

Nota Técnica

Evaluación de almidón de maíz y sagú sobre el crecimiento *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*

Milagros Rondón Asuaje¹, María Claudia Sánchez–Cuevas^{1*} y Ramón Silva–Acuña²

¹Clínica Universitaria de Diagnóstico Agrícola (CUDA), Postgrado en Agricultura Tropical, Universidad de Oriente, Núcleo Monagas, Maturín-Venezuela. ²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Maturín, Monagas, Venezuela. *Correo electrónico: mcsanchez@udo.edu.ve

RESUMEN

El alto costo del agar ha tornado prohibitivo su uso en laboratorios de fitopatología y biotecnología; tal limitación exige la búsqueda de solidificantes alternativos para facilitar el proceso de investigación agrícola. Se realizaron ensayos con el objetivo de evaluar dosis de almidón de maíz y de sagú como agentes solidificantes, para sustituir el agar de los medios de papa-dextrosa-agar (PDA). El almidón de maíz (Maizina®) se evaluó en las dosis de 50, 75, 100 y 125 g.L⁻¹, y el sagú, almidón de tubérculos de *Maranta* sp, en las dosis de 60, 70, 80 y 90 g.L⁻¹. Para cada dosis evaluada se utilizó medio litro de la decocción de papa y 20 g de sacarosa por litro del medio de cultivo. Para ambos ensayos se colocó un tratamiento testigo de PDA. Del aislamiento de *S. rolfsii* proveniente de placas de Petri con PDA, se retiraron discos de la periferia de la colonia y se sembraron en las cápsulas de Petri de las dosis evaluadas de almidón de maíz y sagú. El crecimiento radial fue cuantificado a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la siembra del aislamiento del hongo. Se empleó el diseño experimental completamente aleatorio, con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. De acuerdo con los resultados obtenidos, la dosis más promisoría de almidón de maíz fue la de 125g.L⁻¹ y para el caso del sagú resultó la de 60g.L⁻¹. Ambos almidones pueden ser aprovechados como fuentes alternativas solidificantes para los medios de cultivo en condiciones de laboratorio.

Palabras clave: agar, almidón, cultivo de tejido, medio de cultivo.

Evaluation of cornstarch and sagú on *in vitro* growth of *Sclerotium rolfsii*

ABSTRACT

High cost of agar commonly employed in the preparation of culture media has become prohibitive in Venezuela. This situation requires searching for alternative sources of national origin to facilitate the process of agricultural research. This research was conducted with the aim of evaluating dose of cornstarch and sagú as solidifying agents to replace agar in potato dextrose agar (PDA) culture medium. Cornstarch obtained from the commercial product Maizina Americana®, was evaluated at dose of 50, 75, 100 and 125 g/l, and sagú starch obtained from the tuber *Maranta* sp at doses of 60, 70, 80 and 90g/l. For all doses was used 15 g of dextrose, 500 cc of the decoction of 200 g of potatoes and 20 g of sucrose per liter of culture medium. For each of the tests a control treatment with PDA alone was used. Discs were removed from the periphery of the colony from PDA plates with pure isolation of *S. rolfsii* and were planted in the petri dishes used to test doses of cornstarch and sagú. The radial growth of the fungus was quantified at 24, 48 and 72 h after planting. A completely randomized statistical design was used, with five treatments, four replications and the experimental unit consisted of four Petri dishes. According to the results obtained, the most promising cornstarch dose was 125 g/l and, in the case of sagú, was 60 g/l. Both may be employed as alternative sources for solidifying culture media used in laboratory conditions, particularly for *S. rolfsii*.

Key words: agar, starch, tissue culture, culture media.

Recibido: 26/07/17 Aprobado: 06/11/18

INTRODUCCIÓN

El aislamiento en cultivo puro de microorganismos en placas con agar se convirtió en una metodología standard en microbiología, desde que Robert Koch y sus colaboradores encontraron que el agar era un agente gelificante muy efectivo. En investigaciones recientes, se demuestra que otros agentes solidificantes permiten el crecimiento de algunos organismos que no se pueden cultivar en medios con agar (Tamaki *et al.* 2009). Los agentes solidificantes proveen la firmeza al medio e influyen en sus características de difusión (Das *et al.* 2015). En biotecnología, el éxito del cultivo de tejidos vegetales depende primordialmente del medio de cultivo. Este medio, además de poseer los requerimientos nutricionales de la especie, su efectividad obedece tanto de los ingredientes básicos como de los nutrimentos, azúcares y hormonas contenga y, de manera particular, del agente solidificante (Szabados *et al.* 1993).

El agente solidificante usado de manera tradicional es el agar (Puchooa *et al.* 1999). Es un compuesto inerte. Una sustancia coloidal disecada, que proviene de diversas algas rojas, que es estable a varias temperaturas, no tiene efectos tóxicos a la mayoría de los microorganismos, presenta buena difusión, no es digerida por la mayoría de las bacterias, es transparente y metabólicamente inerte. Por otro lado, su alto precio ha hecho que su utilización sea muy costosa y debido a su uso generalizado en laboratorios, las fuentes naturales del agar (*Gelidium*, *Gracillaria* y *Pterocladia*) están siendo sobre-explotadas, por lo que es imperativo buscar agentes solidificantes alternativos (Basu *et al.* 2015).

Para el caso específico del uso de medios en biotecnología, donde los volúmenes de medio de cultivo requeridos son altos, se generan elevados costos y la búsqueda de opciones de menor costo, ha sido uno de los objetivos más resaltantes en estos experimentos. Tanto Chacón *et al.* (2000) como Szabados *et al.* (1993) constataron que Gelrite® y Phytigel® representan una opción alentadora como agentes gelificantes y agregan que el uso del Phytigel® a 1,3 y 1,8 g.L⁻¹ favorece el crecimiento *in vitro* de *Dioscorea trifida* y *D. alata*. Por su parte Teixeira da Silva y Tanaka

(2009), en la propagación de cuerpos semejantes a protocormos de una orquídea *Cymbidium* híbrida, lograron superiores resultados al añadir 4 g.L⁻¹ de almidón de maíz y 4 g.L⁻¹ de agar en el medio de cultivo en lugar de agar solo (8 g.L⁻¹). También se han utilizado solidificantes alternativos para la conservación *in vitro* de cambur (AAB, subgrupo Mysore), tal como lo señalan Agrawal *et al.* (2010), quienes utilizaron Isabgol en el medio y obtuvieron una sobrevivencia del 100 % a los 12 meses, comparada con 79-83 % de agar y 51-57 % de Phytigel, además de una reducción del 59 % del costo del medio de cultivo, comparado con agar. Por su parte, Petrovski y Tillett (2012) señalan que se puede reducir el costo del solidificante para el cultivo de microorganismos al utilizar agar grado comestible en lugar del agar grado bacteriológico, comúnmente usado en la preparación de medios de cultivo en los laboratorios.

Otros agentes solidificantes, como la goma de xanthano, proveniente de la fermentación de la bacteria *Xanthomonas campestris*, ha sido utilizada exitosamente, sola o en combinación con agar, en la preparación de medios para el cultivo de hongos y bacterias y muchos de los microorganismos evaluados se desarrollaron mejor en los medios solidificados con xanthano solo o xanthano y agar que con agar solo (Babbar y Jain 2006). Una experiencia similar reportan Gangotri *et al.* (2012) al utilizar la goma Guar como gelificante en medio de cultivo de microorganismos. Así mismo, la goma Katira, proveniente de la corteza de *Cochlopermum religiosum*, ofrecen ventajas en relación al agar y puede sustituirlo de forma práctica para el cultivo de tejidos vegetales, sin que esto signifique disminución de la calidad del medio de cultivo (Jain y Babbar 2002).

La alternativa de uso de almidones, como fue señalado por Romay *et al.* (2006) y, más reciente, por Kwoseh *et al.* (2012), han abierto la posibilidad de emplear estos compuestos, por sus componentes amilosa y amilopectina (Alarcón y Dufour 2002). Los gránulos de almidón, al ser calentados entre 55 y 80 °C, absorben agua y se hinchan, aumentan varias veces su tamaño, y la gelificación forma una pasta o engrudo que

aporta consistencia al medio donde se encuentre agregado. Romay *et al.* (2006), constataron que el almidón AIM TF-351 podía sustituir al Phytigel® en la micropropagación de la yuca e indicaron que su valor es ocho veces más barato que el Phytigel®; estos resultados indican que el almidón es una alternativa económica como agente endurecedor de los medios de cultivo; sin embargo, al ser su consistencia viscosa, recomiendan no calentarlo sino colocar la cantidad requerida por el volumen de medio. También se ha reportado la formación de un mayor número de brotes en medios gelificados con almidón de yuca (Maliro y Lameck 2004), probablemente por el hecho de que el almidón de yuca actúa como una fuente de carbono adicional y de otros suplementos iónicos (Onuweme 1982). Otro factor que parece ser responsable por la respuesta favorable de los explantes a los almidones vegetales utilizados como gelificantes en los medios de cultivo, es la ausencia de inhibidores que están presentes en el agar (Puchooa *et al.* 1999).

Por su parte, Kwoseh *et al.* (2012) utilizaron almidón de yuca para solidificar medios para cultivar los hongos *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger* y concluyeron que los medios permitieron tanto el crecimiento como la esporulación de los hongos. Ante las posibilidades de uso de los almidones o alimentos que lo contengan como agentes solidificantes, esta tecnología podría constituirse en una alternativa de uso práctico en medios de cultivo para estudios de biología de hongos fitopatógenos y hacer más económica las labores en condiciones de laboratorio. Basados en los anteriores argumentos, la presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar diferentes dosis de almidón de maíz y sagú como agentes gelificantes del medio de cultivo. Se utilizó como indicador al hongo *Sclerotium rolfsii*, fitopatógeno que causa importantes pérdidas económicas en muchos cultivos comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental

Los experimentos se realizaron en condiciones de laboratorio, en la Clínica Universitaria

de Diagnóstico Agrícola (CUDA) adscrita al Postgrado de Agricultura Tropical del Núcleo Monagas de la Universidad de Oriente, Campus Juanico, Maturín, estado Monagas, Venezuela.

Tratamientos

El almidón de maíz obtenido del producto comercial Maizina Americana® de Alfonso Rivas & Cía., se usó como agente solidificante del medio de cultivo en dosis de 50; 75; 100 y 125 g.L⁻¹; y, el sagú, almidón obtenido artesanalmente del tubérculo de *Maranta* sp., se empleó en las dosis de 60; 70; 80 y 90 g.L⁻¹. Para cada una de las dosis evaluadas en ambos ensayos, se utilizó medio litro de la decocción de 200 g de papa y 20 g de sacarosa por litro de medio de cultivo, conjuntamente con la dosis correspondiente de almidón de maíz o sagú. Para el testigo, el medio se preparó con la misma cantidad de la decocción de la papa y de sacarosa, pero con 15 g de agar como agente gelificante (PDA).

Preparación de los medios de cultivo

En un Erlenmeyer de 2 L se colocaron 500 mL de la decocción de 200 g de papa, previamente filtrados en dos capas de gasa, y se le agregó los 20 g de sacarosa. De acuerdo a la constitución de los tratamientos se agregaron cada una de las dosis de almidón, luego se completó el volumen con agua, a un litro. La mezcla se mantuvo sobre agitación constante, a 100 °C en calentador-agitador Orbital PC-351. Los medios de cultivo fueron vertidos en cápsulas de Petri y colocados en envases porta placas, esterilizados en autoclave Market Forge a 1,5 libras de presión y 121 °C por 15 minutos (Rivero *et al.* 2013).

Cuantificaciones del crecimiento micelial

Durante el periodo de conducción de los ensayos, con una regla milimetrada, se cuantificó el diámetro de la colonia fúngica de *S. rolfsii*, en dos dimensiones por el reverso de las placas. Después de transcurridas 24; 48 y 72 horas de la siembra del aislamiento de *S. rolfsii* proveniente

de placas de PDA, y con el valor promedio de ambas medidas se calculó el área (cm²) de crecimiento micelial.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental para ambos experimentos fue el completamente aleatorio, con cinco tratamientos, cuatro repeticiones y la unidad experimental constituida por cuatro cápsulas de Petri. Las evaluaciones se realizaron a las 24, 48 y 72 horas, en unidades experimentales independientes en el tiempo.

Los valores provenientes de la variable área de crecimiento del aislamiento fúngico de *S. rolfsii*, fueron examinados mediante análisis de varianza y sus promedios comparados por la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad. Previo al análisis de varianza, los valores cuantificados se exploraron por el programa estadístico Infostat versión 2017 (Di Rienzo *et al.* 2017) en relación a la normalidad de los errores por la prueba de Shapiro Wilk y la de homogeneidad de varianza de Bartlett, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En ambos experimentos se cumplieron los supuestos de normalidad de los errores y de homogeneidad de varianza correspondientes a las pruebas de Shapiro-Wilk y de Bartlett, para realizar en análisis de varianza paramétrico.

Almidón de maíz

De manera general, a las 24 horas después de la siembra del aislamiento de *S. rolfsii* se observó la mayor área de crecimiento del hongo en el tratamiento con la mayor concentración de almidón de maíz. En este, el crecimiento en PDA convencional no superaba al crecimiento del hongo en las dosis de 60 y 75 g.L⁻¹. A las 48 horas se mantuvo la misma tendencia observada las 24 horas, en relación a la dosis más elevada; sin embargo, el crecimiento en área de la colonia de *S. rolfsii* en PDA supera las tres primeras dosis (50; 75 y 100 g.L⁻¹). A las 72 horas el área que se colonizó por el hongo, en el PDA, supera numéricamente a todas las dosis del almidón de maíz.

En el análisis de varianza (Cuadro 1) se constató diferencias entre tratamientos para las 24 y 72 horas en el crecimiento del área colonizada por *S. rolfsii*; mientras que, no se detectó diferencias entre los tratamientos a las 48 horas. Se observó (Cuadro 2) que a las 24 horas después de la siembra (HDS), del aislamiento de *S. rolfsii*, en el tratamiento con la dosis de 125 g.L⁻¹ la mayor área de crecimiento y difiere de las demás. Los otros tratamientos que presentaron menores áreas colonizadas por el patógeno son estadísticamente similares entre sí por la prueba de Tukey a 5 % de probabilidad.

A las 48 horas, se mantuvo tendencia numérica similar a la observada a las 24 horas de

Cuadro 1. Resumen del análisis de varianza de la variable diámetro de la colonia a las 24; 48 y 72 horas después de la siembra en los medios de cultivo con las dosis de almidón de maíz.

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios		
		Horas		
		24	48	72
Tratamientos	4	11,12**	178,60 ^{ns}	749,63**
Error	15	3,53	85,40	188,84**
CV (%)		30,01	34,87	36,00

Significativo a 1 % de probabilidad por la prueba de F; y NS=no significativo.

Cuadro 2. Valores promedios para las áreas de crecimiento del aislamiento de *Sclerotium rolfsii* en las diferentes dosis de almidón de maíz comparadas por la prueba de Tukey a 5 % de probabilidad.

Tratamientos (Maizina ² g.L ⁻¹)	Tiempo de cuantificación (horas)		
	24	48	72
50	4,13 c	16,57 a	24,17 b
75	6,40 b	25,99 a	25,99ab
100	6,09 bc	25,70 a	36,67 ab
125	8,79 a	34,95 a	48,88 ab
PDA ¹	5,89 bc	29,27 a	55,15 a

¹Medio de cultivo constituido de 200 g de papa, 15 g de agar y 20 g de sacarosa por litro de agua y en el medio de cultivo con maizina² este componente sustituyó al agar en cada una de las dosis indicadas.

crecimiento de la colonia fúngica, donde la mayor área colonizada correspondió al tratamiento con 125 g.L⁻¹, pero estadísticamente no se detectaron diferencias entre los tratamientos. Para el caso de la evaluación de las 72 horas, el tratamiento con PDA presentó la mayor área colonizada y, estadísticamente, entre los tratamientos estudiados solo difirió de la dosis de 50 g.L⁻¹; los demás tratamientos son estadísticamente similares entre sí por la prueba de Tukey a 5 % de probabilidad.

Sagú

De manera general, se puede observar en el Cuadro 4 que a las 24 horas del aislamiento de *S. rolfsii*, entre los medios de cultivo, el tratamiento con la mayor área de crecimiento fue la dosis de 70 g.L⁻¹; el tratamiento de 80 g.L⁻¹ presentó el menor crecimiento. A las 48 horas se observa que el mayor crecimiento de la colonia fúngica ocurrió en la dosis de 60 g.L⁻¹ y el menor crecimiento de la colonia se presenta en la dosis de 80 g.L⁻¹. A las 72 horas el mayor crecimiento se constata en el tratamiento control (PDA) y el menor en el tratamiento de 70 g.L⁻¹.

Por el análisis de varianza (Cuadro 3) se constató diferencias entre los tratamientos, en los tres

momentos de cuantificación del área colonizada por el hongo, en las cápsulas de Petri.

En relación a la comparación de los valores promedios por la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad (Cuadro 4) se observó a las 24 horas los tratamientos sagú 60 y 70 g.L⁻¹ presentaron el mayor crecimiento del aislamiento de *S. rolfsii*; estos fueron similares entre sí y difieren de los demás. El tratamiento constituido por el PDA presentó un comportamiento estadístico intermedio en relación al crecimiento del hongo, que también difiere de los demás. Finalmente, el grupo formado por los tratamientos con 80 y 90 g.L⁻¹ que son similares entre sí, difieren de los demás y presentan la menor área de crecimiento de la colonia fúngica de *S. rolfsii*.

A las 48 horas se observó que los tratamientos con sagú a 60 g.L⁻¹ y el PDA presentaron las mayores áreas de crecimiento del aislamiento fúngico; estos fueron estadísticamente similares entre sí y difieren de los demás, mientras que el tratamiento correspondiente a la dosis de 90 g.L⁻¹ formó un grupo intermedio de área colonizada; finalmente, las dosis de 70 y 80 g.L⁻¹ son similares entre sí y presentan las menores áreas de crecimiento de la colonia fúngica.

Cuadro 3. Resumen del análisis de varianza de la variable áreas de crecimiento de las colonias de *Sclerotium rolfsii*, a las 24; 48 y 72 horas después de la siembra en los medios de cultivo con las dosis de sagú.

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios		
		Horas		
		24	48	72
Tratamientos	4	0,50**	130,81**	667,62**
Error	15	0,02	17,53	44,31
CV (%)		8,08	14,86	16,22

Significativo a 1 % de probabilidad por la prueba de F.

Cuadro 4. Valores promedios para las áreas de crecimiento del aislamiento de *Sclerotium rolfsii* en las diferentes dosis de sagú comparadas por la prueba de Tukey a 5 % de probabilidad.

Tratamientos (sagú g.L ⁻¹)	Tiempo de cuantificación (horas)		
	24	48	72
60	2,07 a	35,29 a	51,27 a
70	2,15 a	23,30 b	25,89 b
80	1,26 c	21,38 b	27,82 b
90	1,41 c	30,14 ab	44,35 a
PDA ¹	1,75 b	30,71 a	54,60 a

¹Medio de cultivo constituido de la decocción de 200 g de papa, 15 g de agar y 20 g de sacarosa por litro de agua. En el medio de cultivo empleando sagú, el agar fue sustituido por las dosis indicadas.

A las 72 h se observó la formación de dos grupos estadísticos por la prueba de Tukey a 5 % de probabilidad, el primero formado por los tratamientos con las dosis de 60 y 90 g.L⁻¹ de sagú y el PDA (Testigo), con los mayores valores de área colonizada y similar entre sí. Por el otro lado, el segundo grupo constituido por los tratamientos con 70 y 80 g.L⁻¹ que presentaron las menores áreas de crecimiento, similares entre si y diferentes de los demás. No se observó ninguna variación visible en las características de las colonias fúngicas en las diferentes dosis de sagú evaluadas.

Los resultados estadísticos de esta investigación consolidan que hasta las 72 h el área de crecimiento de la colonia de *S. rolfsii* hubo similitud entre el tratamiento PDA (testigo) y la dosis de 125 g.L⁻¹ de almidón de maíz. Esa dosis siempre estuvo entre los mejores tratamientos en las evaluaciones realizadas a 24 y 48 h en área de crecimiento del fitopatógeno. Para el caso del sagú, la dosis de 60 g.L⁻¹ de forma consistente superó en área de crecimiento en las dos primeras evaluaciones (24 y 48 h) al tratamiento PDA y, de manera similar a las 72 h fue estadísticamente similar al testigo PDA. Estos hallazgos

consolidan la efectividad de uso del almidón de maíz y del sagú como gelificantes, más aún cuando *S. rolfsii* exhibió un crecimiento normal durante el período de evaluación en todos los tratamientos.

La alternativa de uso del almidón de maíz y del sagú como agentes solidificantes ofrecen una opción en laboratorios donde se emplea con frecuencia medios de cultivos, tanto en estudios de naturaleza fitopatológica como biotecnológica, siendo el primero un almidón manufacturado y el otro un almidón extraído artesanalmente de un tubérculo. Los resultados de estos ensayos, al igual que los obtenidos por Mateen *et al.* (2012) con la goma Guar, producto veinte veces más barato que el agar, que permitió la formación de un mayor número de esporas de los hongos *Alternaria solani* y *Trichoderma harzianum* y el crecimiento de colonias de mayor diámetro de *Alternaria alternata* y *T. harzianum* que el agar, señalan la posibilidad de utilizar otros gelificantes alternativos para el cultivo de hongos fitopatógenos *in vitro*. Sin embargo, Puchooa *et al.* (1999) encontraron que el almidón de maíz, a una dosis de 90 g.L⁻¹, indujo la formación del menor número de brotes y el peso fresco y seco más bajo de explantes que los otros gelificantes utilizados en el ensayo de cultivo de tejidos de tabaco.

Kuria *et al.* 2008 resaltan la importancia de utilizar almidones como gelificantes de medios de cultivo para micropropagación, debido a su bajo costo comparado con el agar, disponibilidad en países de bajos recursos. Señalan que la menor fuerza gelificante de los almidones puede resolverse incrementando la dosis del almidón, agregando agar en bajas concentraciones o modificando la composición química de los almidones para incrementar su fuerza solidificante. Estos investigadores destacan la necesidad de continuar las investigaciones en el uso de este compuesto, como solidificante de medio de cultivo. Ante la posibilidad de uso de los almidones o alimentos que los contengan y que actuarían como agentes gelificante, se abre otra alternativa válida y de uso práctico en condiciones de laboratorio para paliar los elevados costos que

implican el empleo del agar, componente importado, como agente solidificante en los medios de cultivo.

CONCLUSIONES

Tanto el almidón de maíz (Maizina) como el sagú pueden ser empleados como fuentes solidificantes alternativas para los medios de cultivo empleados en condiciones de laboratorio, en relación al crecimiento de la colonia de *S. rolfsii*.

La dosis de almidón de maíz más promisorio fue 125 g.L⁻¹ y para el caso del sagú fue 60 g.L⁻¹.

LITERATURA CITADA

- Agrawal, A; Sanayaima, R; Tandon, R; Tyagi, RK. 2010. Cost-effective *in vitro* conservation of banana using alternatives of gelling agent (isabgol) and carbon source (market sugar). *Acta Physiologiae Plantarum* 32(4):703-711.
- Alarcón M, F; Dufour, DL. 2002. Almidón agrario de yuca en Colombia. In: Ospina P., Bernardo; Ceballos, Hernán; Álvarez, Elizabeth; Bellotti, Anthony C.; Calvert, Lee A.; Arias V., Bernardo; Cadavid L., Luis Fernando; Pineda L., Benjamín; Llano R., Germán Alberto; Cuervo, Maritza I. (eds.). La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Consorcio Latinoamericano para la Investigación y el Desarrollo de la Yuca; Proyecto IP-3 de Mejoramiento de Yuca, Cali, CO. (Publicación CIAT N° 327). p. 470-502.
- Babbar, SB; Jain, R. 2006. Xanthan Gum: An Economical Partial Substitute for Agar in Microbiological Culture Media. *Current Microbiology* 52(4):287-292.
- Basu, S; Bose, C; Ojha, N; Das, N; Das, J; Pal, M; Khurana, S. 2015. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation* 11(4):182-184.
- Das, N; Tripathi, N; Basu, S; Bose, C; Maitra, S; Khurana, S. 2015. Progress in the

- development of gelling agents for improved culturability of microorganisms. *Frontiers in Microbiology* 6(698):1-7.
- Di Rienzo JA; Casanoves F; Balzarini MG; González L; Tablada M; Robledo CW. 2017. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Gangotri, W.; Jain-Raina, R.; and Babbar, SB. 2012. Evaluation of guar gum derivatives as gelling agents for microbial culture media. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2279–2285.
- Jain, N; Babbar, SB. 2002. Gum katira - a cheap gelling agent for plant tissue culture media. *Plant Cell, tissue and Organ Culture* 71(3):223-229.
- Kuria, P; Demo, P; Nyende, AB; Kahangi, EM. 2008. Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the in vitro micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology* 7(3):301-307.
- Kwoseh, CK; Asomani-Darko, M; Adubofour, K. 2012. Cassava starch-agar blend as alternative gelling agent for mycological cultura media. *Botswana Journal of Agricultura Applied Sciences* 8(1):8-15.
- Maliro, MFA; Lameck, G. 2004. Potential of cassava flour as a gelling agent in media for plant tissue cultures. *African Journal of Biotechnology* 3(4):244-247.
- Mateen, A; Hussain, S; Rehman, SU; Mahmood, B; Khan, MA; Rashid, A; Sojail, M; Farooq, M; Shah, SJA. 2012. Suitability of various plant derived gelling agents as agar substitute in microbiological growth media. *African Journal of Biotechnology* 11(45):10362-10367.
- Onuweme, IC. 1982. *The Tropical Crops, Yams, Cassava, Sweet potatoes and Cocoyams*; University of Ife; Ile-Ife, Nigeria, 145p.
- Petrovski, S; Tillett, D. 2012. Back to the kitchen: food-grade agar is a low-cost alternative to bacteriological agar. *Anal. Biochem.* 429(2):140-145.
- Puchooa, D; Purseramen, PN; Rujbally, BR. 1999. Effects of medium support and gelling agent in the tissue culture of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Science and Technology* 3:129-144.
- Rivero C; Sánchez-Cuevas MC; Silva-Acuña, R. 2013. Evaluación de extractos acuosos de diferentes especies vegetales para el control *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Revista Científica UDO Agrícola* 13(1):66-70.
- Romay, G; Matheus, J ; Gerstl, A; Rueda, R; Santana, M. 2006. Almidón modificado de yuca como sustituto económico del agente solidificante para medios de cultivo de tejidos vegetales. *Interciencia* 31(9):1-7.
- Szabados, L; Nuñez, V; Tello, L; Mafla, G; Roa, J; Rocca, W. 1993. Agentes geletinizadores. En: Rocca, W. y Mroginski, L (Eds). *Cultivo de Tejidos Vegetales en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT, Colombia, 1-4 p.
- Tamaki, H.; Hanada, S; Sekiguchi Y; Tanaka Y; Kamagata Y. 2009. Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environmental Microbiology* 11(7):1827-1834.
- Teixeira da Silva, JA; and Tanaka, M. 2009. Impact of Gelling Agent and Alternative Medium Additives on Hybrid Cymbidium Protocorm-like Body and Callus Formation. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 3(1):56-58.