



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
CAMPUS TUXTEPEC

Establecimiento *in vitro* de *Dioscorea composita* HEMSL y  
*Dioscorea mexicana* SCHEIDW mediante evaluación de  
protocolos de desinfección secuenciales

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

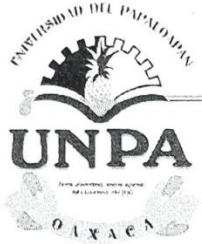
Presenta:

**DAVID CARRANZA OJEDA**

Director:

**Dr. Enrique Villalobos Amador**

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., 2024



# UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

### INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA


#### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

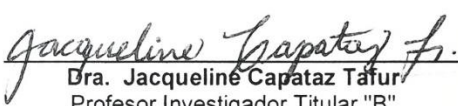
En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 23 de abril de 2024 a las 16:15 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Establecimiento *in vitro* de *Dioscorea composita* HEMSL y *Dioscorea mexicana* SCHEIDW mediante evaluación de protocolos de desinfección secuenciales**" presentada por el alumno **David Carranza Ojeda**, con número de matrícula 16090003, aspirante al título de Licenciatura.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.


Tuxtepec, Oaxaca, a 23 de abril de 2024.


#### ATENTAMENTE LA COMISIÓN REVISORA

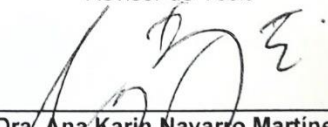
  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Enrique Villalobos Amador**  
Profesor Investigador Titular "A"  
Universidad del Papaloapan  
Director de Tesis

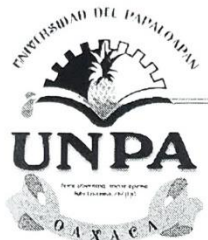
  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Jacqueline Capataz Tafur**  
Profesor Investigador Titular "B"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ariana Arlene Huerta Heredia**  
Investigadora por México CONAHCyT-UNPA  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García**  
Profesor Investigador Asociado "C"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Omar Wíñas Bravo**  
Profesor Investigador Titular "A"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Ana Karín Navarro Martínez**  
Profesor Investigador Titular "B"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

### INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 23 de abril de 2024  
Oficio No. JCIB/007/04/2024

**M.E. Yesenia Barrientos Arenal**  
Jefe de Servicios Escolares  
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **David Carranza Ojeda** con número de matrícula **16090003** que tiene título definitivo "**Establecimiento *in vitro* de *Dioscorea composita* HEMSL y *Dioscorea mexicana* SCHEIDW mediante evaluación de protocolos de desinfección secuenciales**", para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dra. Jacqueline Capataz Tafur (Presidente, Universidad del Papaloapan)  
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia (Vocal, Universidad del Papaloapan)  
Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García (Secretario, Universidad del Papaloapan)  
Dr. Omar Viñas Bravo (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)  
Dra. Ana Karin Navarro Martínez (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

**Atentamente**

*Terra uberrima, mens aperta*  
*Bou Lo-tama, chí jí jú*



*Jacqueline Capataz Tafur*  
Dra. Jacqueline Capataz Tafur  
Jefe de Carrera de Ingeniería en Biotecnología  
Universidad del Papaloapan



*Héctor López Arjona*  
Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona  
Vice Rector Académico  
Universidad del Papaloapan

VICE-RECTORIA  
ACADEMICA

JEFATURA DE INGENIERIA  
EN BIOTECNOLOGIA Enrique Villalobos Amador, Director de tesis, Para su conocimiento  
CAMPUS TUXTEPEC Carranza Ojeda, Alumno, Para su conocimiento  
c.c.p. Archivo

Campus Loma Bonita  
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma Bonita,  
Oaxaca C.P.68400  
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

Campus Tuxtepec  
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,  
Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68301  
Tel/Fax: 01 287 875 9240

## HOJA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la Universidad del Papaloapan para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres por su inquebrantable apoyo durante todo el proceso de culminación de mi educación. Su amor, aliento y sacrificio han sido la fuerza impulsora detrás de cada paso que he dado en este camino académico.*

*A mis hermanos, gracias por el apoyo y ánimo. Leo, inspiración desde el inicio, este logro es tuyo también; gracias por todo lo que me has enseñado y dado. Sergio, tu apoyo fue esencial. Manuela, tu cariño es impresionante. Elí, gracias por enseñarme a perseverar y mantener el optimismo. A todos, gracias por estar siempre ahí cuando más lo necesitaba.*

*A mis cuñadas, Rosa y Patricia, les agradezco su amabilidad y apoyo, los cuales han sido un regalo invaluable en mi vida.*

*A mi director de tesis, el Dr. Enrique Villalobos Amador por su invaluable contribución a este proyecto de investigación. Sus conocimientos expertos y las herramientas que me proporcionó fueron fundamentales para abordarlo con éxito. Agradezco especialmente su constante motivación, que me impulsó incluso en los momentos más desafiantes. Su disposición permanente para aclarar cualquier duda fue de gran ayuda.*

*A los revisores de este trabajo conformado por la Dra. Jacqueline Capataz Tafur, la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia, el Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García, el Dr., Omar Viñas Bravo y la Dra. Ana Karin Navarro Martínez. Sus valiosas sugerencias y comentarios han contribuido significativamente a elevar la calidad académica de mi trabajo. Agradezco su tiempo, esfuerzo y compromiso.*

## DEDICATORIA

*Dedicado con profundo amor y gratitud a mis queridos padres, quienes con su incansable esfuerzo y sacrificio han sido los pilares fundamentales que me han impulsado a lo largo de esta travesía. Es difícil expresar el profundo agradecimiento que albergo hacia ustedes. La vida, sin lugar a dudas, ha sido buena conmigo al premiarme con unos padres tan excepcionales y perfectos. Su calidad humana es indescriptible.*

*Este logro no es solo mío, sino también de ustedes. Gracias por creer en mí, por sacrificarse para que yo pudiera perseguir mis sueños y por ser mis más grandes ejemplos de amor, perseverancia y determinación.*

*Que este logro sea un tributo de su amor y sacrificio, y que cada éxito que logre en el futuro sea también suyo. Los amo más de lo que las palabras pueden expresar. ¡Gracias por tanto!*

## I. INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. MARCO TEÓRICO .....	5
2.1 Taxonomía y diversidad del género <i>Dioscorea</i> .....	5
2.2 Descripción botánica del género <i>Dioscorea</i> .....	5
2.3 Distribución geográfica de especies del género <i>Dioscorea</i> .....	8
2.4 Situación actual de las especies del género <i>Dioscorea</i> productoras de diosgenina .....	8
2.5 Especies del género <i>Dioscorea</i> con importancia alimentaria y farmacológica .....	10
2.6 Importancia de la diosgenina en la semisíntesis de fármacos esteroideos .....	11
2.7 Historia del barbasco en México .....	12
2.8 Propagación de especies de <i>Dioscorea</i> .....	15
2.8.1 Propagación convencional.....	15
2.8.2 Propagación a través del cultivo <i>in vitro</i> .....	16
2.8.3 Factores determinantes en la micropropagación .....	18
2.8.4 Reactores de Inmersión Temporal (RIT).....	18
3. ANTECEDENTES.....	20
3.1 Componentes esenciales en la micropropagación de <i>Dioscoreas</i> .....	20
3.1.1 Cultivos asépticos .....	20
3.1.2 Medio de cultivo .....	21
3.1.3 Explantes y reguladores de crecimiento .....	21
3.1.3.1 Segmentos nodales .....	22
3.1.4 Inductores de raíces .....	24
3.1.5 Temperatura y luz.....	24
3.2 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>D. composita</i> y <i>D. mexicana</i> .....	24

4. JUSTIFICACIÓN .....	26
5. HIPÓTESIS .....	27
6. OBJETIVOS .....	28
6.1 Objetivo general .....	28
6.2 Objetivos específicos .....	28
7. METODOLOGÍA.....	29
7.1 Estrategia experimental .....	29
7.2 Material vegetal y localización geográfica .....	29
7.3 Evaluación del establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> de <i>D. composita</i> a partir de segmentos nodales .....	32
7.3.1 Etapa de corte del explante.....	32
7.3.2 Procedimiento de desinfección previo.....	32
7.3.3 Procedimientos de exposición secuenciales a los agentes desinfectantes de segmentos nodales de <i>D. composita</i> .....	33
7.4 Evaluación de la proliferación o propagación vegetativa de yemas de <i>D. composita</i> a partir del mejor tratamiento de desinfección.....	37
7.5 Establecimiento y evaluación de la proliferación vegetativa de yemas de <i>D. mexicana</i> .....	38
7.6 Subcultivo de <i>D. composita</i> y <i>D. mexicana</i> .....	39
7.7 Evaluación de respuestas callogénica y rizogénica en <i>D. Mexicana</i> .....	39
7.8 Reactores de inmersión temporal automatizado RITA en <i>D. composita</i> y <i>D. mexicana</i> .....	40
7.9 Toma y análisis de resultados.....	40
8.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41

8.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Dioscorea composita</i> .....	41
8.1.1 Efectividad del tratamiento de desinfección previo .....	41
8.1.2 Evaluación de la factibilidad de los procedimientos de exposición secuenciales a los agentes desinfectantes.....	41
8.1.3 Incidencias de contaminaciones microbiológicas en explantes de <i>D. composita</i> según la época del año. ....	42
8.1.4 Efecto del antibiótico Quinofres (levofloxacin) en yemas de <i>D. composita</i> . ....	43
8.1.5 Efecto del Biocida Plant Preservation Mixture (PPM) en yemas de <i>D. composita</i> . ....	45
8.1.6 Contaminaciones recurrentes en el cultivo <i>in vitro</i> .....	46
8.1.7 Proliferación de brotes de <i>D. composita</i> .....	49
8.1.8 Proliferación de brotes de <i>D. composita</i> en el primer subcultivo.....	50
8.2 Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Dioscorea mexicana</i> .....	51
8.2.1 Respuesta de explantes de <i>D. mexicana</i> a diferentes Fitohormonas .....	52
8.2.2 CFB de <i>D. mexicana</i> .....	53
8.2.3 Subcultivo de <i>D. mexicana</i> .....	54
8.3 Aplicación de RITA en el subcultivo de <i>D. composita</i> y <i>D. mexicana</i> .....	56
8.4 Comparación de la eficiencia de proliferación de brotes entre el sistema SIT y el método convencional en frasco .....	57
9.CONCLUSIONES.....	59
10.PERSPECTIVAS.....	60
11. REFERENCIAS .....	61
12. ANEXOS.....	70

## II. INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Dibujo taxonómico de <i>Dioscorea composita</i> .	6
<b>Figura 2.</b>	Dibujo taxonómico de la parte aérea de <i>Dioscorea mexicana</i> .	7
<b>Figura 3.</b>	Distribución global de registros de ocurrencia de especies de <i>Dioscorea</i> que contienen diosgenina	8
<b>Figura 4.</b>	Máximas similitudes de áreas adecuadas y distribución ecológica para dos especies de <i>Dioscoreas</i> .	10
<b>Figura 5.</b>	Estructura química de la diosgenina aislada de la <i>D. trifida</i> .	12
<b>Figura 6.</b>	Degradación de R. Marker.	15
<b>Figura 7.</b>	Ejemplo de reactores RIT.	19
<b>Figura 8.</b>	Diseño de investigación	29
<b>Figura 9.</b>	Segmento nodal de una guía vigorosa y joven de <i>D. composita</i> .	30
<b>Figura 10.</b>	Ubicación de los municipios donde se localizan las plantas de <i>D. composita</i> .	31
<b>Figura 11.</b>	Proceso de desinfección superficial de explantes.	33
<b>Figura 12.</b>	Subcultivo de <i>D. mexicana</i> .	39
<b>Figura 13.</b>	Perfil de contaminación total (hongos y bacterias) durante un periodo de dos años en <i>D. composita</i> .	43
<b>Figura 14.</b>	Comparación de la calidad de brotación utilizando levoflaxacino.	44
<b>Figura 15.</b>	Efecto del antibiótico levoflaxacino en brotes de <i>D. composita</i> .	45
<b>Figura 16.</b>	Brotes de <i>D. composita</i> de 10 días, sembrados en Medio MS, suplementado con el biocida PPM.	46
<b>Figura 17.</b>	Contaminación bacteriana y fúngica presentada en <i>D. composita</i> .	48
<b>Figura 18.</b>	Detalle de la morfología interna del tallo de <i>D. composita</i> .	48
<b>Figura 19.</b>	Desarrollo de brotes de <i>D. mexicana</i> .	52
<b>Figura 20.</b>	Tipos de respuesta al tratamiento hormonal de segmentos nodales de <i>D. mexicana</i> .	53
<b>Figura 21.</b>	Proliferación de brotes de <i>D. mexicana</i> .	54
<b>Figura 22.</b>	Proliferación de brotes en <i>D. mexicana</i> .	55

**Figura 23.** Aspecto de la promoción del crecimiento de *D. composita* bajo esquema RITA.. 56

**Figura 24.** Aspecto de la promoción del crecimiento de *D. mexicana* y proliferación de segmentos nodales bajo esquema RITA..... 57

### III. INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Taxonomía del género <i>Dioscorea</i> .....	5
Tabla 2.	Especies del género <i>Dioscorea</i> empleadas para obtener diosgenina.....	11
Tabla 3.	Composición de medios de cultivo reportados para la brotación de segmentos nodales en especies del género <i>Dioscorea</i> . .....	23
Tabla 4.	Colectas de campo del material vegetal. ....	31
Tabla 5.	Procedimientos de exposición secuenciales a los agentes desinfectantes. ....	35
Tabla 6.	Porcentajes de contaminación bacteriana, fúngica y eficiencia de cada procedimiento. ....	42
Tabla 7.	Brotación de segmentos nodales de <i>D. composita</i> provenientes de campo.....	49
Tabla 8.	Brotación de segmentos nodales <i>D. composita</i> en el primer subcultivo Vf. ....	50
Tabla 9.	Resultado del establecimiento <i>in vitro</i> de <i>D. mexicana</i> . ....	51
Tabla 10.	CFB del subcultivo en <i>D. mexicana</i> .....	55
Tabla 11.	Extracto de datos de los promedios de proliferación entre la etapa de establecimiento ( <i>Vi</i> ), primer subcultivo ( <i>Vf1</i> ) y subcultivo en biorreactor ( <i>Vf2</i> ).....	58

#### IV. ABREVIATURAS

2,4-D:	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
AIA:	Ácido indol-3-acético
AIB:	Ácido indol butírico
ANA:	Ácido 1-naftalenacético
BAP:	6-Bencilaminopurina
CFB:	Capacidad de formación de brotes
KIN:	Cinetina
MS:	Medio basal de Murashige y Skoog
PPM:	Plant Preservation Mixture
PVP:	Polyvinylpyrrolidona
RCV:	Regulador del crecimiento vegetal
RITA:	Recipiente para inmersión temporal automatizado
<i>r</i> :	Tasa geométrica de propagación
SIT:	Sistemas de inmersión temporal
TDZ:	Thidiazurón
TIB:	Biorreactores de inmersión temporal
<i>t</i> :	Intervalo de tiempo de un ciclo de cultivo
<i>V<sub>f</sub></i> :	Promedio de proliferación de brotes del subsecuente subcultivo
<i>V<sub>i</sub></i> :	Promedio de proliferación de brotes en el subcultivo previo

## V. RESUMEN

*Dioscorea composita* y *Dioscorea mexicana* son dos de las tres especies mexicanas de la familia de *Dioscoreaceae* que producen sapogeninas, como la diosgenina, un precursor de diferentes fármacos y hormonas esteroidales. Este estudio se enfocó en evaluar la eficiencia de cinco protocolos de exposición secuencial a agentes desinfectantes para propagar material vegetativo de ambas especies bajo condiciones *in vitro*, utilizando poblaciones silvestres. Para ello, se cultivaron segmentos nodales en medio Murashige y Skoog (MS), el cual fue suplementado con dos tipos de reguladores de crecimiento para romper la dormancia de brotes latentes: uno con 1 mg/L de 6-Bencilaminopurina (BAP) y otro con una combinación de 1 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de ácido 1-naftalenacético (ANA). A los 25 días se evaluaron las eficiencias de los protocolos de desinfección, así como la capacidad de formación de brotes (CFB) de cada tratamiento hormonal. En el tratamiento de desinfección cinco (TD5) en *D. composita*, se obtuvo una eficiencia del  $53.11 \pm 8.96\%$  de explantes libres de contaminaciones. El medio de cultivo suplementado solo con 1 mg/L de BAP mostró una CFB de  $0.13 \pm 0.15$ , superior al tratamiento hormonal combinado. Los brotes obtenidos en este medio, fueron subcultivados y se evaluó nuevamente el efecto de la hormona BAP, ya sea individual o combinada con ANA. Se confirmó un mayor desarrollo en el medio con solo 1 mg/L de BAP, sin presencia de ANA, lo que resultó en una CFB de  $0.54 \pm 0.17$ .

En el establecimiento *in vitro* de *D. mexicana*, se aplicó el tratamiento de desinfección TD5, el mismo utilizado previamente en *D. composita*. Se logró una eficiencia del 91 % en la eliminación contaminaciones de los explantes, obteniéndose una CFB de 1.44, al utilizar BAP (1 mg/L) como hormona de crecimiento. Durante la etapa de subcultivo, se observó que el medio suplementado únicamente con BAP (1mg/L) promovió el mayor desarrollo de brotes, alcanzando una CFB de  $0.78 \pm 0.31$ .

Finalmente, se realizó una comparación entre la proliferación de brotes utilizando el sistema de frascos descrito anteriormente y el sistema de inmersión temporal (RITA) en ambas especies de *Dioscorea*. Se observó una mayor proliferación en el sistema RITA, con una CFB de 3.5 para *D. composita* y 4.99 para *D. mexicana*, respectivamente.

## VI. ABSTRACT

*Dioscorea composita* and *D. mexicana* are two of the three Mexican species of the *Dioscoreaceae* family that produce sapogenins, such as diosgenin, a precursor of various pharmaceuticals and steroid hormones. This study aimed to evaluate the efficiency of five sequential exposure protocols to disinfectants for propagating vegetative material from both species under *in vitro* conditions, using wild populations. For this purpose, nodal segments were cultured in Murashige and Skoog (MS) medium, which was supplemented with two types of growth regulators to break the dormancy of latent buds: one with 1 mg/L of 6-Benzylaminopurine (BAP) and another with a combination of 1 mg/L of BAP + 0.5 mg/L of 1-Naphthaleneacetic acid (NAA). After 25 days, the efficiencies of the disinfection protocols were evaluated, as well as the capacity for shoot formation (CFB) of each hormonal treatment. In disinfection treatment five (TD5) in *D. composita*, an efficiency of  $53.11 \pm 8.96\%$  of explants free from contamination was obtained. The medium supplemented only with 1 mg/L of BAP showed a CFB of  $0.13 \pm 0.15$ , higher than the combined hormonal treatment. The shoots obtained in this medium were subcultured, and the effect of BAP hormones, either individually or combined with NAA, was evaluated again. Greater development was confirmed in the medium with only 1 mg/L of BAP, without presence of NAA, resulting in a CFB of  $0.54 \pm 0.17$ .

In the *in vitro* establishment of *D. mexicana*, disinfection treatment TD5, the same as previously used in *D. composita*, was applied. An efficiency of 91% in eliminating contaminants from the explants was achieved, resulting in a CFB of 1.44 when using BAP (1 mg/L) as a growth hormone. During the subculture stage, it was observed that the medium supplemented only with BAP (1 mg/L) promoted the greatest shoot development, reaching a CFB of  $0.78 \pm 0.31$ . Finally, a comparison was made between shoot proliferation using the flask system described above and the temporary immersion system (RITA) in both *Dioscorea* species. Greater proliferation was observed in the RITA system, with a CFB of 3.5 for *D. composita* and 4.99 for *D. mexicana*, respectively

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia *Dioscoreaceae* está constituida por más de 600 especies con flores casi siempre unisexuales y las plantas normalmente son dioicas, concentradas, pero no limitadas a las regiones tropicales y subtropicales del mundo; África, Sudeste Asiático, India y América (Ayensu, 1972; citado por Bernabé *et al.*, 2012; Coursey, 1967 y Onwueme, 1978; citado por Krikorian A. D., 1994), de las cuales, aproximadamente veinticinco especies son comestibles, quince medicinales y seis ornamentales (Bhattacharjee, R., *et al.*, 2011). Las especies de *Dioscorea* que presentan tubérculos comestibles son una fuente importante de calorías rica en almidón y proteínas en zonas rurales denominadas comúnmente ñames, su almidón es semejante al de maíz, tanto en sabor como en textura y color, este es empleado por las industrias alimenticias (González V.M., 2012), siendo *Dioscorea alata*, *D. esculenta* y *D. bulbifera* las mayormente cultivadas en el mundo, *D. dumetorum* de origen asiático y África, y *D. trifida* de Centro América. Las especies comestibles son generalmente estériles con número cromosómico variable entre la misma especie; n=10 en África y n=9 los cultivares en América, debido a que se han venido propagando a partir de sus tubérculos presentando niveles altos de poliploidía. Los tubérculos presentan yemas preformadas o pueden formarse a partir de la capa meristemática ubicada a unos milímetros de la superficie del mismo.

El cultivo convencional de algunas especies de *Dioscorea* se ha visto afectado por diversos factores. Se ha observado que la propagación por semillas es lenta e inadecuada para una multiplicación rápida, mientras que la producción de tubérculos se ve afectada por infecciones virales y nematodos (Raynor *et al.*, 1992). Las principales enfermedades que aquejan a las especies cultivadas comestibles son las machas foliares causada por *Cercospora* spp., la antracnosis causada por *Colletotrichum*, el hongo que causa pudrición de la raíz *Rhizoctonia*, y nemátodos del género *Scutellonema*, aunque la susceptibilidad a estas enfermedades varía para cada especie y variedad. La identificación de fuentes alternativas de nuevo material de propagación se convierte en una prioridad importante. El alcaloide dioscorina se distribuye de diversas formas, pero los cultivares comestibles populares contienen poco. Además, es termolábil y se destruye al hervirlo. A este

respecto, el otro grupo es de importancia farmacéutica principalmente por acumular en sus rizomas sapogeninas esteroidales, de las cuales al hidrolizarse se libera la diosgenina que es utilizada como precursor químico para la semisíntesis de hormonas sexuales y corticosteroides (Tsukamoto & Ueno, 1936; citados por Waizel, 2009). Los ejemplos que prestan importancia farmacéutica son *D. deltoidea* de la India, y *D. floribunda*, *D. composita*, y *D. mexicana* de Centro América y México. En México se han localizado aproximadamente sesenta y seis especies del género *Dioscorea*, algunas de las cuales tienen tubérculos comestibles, pero las de mayor importancia son la *D. mexicana* y la *D. composita* (Waizel, 2009), la primera conocida como cabeza de negro y la segunda como barbasco, ambas descubiertas por Marker en los años 40, almacenan diosgenina en sus rizomas y tubérculos, aunque la *D. composita* acumula una mayor concentración (Haro, 2013).

El manejo de recursos genéticos *in vitro* proporciona la base para generar material de plantación en plantas de vida útil corta, como es el caso de este grupo vegetal. El cultivo de células, tejidos, órganos, así como de germoplasma *in vitro* fomenta el estudio e intercambio de clones y variantes somaclonales como forma de obtener una importante fuente de variación obtenidos mediante diversos métodos de cultivo; cultivo de callos, la embriogénesis somática, la fusión y regeneración de protoplastos. Esto también puede combinarse con mutagénesis de sistemas generados *in vitro*. La selección de clones para cultivo basada en las preferencias del consumidor o en las características deseadas del tubérculo es una importante actividad de prueba de campo en la que se buscan nuevos mercados y la idea es que bien podrían lograrse nuevos genotipos. Debido a la problemática que se puede presentar en el cultivo convencional, es evidente el potencial que tiene la biotecnología debido a la alta disponibilidad de meristemas preformados o alternativamente los tejidos que son capaces de generar meristemas de novo (Krikorian A. D., 1994). La micropropagación *in vitro* pretende superar estas limitaciones con la disponibilidad de material de alta calidad y en menor tiempo (Vaillant *et al.*, 2005).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Taxonomía y diversidad del género *Dioscorea*

La familia botánica *Dioscoreaceae* está formada por los géneros *Dioscorea*, *Stenomeris* y *Trichopus*. El género *Dioscorea* es el más numeroso e importante, compuesto por un número no preciso de especies que oscila entre 650 y 850 (Téllez-Valdés & Geeta, 2007). En México contamos con alrededor de 63 especies y algunas de las cuales son endémicas, por lo que este grupo botánico contribuye a la megabiodiversidad de nuestro país (Sosa V., Schubert B.G. & Gómez-Pompa A. 1987). En la Tabla 1 se detalla la ubicación taxonómica del género *Dioscorea*.

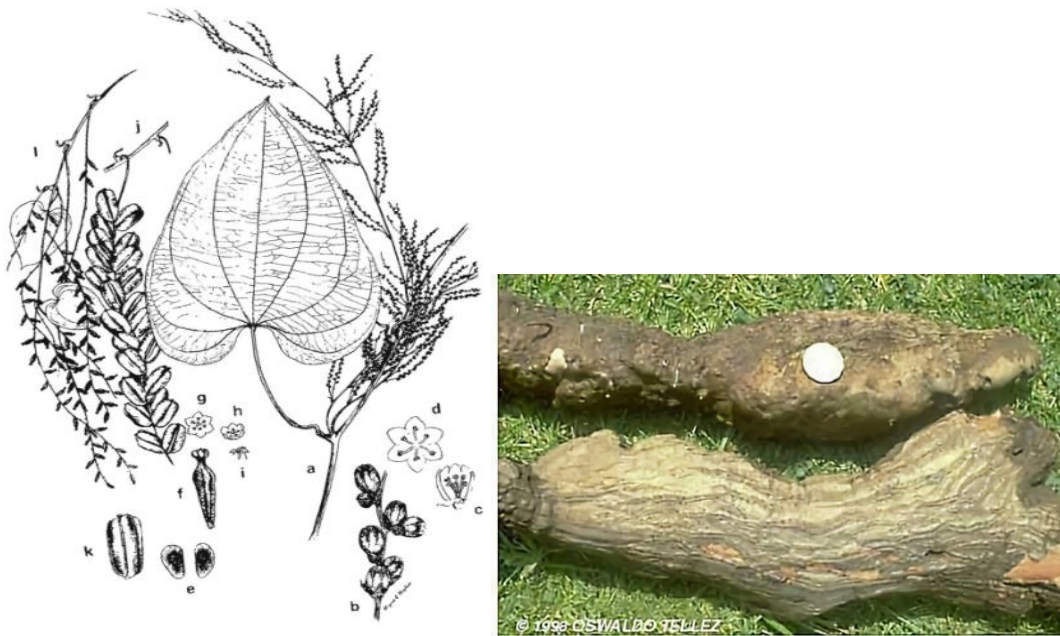
Tabla 1. Taxonomía del género *Dioscorea*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Orden</b>	Dioscoreales
<b>Familia</b>	Dioscoreaceae
<b>Género</b>	<i>Dioscorea</i>

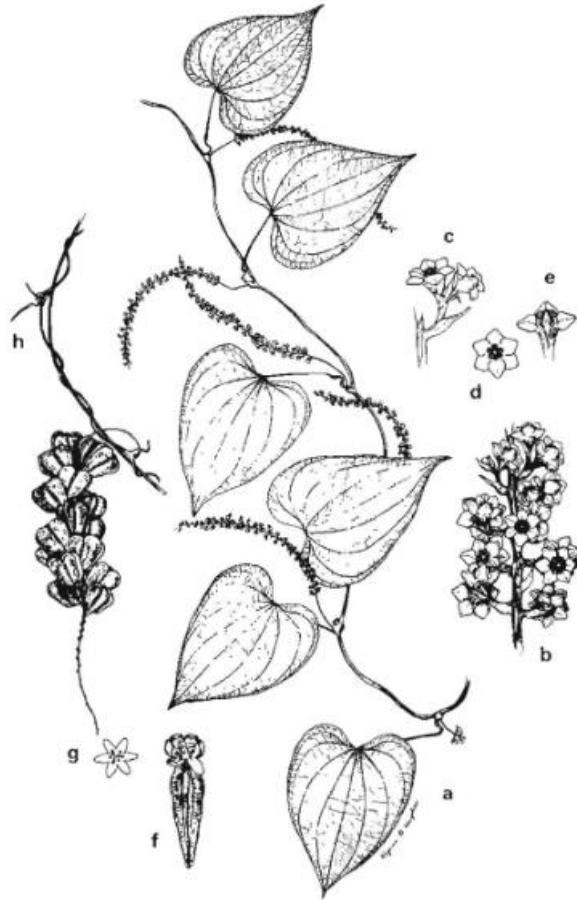
### 2.2 Descripción botánica del género *Dioscorea*

Las plantas del género *Dioscorea* conocidas específicamente en América Latina con los nombres de barbasco o ñame, crecen en los trópicos y subtrópicos del mundo. Las *Dioscorea* son plantas monocotiledóneas que pertenecen a una familia botánica de origen monofilético *Dioscoreaceae*, que se ubica en el orden Dioscoreales, el cual agrupa a plantas trepadores, con hojas reticuladas, dioicas, semileñosas y con bases tuberosas, con rizomas hipógeos de diversas formas y en algunas especies epígeos, grandes y con una corteza escamosa, tallos volubles ocasionalmente con espinas, algunas veces con

bulbillos en las axilas foliares. Hojas enteras, lobadas o divididas, a menudo cordadas, con un ápice largamente acuminado y una base truncada o redondeada, palmadamente nervada, peciolo articulado en la base. Presentan inflorescencias estaminadas, poco a muy ramificadas, solitarias o en grupos en las axilas de las hojas, flores pequeñas, bracteadas, campanuladas, infundibuliformes, esféricas o urceoladas, perianto con seis tépalos radiales, tépalos externos e internos muy diferenciados en dos verticilos, seis estambres por lo general, algunas veces tres fértiles y tres estériles, con seis o tres estaminodios presentes o sin estaminodios; parecidos a los estambres de las flores estaminadas, ovario ínfero, trilobular, con una columna estilar triramificada o con tres estilos separados. El Fruto está constituido por una cápsula trilobular con dos a cuatro semillas comprimidas en cada lóculo o cavidad, semillas aladas alrededor o solamente en la parte inferior o casi esféricas sin alas, lisas o reticuladas (Figura 1) (Sosa *et al.*, 1987).



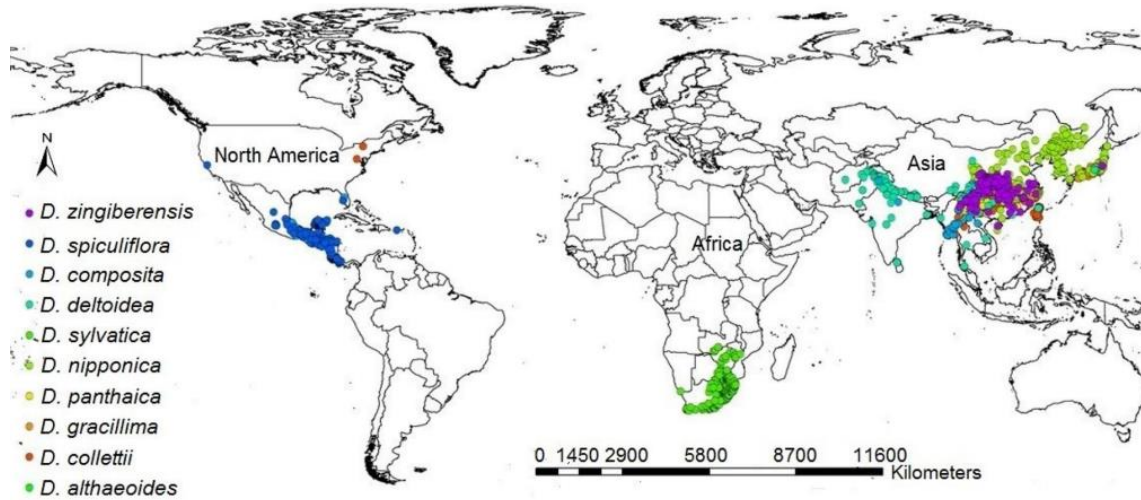
**Figura 1.** Dibujo taxonómico de *Dioscorea composita* (izquierda). a, rama con inflorescencias estaminadas; b, detalle de una inflorescencia estaminada; c, flor estaminada en vista lateral; d, flor estaminada vista desde arriba; e, semillas; f, flor pistilada; g, h, flores pistiladas en detalle; i, detalle de la columna estilar; j, infrutescencia; k, cápsulas; l, rama con inflorescencias pistiladas. Ilustración por Regina O. Hughes (Sosa *et al.*, 1987). Tubérculo alargado y cilíndrico (derecha), con una piel rugosa de color marrón oscuro o grisáceo. Ilustración por O. Téllez V.



**Figura 2.** Dibujo taxonómico de la parte aérea de *Dioscorea mexicana*(arriba). a, rama con inflorescencias pistiladas; b, detalle de una inflorescencia pistilada; c, fascículo en el raquis; d, flor estaminada vista desde arriba; e, flor estaminada vista de lado; f, flor pistilada; g, flor pistilada vista desde arriba; h, infrutescencia. Ilustración por Regina O. Hughes (Sosa *et al.*, 1987). Tubérculo (abajo) con textura externa rugosa, el color de la piel del tubérculo puede variar desde tonos marrones hasta tonos más claros (Global Biodiversity Information Facility, 2022).

### 2.3 Distribución geográfica de especies del género *Dioscorea*

Las plantas del género *Dioscorea* se encuentran distribuidas principalmente en la zona ecuatorial y en los trópicos y subtrópicos del mundo (González, V. M., 2012). En México este género se encuentra mayormente representado en los estados de Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Tabasco (Haro, 2013).



**Figura 3.** Distribución global de registros de ocurrencia de especies de *Dioscorea* que contienen diosgenina (Shen, L., *et al.*, 2018).

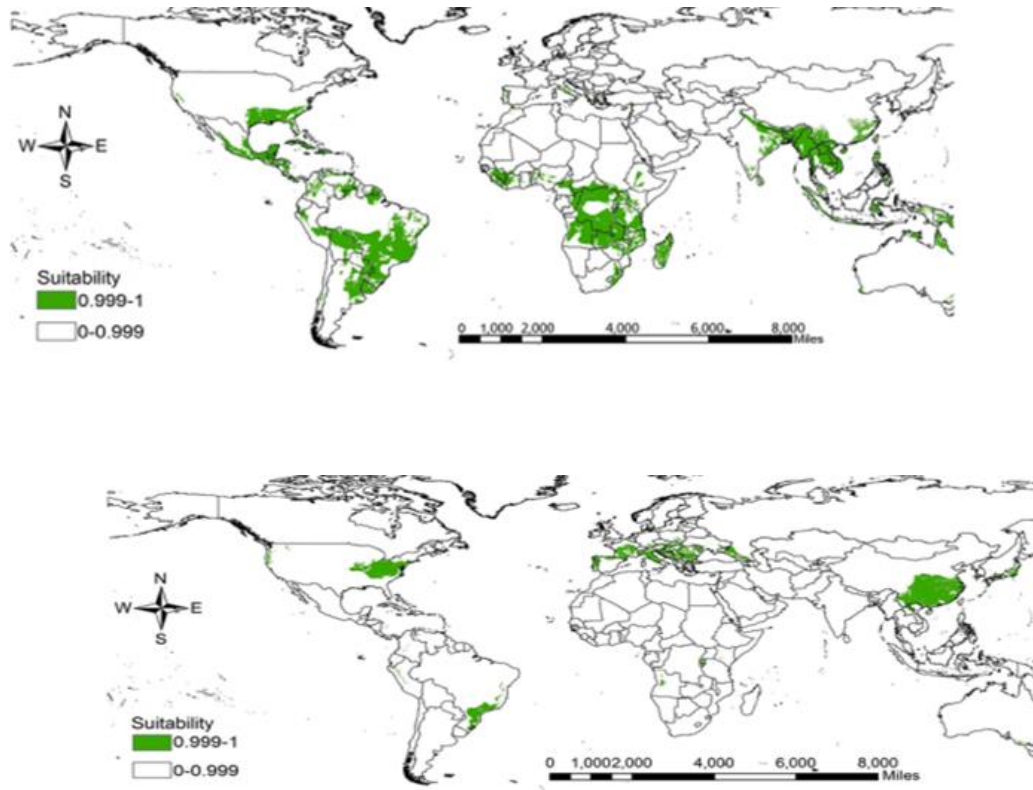
### 2.4 Situación actual de las especies del género *Dioscorea* productoras de diosgenina

La diosgenina es un precursor químico para la fabricación de fármacos esteroides con gran demanda en el mercado, la cual se extrae de especies vegetales del género *Dioscorea* (Li X, *et al.*, 2010). Estas especies son fuente de precursores químicos para la semisíntesis de hormonas esteroides debido al fracaso de la síntesis química de esteroides. La demanda del mercado ha impulsado la expansión de la introducción y el cultivo de estas especies vegetales a nivel mundial. China y México son los dos principales países productores, que representan el 67% del rendimiento de diosgenina con el recurso de *Dioscorea* más rico del mundo (Li X., *et al.*, 2010). Sin embargo, el rendimiento y la calidad de la diosgenina disminuyeron debido a la falta de germoplasma de alta calidad, al desconocimiento de las regiones vegetales productoras, y a la escasez de tecnología (Sautour M., *et al.*, 2007). Estos recursos mermaron, además debido a la

sobreexplotación, al grado de que algunas especies estén casi extintas (Yongqin *et al.*, 2003 citado por Shu, Y., *et al.*, 2005; Yi T., *et al.*, 2014). La diosgenina se extrae principalmente de *Dioscorea* silvestres por lo que están sujetas al deterioro medioambiental y a la enorme presión a la que están sujetas debido a la gran demanda del mercado. Este hecho hace necesaria la identificación de nuevas líneas productoras, así como el conocimiento de su distribución ecológica para que se mantenga la producción de diosgenina. A este respecto se realizó un estudio de predicción del potencial global de distribución de especies de *Dioscorea* que producen naturalmente diosgenina, con base a sus requerimientos climáticos como la precipitación anual, así como la radiación media anual son dos de los factores que pueden determinar la distribución de estas especies. Los resultados revelaron que las áreas de distribución potencial de diez especies presentan un amplio rango de distribución y además nuevas áreas ecológicamente idóneas en el centro de Sudamérica, el sur de Europa y la región costera de Oceanía (Figura 4). El rango ecológico de las especies *D. deltoidea*, *D. collettii*, *D. composita* y *D. spiculiflora* cubre principalmente la región central del Sur América, parte sur de África y Asia. En contraste, las áreas potenciales para *D. althaeoides*, *D. zingiberensis*, *D. gracillima* y *D. panthaica* se distribuyeron principalmente en la parte oriental de América del Norte, parte sur de Europa y Asia. La identificación de las áreas ecológicamente aptas es necesaria para la planificación de la conservación y el cultivo para la producción de diosgenina (Shen, L., *et al.*, 2018).

Existen 137 especies reportadas de *Dioscorea* que acumulan este compuesto, de las cuales 41 contienen más del 1 % de diosgenina (Wan J.R., *et al.*, 1994). Tanto la calidad de la diosgenina como un entorno ecológicamente saludable son requisitos básicos para que la industria China de este precursor químico, se consolide, la cual está basada en la superficie cultivada de *D. zingiberensis*, especie que produce una alta concentración de diosgenina (Li X, *et al.*, 2010; Shu, Y., *et al.*, 2005). Como se ha venido mencionando, el comprender las condiciones de hábitat necesarias para este grupo de especies resulta útil para gestionar la recuperación de las poblaciones silvestres, así como las plantaciones, para promover el crecimiento de esta actividad económica (Dansí A., *et al.*, 1999; Ondo

O., *et al.*, 2016). Todavía existen algunas especies de *Dioscorea* cultivadas en la China rural, pero aún no se ha determinado si pueden ser comercialmente rentables (Liu P., *et al.*, 1993). En la India, por ejemplo, casi el 100 % de la producción de medicamentos esteroideos se basa en la diosgenina obtenida de *Dioscorea* (Chaturvedi H.C., *et al.*, 2007). Por lo tanto, es necesario explorar enfoques en la conservación y cultivo de *Dioscorea* que contienen diosgenina (Shen, L., *et al.*, 2018).



**Figura 4.** Máximas similitudes de áreas adecuadas (lado izquierdo) y distribución ecológica (lado derecho) para dos especies de *Dioscoreas* que producen diosgenina; *D. composita* (arriba), y *D. zingiberensis* (abajo) (Shen, L., *et al.*, 2018).

## 2.5 Especies del género *Dioscorea* con importancia alimentaria y farmacológica

En la literatura hay registros que describen la importancia de las especies del género *Dioscorea* para las industrias farmacéuticas y alimentarias. Las mayormente utilizadas como fuentes de alimento al conservar en sus rizomas altas concentraciones de almidón, son: *D. convolvulacea*, *D. corpumaculata*, *D. esculenta*, *D. trifida*, *D. rototiflora* y *D.*

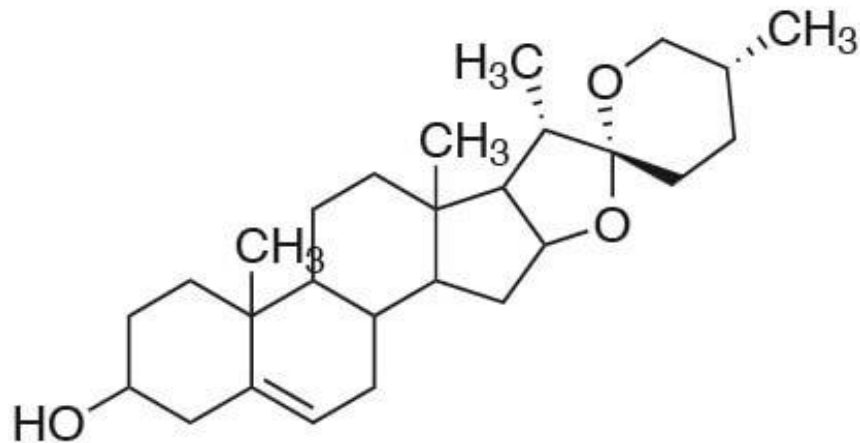
*rotundata* (Ng, S. Y. C., 1992). En tanto que las especies relevantes para la industria farmacéutica son: *D. balcanica*, *D. deltoidea* y *D. batatas*, utilizadas para tratar diversos problemas de salud como la inflamación, dolor en articulaciones, diabetes, infecciones y dismenorrea (Waizel, 2009). Los componentes farmacológicamente activos de estas especies son la diosgenina, una sapogenina esteroidal, y dioscina, una forma de diosgenina con azúcar (Ramos *et al.*, 2015). Tras varias décadas del descubrimiento de las *Dioscoreas* en México, en la actualidad se tienen registros de otras especies de *Dioscorea* que se han ganado un lugar como fuentes de diosgenina. En la Tabla 2 se citan algunas.

Tabla 2. Especies del género *Dioscorea* empleadas para obtener diosgenina.

ESPECIE	ORIGEN	REFERENCIA
<i>D. nipponica</i> Makino	China	Chen <i>et al.</i> , 2007
<i>D. multiflora</i> Grised	Sudamérica	Sousa <i>et al.</i> , 2011
<i>D. rotundata</i> Poir	África	Uchendu <i>et al.</i> , 2016
<i>D. villosa</i> L.	Norte América	Ranjan & Langhu, 2017
<i>D. deltoidea</i>	Asia	Kumar <i>et al.</i> , 2017
<i>D. floribunda</i>	México y Centro América	Mora <i>et al.</i> , 2018

## 2.6 Importancia de la diosgenina en la semisíntesis de fármacos esteroideos

Las saponinas son glucósidos provenientes de diversas fuentes naturales, la hidrólisis enzimática o más efectivamente con ácidos minerales de saponinas pueden producir uno o varios azúcares, junto con una sustancia denominada aglicona, esta cuando tienen una estructura esteroidal se denominan sapogenina (Haro, 2013; Waizel, 2009). La diosgenina actúa como precursor en la semisíntesis de fármacos esteroideos (Tsukamoto & Ueno, 1936; citados por Waizel, 2009), síntesis de hormonas sexuales (progesteronas y estrógenos principalmente) y corticosteroides (Kumar *et al.*, 2017), en la figura 5 se muestra la estructura de esta molécula.



**Figura 5.** Estructura química de la diosgenina aislada de la *D.trifida* descrita por Maldonado García *et al.* (2012).

## 2.7 Historia del barbasco en México

La industria de hormonas esteroideas, hormonas sexuales y corticoesteroides, se originó en Alemania debido a que en ese país se llevaron a cabo los primeros aislamientos en forma pura, en los años 20's y 30's. Científicos de Europa y Estados Unidos buscaron métodos de producción de éstas para su uso como fármacos en diferentes aplicaciones médicas. La primera estrategia consistió en su extracción a partir de glándulas y orina de animales como la progesterona, la testosterona y la estrona, por lo que se pasó a la síntesis química a partir de esteroides. El primer precursor químico que utilizaron para la producción de hormonas sexuales sintéticas fue el colesterol de origen animal, siendo los países líderes Alemania, Suiza y Holanda. Científicos Estadounidenses buscaron otra fuente de esteroides más barata, por lo que el químico Russell Marker dirigió su investigación al reino vegetal en busca de esteroides, específicamente las sapogeninas. La sapogenina más común es la diosgenina, la cual fue aislada por primera vez en Japón en el año 1936, a partir de una planta del género *Dioscorea*. La industria de las hormonas esteroideas en México tuvo su origen en los años 40's. En 1940, Marker desarrolló una

metodología conocida como “degradación de Marker”, mediante la cual convirtió la sapogenina diosgenina en progesterona (Figura 6) (Marker, 1940; citado por Aguilar & Iglesias, 2001). A partir de este desarrollo de síntesis química, se encontró en México una *Dioscorea* conocida como cabeza de negro, la cual crece en las selvas del sudeste de nuestro país. En 1944, Marker crea la compañía Syntex. La extracción de sapogeninas y su uso como precursores químicos a partir de la planta mexicana del barbasco para la síntesis de hormonas esteroidales permitió alcanzar la escala comercial. En 1949 se descubre en México otra especie de barbasco, *Dioscorea composita*, que presentó dos grandes ventajas sobre el barbasco cabeza de negro, *Dioscorea mexicana*, acumulaba cinco veces más diosgenina y era casi inagotable en México, por lo que en ese entonces desapareció la incertidumbre de la disponibilidad de la materia prima de origen vegetal para la industria esteroide en nuestro país. Edward Kendall y Philip Hench descubren las propiedades antiinflamatorias contra los síntomas de la artritis reumática de la cortisona. La cortisona, principal glucocorticoide secretado por la corteza suprarrenal y el esteroide más abundante en sangre, es una hormona esteroideal con aplicaciones clínicas como potente antiinflamatorio en el tratamiento de la artritis reumática, fue un ejemplo de éxito desde los años 50’s, gracias al uso del barbasco. Upjohn & D.H. Peterson en 1952, desarrollaron un proceso fermentativo en el cual consiguieron obtener la cortisona a partir de progesterona (Hogg, 1992). Este adelanto fue crucial y decisivo para comprender que los esteroides obtenidos a partir de diosgenina se pueden emplear como precursores para la elaboración de la cortisona y todos sus derivados. A partir de entonces, la empresa Syntex produjo toneladas de progesterona a partir de la diosgenina extraída del barbasco para atender la fuerte demanda de corticoides. En 1950, Rosenkranz logra la producción sintética de los cuatro tipos principales de hormonas esteroides, progestógenos, andrógenos, estrógenos y corticoides a partir de la diosgenina. El desarrollo de derivados de la cortisona que presentan menores efectos secundarios junto al uso de las hormonas esteroidales como principio activo de las píldoras anticonceptivas, hicieron que la industria de los esteroides se desarrollara. Ya en los años 70’s la industria de medicamentos con esteroides usados como principios activos

era multimillonaria. México fue líder en la producción de fármacos hormonales básicos. La demanda mundial convirtió a esta industria en una de las fuentes de exportación más importantes para nuestro país, en un periodo de ocho años, 1965 a 1973, se mantuvo con un promedio del 92.5 % de la producción total exportada.

En 1977, tres de las diez empresas exportadoras de productos químicos más importantes de México pertenecían a la industria de hormonas esteroideas. Los esteroides constituían más del 60 % de todas las exportaciones farmacéuticas mexicanas. Dentro de la industria química, los esteroides ocuparon el segundo lugar, sólo después del ácido fosfórico, en lo que se refiere al valor de las exportaciones. Sin embargo, esto conllevó al saqueo de más de un millón de toneladas de barbasco, y la industria mexicana no tuvo la capacidad de producir productos terminados debido al control de las empresas subsidiarias de corporaciones transnacionales, cuyo fin fue satisfacer las necesidades de la empresa matriz. En 1975, se creó la empresa paraestatal Proquivemex con la finalidad de conservar la soberanía del barbasco y el crecimiento interno. El conflicto se generó debido a la estructura verticalmente integrada de la industria farmacéutica internacional de hormonas, a la estrategia global de las transnacionales y a la falta de acción autónoma del Estado para establecer prioridades nacionales (Gereffi G. 1977).

La disminución en la producción de diosgenina en México fue y sigue siendo influenciado por múltiples factores. La competencia de otros productores, como china e india, siguen siendo así como en el pasado un desafío, ya que estos pueden producir esteroides a partir de materia primas más económicas. Además, los avances en síntesis química y biotecnología siguen permitiendo la producción de esteroides de manera más eficiente y económica. En este contexto, compuestos similares como el sitosterol, la hecogenina y la sarsasapogenina siguen siendo alternativas viables, contribuyendo así a la continua disminución de la demanda y producción de diosgenina en el país (Basurto, 2023).



plantados bajo condiciones de humedad, desarrollan yemas germinativas que más tarde dan lugar a los tallos (Raynor *et al.*, 1992; Gonzáles, 2012).

- Bulbillos aéreos: Se seleccionan y clasifican en bulbillos de primera (mayores de 80 g), de segunda (entre 40 y 80 g) y de tercera (entre 10 y 40 g), la plantación se realiza por separado (Gonzáles, 2012).
- Tubérculos: Al realizar la siembra por rizomas a las dos semanas se inicia el desarrollo del tallo y el follaje, representado por la ocurrencia de brotes y retoños (Gonzáles, 2012).

Algunos de los principales problemas que interfieren en la viabilidad de esta técnica según Cabrera Jova (2009), son:

- Lento desarrollo de propágulos.
- Material vegetativo infectado por nematodos y virus, que se transmiten a la siguiente generación de plantas.
- Deterioro de la calidad de tubérculos.
- Baja disponibilidad de propágulos.

### **2.8.2 Propagación a través del cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se define como el cultivo de semillas, órganos, explantes, tejidos, células o protoplastos de plantas en un medio nutritivo sintético definido químicamente en condiciones estériles y controladas de luz, temperatura y humedad (Bhatia, 2015). Por otro lado, la micropropagación es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de ella, a partir de explantes de una planta madre, se desarrollan plantas genéticamente idénticas, llamadas clones. Las principales etapas de la micropropagación que describe Castillo A. (2014), se mencionan a continuación:

a) Desinfección del material vegetal: La propagación de plantas comienza con la selección de una planta madre, de la cual se extraen fragmentos para obtener explantes, que pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, entre otros. Antes de extraer los explantes, se desinfectan los fragmentos de la planta madre para eliminar contaminantes externos, especialmente hongos y bacterias. Este proceso se realiza con

hipoclorito de sodio (agua clorada comercial) durante 5 a 15 minutos, seguido de enjuagues en agua esterilizada. La extracción de explantes se lleva a cabo en cabinas de flujo laminar para mantener condiciones de asepsia. Los explantes desinfectados se colocan en tubos de cultivo con medio de iniciación para controlar su sanidad y viabilidad

**b) Introducción del material *in vitro*:** Después de desinfectar superficialmente las semillas o yemas seleccionadas, se colocan en medio de cultivo estéril. En aproximadamente una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, dando inicio al ciclo de cultivo *in vitro*.

**c) Multiplicación:** Durante esta fase, los explantes que han sobrevivido a las fases anteriores se espera que generen brotes con varias hojas, ya sea de origen axilar o adventicio. Cada hoja tiene una yema en su base que se desarrollará al entrar en contacto con el medio de cultivo. Los nuevos brotes se deben subcultivar periódicamente en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados, manteniendo condiciones de asepsia. Este proceso aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas.

**c) Enraizamiento:** Para iniciar el enraizamiento de los explantes, se emplean plantines individuales de alrededor de 2 centímetros de tamaño. Los brotes obtenidos previamente se trasladan a un medio que carece de reguladores de crecimiento o contiene únicamente hormonas auxinas. En algunas especies, el proceso de multiplicación y enraizamiento ocurre simultáneamente, ya que las raíces emergen en el mismo medio donde se desarrollan nuevas yemas.

**d) Aclimatación de explantes:** Durante la aclimatación, los explantes enraizados se ajustan a condiciones naturales fuera del laboratorio, pero enfrentan desafíos al trasladarse a invernaderos debido a su origen en ambientes húmedos. Esto puede causar problemas como la falta de estomas funcionales y una cutícula poco desarrollada, aumentando el riesgo de desecación. Es crucial realizar una aclimatación cuidadosa para garantizar la supervivencia y el crecimiento saludable de las plantas en su nuevo entorno.

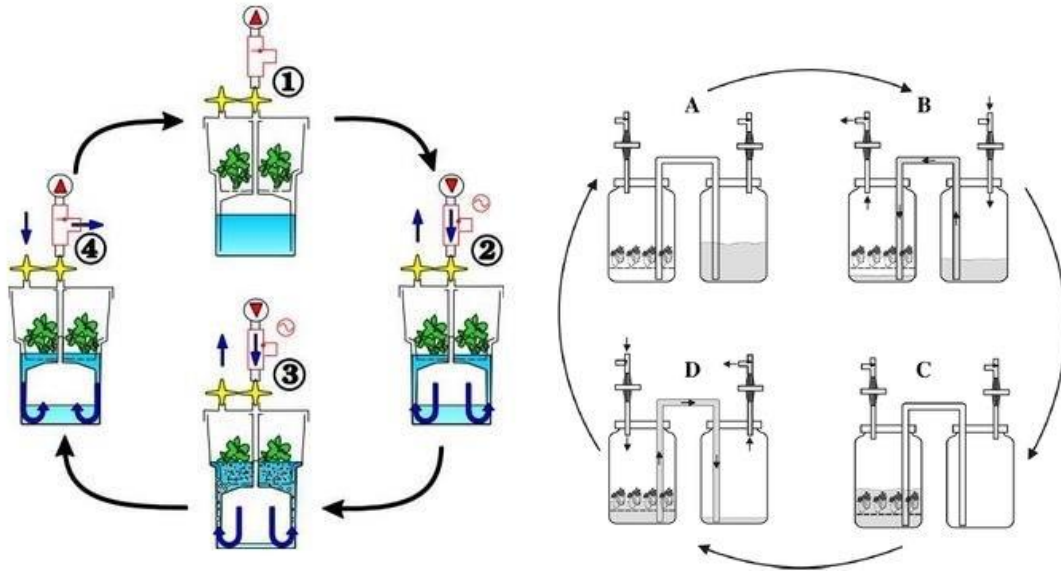
### 2.8.3 Factores determinantes en la micropropagación

- **Explante:** Se trata de un tejido u órgano de la planta que se aísla para micropropagar. Para el caso de especies propagadas vegetativamente, los explantes mayormente utilizados son brotes jóvenes y ápices meristemáticos (Villalobos & Thorpe, 1991).
- **Factores físicos:** La luz y la temperatura, son los principales factores que influyen sobre la micropropagación. La temperatura de incubación para la mayoría de las plantas fluctúa entre los 24 y 28°C. Mientras que la importancia de la luz en la diferenciación involucra diferentes componentes como la intensidad, el fotoperiodo y la calidad (Villalobos & Thorpe, 1991).
- **Medio de cultivo:** Constituido por elementos nutritivos esenciales principales y secundarios de las plantas, vitaminas, reguladores del crecimiento de las plantas y carbohidratos como fuente de carbono con otras sustancias orgánicas como aditivos óptimos (Das *et al.*, 2013).

### 2.8.4 Reactores de Inmersión Temporal (RIT)

Un biorreactor es un ambiente cerrado y estéril que cuenta con entradas y salidas para el flujo de aire bajo presión y utiliza un medio líquido. En los Reactores de Inmersión (RIT) están involucrados componentes como compresores de aire para el flujo de aire, conexiones de tubos de silicona, filtros de membrana y un monitoreo remoto, en el cual el crecimiento se ve favorecido por no haber inmersión continua en el medio, en la figura 7 se muestran dos ejemplos de RIT. Los Biorreactores de Inmersión Temporal (TIB), son un tipo de RIT utilizados para diferenciar tejidos vegetales. Existen diferentes diseños de TIB, pero los más comunes consisten en dos recipientes o vasos comunicantes, uno destinado para el medio de cultivo y otro para los cultivos (Figura 7). Otro tipo de RIT es el Recipiente para Inmersión Temporal Automatizado (RITA), en el que el recipiente superior que contiene la planta está vinculado al compartimento inferior que contiene el medio de cultivo y la presión interna regula el movimiento del medio hacia arriba, el cual posteriormente cae por gravedad de modo que se pueda cronometrar la inmersión de los cultivos (Figura 7). También está el biorreactor de Inmersión por Burbujas (BIB) donde

se aporta nutrientes y aire a los cultivos mediante burbujeo. En todos estos casos, los cultivos se sumergen en el medio de manera cronometrada, en términos de frecuencia y duración de la inmersión, para permitir la aireación (Balogum *et al.*, 2014).



**Figura 7.** Ejemplo de reactores RIT: Representación esquemática del funcionamiento del sistema de inmersión temporal (TIB) (derecha) y funcionamiento del sistema RITA (izquierda) (KASALAB, 2020; Orellano *et al.*, 2017).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Componentes esenciales en la micropropagación de *Dioscoreas*

##### 3.1.1 Cultivos asépticos

Para *D. alata* y *D. rotundata* se ha reportado que los segmentos nodales en crecimiento activo con yemas axilares son un excelente explante, esto significa que la época del año es importante. Se recomienda también partir de planta madre cultivada en fotoperiodo menor a 16 horas luz como preacondicionamiento para conseguir activar los meristemos (Mantell *et al.*, 1979 citado por Krikorian A. D., 1994). Con dicho preacondicionamiento, una sola exposición con hipoclorito al 0.5 % durante 5 minutos previamente al uso de etanol al 70%, y los posteriores lavados, normalmente es suficiente para obtener material vegetal limpio. Sin embargo, la eficiencia depende de la temporada, por lo que puede ser necesario el uso de tratamientos más extensos con agitación prolongada y el uso de detergentes. Los segmentos nodales se siembran en posición vertical en medio MS agar adicionado con 2 % de sacarosa y citoquininas. A los 20 a 30 días surgen brotes y raíces adventicias, la re-inoculación previo a la escisión del nudo como nuevos segmentos nodales con hojas individuales en intervalos de 2 a 3 semanas resultó un método eficaz para multiplicar material clonal, estimándose que se pueden obtener 65 000 plántulas partiendo de un segmento nodal en un periodo de seis meses. Por otro lado, se han generado plantas libres de virus aislando meristemos apicales de 0.2 a 0.5 mm incluido de 1 a 2 primordios foliares de *D. alata* tratados con aire caliente durante al menos 14 días con una eficiencia del 19 %, en medio MS suplementado con 1 o 0.5 mg/L de ANA y 0.2 o 0.1 mg/L de BAP (Mantell *et al.*, 1980 citado por Krikorian A. D., 1994).

Los explantes colectados de campo, generalmente están contaminados por diversos microorganismos. Para eliminar estos contaminantes, normalmente se utilizan soluciones de agentes esterilizantes como hipoclorito de sodio (1-5 %), alcohol etílico (70-90 %) y cloruro de mercurio al 0.1 % seguido de varios lavados con agua estéril (Das *et al.*, 2013). También se utilizan bavistina al 5 % (p/v) y estreptomycin al 0.2 % (p/v) y detergentes como agentes esterilizantes de superficies (Behera *et al.*, 2009). Mwrigi *et*

*al.* (2010), citado por Bonilla-Morales M.M & Hernández-Castañeda O. I., (2012), obtuvo una eficiencia del 85 % en el establecimiento del cultivo utilizando el agente desinfectante Hidróxido de Sodio (15 a 40 %) en una exposición de 20 a 40 min y posteriormente una exposición secuencial realizando un doble sumergimiento de los explantes en NaOH al 40 % por 30 min y NaOH al 30 % por 20 min.

### **3.1.2 Medio de cultivo**

De acuerdo a varios estudios el medio de cultivo comúnmente utilizado para el desarrollo de brotes de diferentes especies de *Dioscorea*, es el de Murashige y Skoog (MS; Das *et al.*, 2013; Vaillant *et al.*, 2005), el cual ha sido aplicado a especies como, *D. oppositifolia* (Behera *et al.*, 2009), *D. zingiberensis* (Chen *et al.*, 2003), *D. fordii* (Yan *et al.*, 2011), *D. deltoidea* (Kumar *et al.*, 2017), *D. alata* (Shah & Lele, 2012; Kumar, A. *et al.*, 2014), entre otras.

### **3.1.3 Explantes y reguladores de crecimiento**

El éxito del cultivo *in vitro* de *Dioscorea* depende en gran medida de las concentraciones y tipos de hormonas incluidas en el medio de cultivo, así como del tipo de explante usado (Das *et al.*, 2013). Se utilizan hojas, segmentos nodales y tubérculos como explantes para micropropagarlas, mediante organogénesis directa o indirecta. Los mejores resultados de inducción de brotes se obtienen al utilizar segmentos nodales, lo anterior se fundamenta en el estudio realizado por Bernabé *et al.* (2012) al trabajar con la especie *D. remotiflora*; cultivaron segmentos de hojas y segmentos nodales en medio MS con diversos reguladores de crecimiento (BAP, KIN, ANA y 2, 4-D), después de 3 meses, los segmentos de hojas no dieron ninguna respuesta celular, mientras que los segmentos nodales mostraron un crecimiento visible de brotes en los sitios de las yemas axilares. Por otro lado, Shah & Lele (2012), trabajaron con tres tipos de explantes de *D. alata*, con segmentos de hojas, segmentos nodales y tubérculos, los transfirieron a un medio MS y por organogénesis indirecta trataron de obtener plantas completas. La iniciación general de callos se observó en los tres tipos de explantes a los 8 - 11 días, en un medio enriquecido con 0.2 ppm de BAP, 2.0 ppm de 2,4-D, 825 ppm de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y 950 ppm de

KNO<sub>3</sub>, estos fueron transferidos a un medio de multiplicación en donde a los 21 días se observó una rápida respuesta de brotación y formación de raíces en callos provenientes de segmentos nodales, los otros callos no dieron ningún tipo de respuesta.

### 3.1.3.1 Segmentos nodales

Los segmentos nodales han sido ampliamente utilizados para micropropagar diversas especies del género *Dioscorea*, se basa en la formación de brotes a partir de yemas que se encuentran en las axilas o primordios de las hojas, los cuales son divididos y subcultivados (González, 2012; Ranjan, D. C., & Langhu, T., 2017). Varios investigadores reportan información relevante sobre la viabilidad de estos explantes, como Chen *et al.* (2003) quienes trabajaron con *D. zingiberensis*, observaron una rápida formación de yemas axilares en los segmentos nodales cultivados en medio MS suplementado con BAP (4.4 µM) y ANA (1,1 µM). Jirakiattikul *et al.* (2016) también cultivaron segmentos nodales de *D. birmanica* en medio MS fortificado con diversas concentraciones de BAP. El mayor número de brotes ( $2.8 \pm 0.5$ ) y nudos por brote ( $5.7 \pm 0.8$ ) se obtuvo luego de la adición de 2 mg/L de BAP al medio de cultivo. Por otro lado, Chen *et al.* (2007) también inocularon segmentos nodales de *D. nipponica* en medio de cultivo basal MS adicionado con dos hormonas, BAP y ANA. La mayor frecuencia de inducción de brotes y microtubérculos se obtuvieron con 2.0 mg /L de BAP y 1.0 mg/L de ANA. La tabla 3, expone más antecedentes de especies micropropagadas a partir de segmentos nodales, así como las respectivas concentraciones de fitohormonas usadas en cada una.

Tabla 3. Composición de medios de cultivo reportados para la brotación de segmentos nodales en especies del género *Dioscorea*.

Especies	Reguladores del crecimiento	Referencias
<i>D. zingiberensis</i>	MS + 1 mg/L BAP + 0.2 mg/L ANA	Chen <i>et al.</i> , 2003
<i>D. oppositifolia</i>	MS + 2 mg/L BAP + 0.3 % carbón	Das <i>et al.</i> , 2013
<i>D. oppositifolia</i>	MS + 2.0 mg/L KIN + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L ANA + 100.0 mg/L ácido ascórbico	Behera <i>et al.</i> , 2009
<i>D. opposita</i>	MS + 1.0 mg/L ANA + 1.0 mg/L BAP	Lin <i>et al.</i> , 2014
<i>D. hispita</i>	WPM + 1.0 mg/L BAP + 100.0 mg/L PVP	Shukla and Shukla, 2013
<i>D. bulbifera</i>	MS + 0.5 mg/L ANA + 5.0 mg/L KIN	Das <i>et al.</i> , 2013
<i>D. fordii</i>	MS + 1.0 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA	Yan <i>et al.</i> , 2011
<i>D. nipponica</i>	MS + 2.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L ANA	Chen <i>et al.</i> , 2007
<i>D. deltoidea</i>	MS + 1.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L AIB	Kumar <i>et al.</i> , 2017
<i>D. alata</i>	MS+ 1.5 mg/L KIN + 2.0 mg/L AIA	Shah & Lele, 2012

**Nota:** MS corresponde al medio de cultivo Murashige y Skoog, WPM al medio Woody Plant Medium. Además, BAP (Bencilaminopurina), ANA (ácido nafatalenacético), KIN (kinetina), AIB (ácido indol-3-butírico) y AIA (ácido indol-3-acético) son hormonas del crecimiento vegetal, mientras que PVP (Polyvinylpyrrolidone) es un polímero que actúa como antioxidante.

A partir de la información, se deduce que las citocininas y auxinas, específicamente BAP, KIN y NAA, son reguladores de crecimiento por excelencia, optimizan la formación de brotes de diferentes especies de *Dioscorea*. Las mejores respuestas de inducción de brotes se obtienen cuando se combinan dos hormonas a diferentes concentraciones; altas en Citocininas y bajas en Auxinas.

### **3.1.4 Inductores de raíces**

Varios estudios reportan que las auxinas propician la formación de raíces en plantas de *Dioscorea*. Por ejemplo, Chen *et al.* (2003) trabajaron con *D. zingiberensis*, observaron que los brotes inoculados en el medio MS indujeron el mayor número de raíces luego de ser tratados con 4.9  $\mu\text{M}$  de AIB. El AIA, otra auxina, que al ser suplementada a un medio basal a concentraciones de 2.0 mg/L, induce el mayor número de raíces en la especie *D. hispita* (Shukla & Shukla, 2013). Otros estudios revelaron que a concentraciones de 8.28  $\mu\text{M}$  de AIB, 5.38  $\mu\text{M}$  de ANA y 2.5 mg/L de AIA se induce la mayor formación de raíces en brotes de *D. remotiflora*, *D. rotundata* y *D. alata* respectivamente (Bernabé *et al.*, 2012; Uchendu *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2013). A partir de las raíces formadas se pueden obtener microtubérculos cuando se añade sacarosa al medio de cultivo (Alizadeh *et al.* 1998; Uchendu *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2007).

### **3.1.5 Temperatura y luz**

Las condiciones de incubación de explantes de *Dioscorea* según lo reportado en la literatura son: 16 horas de luz u 8 horas de oscuridad y se mantienen con una luz fluorescente blanca de densidad de flujo 25-30  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a una temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  bajo 60-70 % de humedad relativa en una cámara de crecimiento de cultivo de tejido vegetal (Shah & Lele, 2012).

### **3.2 Cultivo *in vitro* de *D. composita* y *D. mexicana***

Actualmente existen muy pocas investigaciones relacionadas al cultivo *in vitro* de *D. composita*. Sin embargo, de los únicos reportes que se tienen, se sabe que a partir de segmentos nodales inoculados en medio MS tratado con 0.5 ppm de BAP, se obtienen múltiples brotes (Heble & Staba, 1980). Otros investigadores estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa, el tipo de fitohormona y la variación del medio de cultivo en la inducción de microtubérculos de *D. composita*. La sacarosa al 8 %, ANA y AIB a concentraciones de 5.0  $\mu\text{M}$  y los medios de cultivo de Anderson Rhododendron y Murashige y Skoog, indujeron una mayor respuesta (Alizadeh *et al.*, 1998). En una investigación reciente se pudieron establecer cultivos *in vitro* a partir de segmentos

nodales de plantas de *D. composita*, empleando Cloralex como agente antiséptico con una eficiencia del 24.785 %. El 95 % de los explantes establecidos *in vitro* desarrollaron raíces adventicias utilizando AIB como inductor a una concentración de 1 mg/L. Se reportó una eficiencia de transformación genética vía *Agrobacterium rhizogenes* cepa A4 del  $0.33 \pm 0.57$  %, a partir de la cual se obtuvo una línea de raíz transgénica. Se logró extraer y cuantificar diosgenina, reportando una concentración de 2.239 mg/g de diosgenina en la línea transgénica, creciendo bajo condiciones *in vitro* inducido con AIB bajo oscuridad y 0.087 mg/g bajo fotoperiodo largo (16:8) (Sánchez-López, G. C., 2018).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En la región de la cuenca del Papaloapan, específicamente en el municipio de Tuxtepec, se han localizado en estado silvestre a dos especies de barbasco de mayor importancia económica de México (*D. composita* y *D. mexicana*), de las cuales se desconoce su estado actual a nivel de densidad poblacional, teniendo como antecedente la extensa explotación que se le dio a éste recurso natural en los años 60's y 70's, el cual fue una importante fuente de ingresos para la economía del país y para la población de ésta región debido a la alta demanda como una fuente barata de diosgenina.

Actualmente la demanda de *D. composita* y *D. mexicana* es nula en la región debido a la importación de derivados de diosgenina, el principal precursor de hormonas esteroidales, desde China por parte de la industria farmacéutica en México, Proquina Bayer. La biotecnología podría recuperar la autosuficiencia de precursores químicos para la síntesis de hormonas esteroidales en México a través del desarrollo de la tecnología del cultivo *in vitro*, el cultivo de tejidos y la micropropagación recuperará las poblaciones de este recurso que se explotó en el pasado siglo, permitiendo el aprovechamiento sostenible del recurso así como la regeneración de sus poblaciones en su estado natural como coadyuvante en programas de conservación de hábitats naturales. Para ello, se requiere enfocarse al trabajo de campo y evaluar la factibilidad de establecer propuestas con los propósitos descritos en este texto.

## 5. HIPÓTESIS

Los protocolos de exposición secuenciales a los agentes desinfectantes serán más eficaces que los de una sola exposición para el establecimiento de los cultivos de *Dioscorea composita* y *D. mexicana*, permitiendo establecer los cultivos *in vitro*. Además, la fitohormona BAP, y BAP combinada con ANA inducirá la proliferación de yemas preexistentes en ambas especies.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

- Evaluar protocolos de exposición secuencial a agentes desinfectantes en el establecimiento de cultivo *in vitro* y propagación vegetal de *Dioscorea composita* y *Dioscorea mexicana*.

### 6.2 Objetivos específicos

- Determinar la eficiencia de cinco protocolos de exposición secuenciales a agentes desinfectantes en el establecimiento *in vitro* y propagación vegetal de *Dioscorea composita* y *Dioscorea mexicana* partiendo de segmentos nodales de plantas de campo.
- Establecer las condiciones para la proliferación de yemas bajo condiciones *in vitro* de *Dioscorea composita* y *Diocorea mexicana* partiendo de segmentos nodales de planta de campo.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Estrategia experimental

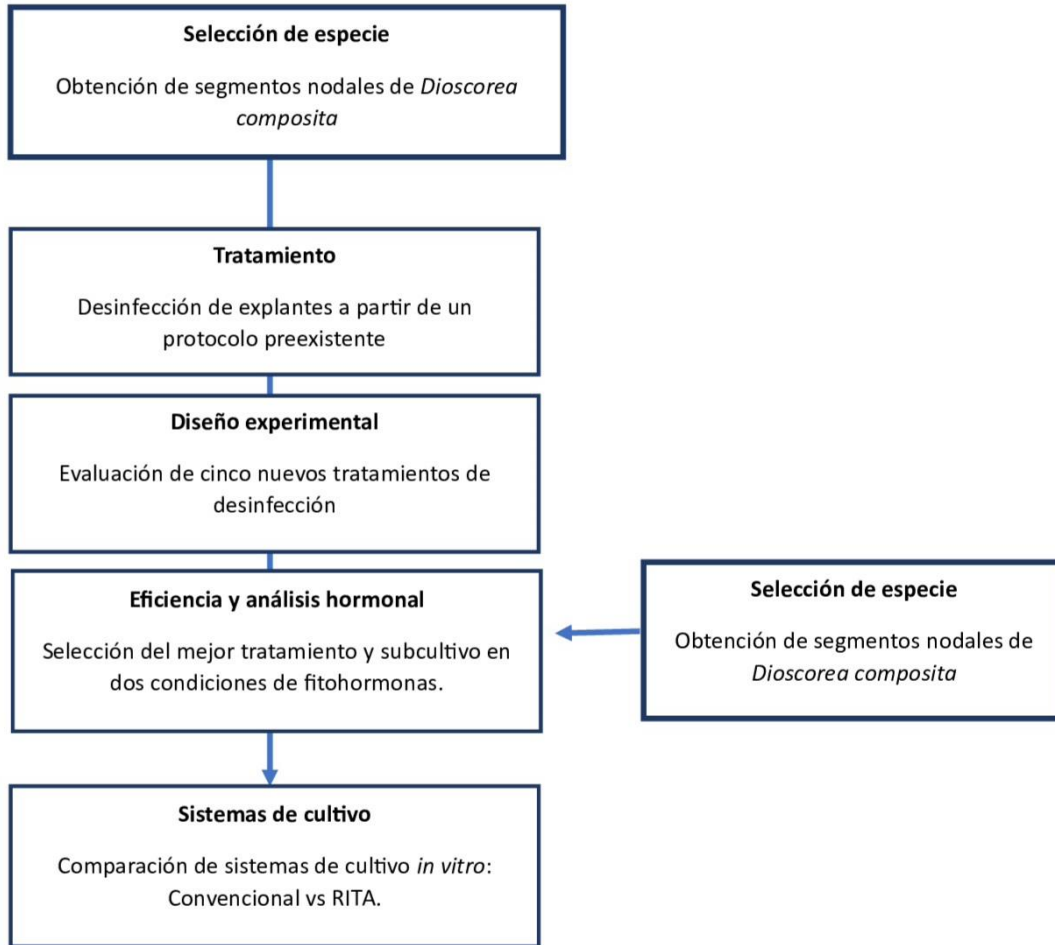


Figura 8. Diseño de investigación

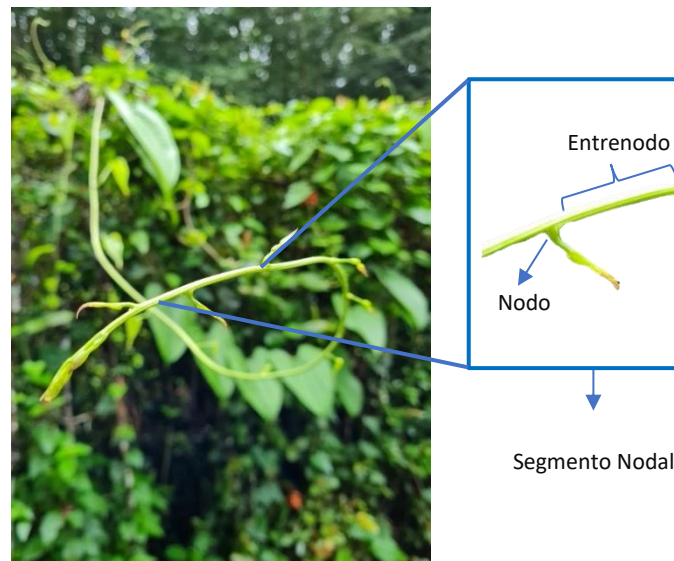
### 7.2 Material vegetal y localización geográfica

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Dioscorea* se colectaron tallos estacionales jóvenes y vigorosos con segmentos nodales (nodos y entrenodos) de plantas adultas (Figura 9), los cuales se trasladaron en bolsas al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV) y Unidad de micropropagación y escalamiento de la UNPA, Campus Tuxtepec, para su inmediato establecimiento de las condiciones *in vitro* por evaluar. La ubicación de los puntos geográficos de colecta de la especie *D. composita* se encuentran

dentro del área interna de la UNPA Campus Tuxtepec y del municipio de Santiago Jocotepec, específicamente en la Comunidad de Río Chiquito (Figura 10). En el municipio de San Juan Bautista, en el área de la UNPA, el primer punto se ubica a unos 30 metros al norte del Instituto de Biotecnología y a unos 10 metros al noroeste del Centro de Investigación Científica (CIC). El segundo punto está a solo 5 metros al este saliendo de la Biblioteca, mientras que el tercer punto se encuentra en el camino hacia la Biblioteca, a unos 10 metros al norte de esta. Por otro lado, el cuarto punto está a unos 15 metros al suroeste de la entrada de la UNPA y a unos 25 metros al suroeste del ICAPET. El quinto punto se encuentra a unos 10 metros al noreste de la entrada de la UNPA y a unos 20 metros al este del ICAPET. Finalmente, el sexto punto está en la malla del ICAPET, a unos 10 metros al noreste de la entrada de la UNPA.

En el municipio de Jocotepec, específicamente en las orillas de la comunidad de Río Chiquito, que se encuentra a unas 2 horas de la Ciudad de Tuxtepec, Oaxaca, el primer punto de recolección se halla a 200 metros al sur del pueblo. El segundo punto se localiza a 50 metros al oeste de la carretera y a 150 metros al sur de la Avenida 5 de mayo.

El periodo de colecta, así como el número de guías colectadas se especifican en la tabla 4. En tanto que las guías de *D. mexicana* fueron colectadas en una propiedad privada ubicada en la Col. Sebastopol, San Juan Bautista, Tuxtepec.



**Figura 9.** Segmento nodal de una guía vigorosa y joven de *D. composita*.

Tabla 4. Colectas de campo del material vegetal.

Periodo de Colecta	Número de Guías colectadas	Número de Explantes (n)
Junio-Agosto (verano)	21	286
Octubre-Noviembre (otoño)	48	406
Diciembre-Enero (invierno)	35	427
Marzo-Mayo (primavera)	31	261
<b>Número total de explantes sembrados</b>		<b>1380</b>



**Figura 10.** Ubicación de los municipios donde se localizan las plantas de *D. composita*. Icono azul: Áreas de recolección, Icono rojo: Puntos específicos de recolección.

### **7.3 Evaluación del establecimiento de cultivo *in vitro* de *D. composita* a partir de segmentos nodales**

#### **7.3.1 Etapa de corte del explante**

El material vegetativo (guía juvenil) obtenido de campo fue seccionado hasta la obtención de segmentos nodales de aproximadamente 5 cm con ayuda de unas tijeras y un bisturí previamente desinfectados con etanol al 96 % (Figura 11A Y 11B), posteriormente los segmentos fueron depositados en 4 frascos cerrados de cristal de 500 mL con agua destilada y tween 20 (Figura 11B).

#### **7.3.2 Procedimiento de desinfección previo**

El tratamiento de desinfección superficial usado como primera alternativa, fue establecido por Sánchez-López G. (2018) para la *D. composita*, el cual se describe a continuación: los segmentos nodales obtenidos en la etapa de corte, fueron depositados en 4 recipientes de vidrio con una solución de agua destilada estéril con tween 20 (2 gotas/L) y se mantuvieron en agitación constante durante 20 minutos. Luego se efectuaron 2 lavados con agua destilada estéril. Todo el proceso se repitió una vez más para posteriormente incubar los explantes en el bactericida microdyn durante 10 minutos, se hicieron 2 lavados con agua destilada estéril, una desinfección con etanol al 70% durante 1 minuto y otros dos enjuagues con agua destilada estéril (Figura 11B y 11C). Se trasladaron los explantes a la campana de flujo laminar, donde fueron sometidos a una solución de Cloralex al 20% durante 20 minutos, aplicando un ciclo de vacío de 1 minuto (Figura 11D). Se realizaron nuevamente 2 lavados con agua destilada estéril y finalmente se prosiguió con la siembra en el medio de cultivo MS, suplementado con 1 mg/L de BAP (Murashige & Skoog, 1962). Se evaluaron los resultados de desinfección semanalmente hasta el día 25. Debido a los elevados porcentajes de contaminación y baja efectividad del tratamiento, se diseñaron y evaluaron nuevos procedimientos de desinfección de exposición secuencial como a continuación se describe.



**Figura 11.** Proceso de desinfección superficial de explantes: A) Guía de *Dioscorea Composita* colectada de campo, B) Obtención de segmentos nodales, C) Desinfección superficial con tween 20. D) Aplicación de vacío y desinfección final en Campana de flujo Laminar.

### 7.3.3 Procedimientos de exposición secuenciales a los agentes desinfectantes de segmentos nodales de *D. composita*

Se evaluaron cinco tratamientos de desinfección de segmentos nodales de *D. composita* (Tabla 5). Cada tratamiento se repitió tres veces para asegurar la validez de los resultados. En cada repetición, se emplearon 62 explantes en promedio, distribuidos uniformemente en 62 frascos de cristal previamente esterilizados. Cada frasco contenía 20 mL de medio basal MS, suplementado con vitaminas MS, 30 g/L de sacarosa y 5.4 g/L de Gellan®. Tras la esterilización en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 20 minutos, los frascos se dejaron

reposar a temperatura ambiente durante 7 días para descartar posibles contaminaciones. La mitad de los segmentos nodales se sembraron en medio con BAP a 1 mg/L, mientras que la otra mitad se sembró en un medio combinado con BAP a 1 mg/L y ANA a 0.5 mg/L, destinado a estimular el rompimiento de la dormancia de brotes latentes. Los explantes se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas luz, bajo luz blanca fluorescente continua a una temperatura constante de  $26 \pm 2$  °C.

A los 25 días se registraron los porcentajes de contaminación y eficiencia, es decir explantes libres de contaminaciones, para cada repetición de cada tratamiento. Las siguientes ecuaciones fueron utilizadas para estos cálculos.

#### **E.C.1**

$$Pc = \frac{C}{T} \times 100$$

#### **E.C.2**

$$Pnc = \frac{NC}{T} \times 100$$

Donde:

*Pc*: porcentaje de explantes contaminados

*Pnc*: porcentaje de explantes no contaminados

*C*: número de explantes contaminados

*NC*: número de explantes no contaminados

*T*: número total de explantes sembrados

Tabla 5. Procedimientos de exposición secuencial a los agentes desinfectantes.

Tratamiento (T)	Soluciones desinfectantes	Concentración	Tiempo de exposición (min.)
TD1	-Fungicida Benomilo®	0.1 g/L	20
	-Agua destilada + tween (1 lavado)	1 gota/L	
	-Cloro	5 % (v/v)	15
	-Agua destilada + tween (1 lavado)		
	-Etanol	70 % (v/v)	1
	-Agua destilada + tween (1 lavado)	1 gota/L	
	-Cloro + 1 ciclo de vacío	2.5 % (v/v)	15
	-Agua destilada estéril (2 lavados)		
TD2	-Fungicida Benomilo®	0.1 g/L	20
	-Agua destilada + tween (1 lavado)	1 gota/L	
	-Bactericida Member's Mark®	3.5 ml/L	20
	-Cloro	5 % (v/v)	20
	-Agua destilada + tween (1 lavado)		
	-Etanol	70 % (v/v)	1
	-Agua destilada + tween (1 lavado)	1 gota/L	
	-Cloro + 1 ciclo de vacío	2.5 % (v/v)	15
-Agua destilada estéril (2 lavados)	1 gota/L		

TD3	-Agua destilada + tween (4 lavados)	1 gota/l	5
	-Fungicida Benomilo®	0.9 g/L	30
	-Agua destilada + tween (1 lavado)	1 gota/L	
	-Bactericida Member's Mark®	3.5 ml/L	30
	-Cloro	15 % (v/v)	20
	-Agua destilada + tween (1 lavado)		
	-Etanol	70% (v/v)	1
	-Agua destilada + tween (1 lavado)	1 gota/L	
	-Cloro + 1 ciclo de vacío	15 % (v/v)	20
	-Agua destilada estéril (2 lavados)	1 gota/L	
TD4	-MS liquido + Antibiótico Quinofres(levofloxacino)	500 mg Atb/L MS	30
	-Agua destilada + tween (4 lavados)	1 gota/L	5
	-Fungicida Benomilo®	0.9 g/L	30
	-Agua destilada + tween (1 lavado)	1 gota/L	
	-Bactericida Member's Mark®	3.5 ml/L	20
	-Cloro	30 % (v/v)	25
	-Agua destilada + tween (1 lavado)		
	-Etanol	70 % (v/v)	2
	-Agua destilada + tween (1 lavado)	1 gota/L	
	-Cloro + 1 ciclo de vacío	30 % (v/v)	25
-Agua destilada estéril (2 lavados)	1 gota/L		
	-Agua destilada + tween (4 lavados)	1 gota/L	5
	-Fungicida Benomilo®	0.9 g/L	30
	-Agua destilada + tween (1 lavado)	1 gota/L	
	-Bactericida Member's Mark®	3.5 ml/L	20
	-Cloro	30 % (v/v)	25

TD5	-Agua destilada + tween (1 lavado)		
	-Etanol	70 % (v/v)	2
	-Agua destilada + tween (1 lavado)	1 gota/L	
	-Cloro + 1 ciclo de vacío	30 % (v/v)	25
	-Agua destilada estéril (2 lavados)	1 gota/L	
	-Plant preservation Mixture (PPM)	2 ml/L	

**Nota:** El procedimiento 5 es análogo al 4, con la variación de que en este se adicionó al medio de cultivo el biocida PPM (ver ANEXO 1).

#### **7.4 Evaluación de la proliferación o propagación vegetativa de yemas de *D. composita* a partir del mejor tratamiento de desinfección.**

Se analizó el mejor tratamiento de desinfección superficial de *D. composita*. De los cinco probados, uno mostró ser el más eficiente, y este se tomó para evaluar el porcentaje de explantes con estructuras propagativas (brotes, raíces o callos), promedio de proliferación y posteriormente la capacidad de formación de brotes (CFB), haciendo uso de las fórmulas siguientes:

##### **E.C.3**

$$Pep = \frac{B}{T} \times 100$$

##### **E.C.4**

$$\bar{X} = \frac{\text{Total de brotes}}{\text{Número total de explantes}} \times 100$$

Donde:

*Pep*: porcentaje de explantes con estructura propagativa (brote, raíz o callo)

$\bar{X}$ : promedio de proliferación de brotes por segmento nodal

B: Explante con estructura propagativa (brote, raíz o callo)

T: número total de explantes sembrados

Con los resultados de las ecuaciones anteriormente descritas, se pudo determinar la capacidad de formación de brotes (CFB) (da Silva *et al.*, 2016):

### E.C.5

$$CFB = \frac{(\text{promedio de proliferación de brotes})(\% \text{ de explantes con brotes})}{100}$$

donde:

explante: segmento nodal

CFB: capacidad de formación de brotes

Así como las tasas geométricas de propagación *in vitro*:

### E.C.6

$$r = \left( \sqrt[t]{\left( \frac{Vf}{Vi} \right)} - 1 \right) \times 100$$

donde:

*r*: tasa geométrica de propagación

*Vf*: promedio de proliferación de brotes del subsecuente subcultivo

*Vi*: promedio de proliferación de brotes en el subcultivo previo

*t*: intervalo de tiempo de un ciclo de cultivo

## 7.5 Establecimiento y evaluación de la proliferación vegetativa de yemas de *D.*

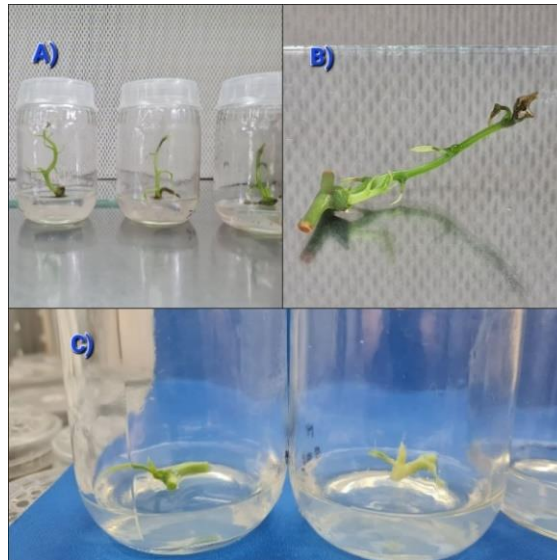
### *mexicana*.

El mejor tratamiento de desinfección de explantes, originalmente aplicado en *D. composita*, se ajustó para el establecimiento de *D. mexicana* con una ligera variación: en esta especie se realizó solo una réplica, a diferencia de las tres réplicas aplicadas a la *D. composita*, la mitad de los explantes fueron sembrados en dos condiciones hormonales, BAP (1 mg/L) y BAP(1 mg/L) + ANA (0.5 mg/L). En *D. mexicana*, también se evaluaron los porcentajes de explantes contaminados y no contaminados, así como el porcentaje de estructuras propagativas (brotes, raíces o callos), el promedio de proliferación de brotes por segmento nodal y CFB. Estos datos fueron tomados desde la primera semana de

siembra hasta el día 25, utilizando las mismas formulas aplicada en el estudio de *D. composita*.

### 7.6 Subcultivo de *D. composita* y *D. mexicana*

Se seleccionaron brotes de aproximadamente 8 cm, con 3 o 4 nudos, tanto de la *D. mexicana* como de la *D. composita*, para ser subcultivados (Figura 12A). Estos se colocaron en placas de vidrio, se cortaron en segmentos nodales (Figura 12B) y finalmente fueron depositados en frascos de cristal en el mismo medio de cultivo y bajo las mismas condiciones de crecimiento del explante original (12C). Se realizó un subcultivo para cada especie, con varias repeticiones; tres para *D. composita* y dos para *D. mexicana*.



**Figura 12.** Subcultivo de *D. mexicana*. A) Selección de Brotes; B) Obtención de segmentos nodales y C) Siembra en medio Basal MS con sus respectivas hormonas.

### 7.7 Evaluación de respuestas callogénica y rizogénica en *D. Mexicana*

La respuesta callogénica y rizogénica en *D. mexicana* fueron evaluadas mediante la observación de la formación y expansión de estas estructuras, incluyendo su tamaño y morfología. Además, se determinó el porcentaje de formación de callos y raíces mediante la siguiente ecuación.

### E.C.7

$$\text{Porcentaje de formación(raíz o callo)} = \frac{\text{Número de segmentos con callos o raíces}}{\text{Número total de segmentos}} \times 100$$

### 7.8 Reactores de inmersión temporal automatizado RITA en *D. composita* y *D. mexicana*

Se cultivaron segmentos nodales de plantas de *D. composita* y *D. mexicana* en reactores de inmersión temporal (RITA®), después de su previo establecimiento *in vitro*. Las condiciones fueron las siguientes; los segmentos se sumergieron durante 2 minutos con una frecuencia de 6 horas, utilizando 300 ml de medio de cultivo. Se empleó una densidad de inóculo de al menos 10 explantes para *D. composita* y 26 para *D. mexicana*. Se mantuvieron las condiciones descritas para el establecimiento y subcultivos; medio MS adicionado con vitaminas MS, 1 mg/L de BAP, 2 ml/L de PPM, 30 g/L de sacarosa, fotoperiodo largo de 16 horas luz, bajo luz blanca fluorescente (54  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) a una temperatura de  $26 \pm 2$  °C por 3 meses.

### 7.9 Toma y análisis de resultados

Se realizó un diseño experimental completamente al azar de una vía. La unidad experimental fue el explante (segmento nodal) y el número de repeticiones por cada tratamiento fue de al menos 60 (n=60), con 3 réplicas, sin discriminación de resultados. Se determinó si existía diferencia entre los tratamientos por medio de un análisis de varianza con 95 % de confiabilidad. En el caso donde se presentó diferencia significativa entre los tratamientos, se realizó la prueba de comparación múltiple de medias Tukey con una confiabilidad del 95 % con el programa MINITAB 2019, con la finalidad de seleccionar el mejor tratamiento en cada etapa del cultivo *in vitro*.

## 8.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Establecimiento *in vitro* de *Dioscorea composita*

#### 8.1.1 Efectividad del tratamiento de desinfección previo

El protocolo de desinfección utilizado en esta experiencia, como primera alternativa para el establecimiento *in vitro* de *D. composita*, se basó en un método previamente diseñado por Sánchez-López G. (2018). Sin embargo, los resultados mostraron que la eficiencia de este protocolo fue del 0 %, que representa el porcentaje de explantes sin contaminación. Este valor contrasta significativamente con el reportado por la autora del protocolo original, quien tuvo una eficiencia del 38.51%. Esta discrepancia en los resultados puede atribuirse posiblemente a la diferencia en la época del año en que se recolectó el material vegetal. En la investigación previa, los explantes fueron recolectados entre los meses de abril y junio, mientras que en esta investigación se replicó el protocolo con explantes recolectados en octubre y noviembre. Se sabe que los meses de mayor precipitación y mayor humedad relativa que abarca de agosto a diciembre en el hemisferio norte, favorecen en mayor medida la proliferación de microorganismos, mientras que en época seca (enero-abril) la incidencia de estos se reduce (Sancho & Guevara, 1991).

#### 8.1.2 Evaluación de la factibilidad de los procedimientos de exposición secuenciales a los agentes desinfectantes

Los resultados de los tratamientos TD1, TD2 y TD4 no fueron favorables, dado que los porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica fueron muy elevados, más del 85 % de los segmentos nodales sembrados se contaminaron mientras que en el TD3 se obtuvieron mejores resultados;  $22.31 \pm 17.6$  % de explantes viables (Tabla 6) gracias al uso de un antibiótico de amplio espectro. Sin embargo, si se comparan los tratamientos TD3 y TD5 se da por hecho que existe diferencia estadísticamente significativas entre cada uno, el mejor tratamiento fue el TD5 con una eficiencia del  $53.11 \pm 8.96$  % que representa el porcentaje de explantes libres de contaminaciones, a pesar de esta clara reducción de contaminaciones, dichos resultados contrastan con los que reportan Mwrighi

*et al.* (2010), citado por Bonilla M. & Hernández C. (2012), dado que ellos obtuvieron una eficiencia del 85 % aplicando la misma metodología de exposición secuencial a agentes desinfectantes a los explantes de las especies *D. alata* y *D. rotundata*.

Tabla 6. Porcentajes de contaminación bacteriana, fúngica y eficiencia de cada procedimiento.

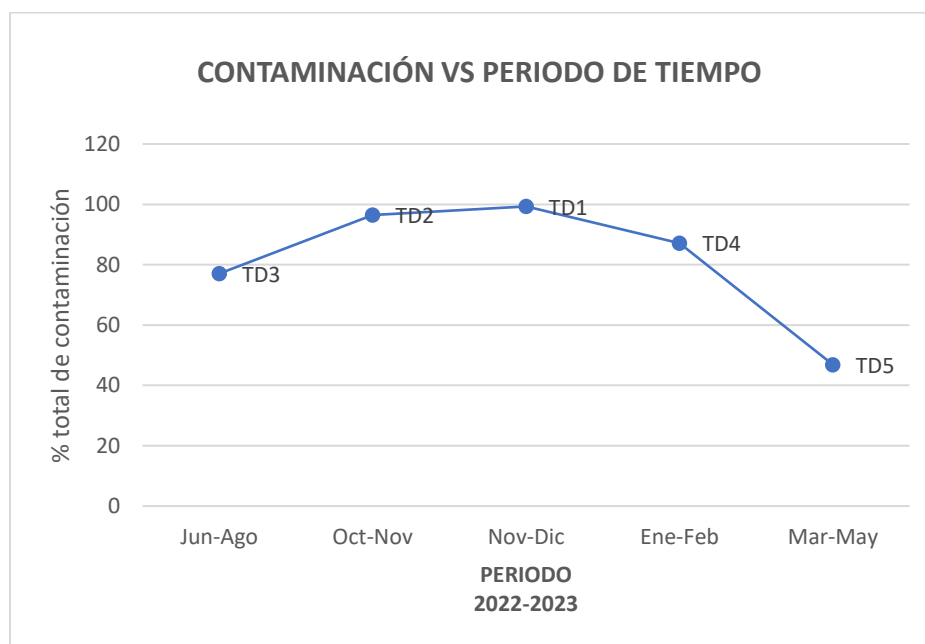
Tratamientos de desinfección	% Contaminación y Eficiencia (promedio)		
	Bacteriana	Fúngica	Eficiencia
TD1	58.88 ± 9.21 <sup>A</sup>	40.42 ± 8.86 <sup>AB</sup>	0.68 ± 1.1 <sup>B</sup>
TD2	35.28 ± 6.61 <sup>A</sup>	61.18 ± 7.46 <sup>A</sup>	1.81 ± 1.59 <sup>B</sup>
TD3	48.62 ± 40.4 <sup>A</sup>	28.45 ± 23.3 <sup>AB</sup>	22.31 ± 17.6 <sup>B</sup>
TD4	52.52 ± 16.92 <sup>A</sup>	34.61 ± 11.39 <sup>AB</sup>	12.89 ± 10.19 <sup>B</sup>
TD5	30.13 ± 17.01 <sup>A</sup>	16.74 ± 8.80 <sup>B</sup>	53.11 ± 8.96 <sup>A</sup>

**Nota:** Letras iguales en cada columna, indican que no hay diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos mediante el análisis ANOVA por la prueba de Tukey (N=15,  $p=0.05$ ), esto significa que la falta de diferencias significativas entre las medias de los tratamientos puede deberse a la alta variabilidad en los datos y al tamaño de la muestra que es relativamente pequeño.

### 8.1.3 Incidencia de contaminaciones microbiológicas en explantes de *D. composita* según la época del año.

La figura 13 presenta el porcentaje promedio de contaminación en explantes que se establecieron mensualmente durante el periodo comprendido entre junio 2022 y mayo 2023. El mayor porcentaje de contaminación se presentó en los meses de octubre-diciembre, época de mayor precipitación y humedad relativa, dichos resultados también son reportados por Sancho & Guevara (1991), quienes trabajaron con papaya, ellos explican que este problema se debe al deslizamiento de las gotas de lluvia desde las hojas hasta el tallo de la planta, favoreciendo así el acumulamiento de microorganismos en los

espacios intersticiales alrededor de las yemas axilares y entre los primordios foliares de la misma, por tal motivo se imposibilita la eliminación total de cualquier microorganismo con agentes antisépticos convencionales. Con el paso del tiempo, con la llegada de la época seca (marzo-mayo) se redujo drásticamente el porcentaje de contaminación (Figura 13), este comportamiento no solo se ha observado en plantas de *Dioscorea*, también en plantas de *Aloe vera L.* y *Carica papaya*, (Perez Alonso *et al.*, 2015; Sancho & Guevara, 1991). Por lo tanto, se llega a la conclusión de que la época del año influye directamente en el estado fisiológico de la planta madre y por ende puede perturbar o no, según sea el caso, el establecimiento *in vitro* de las especies *Dioscorea*, dicha aseveración coincide con estudios previos, realizados en *D. Rotundata* y *D. alata* (Mantell *et al.*, 1980 citado por Krikorian A. D., 1994).

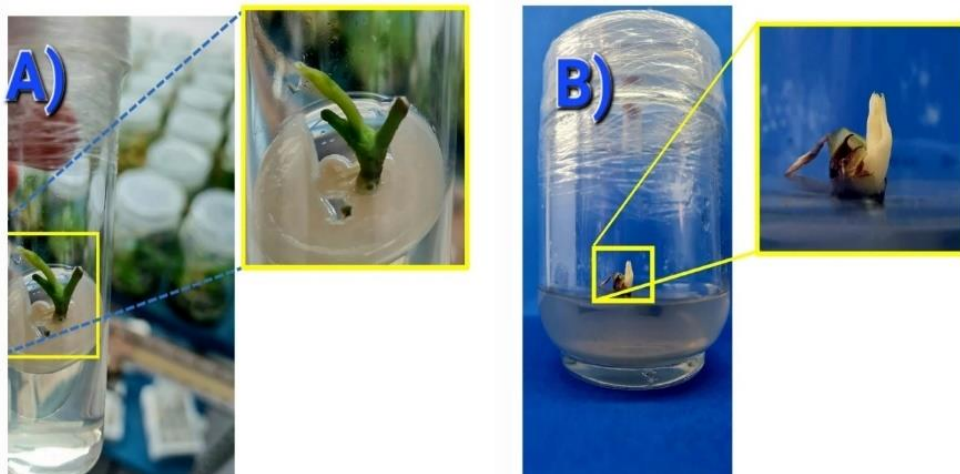


**Figura 13.** Perfil de contaminación total (hongos y bacterias) durante un periodo de dos años en *D. composita*.

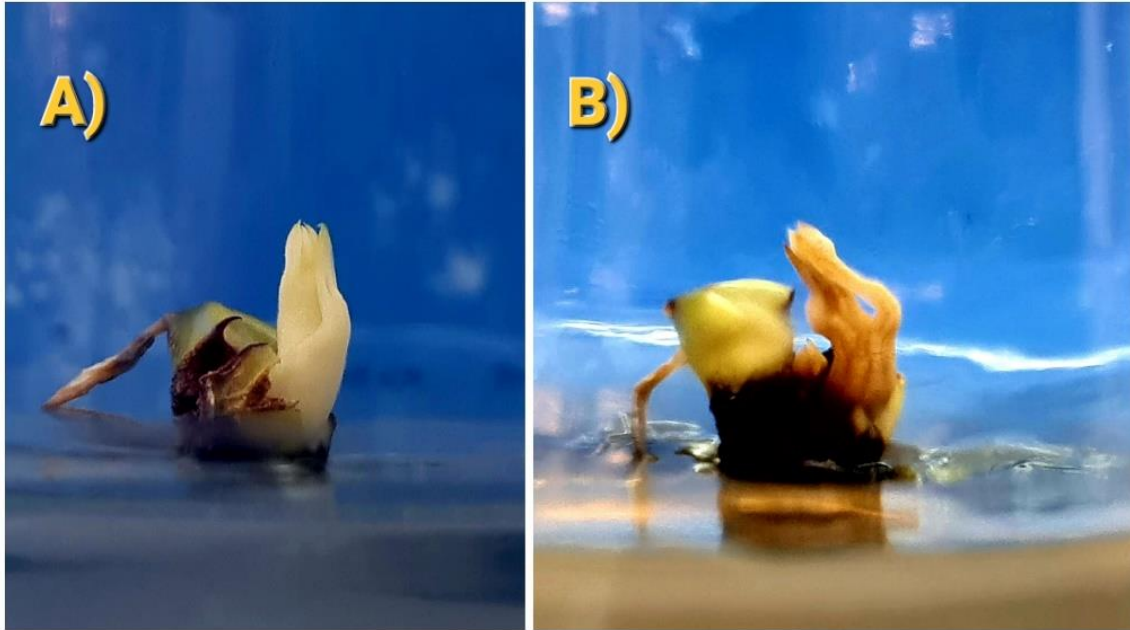
#### 8.1.4 Efecto del antibiótico Quinofres (levofloxacin) en yemas de *D. composita*.

El desarrollo de las primeras yemas laterales de los explantes de *D. composita* fue visible a los 7 días de siembra. Las yemas laterales de los segmentos nodales que no fueron incubados con el antibiótico Quinofres (levofloxacin), correspondientes a los

tratamientos TD1, TD2 y TD4, tenían buenas características, eran verdes y vigorosas con una elongación bastante marcada a las 3 semanas de siembra (Figura 14A), sin embargo, estas fueron muy susceptibles a contaminación debido a la poca astringencia de los tratamientos. Por otra parte, los explantes que fueron tratados con el antibiótico anteriormente mencionado, correspondientes al tratamiento TD4, permanecieron en un ambiente totalmente aséptico. A pesar de esto, desarrollaron yemas cloróticas de lento crecimiento, apenas perceptibles después de dos meses de siembra (Figura 14B y 15B). Después de cinco meses experimentaron necrosis completa (Figura 15B). Tras estos resultados se suspendió el uso del agente antimicrobiano. Szewczyk-Taranek *et al.* (2016), reportan resultados similares, ellos cultivaron brotes de *Staphylea pinnata L.* en medio MS suplementado con 100-300 mg de doxiciclina y la misma concentración de gentamicina, durante 4 meses. Se encontró que la doxiciclina resultó ser fitotóxica para la planta, causando la muerte de sus brotes. Por otro lado, la gentamicina inhibió el desarrollo de los brotes, seguido de una marcada clorosis en comparación con el control. A pesar de que los antibióticos tienen un alto potencial para eliminar fitopatógenos, esta acción no excluye la posibilidad de resultados adversos, como la fitotoxicidad, como también lo han reportado Mbah & Wakil (2012) en brotes de *D. rotundata*.



**Figura 14.** Comparación de la calidad de brotación utilizando levofloxacino. A) brote vigoroso y verde de 3 semanas con una longitud de aproximadamente 3 cm; B) brote clorótico de 2 meses desarrollado a partir de un explante incubado con el antibiótico levofloxacino (Quinofres).



**Figura 15.** Efecto del antibiótico levofloxacin en brotes de *D. composita*. A) brote clorótico de 2 meses y B) brote necrosado pasados 6 meses.

#### **8.1.5 Efecto del Biocida Plant Preservation Mixture (PPM) en yemas de *D. composita*.**

El biocida Plant Preservation Mixture (PPM), usado en el tratamiento TD5 redujo el 53 % de las contaminaciones microbianas que se había presentado anteriormente al hacer uso de otros tratamientos de desinfección, además, no se observaron efectos no deseados, como necrosis o inhibición del crecimiento vegetal. Esto concuerda con lo reportado por Digonzelli *et al.* (2005), los cuales evaluaron la acción bacteriostática y/o bactericida del PPM para controlar la contaminación con *Pseudomonas*, y su efecto sobre el crecimiento *in vitro* de caña de azúcar. El PPM no tuvo efectos inhibitorios sobre la longitud y número de macollo, pero sí repercutió de manera satisfactoria en el control de los contaminantes. Según Digonzelli *et al.* (2005), las concentraciones óptimas del antibiótico para un mejor control de contaminaciones fúngicas y bacterianas, se encuentra en un rango de 0.5 a 2 mL/L, ya que es un preservante de amplio espectro, que afecta a enzimas fundamentales en el ciclo del ácido cítrico y en la cadena de transporte de electrones, concentraciones bajas a las ya mencionadas reduce la eficiencia del mismo, dicha concentración coincide con los 2 ml/L usados en este estudio. En la figura 16, se observan brotes de 10 días cultivados en medio MS tratado con PPM, existe una gran diferencia morfológica de estos

respecto a los que fueron cultivados con el antibiótico levofloxacino (Quinofres) (Figura 14B).



**Figura 16.** Brotes de *D. composita* de 10 días, sembrados en Medio MS, suplementado con el biocida PPM.

#### **8.1.6 Contaminaciones recurrentes en el cultivo *in vitro***

Las contaminaciones más frecuentes detectadas tras varios meses fueron de bacterias y hongos. La bacteria más común en sus primeras dos semanas de aparición era blancuzca y lechosa, y al mes cambiaba a un color amarillento (Figura 17A), en tanto que, el hongo más común era de aspecto algodonoso y blancuzco (Figura 17B). La investigación realizada por Folgueras *et al.* (2016), nos ofrece un panorama general sobre la frecuencia de estos contaminantes en las especies de *D. alata*, *D. cayenesis* y *D. rotundata*, en dichas plantas detectaron la presencia de virus, hongos y bacterias los cuales provocaban la pudrición de sus tubérculos. Por otro lado, Doncel M & Pérez-Cordero (2017), hablan sobre la persistencia de estos microorganismos dentro del tejido de otras especies de *Dioscorea*, en este estudio aislaron un total de 64 morfotipos de bacterias endófitas de las variedades de ñame. Endófito, término que hace referencia a aquellos

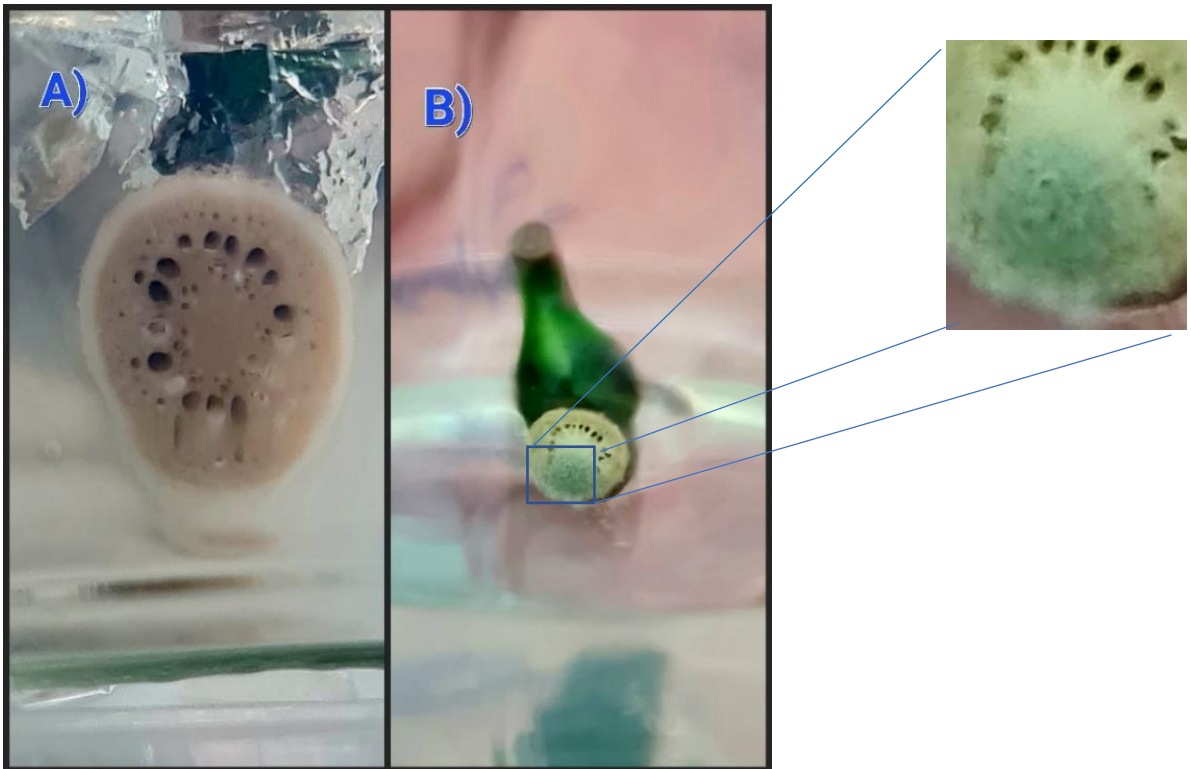
microorganismos que viven dentro de los diferentes tejidos, tales como las raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Los principales organismos endófitos pueden ser bacterias, virus y hongos. Al vivir dentro de la planta, pueden intercambiar nutrientes, sustancias que estimulen el crecimiento vegetal o incluso, pueden promover mecanismos de defensa contra patógenos invasores (Santoyo Pizano, n.d.).

Antes de continuar, es importante señalar que en el siguiente estudio de microorganismos no se llevó a cabo un análisis microbiológico detallado. La identificación visual de microorganismos puede ser desafiante debido a las similitudes entre ciertos grupos, como bacterias y levaduras, lo que puede dificultar su distinción. Sin embargo, los hongos filamentosos suelen presentar características únicas, como estructuras filamentosas visibles a simple vista. Si bien en la presente investigación no se prioriza la identificación de hongos y bacterias, se reconoce su importancia potencial como área de interés para investigaciones posteriores.

El comportamiento de estos microorganismos en nuestra planta de estudio fue variado, tanto hongos como bacterias aparecieron a los cinco y quince días de siembra, otros tantos, principalmente algunas bacterias, permanecieron latentes dentro del explante durante 3 meses, se manifestaron con la apertura de las primeras y últimas yemas laterales. Según Hernández & Gonzáles (2010), diversos factores pueden desencadenar un efecto inhibitorio en estos microorganismos, por ejemplo, la alta presión osmótica, el pH y ciertas hormonas del medio de cultivo. Debido a este efecto, muchos organismos requieren un periodo de adaptación a las nuevas condiciones antes de manifestarse. Si hay algo que enfatizar de la *Dioscorea*, es la porosidad tan marcada de su tallo que era visible después de cada corte transversal (Figura 18A). Esta característica fisiológica y todos los factores anteriormente mencionados, sin lugar a dudas, se complementan y posibilitan el acceso y alojamiento de diferentes agentes microbianos en el interior de la planta como se observa en la figura 18B, y, por ende, repercuten directamente en el éxito de cualquier protocolo de desinfección superficial.



**Figura 17.** Contaminación bacteriana (A) y fúngica (B) presentada en *D. composita*.



**Figura 18.** Detalle de la morfología interna del tallo. A) corte transversal del tallo donde se aprecian los vasos conductores del tallo de *D. composita* y B) probable contaminación de origen endógeno en *D. composita*.

### 8.1.7 Proliferación de brotes de *D. composita*

El tratamiento de desinfección TD5 al ser más eficiente que su análogo el tratamiento TD4, como se mencionó anteriormente, fue seleccionado para evaluar la respuesta de brotación de explantes de *D. composita* en función de BAP y una combinación de BAP más ANA. El mayor porcentaje de brotación se alcanzó con una concentración de 1 mg/L de BAP sin la combinación hormonal (tabla 7). Esta misma tendencia se ha observado en otras especies de *Dioscorea*, como en el caso de la *D. zingiberensis*, donde el porcentaje de brotación se vio influenciado de manera negativa por la combinación hormonal (Chen *et al.*, 2003), sin embargo, al realizar una comparación entre el promedio de brotación por segmento nodal de cada tratamiento hormonal, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas (tabla 7). La CFB registrada fue de  $0.13 \pm 0.15$  a una concentración de 1 mg/L de BAP. Por otro lado, con el tratamiento hormonal BAP + ANA, se obtuvo una CFB de  $0.05 \pm 0.04$ . Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las CFB de cada tratamiento, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Brotación de segmentos nodales de *D. composita* provenientes de campo.

Tratamientos	Promedio de proliferación de brotes Vi	Porcentaje de brotación de explantes	CFB
BAP (1 mg/L)	$0.31 \pm 0.20^A$	$31.75 \pm 21^A$	$0.13 \pm 0.15^A$
BAP + ANA (1 mg/L + 0.5 mg/L)	$0.20 \pm 0.13^A$	$20.12 \pm 13^A$	$0.05 \pm 0.04^A$

**Nota:** Letras iguales en cada columna indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos mediante el análisis ANOVA por la prueba de Tukey (N=6,  $p=0.05$ ). Vi, representa el promedio de proliferación de brotes en el subcultivo previo. Este valor se empleó para calcular la tasa geométrica de propagación ( $r$ ) en conjunto con Vf, la cual se mencionará más adelante.

### 8.1.8 Proliferación de brotes de *D. composita* en el primer subcultivo

Los segmentos nodales formaron brotes a los 15 días de haber sido subcultivados, algunos eran de aproximadamente 7 cm de longitud, otros, yemas apenas perceptibles a la vista. Sin embargo, los porcentajes de brotación y la CFB fueron muy superiores a los valores obtenidos de explantes provenientes de campo (Tabla 8). Este comportamiento puede deberse al efecto de adaptación que van experimentado los segmentos nodales en los medios de cultivo con reguladores de crecimiento. A medida que se realizan más subcultivos, es probable que estos segmentos se adapten progresivamente a las fitohormonas y a las condiciones *in vitro* (Vilchez *et al.*, 2009; Castro Garibay *et al.*, 2023) (Tabla 10).

Tabla 8. Brotación de segmentos nodales *D. composita* en el primer subcultivo Vf.

Tratamientos	Promedio de proliferación de brotes Vf	Porcentaje de brotación	CFB
BAP(1mg/L)	0.73	73 ± 12.40 <sup>A</sup>	0.54± 0.17 <sup>A</sup>
BAP+ANA (1 mg/L+ 0.5 mg/L)	0.33	33.33 <sup>A</sup>	0.1 <sup>A</sup>

**NOTA:** En el tratamiento fitohormonas 2, correspondiente a la combinación hormonal BAP + ANA se realizó solo una réplica, por lo que los valores de brotación y porcentaje no corresponden a un promedio, sino al dato puntual de una observación. La razón por la que no se hicieron 3 réplicas como en el primer tratamiento, fue debido a la baja CFB que este presentó en la etapa de establecimiento, lo que influyó en la disponibilidad de material de siembra en la etapa de subcultivo. De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA), con 95 % de confiabilidad, no se hayo diferencia significativa entre los tratamientos. Vf, representa el promedio de proliferación de brotes en el subsecuente subcultivo, útil para el cálculo de *r*.

## 8.2 Establecimiento *in vitro* de *Dioscorea mexicana*

El establecimiento de la *D. mexicana* resultó sencillo mediante la implementación del tratamiento TD5, que previamente se había utilizado con éxito en la especie *D. composita*.

La frecuencia de contaminaciones fue muy baja tanto en explantes sembrados en el medio con BAP solo, como en el medio con BAP más ANA. Aproximadamente el 8 % del material vegetal se contaminó en ambos casos, mientras que el resto se mantuvo en un ambiente totalmente aséptico. Estos explantes desarrollaron brotes después de 7 días, y a las 2 semanas, su longitud era de aproximadamente 5 cm (ver Figura 19A). Posteriormente crecieron de manera vigorosa y formaron nudos bien definidos a los 21 días (ver Figura 19B).

En la tabla 9 se detalla la viabilidad de este tratamiento, junto con los datos correspondientes a la formación de brotes, callos y raíces.

Tabla 9. Resultado del establecimiento *in vitro* de *D. mexicana*.

Tratamiento Hormonal	Porcentaje de contaminación total	Porcentaje Eficiencia	Porcentaje de brotación	Porcentaje de Formación de callo	Porcentaje de Formación de raíces	Promedio de proliferación de brotes Vi	CFB
<b>BAP</b>	8.82	91.18	88.23	0	0	1.64	1.44
<b>BAP/ANA</b>	8.1	91.9	35.13	64.86	10.81	0.35	0.12

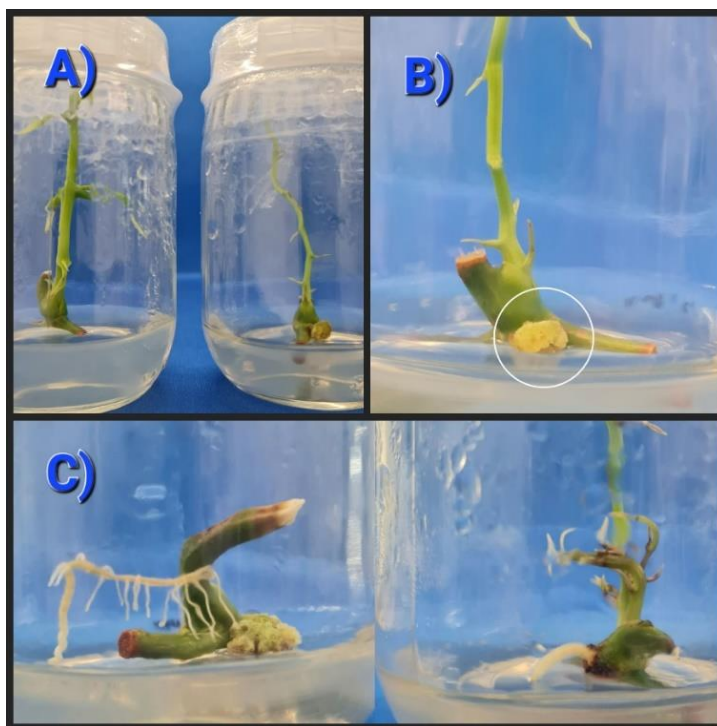
**Nota.** Vi representa el promedio de proliferación de brotes en el subcultivo previo, en este caso, de *D. Mexicana*.



**Figura 19.** Desarrollo de brotes de *D. mexicana*. A) brotes de 14 días y B) brotes de 21 días.

### 8.2.1 Respuesta de explantes de *D. mexicana* a diferentes Fitohormonas

De acuerdo a la tabla 9, el mejor regulador del crecimiento vegetal fue BAP a una concentración de 1 mg/L, el 88.23% de los explantes que fueron tratados con esta hormona desarrollaron brotes vigorosos, mientras que la combinación de BAP más ANA, brotes más delgados y en muy bajo porcentaje (Figura 20A), sin embargo, en este tratamiento se indujeron respuestas caulogénicas y callogénicas al mismo tiempo (Figura 20B) y a los 50 días, respuesta rizogénica (Figura 20C). Este comportamiento es muy recurrente en estas plantas, como se señala en el estudio de Chen *et al.* (2003), que se basa en la *D. zingiberensis*. Según este estudio, es inevitable que se forme callo cuando se usan dos reguladores de crecimiento, específicamente BAP y ANA, en el mismo medio de cultivo.

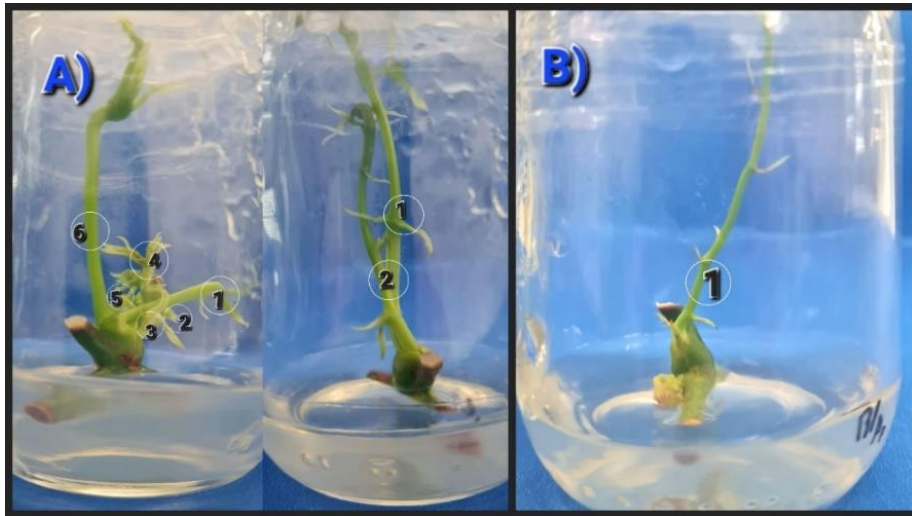


**Figura 20.** Tipos de respuesta al tratamiento hormonal de segmentos nodales de *D. mexicana*. A) brote de buen grosor creciendo en medio suplementado con BAP (izquierda) y brote delgado creciendo en medio suplementado con BAP más ANA (derecha); B) explante con Brote y callo y C) respuesta rizogénica de explantes después de 50 días de haberse cultivado

### 8.2.2 CFB de *D. mexicana*

La proliferación de yemas que originan brotes y el desarrollo de los mismos en *D. mexicana* fue totalmente diferente en comparación con los desarrollados en *D. composita*. Algunos explantes colocados en medio MS con BAP produjeron un número máximo de hasta 6 brotes, mientras que otros generaron un mínimo de 2 (ver Figura 21A). Por otro lado, aquellos sembrados en medio con BAP más ANA solo produjeron 1 brote por segmento nodal (Figura 21B). Este contraste en los resultados se evidencia al compararlos con los obtenidos por Dessalegn *et al.* (2015), quienes trabajaron con *Dioscorea spp.* y encontraron que el mayor promedio proliferación de brotes ( $6.40 \pm 0.28$ ) se logró en un medio MS suplementado con 1.5 mg/L de BAP más 0.15 mg/L de ANA.

Otros estudios, como el realizado por Jirakiattikul *et al.* (2016) en la especie *D. birmanica*, muestran resultados similares a los reportados en esta investigación, donde el mayor promedio de brotes se consiguió cuando se suplementaron 2 mg/l de BAP al medio de cultivo. Se puede entender entonces que cada especie de *Dioscorea* puede asimilar y responder de manera diferente a las concentraciones y combinaciones hormonales del medio de cultivo. La mayor CFB fue de 1.44 y se observó en el medio suplementado con 1 mg/L de BAP (ver tabla 9).

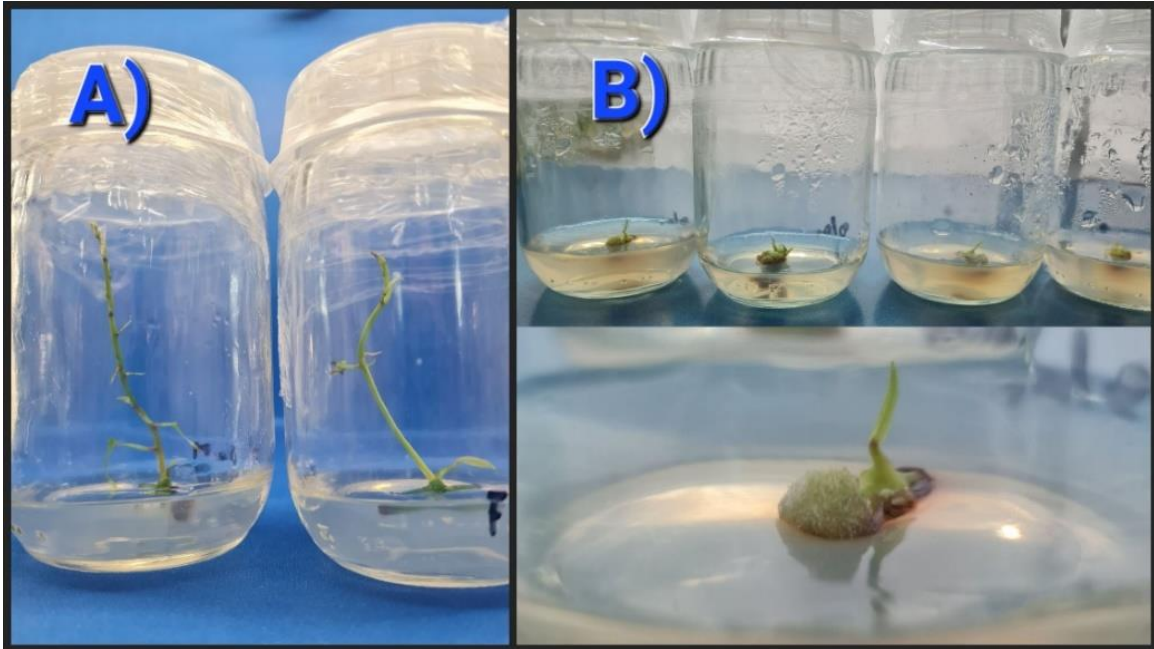


**Figura 21.** Proliferación de brotes de *D. mexicana*. A) segmento nodal con 6 brotes (Izquierda) y 2 brotes (derecha) creciendo en medio MS suplementado con BAP y B) segmento nodal con 1 brote creciendo en medio MS suplementado con BAP más ANA.

### 8.2.3 Subcultivo de *D. mexicana*

Se subcultivaron segmentos nodales de aproximadamente 1 cm de longitud, los cuales desarrollaron yemas laterales a los 7 días. Posteriormente, a los 25 días, se observaron brotes de aproximadamente 10 cm de longitud (Figura 22A). Esta tendencia de brotación y crecimiento solo se observó en el Medio de cultivo suplementado con BAP, con un promedio de CFB de  $0.78 \pm 0.31$  (Tabla 10).

Por otro lado, los explantes cultivados en Medio MS suplementado con BAP + ANA, no formaron brotes. Sin embargo, el 100 % de ellos desarrollaron callo a los 15 días (figura 22B). Esta propensión también se observó en explantes provenientes de campo (Figura 20B) y en la especie de *D. hispita*, donde se visualizó la influencia de la combinación de las hormonas anteriormente mencionadas en la formación de callo (Mahmod *et al.*, 2020).



**Figura 22.** Proliferación de brotes en *D. mexicana*. A) brote de 25 días desarrollándose en medio MS con BAP y B) explantes de 15 días con respuesta callogénica.

Tabla 10. CFB del subcultivo en *D. mexicana*.

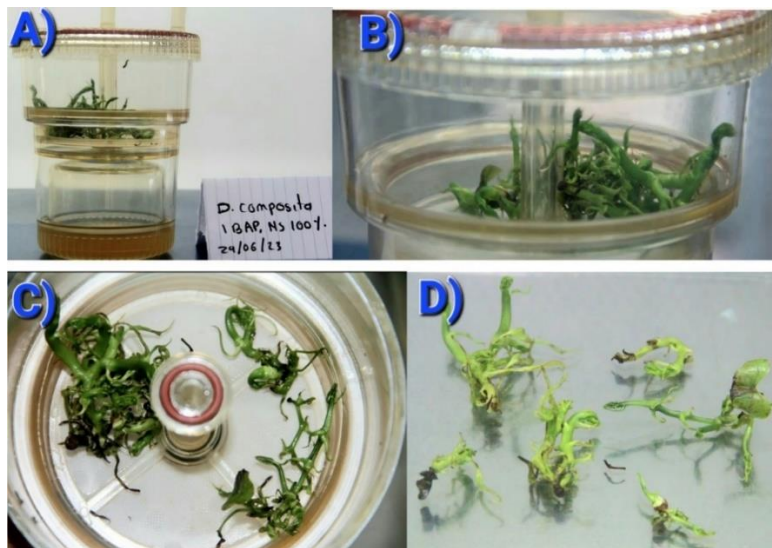
Tratamientos	Promedio de proliferación de brotes Vf	% brotación	CFB	% Formación de raíces
BAP	$0.87 \pm 0.17^A$	$87.5 \pm 17^A$	$0.78 \pm 0.31^A$	0
BAP/ANA	$0 \pm 0^B$	$0 \pm 0^B$	$0 \pm 0^B$	100

**Nota.** Se realizaron dos replicas por tratamiento hormonal.

### 8.3 Aplicación de RITA en el subcultivo de *D. composita* y *D. mexicana*

Se promovió el crecimiento y la calidad de los brotes obtenidos empleando sistemas de inmersión temporal (SIT) en ambas especies, lo cual coincide con los efectos observados del SIT Plantima® en *Dioscorea fordii* y *Dioscorea alata* (Yan H., et al., 2011).

La densidad de inóculo en *D. composita* fue de 10 segmentos nodales, lo que generó un promedio de 3.5 brotes por explante, sumando un total de 54 explantes (Figura 23) con una CFB de 3.5 y medio enriquecido con BAP (1 mg/L), utilizando reactores RITA®. En *D. mexicana* la densidad del inóculo fue de 26 explantes, lo que resultó en un promedio de 5.2 brotes por explante. Esto dio como resultado un total de 287 explantes con una CFB de 4.99 en medio MS suplementado con BAP (1 mg/L) (Figura 24). Nuestros resultados en cuanto al número de brotes por explante entran dentro del rango de lo reportado con *Dioscorea cayenensis-rotundata* (ñame africano), en el que se obtuvo un máximo de 3.8 brotes por explante a una concentración de 1 mg/L de BAP, 5 a 20 segmentos nodales por biorreactor RITA®, 200 ml de medio, 1 min de inmersión cada 12 horas. La brotación puede aumentar si se aumenta la frecuencia de inmersión a 1 min cada 4 horas (Polzin, F., et al., 2014).



**Figura 23.** Aspecto de la promoción del crecimiento de *D. composita* bajo esquema RITA®. A) cosecha de segmentos nodales a los 3 meses de cultivo B) y C) detalle de la calidad de brotes y D) conteo de brotes.



**Figura 24.** Aspecto de la promoción del crecimiento de *D. mexicana* y proliferación de segmentos nodales bajo esquema RITA®. A) cosecha de segmentos nodales a los 3 meses de cultivo B) y C) detalle de la calidad de brotes, D) conteo de brotes y E) subcultivo de nuevos explantes.

#### **8.4 Comparación de la eficiencia de proliferación de brotes entre el sistema SIT y el método convencional en frasco**

Se consiguió un aumento en el promedio de proliferación de brotes cultivados en el sistema de inmersión temporal (SIT) con respecto al esquema de frasco descrito anteriormente (ver Tabla 11), esto concuerda en *Dioscorea fordii* y *Dioscorea alata*, aunque las condiciones de cultivo difirieran con respecto a nuestra experiencia (250 ml de medio, 3 min de inmersión cada 4 horas, durante seis semanas) (Yan H., *et al.*, 2011). Esto sugiere un papel de los SIT para aumentar la productividad además de la tasa de multiplicación más rápida y reducir los costos en el cultivo de tejidos convencional debido a una reducción significativa de la contaminación y el costo de la mano de obra, entre otros factores, como la aireación del cultivo combinada con la automatización. En los SIT, el crecimiento se ve favorecido ya que no hay inmersión continua en el medio líquido. Se ha informado el uso de SIT tipo TIB para patatas, piña, manzana, café, hierba de limón, palma aceitera, eucalipto, fresa, entre otros. Los brotes del ñame cultivados en TIB

tuvieron un mejor crecimiento y las hojas tenían un mayor contenido de pigmento fotosintético que otras características. El aspecto interesante del uso de TIB para la propagación del ñame es que es posible la producción tanto de plántulas como de microtubérculos. Esto implica que se pueden plantar microtubérculos suficientemente grandes directamente en el campo como se informó para *D. alata*. dado que es la especie económicamente más importante en el cinturón de ñame de África occidental, es fundamental que se preste atención a su propagación en TIB (Balogum M. *et al.*, 2014).

Tabla 11. Extracto de datos de los promedios de proliferación entre la etapa de establecimiento ( $V_i$ ), primer subcultivo ( $V_{f1}$ ) y subcultivo en biorreactor ( $V_{f2}$ ).

	$V_i$	$V_{f1}$	$V_{f2}$
<b><i>D. composita</i></b>			
BAP	0.31	0.73	3.5
<b><i>D. mexicana</i></b>			
BAP	1.64	0.87	5.2

Con los valores promedio de proliferación del sistema convencional, desde la etapa de establecimiento ( $V_i$ ) hasta el primer subcultivo ( $V_{f1}$ ), y evaluando la BAP a razón de 1.0 mg/L, se determinó la tasa de cambio de ( $r$ ) utilizando la fórmula de la E.C.6. A partir de los datos extraídos de la tabla 11, se obtuvo una tasa de cambio de 3.48 para *D. composita* y de 2.5 para *D. mexicana*. La  $r$  fue diferente para cada especie.

## 9.CONCLUSIONES

- Los protocolos de exposición secuencial a los agentes desinfectantes fueron más eficaces que los de una sola exposición en el establecimiento de los cultivos *in vitro* de *Dioscorea composita*, permitiendo además establecer los cultivos *in vitro* de *D. mexicana*.
- El protocolo de desinfección secuencial TD5 fue el que permitió establecer con mayor eficiencia los cultivos *in vitro* de *D. composita* y *D. mexicana*, en un 53 % y 91 %, respectivamente.
- La fitohormona BAP, o combinada con el ANA indujeron la proliferación de yemas preexistentes en ambas especies.
- El biocida PPM, es un excelente agente que inhibe el desarrollo de hongos y bacterias presentes en las especies *D. composita* y *D. mexicana*.
- La BAP sin otro complemento hormonal, favorece en gran medida la capacidad de formación de brotes (CFB) en *D. composita* y *D. mexicana*.
- La combinación hormonal BAP y ANA estimula la formación de callos y raíces en los explantes de *D. mexicana*.
- El uso de sistemas de Inmersión Temporal (SIT) aumenta notablemente la eficiencia de la proliferación de brotes de *D. Composita* y *D. Mexicana* en comparación con el método tradicional en frascos con medio MS sólido, con una CFB de 3.5 y 4.99 respectivamente.

## 10.PERSPECTIVAS

- Evaluar diferentes concentraciones de BAP para optimizar la proliferación de brotes en las especies de *D. composita* y *D. mexicana*.
- Analizar la relevancia de la asociación microbiana en las plantas de *D. mexicana* y *D. composita*.
- Analizar el impacto de las estaciones del año en el proceso de establecimiento *in vitro* de *D. composita* y *D. mexicana*.
- Establecer el proceso completo de micropropagación hasta la etapa de vivero
- Realizar subcultivos para obtener valores de  $r$  y generar gráficos comparativos de los resultados en recipientes de cultivo convencionales y en RITA.

## 11. REFERENCIAS

1. Aguilar, G., & Iglesias, M. (2001). Erionita premodificada con K<sup>+</sup> y zeolita 4A para la adsorción de propano y propileno. *Revista de La Sociedad Química de México*, 45.
2. Alizadeh, S., Mantell, S.H. & Maria Viana, A. *In vitro* shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53, 107–112 (1998). <https://doi.org/10.1023/A:1006036324474>
3. Balogum M., O., N., M., & R., A. (2014). Status and prospects for improving yam seed systems using temporary immersion bioreactors. *African Journal of Biotechnology*, 13, 1614-1622.
4. Basurto, F. (2023). Barbasco y cabeza de negro (*dioscorea spp.*), herencia y despojos de un producto forestal no maderable de México. *Revista Etnobiología*, 21, 3–17
5. Bernabé, A. A., Santacruz, R. F., & Cruz, R. F. (2012). Effect of plant growth regulators on plant regeneration of *Dioscorea remotiflora* (Kunth) through nodal explants. *Plant Growth Regul*, 68, 293-301. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9717-z>
6. Behera, K., Sahoo, S., & Prusti, A. (2009). Regeneration of Plantlet of Water Yam (*Dioscorea oppositifoli* L.) through *In vitro* Culture from Nodal Segments. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(1), 94-102. <https://doi.org/10.15835/nbha3713103>
7. Bhatia, S. (2015). Cultivo de tejidos vegetales. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 31-107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9>
8. Bhattacharjee, R., Gedil, M., Sartie, A., Otoo, E., Dumet, D., Kikuno, H., ... Asiedu, R. (2011). *Dioscorea*. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, 71–96. doi:10.1007/978-3-642-21102-7\_4

9. Bonilla, M. & Hernández, O. (2012). Propagación *in vitro* de ñame (*Dioscorea* spp.): una perspectiva en la producción masiva de plántulas y conservación de germoplasma. *Agronomía*. 20 (2): 65-76.
10. Cabrera Jova, M. A. (2009). Empleo de métodos biotecnológicos para la propagación de ñame. *Biotecnología Vegetal*, 9(4), 195–209.
11. Castillo, A. (2014). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *INIA*, 1–8.
12. Castro Garibay, S. L., Villegas Monter, A., & Cruz Larios, I. J. (2023). Concentración de kinetina y tipo de explante en la multiplicación *in vitro* de *Sequoia sempervirens* (D. Don). *Endl. Polibotánica*, 0(55), 81–94. <https://doi.org/10.18387/POLIBOTANICA.55.6>
13. Chaturvedi HC, Jain M, Kidwai NR. Cloning of medicinal plants through tissue culture-a review. *Indian J Exp Biol*. 2007;45(11):937–48.
14. Chen, Y., Fan, Y., Yi, Y., Luo, Z., & Fu, Y. (2003). Rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* volume, 73, 75-80. <https://doi.org/10.1023/A:1022683824635>
15. Chen, F. Q., Fu, Y., Wang, D., Gao, X., & Wang, L. (2007). The Effect of Plant Growth Regulators and Sucrose on the Micropropagation and Microtuberization of *Dioscorea nipponica* Makino. *Plant Growth Regul*, 26(1), 38-45. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0147-2>
16. Dansi A, Mignouna HD, Zoundjhekepon J, Sangare A, Asiedu R, Quin FM. Morphological diversity cultivar groups and possible descent in the cultivated yams *Dioscorea cayenensis*, *D. rotundata*) complex in Benin Republic. *Genet Resour Crop Ev*. 1999;46(4):371–88.
17. Das, S., Choudhury, M. D. y Mazumder, P. B. (2013) *In vitro* propagation of the genus *Dioscorea* - A critical review', *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(3), pp. 2–6.

18. Da Silva, R.L., Ferreira, C.F., da Silva Ledo, C.A. et al. Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of *in vitro* conservation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 127, 123–133 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1035-0>
19. Dessalegn, O., Bantte, K., & Diro, M. (2015). Effect of Different Combinations of Plant Growth Regulators on *in vitro* Propagation of Yam (*Dioscorea* Species). *Journal of Applied Biotechnology*, 3(2), 20–40. <https://doi.org/10.5296/jab.v3i2.7471>
20. Digonzelli, P., Díaz, L., & Carrizo de Bellone, S. (2005). Uso de PPM (Plant Preservative Mixture) para controlar contaminantes bacterianos en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 22(1), 23–33. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182005000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182005000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
21. Doncel M, P., & Pérez-Cordero, A. (2017). Burkholderia cepacia aisladas de variedades de ñame con actividad antimicrobiana contra *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 9(S1), 31–38. <https://doi.org/10.24188/recia.v9.nS.2017.518>
22. Folgueras, M., Isla, L., & Morales, L. (2016). Phytopathogenic and associated microorganisms to crop of Yam tubers (*Dioscorea* spp.). *Agricultura Tropical*, 2, 61–68.
23. Gereffi, G. (1977). Los oligopolios internacionales: el estado y el desarrollo industrial en México: el caso de la industria de hormonas esteroides. *Foro internacional*, 17(4), 490-541. Obtenido de <https://forointernacional.colmex.mx/index.php/fi/article/view/769>
24. Global Biodiversity Information Facility. (2022, June 22). *Dioscorea mexicana* Scheidw. *ÍNaturalist*. <https://www.gbif.org/occurrence/3966513458>
25. González, V. M. (2012). El Ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 5-15. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/262745086\\_El\\_Name\\_Dioscorea\\_sp](https://www.researchgate.net/publication/262745086_El_Name_Dioscorea_sp)

p\_Caracteristicas\_usos\_y\_valor\_medicinal\_Aspectos\_de\_importancia\_en\_el\_de\_sarrollo\_de\_su\_cultivo

26. Haro, G. (2013). Origen y desarrollo de la investigación esteroidal en México. Las sapogeninas esteroidales. Recuperado de <https://colnal.mx/wp-content/uploads/2019/11/Discurso-Jesu%CC%81s-Romo-Armeri%CC%81a.pdf>
27. Heble, M. R., & Staba, E. J. (1980). Diosgenin Synthesis in Shoot Cultures of *Dioscorea composita*. *Planta Medica*, 40, 120-123. doi:10.1055/S-2008-1075015
28. Hernández, Y., & Gonzales, M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31.
29. Hogg, J. A. (1992). Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation. *Steroids*, 57(12), 593–616. [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(92\)90013-Y](https://doi.org/10.1016/0039-128X(92)90013-Y)
30. Jirakiattikul, W., Rithichai, P., Songsri, O., Ruangnoo, S., & Itharat, A. (2016). *In vitro* propagation and bioactive compound accumulation in regenerated shoots of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(249). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2268-6>
31. KASALAB. (2020, July 2). RITA® Sistema de Inmersión Temporal para cultivo de tejidos vegetales. KASABLOG.
32. Kumar, A. et al. (2014b) 'Rapid protocol for callus induction and differentiation of roots and shoots in *Dioscorea alata* a medicinal plant', *Indian Journal of Agricultura Sciences*, 84(1), pp. 107–111.
33. Kumar, A., Goyal, S. C., Lata, C., Sharma, N., Dhansu, P., & Parshad, J. (2017). Rapid, Efficient Direct and Indirect Regeneration Protocol of *Dioscorea deltoidea* Wall. *National Academy Science Letters*, 40(3), 237–240. doi: 10.1007/s40009-017-0562-5
34. Krikorian A. D. *In vitro* culture of root and tuber crops, in *Plant Cell and Tissue Culture*, edited by I K Vasil and T A Thorpe (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht) 1994, 379.

35. Li X, Ma JZ, Shi YD. Research progress and prospects of dioscorea and diosgenin. *Chem Ind For Prod.* 2010;30(2):107–12.
36. Lin, M., Lin, J., Liu, L., Lu, J., Niu, J., Liu, X., et al. (2014). A protocol for *in vitro* production of microtubers in Chinese yam (*Dioscorea opposita*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78 (6), 1005-1009.
37. Liu P, Guo SL, Lv HF, Xie XW, Wu XY. A summary of the study on Chinese Dioscorea. *J Zhejiang Nornal Univ (Nat. Sci).* 1993;16(4):100–6.
38. Mahmod, N. H., Mustapha, Z., Ariffin Husni, A. H., Ishak, N. A., & Jaafar, H. (2020). Shoot Generation and Callus Induction of *Dioscorea hispida* Dennst by Different Plant Growth Hormones and Basal Media. *Journal Of Agrobiotechnology*, 11(2), 30–38. <https://doi.org/10.37231/jab.2020.11.2.222>
39. Maldonado García, Holger J., Guzmán Lezama, E. G., Márquez Cabezas, S., Tupayachi, A., & Albán, J. (2012). Estudio de sapogeninas esteroidales de especies peruanas del género dioscorea. In *Revista de la Sociedad Química del Perú* (Vol. 78, Issue 3). Sociedad Química del Perú. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2012000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2012000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
40. Mbah, E. I., & Wakil, S. M. (2012). Elimination of Bacteria from in vitro Yam Tissue Cultures Using Antibiotics. *Journal of Plant Pathology*, 94, 53–58.
41. Mora, M. D., Lopez, H. A., & Pastrana, P. M. (2018). Diosgenin: The mos Typical Chemical Precursor in México. BUAP. Obtenido de <https://icupap.buap.mx/sites/default/files/revista/2018/03/3E8-diosgenina.pdf>
42. Murashige, T. (1974). Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135-166. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.25.060174.001031>
43. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
44. Ng, S.Y.C. (1992). Micropropagation of White Yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). In: Bajaj, Y.P.S. (eds) *High-Tech and Micropropagation III. Biotechnology in*

- Agriculture and Forestry, vol 19. Springer, Berlin, Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-662-07770-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-662-07770-2_9)
45. Ondo ovono P, Kevers C, Dommes J. Effects of planting methods and tuber weights on growth and yield of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Gabon. *Int Res J Agr Sci. Soil Sci.* 2016;6(3):32–42.
46. Orellano, J., Dellagiovanna, A., Imanishi, L., Mazzone, V., & Faedo, N. (2017). Sistema de Inmersión Temporal: Automatización de Propagación *in vitro* de Plantas Utilizando Herramientas Libres.
47. Perez Alonso, N. L., Pérez, A., Perez, A., Gómez, L., & Jimenez, E. (2015). *In vitro* establishment and multiplication of Aloe vera L. shoots. *Biotecnología Vegetal* , 15, 85–95.
48. Polzin, F., Sylvestre, I., Déchamp, E. et al. Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA®). *In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 50, 210–216 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9552-6>
49. Ramos, V. A., Bustamante, S. L., Rincon, V. J., Rojas, C. M., Raz, L., & Buitrago, H. G. (2015). Identificación, establecimiento *in vitro* y análisis fitoquímico preliminar de especies silvestres de ñame (*Dioscorea* spp.) empleadas con fines medicinales. *Revista colombiana de biotecnología*, 17(1), 9-17. Obtenido de <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-colombiana-de-biotecnologia/articulo/identificacion-establecimiento-in-vitro-y-analisis-fitoquimico-preliminar-de-especies-silvestres-de-name-dioscorea-spp-empleadas-con-fines-medicinales>
50. Ranjan, D. C., & Langhu, T. (2017). Efficient *in vitro* propagation protocol of a medicinally important plant, *Dioscorea villosa* L. via organogenesis from nodal segments. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 18(7-8), 559-569. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/321831615\\_EFFICIENT\\_in\\_vitro\\_Pro](https://www.researchgate.net/publication/321831615_EFFICIENT_in_vitro_Pro)

pagation\_protocol\_of\_a\_medicinally\_important\_plant\_dioscorea\_villosa\_l\_via\_organogenesis\_from\_nodal\_segments

51. Raynor, B., Lorens, A., & Phillip, J. (1992). Traditional yam cultivation on Pohnpei, Eastern Caroline Islands, Micronesia. *Economic Botany*, 46(1), 25-33. <https://doi.org/10.1007/BF02985251>
52. Rosenkranz, G., Pataki, J., & Djerassi, C. (1950). Steroids. XXV. 1 Synthesis of cortisone. *Journal of the American Chemical Society*, 73(8), 4055-4056
53. Sánchez-López, G. C. (2018). Cultivo de tejidos para la producción de diosgenina en *Dioscorea* spp., de la Cuenca del Papaloapan, México. Tesis, Universidad del Papaloapan, México.
54. Sancho, G., & Guevara, E. (1991). *In vitro* culture of lateral buds of papaya (*Carica papaya* L.). 1. Effect of culture conditions on the initial contaminación of the explants. *BOLTEC*, 24, 14–25.
55. Santoyo Pizano, G. (n.d.). Microorganismos endófitos: origen y vida dentro de las plantas. *Saber Más*. Retrieved December 17, 2023, from <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/68-numero-9/137-microorganismos-endofitos-origen-y-vida-dentro-de-las-plantas.html#:~:text=Los%20principales%20organismos%20end%C3%B3fitos%20pueden,de%20defensa%20contra%20pat%C3%B3genos%20invasores>.
56. Shah, J. H., & Lele, S. (2012). *In vitro* Propagation of *Dioscorea alata* var. *purpurea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 1811-1817. doi:<https://doi.org/10.1007/s12010-012-9658-z>
57. Sautour M, Mitaine-Ofer AC, Lacaille-Dubois MA. The *Dioscorea* genus, a review of bioactive steroid saponins. *J Nat Med*. 2007;61(2):91–101.
58. Shen, L., Xu, J., Luo, L. et al. Predicting the potential global distribution of diosgenin-contained *Dioscorea* species. *Chin Med* 13, 58 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0215-8>

59. Shu, Y., Ying-Cai, Y. & Hong-Hui, L. Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 80, 157–161 (2005). <https://doi.org/10.1007/s11240-004-9543-8>.
60. Shukla, S., & Shukla, S. (2013). Adjuvant and their influence on *in vitro* propagation of *Dioscorea hispida* - an important tuber crop. doi:10.5176/2251-2489\_BioTech13.85
61. Sosa V., Schubert B.G. y Gómez-Pompa A. 1987. Flora de Veracruz, Dioscoreaceae. Fascículo 53. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. ISBN 84-89600-04-X.
62. Sousa, A., Bertoni, B., Franca, S., & Pereira, A. (2011). Micropropagación of *Dioscorea multiflora* griseb. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(1), 92-98. doi:10.1590/S1413-70542011000100011
63. Szewczyk-Taranek, B., Supel, P., Kaszycki, P., Prokopiuk, B., & Pawlowska, B. (2016). Effect of antibiotics on plant regeneration in *Staphylea pinnata* L. *in vitro* cultures. *New Biotechnology*, 33, S155–S156. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.1259>
64. Téllez-Valdés O. and Geeta R. 2007. Sinopsis taxonómica de la sección Apodostemon (*Dioscorea* – Dioscoreaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78:265-279.
65. Uchendu, E., Sobowale, O., Odimegwu, J., & Adetimirin, V. (2016). *In vitro* sucrose concentration influences microtuber production and diosgenin content in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *In vitro Cell*, 52(6), 563-570. doi:10.1007/s11627-016-9789-y
66. Vaillant, F., Bade, P., & Constant, C. (2005). Photoperiod affects the growth and development of yam plantlets. *Biología Plantarum*, 49(3), 355-359. <https://doi.org/10.1007/s10535-005-0007-8>
67. Vilchez, J., Rivas, Y., Albany, N., Molina, M., & Martínez, L. (2009). Efecto de la N6-bencilaminopurina sobre la multiplicación *in vitro* de ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). *Revista de La Facultad de Agronomía*, 26(2), 212–222.

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182009000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182009000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

68. Villalobos, V., & Thorpe, T. (1991). Micropropagación: Concepto, metodología y resultados. En W. Roca, & L. Mroginski, Cultivo de tejidos en la agricultura (págs. 127-141). Obtenido de <https://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/PArte%20C.pdf>
69. Waizel, B. J. (2009). El uso tradicional de las especies del género Dioscorea. Revista de fitoterapia, 9(1), 53-67. Obtenido de [https://www.academia.edu/6871005/El\\_uso\\_tradicional\\_de\\_las\\_especies\\_del\\_genero\\_Dioscorea](https://www.academia.edu/6871005/El_uso_tradicional_de_las_especies_del_genero_Dioscorea)
70. Wan JR, Ding ZZ, Qin HZ. A phytogeographical study on the family Dioscoreaceae. Acta Bot Boreal-Occident Sin. 1994;14(2):128–35
71. Yan, H., Yang, L., & Li, Y. (2011). Axillary shoot proliferation and tuberization of *Dioscorea fordii* Prain et Burk. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 104, 193-198. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9818-1>
72. Yi T, Fan LL, Chen HL, Zhu GY, Suen HM, Tang YN, Zhu L, Chu C, Zhao ZZ, Chen HB. Comparative analysis of diosgenin in Dioscorea species and related medicinal plants by UPLC-DAD-MS. BMC Biochem. 2014; 15:19.

## 12. ANEXOS

### ANEXO 1. Ficha técnica del PPM™



#### SECCIÓN 3: Composición / información sobre los ingredientes.

##### 3.1. Sustancia

No aplicable: el producto es una mezcla

##### 3.2. Mezcla

Nombre	Identificador de Producto	%	Clasificación (GHS-US)
--------	---------------------------	---	------------------------

Ingrediente propietario*	Propietario*	< 0.5*	Acute Tox. 4 (Oral), H302 Acute Tox. 4 (Inhalación: polvo, vapor), H332 Skin Corr. 1B, H314 Eye Dam. 1, H318 Resp. Sens. 1, H334 Skin Sens. 1, H317
--------------------------	--------------	--------	--

\*This information has been withheld as a trade secret

#### SECCIÓN 9: Propiedades físicas y químicas.

##### 9.1. Información sobre propiedades físicas y químicas básicas.

Estado físico	: Líquido
Color	: Claro a ámbar claro
Olor	: Neutro
Umbral de olor	: Datos no disponibles
pH	: 3.8
Punto de fusión	: Datos no disponibles
Punto de congelación	: Datos no disponibles
Punto de ebullición	: Datos no disponibles
Punto de inflamabilidad	: No aplica
Velocidad de evaporación relativa (acetato de butilo = 1)	: Datos no disponibles
Inflamabilidad (sólido, gas)	: No aplica
Límites de explosión	: Datos no disponibles
Propiedades explosivas	: Datos no disponibles
Propiedades oxidantes	: Datos no disponibles
Presión de vapor	: Datos no disponibles
Densidad relativa	: Datos no disponibles
Densidad relativa de vapor a 20 °C	: Datos no disponibles
Solubilidad	: Infinito en agua
Log Pow	: Datos no disponibles
Log Kow	: Datos no disponibles
Temperatura de autoignición	: Datos no disponibles
Temperatura de descomposición	: Datos no disponibles
Viscosidad	: Datos no disponibles
Viscosidad, cinemática	: Datos no disponibles
Viscosidad, dinámica.	: Datos no disponibles

**ANEXO 2. Evaluación de la factibilidad de los procedimientos de exposición secuenciales a los agentes desinfectantes**

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	5518.8	1379.70	13.81	0.000
Error	10	998.9	99.89		
Total	14	6517.7			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
BAP	3	0.317	0.208	(0.037, 0.596)
BAP/ANA	3	0.203	0.1320	(-0.0761, 0.4827)

Desv.Est. agrupada = 0.174308

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BAP	3	0.317	A
BAP/ANA	3	0.2033	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**ANEXO 3. Proliferación de yemas en *D. composita***

Promedio de brotación

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	0.01927	0.01927	0.63	0.470
Error	4	0.12153	0.03038		
Total	5	0.14080			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
BAP	3	0.317	0.208	(0.037, 0.596)
BAP/ANA	3	0.2033	0.1320	(-0.0761, 0.4827)

Desv.Est. agrupada = 0.174308

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BAP	3	0.317	A
BAP/ANA	3	0.2033	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

#### **ANEXO 4. Porcentaje de brotación**

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	202.9	202.9	0.66	0.464
Error	4	1238.5	309.6		
Total	5	1441.5			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
BAP	3	31.8	21.2	(3.5, 60.0)
BAP/ANA	3	20.12	12.96	(-8.08, 48.33)

Desv.Est. agrupada = 17.5965

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BAP	3	31.8	A
BAP/ANA	3	20.12	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANEXO 5. Capacidad de formación de brotes (CFB)

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	1	0.009418	0.009418	0.71	0.446
Error	4	0.052824	0.013206		
Total	5	0.062243			

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
BAP	3	0.1309	0.1553	(-0.0533, 0.3151)
BAP/ANA	3	0.0517	0.0480	(-0.1325, 0.2359)

Desv.Est. agrupada = 0.114918

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
BAP	3	0.1309	A
BAP/ANA	3	0.0517	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.