Establecimiento de protocolo de encapsulado de embriones somáticos de zanahoria (*Daucus carota* L.) y meristemos axilares de camote (*Ipomoea batatas* L.)

Darío Diógenes Rueda Kunz

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Establecimiento de protocolo de encapsulado de embriones somáticos de zanahoria (*Daucus carota* L.) y meristemos axilares de camote (*Ipomoea batatas* L.)

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

Presentado por

Darío Diógenes Rueda Kunz

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2017

Establecimiento de protocolo de encapsulado de embriones somáticos de zanahoria (*Daucus carota* L.) y meristemos axilares de camote (*Ipomoea batatas* L.)

Darío Diógenes Rueda Kunz

Resumen. La producción de semilla artificial (SA) es una técnica utilizada en la micropropagación, consistiendo en encapsular órganos y embriones somáticos (ES). El objetivo de este estudio fue establecer un protocolo de encapsulado de ES de zanahoria y meristemos axilares de camote observando el efecto de almacenarlos en frío. El encapsulado se realizó tomando el material vegetal y mezclándolo en una solución de alginato de sodio (138.9 mM). Se preparó una solución de cloruro de calcio dihidratado (75 mM) y en esta se depositó por goteo el alginato con el material vegetal obteniendo un embrión o meristemo por cápsula. Las SA fueron almacenadas a 4 °C por 7, 14, 21 o 28 días utilizando 30 repeticiones por tratamiento. En cada tratamiento se retiraron las semillas artificiales del frío y se colocaron en el cuarto de crecimiento. El porcentaje de germinación se calculó a los 14 días de estar en el cuarto de crecimiento para zanahoria y para camote la brotación hasta el día 80. El protocolo de encapsulado de ES fue satisfactorio formando la SA. El porcentaje de germinación de zanahoria fue 83% sin tratamiento de frío. A partir del día 14 de refrigeración la germinación de la SA de zanahoria disminuyó 70%. El mismo protocolo se aplicó con éxito en los meristemos de camote, formando la SA. La brotación de camote fue menor al 9% y no significativa con frío. Mediante el uso de este protocolo se obtienen SA con diferentes materiales vegetales pero tratamientos de frío reducen su viabilidad.

Palabras clave: Embriogénesis somática, preservación *in vitro* de órganos, semilla sintética.

Abstract. The production of an artificial seed (SA) is a technique used in micropropagation, consisting in the encapsulation of organs and somatic embryos (ES). This study objective was to stablish an encapsulation of ES of carrots and axillar meristems of sweet potato analyzing the effects of cold temperature storage. The encapsulation was done using the vegetal material and mixing it with a sodium alginate solution (138.9 mM). A dehydrated calcium chloride solution (75 mM) was prepared and in this, the alginate and the vegetal material was deposited by dripping obtaining an embryo or a meristem per capsule. The SA where storage at 4°C for 7, 14, 21 or 28 days using 30 repetitions per treatment. In each treatment the SA was retired of the cold and put it in the growth room. The percentage of germination for carrots was calculated during the day 14 of being in the growth room and in the day 80 for the sweet potato sprout. The encapsulation protocol of ES was satisfactory forming the SA. The percentage of the carrot germination was 83% without cold treatment. Beginning at day 14 of refrigeration the germination of the SA carrots decrease in a 70% putting it in the growth room. The same protocol was applied with succeed for sweet potato meristems, forming the SA. The sprout was less than 9% and had no significance with cold. Following the protocol, SA can be obtained with different vegetal materials but cold treatments reduce is viability.

Key Words: *In vitro* preservation organs, somatic embryogenesis, synthetics seeds.

CONTENIDO

Portadilla i
Página de firmas ii
Resumen iii
Contenido iv
Índice de Cuadros y Figuras v

1. INTRODUCCIÓN 1

2. METODOLOGÍA 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 9

4. CONCLUSIONES 15

5. RECOMENDACIONES 16

6. LITERATURA CITADA 17

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros Página

1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para la inducción *in vitro* de callo y posterior inducción de embriones somáticos a partir de raíces de zanahoria. 4
2. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog al ¼ de concentración utilizado como matriz para encapsulado de embriones somáticos y meristemos de camote y como medio de germinación / brotación de estos. 5
3. Medio de cultivo de Murashige y Skoog modificado para la multiplicación de Camote. 8
4. Efecto del almacenamiento en frío en la germinación de semillas artificiales de zanahoria. 10
5. Efecto del almacenamiento en frío en la brotación de semillas artificiales de camote. 13

Figuras Página

1. Semilla artificial de zanahoria: A) forma irregular, B) forma de lágrima y C) Embrión somático de zanahoria encapsulado y posicionado cerca de la pared. 9
2. Plántula de zanahoria formada a partir de un embrión somático encapsulado después de 14 días. 10
3. Embrión somático de zanahoria: A) deforme después de germinar, B) sin germinar. 11
4. Semilla artificial de zanahoria contaminada. 12
5. Semilla artificial de camote con forma de lágrima. 12
6. Meristemo axilar presentando necrosis por tratamiento en frío. 13
7. Semilla artificial de camote presentando brotación después de 80 días. 14

1. INTRODUCCIÓN

La semilla es el órgano reproductivo más importante en las plantas terrestres. Tiene funciones como renovar, persistir y dispersar poblaciones de plantas, también regenerar bosques y formar parte de la sucesión ecológica. Al hablar de los usos para humanos o animales es una fuente de alimentación, ya sea directa o indirectamente como uso industrial (Campbell y Reece 2005).

En referencia a lo descrito previamente, la semilla es la encargada de generar vida gracias a que guarda nutrientes y puede absorber el agua que está a su alrededor. Estas dos cualidades dan lugar a la germinación de la planta. Se tendrá la raíz, para luego desarrollarse el tallo con los cotiledones, llamándosele plántula (Morales y Cano 2012).

Los nutrientes de las semillas en el endospermo, son fuente de carbohidratos, proteína y lípidos que ayudan al proceso de germinación. Sin embargo existen plantas que tienen muy poco hasta nada de endospermo – ahí radica el problema. Es en estas plantas que la germinación se alarga, o la creación de simbiosis con otros organismos. En el afán de encontrar una solución al problema, investigadores y productores crean un nuevo sistema de propagación con la semilla artificial o sintética que cumple las mismas funciones que una semilla normal (Morales y Cano 2012).

La formación de la semilla artificial tiene un componente principal que es el alginato de sodio, que es un polisacárido obtenido de algas marinas. Tiene características como rigidez, elasticidad y flexibilidad. Una de las propiedades interesantes del alginato es su capacidad gelatinizante, al entrar en contacto con una solución que contenga calcio (Avendaño-Romero et al. 2013).

La semilla sintética se diferencia de la semilla normal ya que su embrión es somático, es decir que se creó por medio de la embriogénesis somática gracias a la producción de callos obtenidos de un explante. A esto se le añade la presencia de un endospermo y una cubierta, ambos creados artificialmente (Khor y Loh 2005).

El primero en presentar el concepto de semilla sintética fue Murashige, pero no fue hasta pasados los años 1980 que empezó a tener éxito (Longfang et al. 2014). Una ventaja significativa que brinda la producción de semillas sintéticas es la reducción de los costos de propagación vegetal (González et al. 2004). Otras ventajas son una estructura intacta, volumen pequeño, rápida propagación y que se puede obtener fuera de época en ambiente favorable (Longfang et al. 2014).

El almacenamiento de semillas artificiales es un factor crítico para mantener la viabilidad del material encapsulado. Las formas de almacenamiento dependen del tiempo que se conservará la semilla artificial: corto, mediano o largo plazo. En las de corto y mediano plazo por lo general se utilizan métodos de baja temperatura sobre cero grados. En los de largo plazo se usan las inmersiones en nitrógeno líquido (Benelli 2016).

La semilla sintética con el encapsulado de embriones somáticos tiene un rol relevante en la biotecnología, específicamente en la propagación masiva de especies élite (Lee-Espinosa et al. 2009). Además de avances en la encapsulación de embriones somáticos se han observado avances en raíces, brotes y yemas, con el propósito de regenerar plantas medicinales (Vdovitchenko y Kuzovkina 2011).

Se encapsulan mayormente brotes axilares y apicales que tienen un meristemo de raíz, sin embargo también es posible encapsular brotes sin una inducción a formar raíces. Por ejemplo brotes de banana y brotes de manzana, este último induciendo raíz con ácido indol butírico. De igual manera se ha logrado encapsular protocormos de diferentes especies de orquídeas, mejorando la salud de las plantas y la facilidad de adaptación durante la liberación en diferentes sustratos (Ara et al. 2000). Por lo anterior expuesto, los objetivos de este estudio fueron los siguientes:

- Establecer el protocolo de encapsulado de embriones somáticos de zanahoria y observar el efecto del almacenamiento en frío.

- Evaluar el protocolo de encapsulado de meristemos axilares de camote y observar el efecto del almacenamiento en frío.

2. METODOLOGÍA

Localización del estudio.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras.

Experimento de encapsulado de embriones somáticos en zanahoria.

Material vegetal. El material vegetal para la investigación fueron raíces de zanahoria, de las que se extrajo láminas de 1 mm de espesor de cambium con xilema.

Desinfección superficial del material vegetal. La desinfección del material se realizó con una inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% $^{v}/_{v}$ (ingrediente activo 4.72 %) por 15 minutos en la solución desinfectante.

Medio de cultivo. El medio de cultivo para la inducción a callogénesis, proliferación de callo e inducción a embriones somáticos (ES) fue el medio de Murashige y Skoog (MS) modificado por Reinert y Yeoman (1982) (Cuadro 1). El pH de los medios fue ajustado a 5.8 y cuando se requirió se solidificó con 1.8 g/L de Phytagel®.

Protocolo de encapsulado. Se usó el protocolo de Wake et al. (1992). El proceso de encapsulamiento de los embriones somáticos se realizó tomando el material vegetal en el estado embrionario de torpedo y mezclándolo en una solución preparada con 0.6 gr de alginato de sodio disuelto en 20 ml de matriz estéril (Alginato de Na 138.9 mM). La matriz consiste en el medio MS a ¼ de concentración (¼ MS) (Cuadro 2). A continuación, se preparó una solución que contenía 0.438 gr de cloruro de calcio dihidratado disuelto en 40ml de agua destilada estéril ($CaCl_2.2H_2O$ 75 mM). Los ES con el alginato de sodio fueron tomados con una jeringa de 10 ml y depositados gota por gota en la solución de cloruro de calcio, con el objetivo de obtener un ES por gota.

Cuadro 1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para la inducción *in vitro* de callo y posterior inducción de embriones somáticos a partir de raíces de zanahoria.

Componentes	**Fórmula**	**Nombre Común**	**mg/L**
Macroelementos	$CaCl_2.2H_2O$	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO_3	Nitrato de potasio	1900.000
	$MgSO_4.7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	1650.000
Microelementos	H_3BO_3	Ácido bórico	6.200
	$CoCl_2.6H_2O$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	$CuSO_4.5H_2O$	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	$MnSO_4.4H_2O$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	Molibdato de sodio bihidratao	0.250
	$ZnSO_4.7H_2O$	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	50.000
Vitaminas		Tiamina	0.100
		Piridoxina	0.100
		Ácido Nicotínico	0.500
Aminoácido		Glicina	3.000
Fitohormonas		2,4-D	0.050
Carbohidrato		Sacarosa	20000.000

Fuente: Reinert y Yeoman (1982)

Cuadro 2. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog al ¼ de concentración utilizado como matriz para encapsulado de embriones somáticos y meristemos de camote y como medio de germinación / brotación de estos.

Componentes	**Fórmula**	**Nombre Común**	**mg/L**
Macroelementos	$CaCl_2.2H_2O$	Cloruro de calcio bihidratado	110.00000
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	42.50000
	KNO_3	Nitrato de potasio	475.00000
	$MgSO_4.7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratado	92.50000
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	412.50000
Microelementos	H_3BO_3	Ácido bórico	1.55000
	$CoCl_2.6H_2O$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.00625
	$CuSO_4.5H_2O$	Sulfato de cobre pentahidratado	0.00625
	KI	Yoduro de potasio	0.20750
	$MnSO_4.4H_2O$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	5.57500
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	Molibdato de sodio bihidratao	0.06250
	$ZnSO_4.7H_2O$	Sulfato de zinc heptahidratado	2.15000
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	12.50000
Vitaminas		Tiamina	0.10000
		Piridoxina	0.12500
		Ácido Nicotínico	0.12500
		Inositol	25.00000
Carbohidrato		Sacarosa	7500.00000

Fuente: Murashige y Skoog 1962

Evaluación de germinación de los embriones somáticos. Después del encapsulado se transfirió las semillas sintéticas al medio ¼ MS y luego se colocaron en el cuarto de crecimiento a 24-26 °C, 70 % de humedad, 16 horas luz por 14 días (2 klx). Otras semillas artificiales se colocaron a 4°C suspendidas en agua destilada estéril por 7, 14, 21 o 28 días. Al terminar el periodo de frío estas semillas artificiales también fueron puestas a germinar en el medio ¼ MS con los mismos parámetros descritos al inicio.

Diseño experimental y análisis estadístico. El diseño experimental que se usó fue un Diseño Completo al Azar con cinco tratamientos, cada tratamiento con 30 repeticiones. Los tratamientos evaluados fueron:

1. Refrigeración 0 días. Después de encapsulado los ES se colocaron en el medio ¼ MS y luego en el cuarto de crecimiento.
2. Refrigeración 7 días. Después de encapsulado los ES se colocaron a 4°C por 7 días.
3. Refrigeración 14 días. Después de encapsulado los ES se colocaron a 4°C por 14 días.
4. Refrigeración 21 días. Después de encapsulado los ES se colocaron a 4°C por 21 días.
5. Refrigeración 28 días. Después de encapsulado los ES se colocaron a 4°C por 28 días.

Todas las semillas artificiales, luego del período de refrigeración, fueron colocadas a germinar en el medio ¼ MS y colocadas en el cuarto de crecimiento. Para el análisis estadístico se utilizó estadística descriptiva y un análisis de varianza y una separación de medias con prueba Duncan exigiendo un nivel de significancia ($P \leq 0.05$), usando el programa SAS 9.3.

Variables evaluadas. Se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas después de 14 días de colocadas en el cuarto de crecimiento. Las semillas fueron previamente expuestas por 0, 7, 14, 21 o 28 días a 4°C.

Experimento encapsulado de meristemos de camote.

Material vegetal. Como material vegetal de investigación se utilizó meristemos de camote (MC) que extrajeron de *vitro* plántulas que se encontraban en etapa de multiplicación, subcultivo 2.

Medio de cultivo. El medio de cultivo donde se establecieron los meristemos de camote fue el de Murashige y Skoog modificado por Jarret (1991) (Cuadro 3). El pH de los medios fue ajustado a 5.8 y cuando se requirió se solidificó con 1.8 g/L de Phytagel®.

Protocolo de encapsulado. Para el encapsulado usaremos el protocolo de Wake et al. (1992) descrito en el experimento de zanahoria.

Evaluación de brotación de meristemos. Después del encapsulado se transfirió los meristemos encapsulados al medio MS modificado para camote (Cuadro 3) y luego se colocaron en el cuarto de crecimiento a 24-26 °C, 70 % de humedad, 16 horas luz (2 klx). Otros meristemos encapsulados se colocaron a 4°C en el medio de mantenimiento ¼ MS por 7, 14, 21 o 28 días. Al terminar el período de frío también fueron puestos a brotar en el medio MS modificado para camote con los mismos parámetros descritos al inicio.

Diseño experimental y análisis estadístico. El diseño experimental fue un Diseño Completo al Azar con cinco tratamientos, cada tratamiento con 20 repeticiones. Los tratamientos evaluados fueron:

1. Refrigeración 0 días. Después de encapsulado los MC se colocaron en el medio MS modificado para Camote y colocadas en el cuarto de crecimiento.
2. Refrigeración 7 días. Después de encapsulado los MC se colocaron a 4°C por 7 días.
3. Refrigeración 14 días. Después de encapsulado los MC se colocaron a 4°C por 14 días.
4. Refrigeración 21 días. Después de encapsulado los MC se colocaron a 4°C por 21 días.
5. Refrigeración 28 días. Después de encapsulado los MC se colocaron a 4°C por 28 días.

Todos los tratamientos, luego del período de refrigeración, fueron colocados para germinar en el medio MS modificado para camote y colocados en el cuarto de crecimiento Para el análisis estadístico se utilizó estadística descriptiva y un análisis de varianza y una separación de medias con prueba Duncan exigiendo un nivel de significancia ($P \leq 0.05$), usando el programa SAS 9.3.

Variables evaluadas. Se evaluó el porcentaje de brotación de los meristemos encapsulados después de 14 días de colocados en el cuarto de crecimiento. Estos meristemos encapsulados fueron previamente expuestos por 0, 7, 14, 21 o 28 días a 4°C.

Cuadro 3. Medio de cultivo de Murashige y Skoog modificado para la multiplicación de Camote.

Componentes	**Fórmula**	**Nombre Común**	**mg/L**
Macroelementos	$CaCl_2.2H_2O$	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO_3	Nitrato de potasio	1900.000
	$MgSO_4.7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	1650.000
Microelementos	H_3BO_3	Ácido bórico	6.200
	$CoCl_2.6H_2O$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	$CuSO_4.5H_2O$	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	$MnSO_4.4H_2O$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	Molibdato de sodio bihidratao	0.250
	$ZnSO_4.7H_2O$	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	50.000
Vitaminas		Tiamina	1.000
		Inositol	100.000
Carbohidrato		Sacarosa	70000.000

Fuente: Jarret (1991)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento de encapsulado de embriones somáticos en zanahoria.
En el proceso de encapsulado de embriones somáticos se obtuvieron semillas encapsuladas con forma de lágrima y forma irregular (Figura 1). Esta variabilidad en la forma de la semilla se debe a la altura a la que se sostuvo la jeringa de 10 ml al momento de goteo. Esto concuerda con lo expuesto por Lee et al. (2013) en el documento sobre el tamaño y textura de ES encapsulados con alginato de calcio, que si la jeringa se sostiene a una altura de ≤ 3 cm se obtiene semillas con forma de lágrima. Pero si se sostiene a mayor altura se obtiene formas de perla, irregular, esférica y ovalada. También se observó en el encapsulado que los embriones quedan por lo general en la parte inferior de la semilla muy cerca de su pared (Figura 1C).

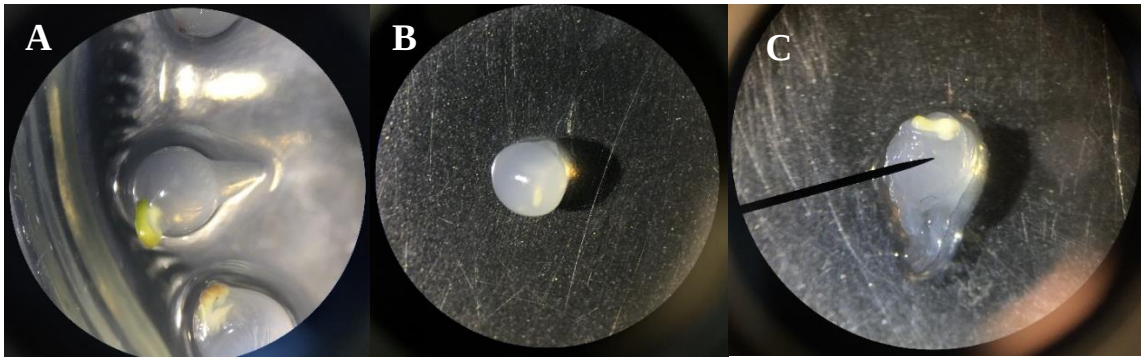

Figura 1. Semilla artificial de zanahoria: A) forma irregular, B) forma de lágrima y C) Embrión somático de zanahoria encapsulado y posicionado cerca de la pared.

La cantidad de semillas artificiales que germinó fue visiblemente afectada por la exposición al frío y se vio una reducción en la germinación a medida que aumentaron los días en refrigeración. Para el tratamiento 0 días en frío se obtuvo el mayor porcentaje de germinación de los embriones (Figura 2) ya que no fueron expuestos a ningún tratamiento de frío (Cuadro 4), aunque esto no concuerda con los datos obtenidos por Wake et al. (1992) que trabajaron en la germinación mejorada de semillas artificiales usando extractos de cianobacterias marinas, dando su prueba control solo un 35% de germinación. Esto pudo haber sido causado porque colocaron las semillas juntas en un plato Petri a germinar, provocando una competencia de nutrientes y espacio entre las mismas, reduciendo así el porcentaje de germinación. Un estudio similiar al nuestro fue el de Lee-Espinosa et al. (2009), en el que encapsularon embriones somáticos de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* con el resultado que diferentes concentraciones de 6-benzilaminopurina (BAP) mejoraron hasta un 80 % la germinación.

Cuadro 4. Efecto del almacenamiento en frío en la germinación de semillas artificiales de zanahoria.

Almacenado (días) a 4°C	Semilla total (N°)	Sí germinaron (N°)	% germinación
0	40	33	83a¥
7	17	13	76a
14	20	5	25b
21	16	3	13b
28	15	1	7b

CV: 29.04%

¥: Los porcentajes de germinación con letras diferentes indican una diferencia significativa ($P \leq 0.05$)

Figura 2. Plántula de zanahoria formada a partir de un embrión somático encapsulado después de 14 días.

Del día cero al día 28 hubo una reducción en la germinación del 76%, probablemente una respuesta al tratamiento de frío que se le dio durante diferentes días. Aunque hay también estudios que indican que las concentraciones muy altas de alginato (> 2%) provocan limitaciones mecánicas o de difusión, afectando la germinación (Kersulec et al. 1993 y Bazinet et al. 1992). A esto le añadimos el encapsulado de embriones somáticos de *Dalbergia sissoo* por parte de Singh y Chand (2010), quienes también obtuvieron una germinación del 21% al almacenar por 30 días.

Tambien los embriones somáticos de *Asparagus cooperi* encapsulados por Ghosh y Sen (1994) lograron obtener solo un 30% de germinación después de almacenarlos por 15 días a 4°C. Datos muy parecidos a los nuestros. Un tratamiento de frío como preservante de las semillas artificiales usando embriones somáticos de *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii* redujo la

germinación hasta en un 25 % al añadir BAP después de 30 días almacenado. (Lee-Espinosa et al. 2009).
Según Redenbaugh et al. (1987) es muy probable que la exposición de los embriones encapsulados al frío inhiba la respiración del material vegetal por las concentraciones del alginato. A pesar de estas limitantes hubo semillas artificiales que germinaron, aunque con deformidades (Figura 3).

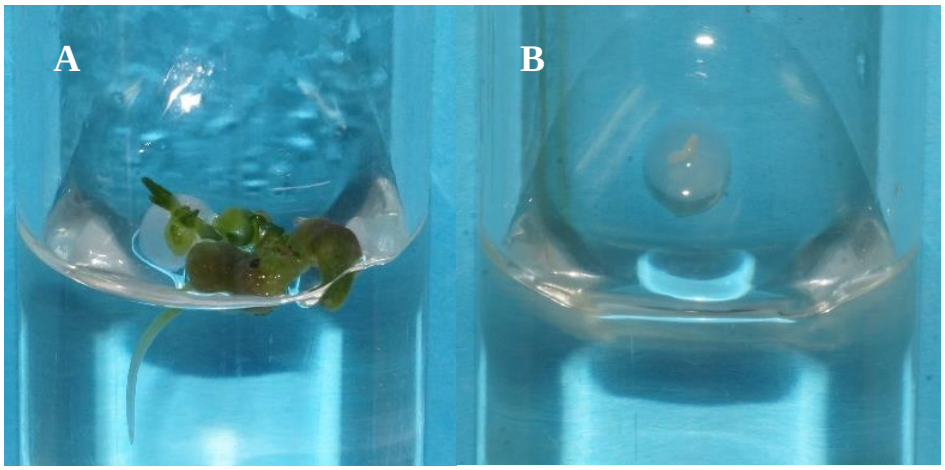

Figura 3. Embrión somático de zanahoria: A) deforme después de germinar, B) sin germinar.

Las semillas artificiales contaminadas en un promedio en los cinco tratamientos fueron de un 25 %. Uno de los causantes pudo haber sido que en el procedimiento del encapsulado no se realizó la esterilización del alginato de sodio, todo lo demás si se esterilizó. Para evitar esto, Lee et al. (2013) recomiendan que se exponga el alginato de sodio en polvo a irradiación de rayos gamma y óxido de etileno. Aunque esta tecnología de irradiación podría generar un cambio a las características físicas y químicas del alginato se logra la esterilización requerida.

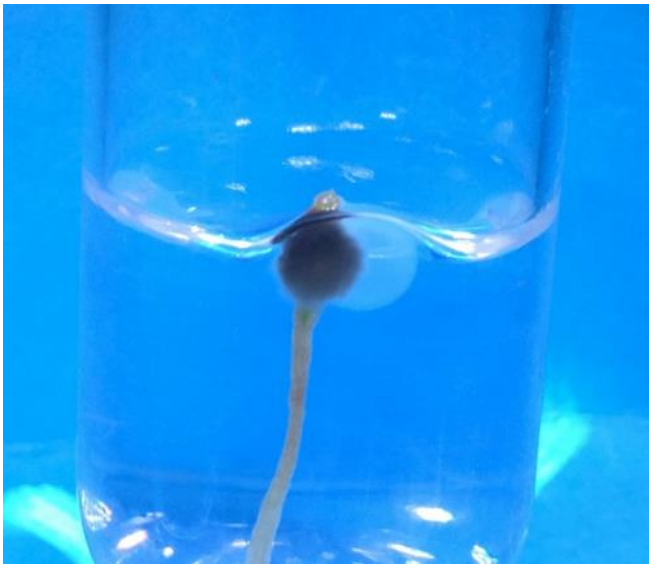

Figura 4. Semilla artificial de zanahoria contaminada.

Experimento encapsulado de meristemos de camote.

Para el experimento del cultivo de camote se obtuvo semillas artificiales con forma uniforme, ya que la jeringa se sostuvo entre 3 a 5 cm de altura. En este caso solo se obtuvieron formas en lágrima (Figura 5).

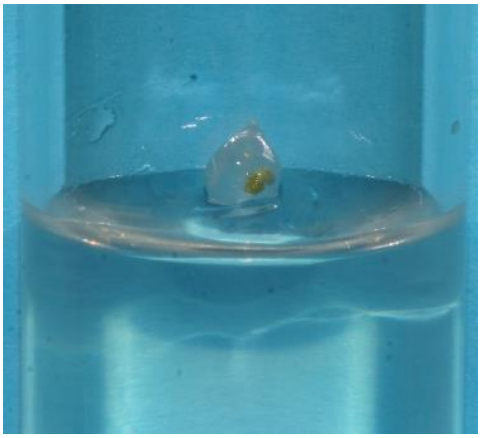

Figura 5. Semilla artificial de camote con forma de lágrima.

Los meristemos axilares expuestos a 4°C no presentaron brotación ni crecimiento alguno (Figura 6) (Cuadro 5). Nuestros datos no concuerdan con los datos obtenidos por Micheli et al. (2017), que encapsularon microcortes de *Morus nigra* L. con la inclusión de BAP en la matriz de encapsulado con su posterior almacenamiento en frío. Ellos obtuvieron hasta un 40 % de brotación después de este tratamiento. Lo que indica que es necesario añadir esta fitohormona a la matriz de encapsulado.

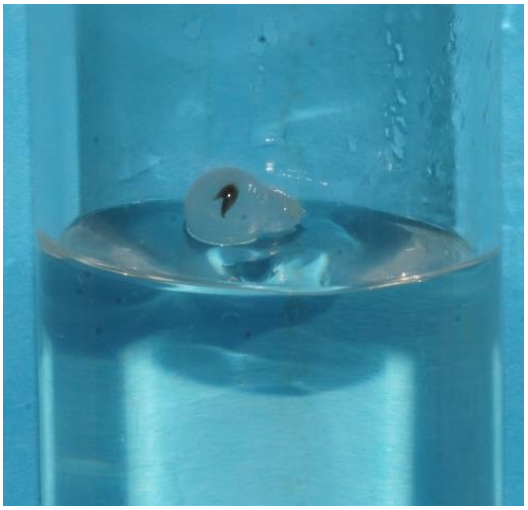

Figura 6. Meristemo axilar presentando necrosis por tratamiento en frío.

Los meristemos axilares sin almacenamiento en frío presentaron 8% de brotación después de 80 días en crecimiento (Figura 7) (Cuadro 5). Datos similares en relación al porcentaje de brotación fueron obtenidos por Prudente et al. (2017) en el encapsulado de yemas laterales de *Hancornia speciosa* con BAP (86%) y sin BAP (35%). Esto significa que la adición de este regulador de crecimiento incrementa la brotación del material vegetal. El estudio de Gonzáles Paneque et al. (2010), quienes encapsularon yema de camote obtuvieron un 95% de brotación al añadir BAP y Giberelinas a la matriz de encapsulado.

Cuadro 5. Efecto del almacenamiento en frío en la brotación de semillas artificiales de camote.

Almacenado (días) a 4°C	Semilla total (N°)	Sí brotaron (N°)	% brotación
0	23	2	9¥
7	13	0	0
14	12	0	0
21	12	0	0
28	13	0	0

CV: 21.08%

¥: No hubo diferencias significativas (P<0.05)

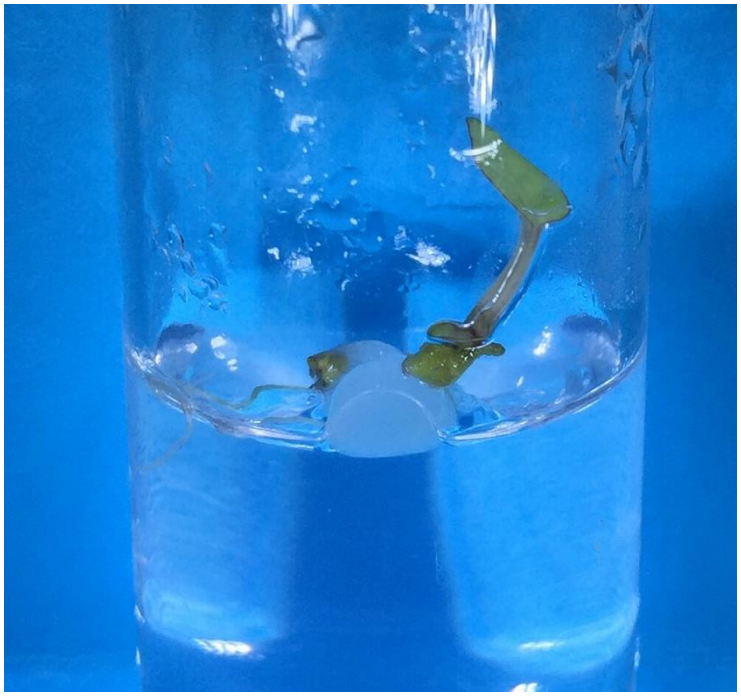

Figura 7. Semilla artificial de camote presentando brotación después de 80 días.

Las semillas artificiales contaminadas en un promedio en los cinco tratamientos fueron de un 10%. Esto probablemente se deba a que en el procedimiento del encapsulado no se realizó la esterilización del alginato de sodio. Aun así, los niveles de contaminación fueron menores que en el experimento de zanahoria.

4. CONCLUSIONES

- El encapsulado de los embriones somáticos de zanahoria es satisfactorio; el porcentaje de germinación sin almacenado en frío es alto, pero después de la exposición al frío se reduce.

- El proceso de encapsular meristemos axilares de camote es factible, pero no se observó brotación.

5. RECOMENDACIONES

- Añadir a la matriz de encapsulados reguladores de crecimiento.
- Hacer estudios de almacenamiento de semillas artificiales a largo plazo modificando la temperatura.
- Probar estudios con dosis de alginato más bajos.

6. LITERATURA CITADA

Ara H, Jaiswal U, Jaiswal VS. 2000. Synthetic seed: prospects and limitations. Current Science. [accessed 2016 Sep 23]. 78(12):1438–1444. http://www.jstor.org/stable/24104316

Avendaño-Romero GC, López-Malo A, Palou E. 2013. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. [accessed 2016 Sep 23] 7(1):87–96. web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-71-Avendano-Romero-et-al-2013.pdf.

Bazinet C, Kersulec A, Dufrene V, Timbert R, Hervagault JF, Barbotin JN. 1992. Physiological somatic embryos (*Daucus carota* L.) behaviour depending on the storage conditions. Biotechnology. (92):139.

Benelli C. 2016. Encapsulation of shoot tips and nodal segments for in vitro storage of "Kober 5BB" grapevine rootstock. Horticulturae. 2(10):1-8. doi:10.3390/horticulturae2030010.

Campbell NA, Reece JB. 2005. Biología. Séptima ed. Madrid (España): Editorial Médica Panamericana. 1351 p.

González OS, Silva JJ, Espinosa Á. 2004. La semilla artificial. Una solución en la biodiversidad mundial. Cuadernos de Biodiversidad. (15):17-22. doi:10.14198/cdbio.2004.15.03.

González OS, Espinosa Á, Silva JJ, Meneses S. 2010. Encapsulado de yemas de boniato (Ipomoea batatas (L.) LAM.) como alternativa para la propagación a gran escala del cultivo. Universidad de Granma.

Ghosh B, Sen S. 1994. Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* baker. Plant Cell Reports. 13(7):381-385. doi:10.1007/BF00234142

Jarret RI. 1991. Cultivo de tejidos de camote. In: Roca WM, Mroginski LA, editors. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia: CIAT. p. 422–437.

Kersulec A, Bazinet C, Corbineau F, COme D, Barbotin JN, Hervagault JF, Thomas D. 1993. Physiological behaviour of encapsulated somatic embryos. Biomaterials, Artificial Cells and Immobilization Biotechnology. 21(3):375-381. doi: 10.3109/10731199309117375.

Khor E, Loh CS. 2005. Artificial Seeds. In: Nedović V., Willaert R. (eds) Applications of Cell Immobilisation Biotechnology. Dordrecht (Holanda): Springer. p. 527-537.

Lee B-B, Ravindra P, Chan E-S. 2013. Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. Chemical Engineering & Technology. 36(10):1627–1642. doi:10.1002/ceat.201300230.

Lee-Espinosa HE, Murguía-González J, Laguna-Cerda A, García-Rosas B, Gámez-Pastrana MR, Galindo-Tovar ME, Landero-Tórres I, Iglesias-Andreu L, Santana-Buzzy N. 2009. Encapsulación de embriones somáticos de Laelia anceps ssp. dawsonii para la producción de semilla sintética. Revista Chapingo Serie Horticultura. [accessed 2016 Sep 23]. 15(2)33-40. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000400006.

Longfang G, Fudong X, Jiufeng G, Ri N. 2014. Plant tissue culture: A recent progress and potential applications. Agricultural Science & Technology. [accessed 2016 Oct 7]. 15(12):2088-2095,2099.http://content.ebscohost.com/ContentServer.asp?T=P&P=AN&K=102888910&S=R&D=a9h&EbscoContent=dGJyMMTo50SeprU4zdnyOLCmr06ep7NSsqq4TbaWxWXS&ContentCustomer=dGJyMOzpr0yxqbZJuePfgeyx44Dt6fIA.

Micheli M, Bececco V, Gardi T, Martorana L, Chiancone B, Germanà MA. 2017. Encapsulation of black mulberry microcuttings: studies on capsules and synthetic seeds. In: Beruto M, Ozudogru EA. Production and establishment of micropropagated plants. Sanremo (Italia): ISHS. p. 636.

Morales EdJ, Cano JdS. 2012. Semillas sintéticas. México: Ciencia y desarrollo. ; [accessed 2016 Oct 2]. http://www.cyd.conacyt.gob.mx/258/articulos/semillassinteticas.html.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15:473–497.

Prudente DO, Paiva R, Nery FC, Reis MV, Paiva PDO, Silva LC. 2017. Encapsulation of black mulberry microcuttings: studies on capsules and synthetic seeds. In: Beruto M, Ozudogru EA. Production and establishment of micropropagated plants. Sanremo (Italia): ISHS. p. 636.

Redenbaugh K, Slade D, Viss P, Fujii JA. 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. Hortic Sci. (22):803-809.

Reinert J, Yeoman MM, 1982. Plant cell and tissue culture. A laboratory manual. Primera edición. Berlin (Alemania): Springer-Verlag. p. 83.

Singh AK, Chand S. 2010. Plant regeneration from alginate-encapsulated somatic embryos of *Dalbergia sissoo* Roxb. Indian Journal of Biotechnology. [accessed 2017 Jul 25]. 9(3):319-324. http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/9893/1/IJBT%209(3)%20319-324.pdf

Vdovitchenko MY, Kuzovkina IN. 2011. Artificial seed preparation as the efficient method for storage and production of healthy cultured roots of medicinal plants. Russ J Plant Physiol. 58(3)524-530. doi:10.1134/S1021443711030174.

Wake H, Akasaka A, Umetsu H, Ozeki Y, Shimomura K, Matsunaga T. 1992. Enhanced germination of artificial seeds by marine cynobacterial extract. Appl Microbiol Biotechnol. 36(5):684–688. doi:10.1007/BF00183250.