F. A., Lechón-Quilumbaquin, B. A, y Anchundia-Lucas, M. A. (2022). Caracterización fisicoquímica y funcional de almidón de papa Superchola y su utilización en la formulación de salchicha tipo Frankfurt. *Sathiri* 17(2). 160-176. <https://doi.org/10.32645/13906925.1137>.
- Prieto Méndez, J., Rubio Hinojosa, C. U., Román Gutiérrez, A. D., Méndez-Marzo, M. A., González Ramírez, C. A., y Prieto García, F. (2009). Degradación física del almidón de cebada (*Hordeum sativum* Jess). Correlación entre la gelatinización y el tamaño de gránulos. *Multiciencias*, 9(2), 115-125. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90411687002>.
- Przetaczek-Rożnowska, I. (2017). Physicochemical properties of starches isolated from pumpkin compared with potato and corn starches. *International Journal of Biological Macromolecules*.101. 536-542. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.092>.
- Qiao, D., Li, H., Shi, W., Lu, J., Zhang, L., Zhang, B., & Jiang, F. (2022). Increasing agar content improves the sol-gel and mechanical features of starch/agar binary system. *Carbohydrate Polymers*, 278. 01-12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118906>.
- Rivas-Cancino. G. (2016). Cultivo *in vitro* de células y tejido vegetal. *Artículos técnicos de INTAGRI*, México. Serie nutrición vegetal (59), 1-5. <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal>.
- Roca, M. W. y Mroginski. (1991). Parte A Principios básicos, metodologías y técnicas del cultivo de tejidos vegetales: Capítulo 1 Establecimiento de tejidos vegetales *in vitro*. Roca, M. W., y Mroginski, L. A. (Eds.) *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Turrialba. Pp. 1-18. [http://ciatlibrary.ciat.cgiar.org/Articulos/Ciat/biblioteca/Cultivo de tejidos en la agricultura](http://ciatlibrary.ciat.cgiar.org/Articulos/Ciat/biblioteca/Cultivo%20de%20tejidos%20en%20la%20agricultura).
- Rodríguez, M., y Chacón, M. (2014). Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 199-122. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002014000100012>.
- Rodríguez-Amaro, M. (2018). Cultivo *in vitro*: alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales. [Tesis. Licenciatura, Universidad Complutense Facultad de farmacia]. Repositorio Institucional. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MIGUEL%20RODRIGUEZ%20AMARO.pdf>.

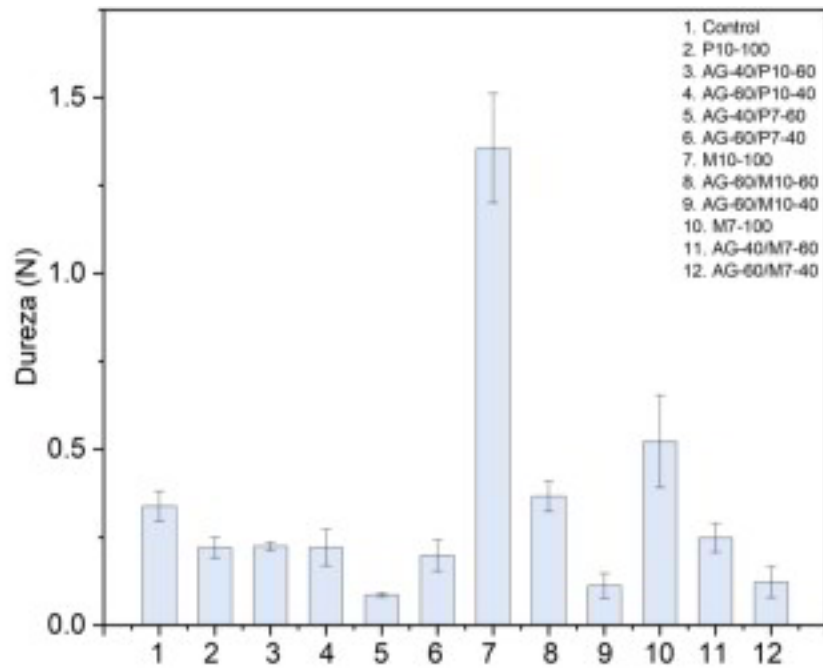
- Rodríguez-Beraud, M. M., Latsague-Vidal, M. I., Chacón-Fuentes, M. A., y Astorga-Brevis, P. K. (2014). inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*. 35(1). 111-118. DOI: 10.4067/S0717-92002014000100011.
- Romay, G., Matehus, J., Gerstl, A., Rueda, R., y Santana, M. A. (2006). Almidón modificado de yuca como sustituto económico del agente solidificante para medios de cultivo de tejidos vegetales. *Interciencia*, 31(9), 686-689. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33912013>.
- Rondón-Asuaje, M., Sánchez-Cuevas, M. C., y Silva-Acuña, R. (2018). Evaluación de almidón de maíz y sagú sobre el crecimiento *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*. *Agronomía Tropical*, 68(1-2). 95-102. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7333135>.
- Ruiz-González, S. P., Rojas-Aréchiga, M., y Mandujano, M. C. (2011). Descripción morfológica y germinación de las semillas de *Echinomastus unguispinus*. Meyrán, J., Golubov, J., Mandujano-Sánchez, M. C., Aguilar-Morales, G., y Rojas-Aréchiga, M. (Eds.) cactáceas y suculentas mexicanas. *Palabra en vuelo*, 56(2). 36-44. https://web.ecologia.unam.mx/cactsucmex/csm2011_56_2.
- Ruvalcaba-Ruiz, D., Rojas-Bravo, D., y Valencia-Botín, A. J. (2010). Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12, 139-143. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93913074015>.
- Saglam, S. & Cifici, C.Y. (2010). Effects of agar and isubgol on adventitious shoot regeneration of woad (*Isatis tinctoria*). *International Journal of Agriculture & Biology* 12 (2), 281–285. https://www.researchgate.net/publication/286323204_Effects_of_Agar_and_Isubgol_on_Adventitious_Shoot_Regeneration_of_Woad_Isatis_tinctoria.
- Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología ArgenBio*. 2, 5-8. https://www.argenbio.org/images/La_biotecnologia/Cap_2/Cultivos celulares II.pdf.
- Sharry, S., Adema, M., y Abedini, W. (2015). Plantas de probeta, manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Edulp. Pp. 6-232. <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/407>.
- Sim, D. H. H., Tan, I. A. W., Lim, L. L. P., & Hameed, B. H. (2021). Encapsulated biochar-based sustained release fertilizer for precision agriculture: A review. *Journal of Cleaner Production*, 303(1), 127018. DOI:[10.1016/j.jclepro.2021.127018](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127018).

- Singh, N., Singh, J., Lovedeep, K., Navdeep-Singh, S., & Balmeet-Singh, G. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*. 81(2). 219-231. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00416-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00416-8).
- Solarte-Montúfar, J. G., Díaz-Muragal, A. E., Osorio-Mora, O., y Mejía-España, D. F. (2019). Propiedades reológicas y funcionales del almidón. Procedente de tres variedades de papa criolla. *Información Tecnológica*, 30(6). 35-44. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000600035>.
- Spotti, M. J. (2013). Estudio de propiedades y estructura de geles mixtos proteína-polisacárido. Influencia de la reacción de glicosilación. [Tesis Doctorado, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química, Instituto de Tecnología de Alimentos]. DSpace Repository. <http://hdl.handle.net/11185/658>.
- Szabados, L., Núñez, V. M., Tello, L. M., Mafla, G., Roa, J., y Roca, W. M. (1991). Capítulo 4, Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos. *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y Aplicaciones*. Turrialba, Pp. 80-93. <http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos/Ciat/biblioteca/Cultivo de tejidos en la agricultura>.
- Tafolla-Rodríguez, L. A. (2018). Beneficio potencial de la biotecnología moderna para el campo mexicano. [Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Pénjamo]. Pp. 151. CIBIOGEM. <https://cibiogem.secihti.mx/wp-content/uploads/2024/10/Tesis-Beneficio-Potencial-Biotecnologia-Campo-Mexicano 2018-51>.
- Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. 39(2). <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.001>
- Tester, R. F., Xin-Qi, J. K. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. 39. 151-165. DOI:10.1016/j.jcs.2003.12.00.
- Tetlow, I. J., Morell, M. K., & Emes, M. J. (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of Experimental Botany*. 55. 2131–2145. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh248>.
- Tiza-Arias, G. (2010). Propagación *in vitro* de las Orquideas *Dendrobium*, *Laelia anceps*, *Phalaenopsis* y *Sobralia xantholeuca*. [Tesis maestría, Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencias Básicas].
- Tovar-Benítez, T. (2008). Caracterización morfológica y térmica del almidón de maíz (*Zea mays* L.) obtenido por diferentes métodos de aislamiento. [Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma de Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería]. UAEH Biblioteca Digital. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/508>.

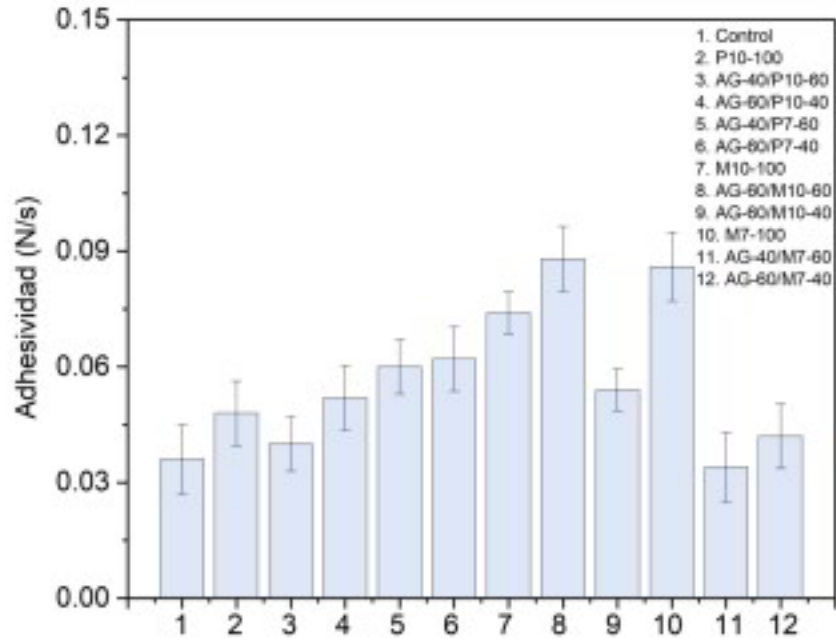
- Trunjauren, A., Luecha, P., & Taratima, W. (2023). The optimization of medium conditions and auxins in the induction of adventitious roots of pokeweed (*Phytolacca americana* L.) and their phytochemical constituents. *Scientifica (Cairo)*, 21. 01-14. DOI:[10.1155/2023/2983812](https://doi.org/10.1155/2023/2983812)
- Tsay, H. S., Lee, C. Y., Agrawal, D. C., & Basker, S. (2006). Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae*-A medicinal. *Plant. In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 42, 445–449. DOI: 10.1079/IVP2006791.
- Ullah, M., Uddin, M. I., Puteh, A. B., Haque, M. S., & Islam, M. S. (2015). Alternative gelling agents for *in vitro* propagation of orchid (*Dendrobium sonia*). *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(3). 792-797. https://www.researchgate.net/publication/282315517_Alternative_gelling_agents_for_in_vitro_propagation_of_orchid_Dendrobium_sonia.
- Utrilla-Coello, R. G., Agama-Acevedo, E., Barba-de la Rosa, A. P. Martínez-Salgado, J. L., Rodríguez-Ambriz, S. L., & Bello-Pérez, L. A. (2009). Blue maize: morphology and starch synthase characterization of starch granule. *Plant Foods Human Nutrition*, 64. 18–24. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0106-8>.
- Vasil, I. K. (2008). A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant cell reports*. 27(9), 1423-1440. DOI: [10.1007/s00299-008-0571-4](https://doi.org/10.1007/s00299-008-0571-4).
- Veitía, N., Collado, R., García-Rodríguez, L., Bermúdez-Carabaloso, I., Torres, D., y Romero, C. (2012). Influencia del agente gelificante en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de callos organogénicos. *Biotecnología Vegetal*, 12(3). https://www.researchgate.net/publication/259382455_Influence_of_gelling_agent_in_the_regeneration_of_plants_from_Phaseolus_vulgaris_L_starting_from_organogenic_callus.
- Vidoy-Mercado, I. (2014). Rejuvenecimiento y micropropagación de olivo (*Olea europea*). [Tesis Doctoral, Universidad de Málaga, Facultad de ciencias]. RiUMA. <http://hdl.handle.net/10630/8773>.
- Villalobos, V. M. A., Mejía-Muñoz., J. M., y Escobar-Araya, H. A. (1991). Parte B Aplicaciones del cultivo de tejidos a especies vegetales económicamente importantes. Capítulo 28 Micropropagación de opuntias y agaves. Roca, M. W., y Mroginski, L. A. (Eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Turrialba. Pp. 643-650. http://ciatlibrary.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.

- Villarroel, P., Gómez, C., Vera, C., y Torres, J. (2018). Almidón resistente: características tecnológicas e intereses fisiológicos. *Revista Chilena de Nutrición*.45(3). 271-278. <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182018000400271>.
- White, P. R. (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiology*, 9(3), 585-600. DOI: [10.1104/pp.9.3.585](https://doi.org/10.1104/pp.9.3.585)
- White, P. R. (1964). The cultivation of animal and plant cells. *The Ronald press company, New York*.
- Wilson, V., & Tenkouano, A. (2020). Cassava starch as alternative low-cost gelling agent for *in vitro* micropropagation of three *Musa* genotypes. *Pelagia Research Library*. 10(1). 8-14. www.pelagiaresearchlibrary.com.
- Zakaria, N. H., Muhammad, N. & Abdullah, M. M. B. (2017). Potential of starch nanocomposites for biomedical applications. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 209(1). 012087. DOI:[10.1088/1757-899X/209/1/012087](https://doi.org/10.1088/1757-899X/209/1/012087).

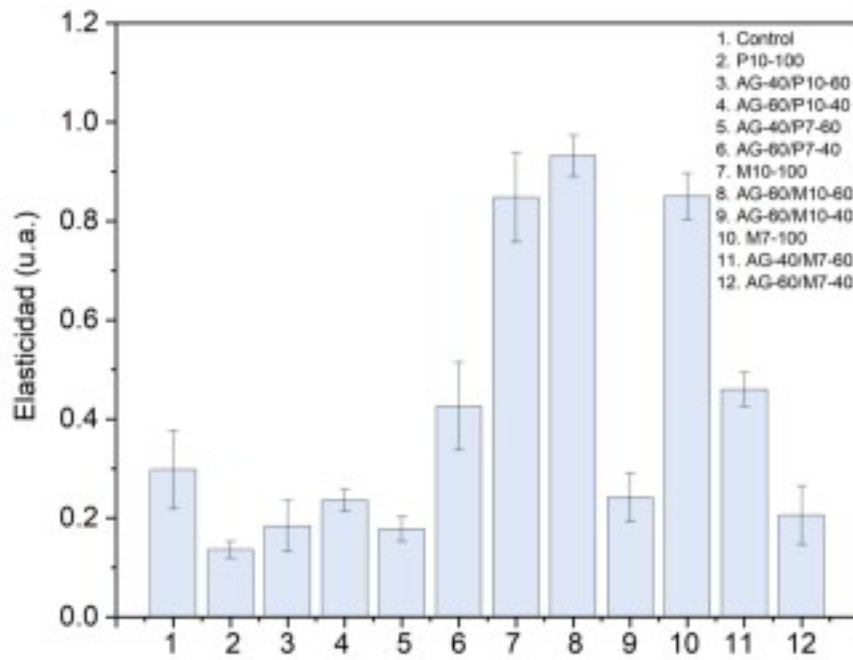
VIII. ANEXOS



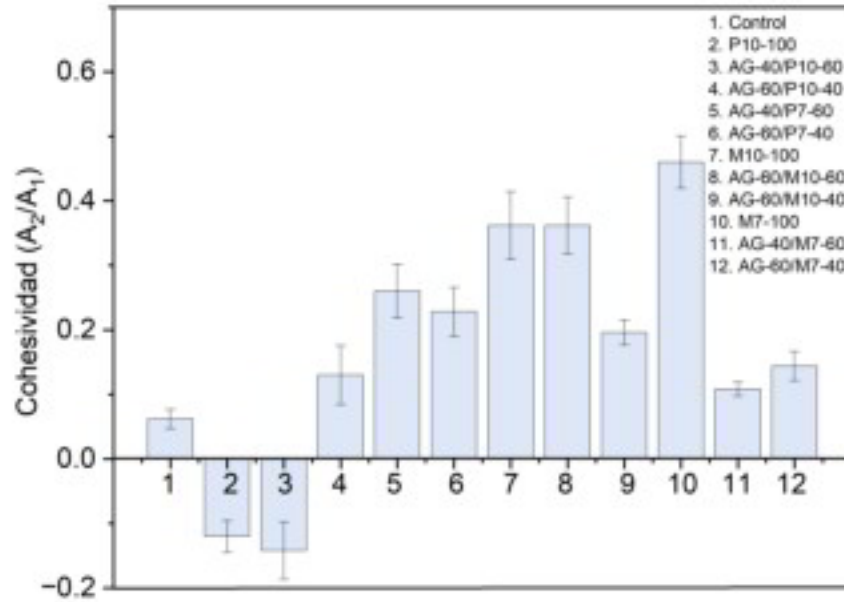
Anexo 1. Grafica de dureza de los agentes gelificantes en sus distintas concentraciones utilizados en la elaboración de medios de cultivo.



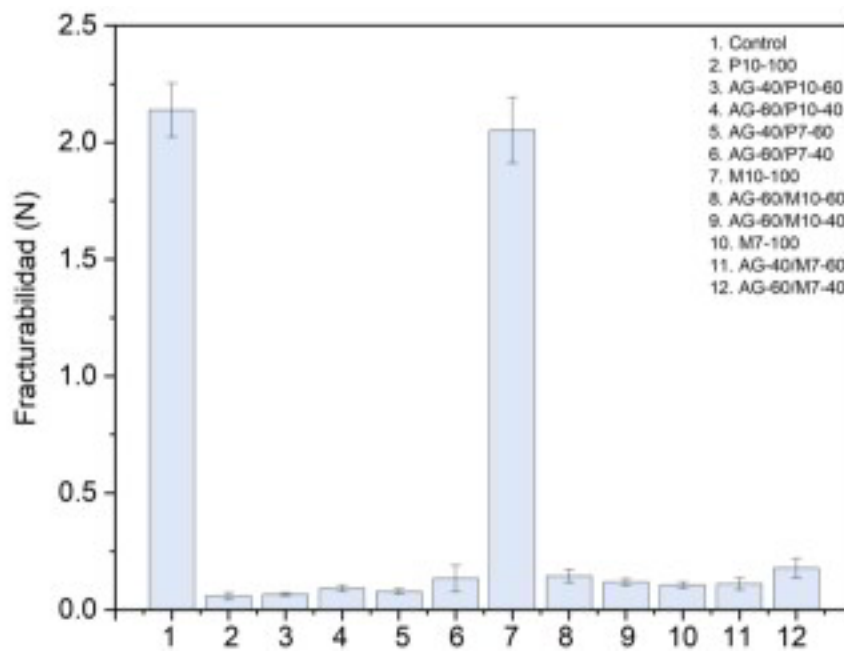
Anexo 2. Grafica de adhesividad de los agentes gelificantes en sus distintas concentraciones utilizados en la elaboración de medios de cultivo.



Anexo 3. Grafica de elasticidad de los agentes gelificantes en sus distintas concentraciones utilizados en la elaboración de medios de cultivo.



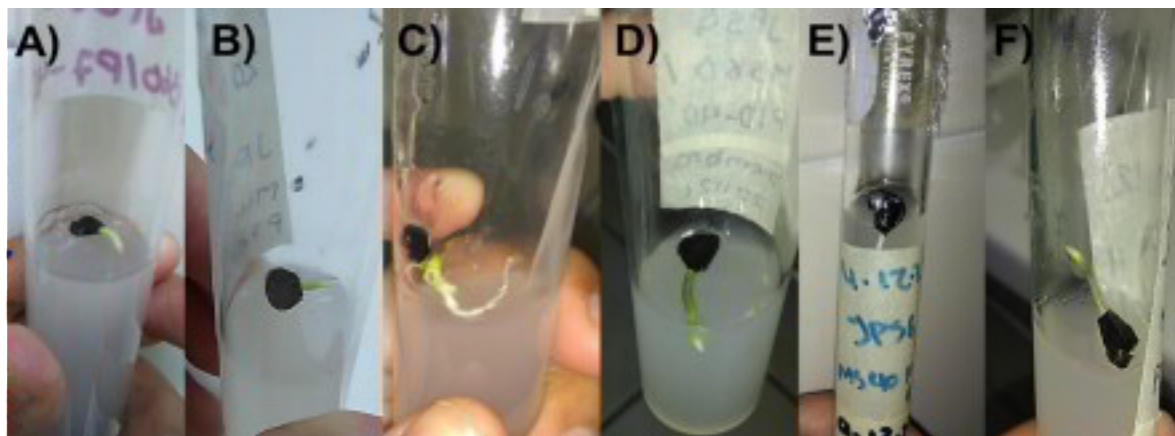
Anexo 4. Grafica de cohesividad de los agentes gelificantes en sus distintas concentraciones utilizados en la elaboración de medios de cultivo.



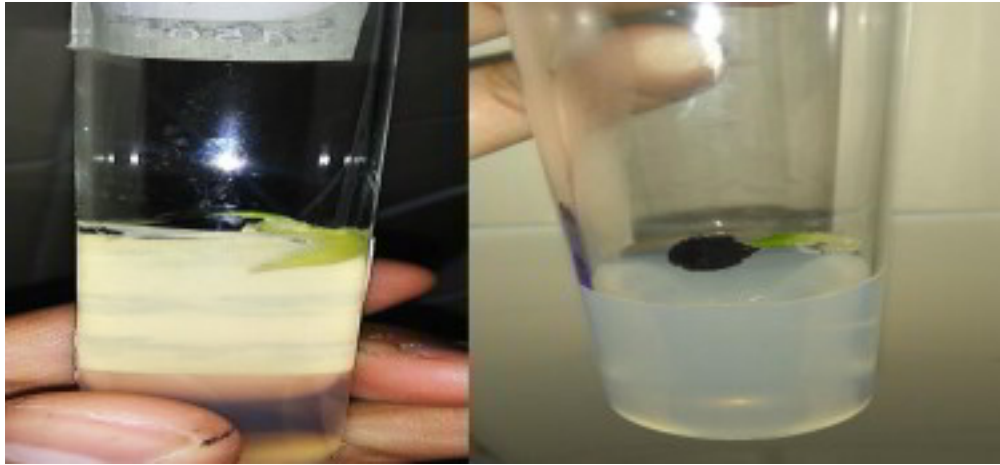
Anexo 5. Grafica de fracturabilidad de los agentes gelificantes en sus distintas concentraciones utilizados en la elaboración de medios de cultivo.



Anexo 6. Germinación de semillas de *Agave potatorum* Zucc. en medios de cultivo gelificados con almidón de maíz a diferentes concentraciones: A) Ag_M740 B) Ag_M760 C) M7100 D) Ag_M1040 E) Ag_M1060 F) M10100.



Anexo 7. Germinación de semillas de *Agave potatorum* Zucc. En medios gelificados con almidón de papa a diferentes concentraciones: A) Ag_P740 B) Ag_P760 C) P7100 D) Ag_P1040 E) Ag_P1060 F) P10100.



Anexo 8. Germinación de semillas de *Agave potatorum* Zucc. en medio control (Agar).