



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

“Producción de semillas sintéticas mediante la encapsulación de embriones somáticos de Musa (plátano)”

Tesis que presenta

SERGIO ALONSO PECH CHABLE

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2017

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “**Producción de semillas sintéticas mediante la encapsulación de embriones somáticos de Musa (plátano)**” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, noviembre de 2017.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

I.B.Q. Sergio Alonso Pech Chable

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Sergio Alonso Pech Chable recibió el apoyo de una beca para estudios de posgrado del CONACYT (699500).

Agradecimientos

Agradezco al CONACYT por la beca No. 699500 y de igual manera, al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) la oportunidad que me brindo para realizar mi posgrado en sus instalaciones, especialmente a la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP) donde realicé mi proyecto.

En especial, agradezco a la Dra. María de Lourdes Miranda Ham y la Dra. Rosa María Gracia-Medrano, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, además de todos los conocimientos que compartieron conmigo.

A los miembros de mi comité tutorial, conformado por la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano y la Dra. Neyi Estrella Gómez, por tenerme mucha paciencia y en tomarse el tiempo para darme sus observaciones durante mi formación académica.

A la M. en C. Lizbeth Castro Concha, por su apoyo y consejo durante mi preparación académica.

Al técnico M.C. José Roberto Ku Cauich, por toda su ayuda en el mantenimiento del material biológico, así como en los consejos y apoyo durante las situaciones adversas que tuve con los cultivos vegetales.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 08 (José David Góngora Espinola, Raúl Manzanilla Rivas, Fray Martin Baas Espinola, Yary Juárez Gómez, Jorge Araujo, Elizabeth Méndez).

A mis amigos del laboratorio 22, Adrián José Enríquez Valencia, Roberto Ku Cauich, Lucila Sánchez, Erika Ramos, Maharshi Ledezma y Lupita Beristain.

También agradezco a mis amigos y compañeros de la Unidad, por haberme brindado su apoyo en diversos aspectos, quienes me ayudaron a crear un sano ambiente laboral, además de que siempre estuvieron en la disposición de escucharme, brindarme críticas y consejos, así como una cálida sonrisa o saludo en los momentos que más falta hizo.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 PLÁTANO	3
1.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA PLANTA	4
1.2 PRODUCCIÓN DE PLÁTANO	5
1.2.1 PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE PLÁTANO	6
1.2.2 PRODUCCIÓN DE PLÁTANO EN MÉXICO	8
1.3 PROPAGACIÓN DE PLÁTANO	9
1.3.1 PROPAGACIÓN TRADICIONAL	9
1.3.2 PROPAGACIÓN POR CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	10
1.3.2.1 EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA	12
1.3.2.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	13
1.4 ENFERMEDADES DEL PLÁTANO	14
1.5 SEMILLAS SINTÉTICAS	16
1.5.1 TIPOS DE SEMILLA SINTÉTICA	18
1.5.1.1 SEMILLAS SINTÉTICAS DESECADAS NO ENCAPSULADAS	18
1.5.1.2 SEMILLAS SINTÉTICAS DESECADAS ENCAPSULADAS	19
1.5.1.3 SEMILLAS SINTÉTICAS HIDRATADAS NO ENCAPSULADAS	19
1.5.1.4 SEMILLAS SINTÉTICAS HIDRATADAS ENCAPSULADAS	20
1.5.2 TIPOS DE ENCAPSULACIÓN	20
1.5.2.1 SEMILLA SINTÉTICA DE CAPA SIMPLE	21
1.5.2.2 SEMILLA SINTÉTICA DE CAPA DOBLE	22
1.5.2.3 SEMILLAS SINTÉTICAS DE CÁPSULA HUECA	22
1.6 MATRICES UTILIZADAS EN LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS SINTÉTICAS	22
1.7 ALGINATO	23
1.7.1 USOS DEL ALGINATO DE SODIO	24

1.7.2 PROPIEDADES DEL ALGINATO	24
1.8 EXPLANTES EMPLEADOS PARA SEMILLA ARTIFICIAL.....	25
1.9 SEMILLAS SINTÉTICAS DE ESPECIES FRUTALES	26
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
CAPÍTULO II	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	31
2.2 MÉTODOS	31
2.2.1 INDUCCIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE	31
2.2.2 MADURACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE.....	32
2.2.3 SELECCIÓN Y ENCAPSULACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE.....	32
2.2.4 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS SINTÉTICAS	33
2.2.5 ACLIMATACIÓN DE LAS PLANTAS PROVENIENTES DE LAS SEMILLAS SINTÉTICAS	33
2.2.6 ANÁLISIS DE DATOS	34
CAPÍTULO III.....	35
RESULTADOS.....	35
3.1 INDUCCIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE.....	35
3.2 MADURACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE	38
3.3 SELECCIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE PARA LA ENCAPSULACIÓN	41

3.4 ENCAPSULACIÓN DE EMBRIONES SÓMATICOS DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE	42
3.5 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS SINTÉTICAS	45
CAPÍTULO IV.....	55
DISCUSIÓN	55
CAPÍTULO V	59
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	59
CONCLUSIONES	59
PERSPECTIVAS.....	60
ANEXOS	61
ANEXO 1.....	61
ANEXO 2.....	62
Sales principales (macronutrientes)	62
Sales menores (micronutrientes)	62
Vitaminas.....	62
BIBLIOGRAFÍA	63

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Morfología de Musa. a. Partes que conforman la planta de plátano; b. Flores femeninas (frutos); c. Flores hermafroditas y d. Flores masculinas.....	5
Figura 1.2 Evolución de la producción mundial del plátano.....	6
Figura 1.3 Hijuelos de plátano. a. Hijuelo de espada; b. Hijuelo de agua.	10
Figura 1.4 Embriogénesis cigótica en dicotiledóneas y monocotiledóneas (Hartmann <i>et al.</i> , 2014).....	13
Figura 1.5 Ejemplos de algunas enfermedades del plátano. a. Sigatoka amarilla; b. Mal de Panamá; c. Moko y d. Enfermedad del rayado de Guineo.....	16
Figura 1.6 Semillas sintéticas de guayaba. a. Embriones somáticos de guayaba encapsulados en alginato de calcio y b. Germinación de semillas sintéticas de <i>V. trifolia</i>	17
Figura 1.7 Tipos de semilla sintética.....	18
Figura 1.8 Tipos de semilla sintética. (a) Capa simple; (b) Capa doble; (c) Cápsula hueca.....	21
Figura 1.9 Entrecruzamiento del alginato de sodio con un catión divalente (Ca^{2+}). Modelo de la caja de huevo (Kashima e Imai, 2012).....	24
Figura 1.10 Estrategia experimental.....	30
Figura 3.1 Inducción de la suspensión embriogénica de plátano macho cv. Chifle. A. Callo embriogénico; B. Acercamiento de callo embriogénico de plátano; C. Transferencia de callo embriogénico a un medio líquido y D. Inducción de la suspensión celular.....	35
Figura 3.2 Filtración de la suspensión embriogénica. A. Suspensión celular embriogénica madre antes de filtrar; B. Proceso de filtrado de la suspensión celular y C. Suspensión embriogénica filtrada.....	37
Figura 3.3 Mantenimiento y limpieza de las suspensiones celulares que presentaban oxidación. A. Suspensiones celulares con algunos agregados celulares oxidados; B.	

Filtrado de la suspensión; C. Suspensión celular resultante de la primera etapa de limpieza y D. Suspensión celular sin células oxidadas, es decir, con células en franca proliferación.....38

Figura 3.4 Suspensiones celulares embriogénicas de plátano macho cv. Chifle. A. Suspensiones madre sin filtrar y B. Suspensión embriogénica filtrada.....39

Figura 3.5 Desarrollo y maduración de embriones somáticos de plátano macho cv. Chifle a partir de suspensiones embriogénicas plaqueadas en medio semisólido. A. Embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo a las dos semanas de maduración; B. Embriones somáticos en maduración de 30 días; C. Embriones en maduración de 45 días y D. Embriones en maduración de 80 días.....40

Figura 3.6 Embriones de plátano cultivar Manzano. A. Embriones con apariencia vítrea a los 60 días de incubación y B. Embriones completamente oxidados (80 días de incubación).....41

Figura 3.7 Embriones somáticos de plátano macho cv. Chifle de ochenta días. A. Embriones somáticos en estadio coleoptilar de plátano (círculos en rojo) y B. Características de desarrollo de un embrión coleoptilar (izquierda) vs uno de tipo escutelar (derecha).....42

Figura 3.8 Semillas sintéticas de plátano macho cv. Chifle, producto de la combinación de alginato de sodio. A. 3% y B. 5%. En ambos casos, se empleó cloruro de calcio al 1%...44

Figura 3.9 Semillas sintéticas de plátano macho cv. Chifle, producto de la combinación de alginato de sodio. A. 3% y B. 5%. En ambos casos, se empleó cloruro de calcio al 3%...44

Figura 3.10 Semillas sintéticas de plátano macho cv. Chifle. En este caso, la combinación que produjo la consistencia deseada fue alginato de sodio al 5% y cloruro de calcio al 2%.45

Figura 3.11 Germinación de embriones somáticos encapsulados y sin encapsular de plátano macho cv. Chifle. A. ES sin encapsular (testigo positivo) recién sembrados, a la derecha, un acercamiento de uno de los frascos; B. ES encapsulados recién sembrados, a la derecha, un acercamiento de uno de los frascos; C. ES sin encapsular (testigo

positivo) después de 30 días de incubación, a la derecha, un acercamiento de uno de los frascos y D. ES encapsulados después de 30 días de incubación, a la derecha, un acercamiento de uno de los frascos.....46

Figura 3.12 Germinación del embrión somático de *Musa* cv. Manzano encapsulado después de 60 días. A. Emergencia de la radícula. (a) Cápsula de alginato; (b) Radícula emergente. B. Embrión germinado de *Musa*. (a) Radícula; (b) Fragmento de la cápsula de alginato y (c) Plúmula.....47

Figura 3.13 Porcentajes de germinación de las semillas sintéticas (SS1, SS2, SS3) de plátano macho cv. Chifle (3 experimentos independientes).....50

Figura 3.14 Diagrama de proceso para la producción de semillas sintéticas de plátano..51

Figura 3.15 Obtención y germinación de las semillas sintéticas. A. Embriones somáticos de ochenta días de incubación; B. Semillas sintéticas de plátano macho cv. Chifle; C. Germinación de las semillas sintéticas a las ocho semanas de incubación y D. Plantas de plátano en medio Cr.....52

Figura 3.16 Aclimatación de plántulas de plátano cv. Manzano. A. Inducción de la formación de raíces de la plántula; B. Aclimatación de la plántula al ambiente del cuarto de cultivo y C. Transferencia de la planta a condiciones de invernadero.....53

Figura 3.17 Aclimatación de las plantas a condiciones de invernadero. A. Plantas con 30 días en condiciones de invernadero; B. Plantas con 60 días en condiciones de invernadero; C. Plantas con 90 días en condiciones de invernadero y D. Plantas con 120 días en condiciones de invernadero.....54

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Principales países productores de plátano (en miles de toneladas).....	8
Cuadro 1.2 Producción de plátano en México	9
Cuadro 1.3 Tipos de explantes empleados para la producción de semillas sintéticas.....	26
Cuadro 3.1 Características de las semillas sintéticas.	43
Cuadro 3.2 Porcentaje de los ES encapsulados del cv. Manzano que germinan a los 60 días en las diferentes concentraciones de alginato y CaCl_2	49



ABREVIATURAS

cv.	Cultivar
ES	Embrión somático o Embriogénesis somática
GA ₃	Ácido giberélico
Ha	Hectárea
RPM	Revoluciones por minuto
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético



RESUMEN

El plátano es un fruto tropical de gran importancia en América, pues es utilizado para su consumo local, así como exportado por su gran valor nutrimental. Esta planta se propaga de manera vegetativa, esto es mediante hijuelos, los cuales se producen anualmente en un número limitado. Con el fin de aumentar la producción de plantas, se ha recurrido a su propagación mediante el cultivo de tejidos. Otra alternativa viable ha sido la tecnología de encapsulación con alginato de sodio para producir semillas sintéticas.

En este trabajo, se estableció un protocolo de encapsulamiento de embriones somáticos de plátano para obtener semillas sintéticas. Para este procedimiento, resultó fundamental la obtención de embriones somáticos (ES) maduros en estadio coleoptilar.

Los antes mencionados embriones somáticos fueron encapsulados con una solución de alginato de sodio y cloruro de calcio para la producción de semillas sintéticas. La consistencia de las semillas sintéticas dependió de las concentraciones de alginato y cloruro de sodio. A bajas concentraciones, tanto de alginato como de cloruro de calcio, se formaron cápsulas muy blandas, mientras que a concentraciones elevadas de ambas soluciones, los hidrogeles eran duros y frágiles, por lo que los ES no contaban con una cubierta adecuada para almacenarlos y protegerlos. La combinación de alginato de sodio 5% y cloruro de calcio 2% resultó en cápsulas de consistencia firme de fácil manipulación.

Las semillas sintéticas germinaron en bajos porcentajes (del rango de 5 a 12% para el cv. Chifle y 72% para el cv. Manzano); sin embargo, las contadas plántulas que se obtuvieron alcanzaron el desarrollo de una planta verdadera.



ABSTRACT

Bananas are a tropical fruit of economic importance in America, since they have been consumed locally, as well as being exported given their nutrimental value. This plant is vegetatively propagated using suckers, which are produced annually in limited numbers. In order to improve their production, they have been propagated through tissue culture. Another alternative is the production of synthetic seeds by encapsulating explants.

In this work, a protocol for encapsulation of banana somatic embryos to obtain synthetic seeds was developed. For our purposes, it was fundamental to obtain somatic embryos at the coleoptilar stage.

The above mentioned embryos were encapsulated in a sodium alginate solution that was polymerized with calcium chloride. At low concentrations of both, alginate and calcium chloride, embryos were only covered by a thin layer of the hydrogel. In contrast at high concentrations of alginate and calcium chloride, the capsules were hard and brittle. Hence, neither of these conditions resulted in an adequate cover for the embryos. The best combination was 5% alginate and 2% calcium chloride that yielded firm, soft spheres, which were easy to manipulate.

The synthetic seeds presented low percentages of germination, but those that germinated produced healthy plantlets. They eventually turned into mature plants.



INTRODUCCIÓN

La biotecnología va abriendo brechas en la agricultura. Tuvo sus inicios en el cultivo de tejidos y células vegetales con la finalidad de propagar masivamente cultivares específicos de diferentes especies de interés, ya sea para su consumo o para el estudio de algún metabolito secundario producido por una planta en particular. Con el tiempo, las técnicas biotecnológicas de propagación vegetal se han especializado para incluir tecnologías como la encapsulación, que permite la producción de semillas sintéticas a partir de explantes diversos, como los embriones cigóticos o somáticos (Gantait *et al.*, 2015; Saiprasad, 2001).

La preservación de los recursos genéticos globales ha forzado el desarrollo de nuevas metodologías de micropropagación, ya que algunas especies aún presentan dificultades para su multiplicación de manera natural, probablemente debido a la heterocigosidad de la semilla, la presencia de un endospermo reducido, la necesidad de una asociación micorrízica (como en el caso de las orquídeas) o que los frutos no poseen semillas (Saiprasad, 2001).

El concepto original de semilla sintética se basaba en el uso de embriones somáticos, ya fueran desecados o hidratados, sin encapsular. Años más tarde, Murashige (1977) definió a la semilla sintética como “un simple embrión encapsulado dentro de una matriz”. Sin embargo, no fue hasta 1982, cuando Kitto y Janick publicaron el primer reporte sobre la encapsulación de embriones somáticos de zanahoria en una resina de polioxietilenglicol (Poliox) (Standardi y Micheli, 2013; Rai *et al.*, 2009; Saiprasad, 2001).

El éxito obtenido en su aplicación se ha reflejado en la propagación de diversas especies de plantas, como la camelia (*Camellia japonica*; Janeiro *et al.*, 1997), manzana (*Malus* spp.), plátano (*Musa* spp.), guayaba (*Psidium guajava* L.) y mango (*Mangifera indica* L.), entre otras (Rai *et al.*, 2009)

A las semillas sintéticas también se les denominan syn-semillas, semillas manufacturadas, semillas clonales o semillas somáticas y son capaces de generar tanto estructuras bipolares (embriones somáticos) como unipolares (microtubérculos, brotes axilares y puntas de brotes apicales) (Hung y Dung, 2015). El uso de estas semillas ha

permitido la expansión de diversas áreas, como la caracterización del germoplasma, la adquisición, conservación e intercambio del mismo, así como la gestión de recursos genéticos (Ahmed *et al.*, 2015).

La tecnología de encapsulación permite la propagación de plantas transgénicas, plantas que no producen semillas y otros tipos que son difíciles de propagar por los métodos convencionales (Ahmed *et al.*, 2015).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

El uso inmoderado de los recursos fitogenéticos ha creado un problema de desabasto de alimentos para el hombre, el cual empeora para aquellas especies que solamente se propagan de manera vegetativa, pues la disponibilidad de material para su multiplicación es limitada. Además, se debe mencionar que, en ocasiones, a través de este sistema de propagación se pueden acarrear infecciones endógenas, por lo que su uso conlleva ciertas limitaciones y esto abona al problema de la producción de alimentos de origen agrícola. Tomando en cuenta este escenario, en la búsqueda de soluciones se han diseñado estrategias biotecnológicas basadas en el cultivo de células y tejidos vegetales, que permiten la obtención masiva de plantas sanas. Las semillas artificiales constituyen una alternativa viable para aquellas especies que de manera natural no producen semillas o presentan dificultades en su reproducción de manera tradicional, como en el caso de algunas variedades comerciales de plátano.

1.1 PLÁTANO

Los plátanos son frutos carnosos, que pueden tener un sabor dulce o amargo. Constituyen una fuente rica en vitaminas y azúcares, también de compuestos bioactivos (fibras y compuestos fenólicos) que están asociados con la reducción del riesgo de las principales enfermedades crónicas degenerativas (Singh *et al.*, 2016).

El fruto es muy popular en el mercado mundial, que se sitúa después del arroz, trigo y maíz, en cuanto a su importancia como cultivo alimentario. La palabra “plátano” se refiere al fruto de la planta herbácea gigante y monocotiledónea de hojas perenes, exclusivamente de la región subtropical que pertenece al género *Musa*, de la familia de las Musáceas (Lassoudière, 2007).

El nombre del género *Musa* se deriva de la palabra árabe “mouz”; sin embargo, se sospecha que el primer emperador de Roma, Octavius Augustus, lo haya utilizado para

rendirle honores a su médico personal Antonius Musa (63-14 AC). De manera similar, el nombre banana se deriva del árabe “banan” que significa dedo, término utilizado por los portugueses al introducir el fruto por primera vez en Guinea (Australian Government, 2008).

1.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA PLANTA

Las plantas de plátano son consideradas como arbustos gigantes, porque alcanzan hasta los 3 metros de altura. A pesar de sus dimensiones, no tiene las características de un árbol leñoso, lo cual significa que su tallo no lignifica, ni tiene engrosamiento secundario. Es una planta perenne, monocotiledónea, que se desarrolla en climas tropicales y subtropicales húmedos (Valdez-Ojeda *et al.*, 2014). Su tasa de crecimiento se considera relativamente rápida, en comparación con otros cultivos y se caracteriza por su producción de frutos durante todo el año (Manzo-Sánchez *et al.*, 2015).

Las variedades comerciales de plátano tienen características muy particulares, que están relacionados con su nivel de ploidía. Esto es, las especies diploides son, por lo general, fértiles y de reproducción sexual, mientras que los triploides, tetraploides, pentaploides, o dicho de otra forma las plantas poliploides, son infértiles y partenocárpicas, además de presentar frutos más grandes y pseudotallos más gruesos. Las plantas de plátano son herbáceas gigantes con pseudotallos aéreos, que se originan de cormos subterráneos, órgano del que se desarrollan vegetativamente los hijuelos (Figura 1.1). Las hojas se distribuyen de manera helicoidal y las bases foliares (peciolos) que circundan al tallo floral conforman el pseudotallo (Soto, 1992). La hoja que recién emerge presenta forma de “cigarro” dentro del pseudotallo. Una vez emergida, se nota su coloración verde. Al madurar, la hoja está constituida por la lámina foliar, el peciolo, la nervadura central y el ápice (Ortiz-Vega *et al.*, 1999). Cuando la planta está en floración, el tallo floral (tallo verdadero) se elonga a través del estrecho espacio central del pseudotallo. Este tallo floral emerge a partir del meristemo apical, que se localiza en el rizoma o cormo. Este proceso detiene el desarrollo foliar (Scot *et al.*, 2006; Soto, 1992).

Cuando el meristemo floral emerge por completo, el bulbo floral queda expuesto a las adversidades del exterior. Con el tiempo, las brácteas (hojas modificadas que forman parte del bulbo floral) se abren exponiendo las primeras flores femeninas, las cuales darán origen a los frutos partenocárpicos (sin polinizar) en racimos dispuestos en dos filas que se convertirán en una mano de frutos. El número de éstas depende del número de grupos en la inflorescencia, y varía dependiendo del genotipo y las condiciones ambientales. Además de las flores femeninas, en la parte inferior, por lo regular, se sostiene una bellota cubierta por brácteas traslapadas que contiene las flores masculinas (Figura 1.1 b, c y d) (Scot *et al.*, 2006; Robinson y Galán-Saúco, 2010).

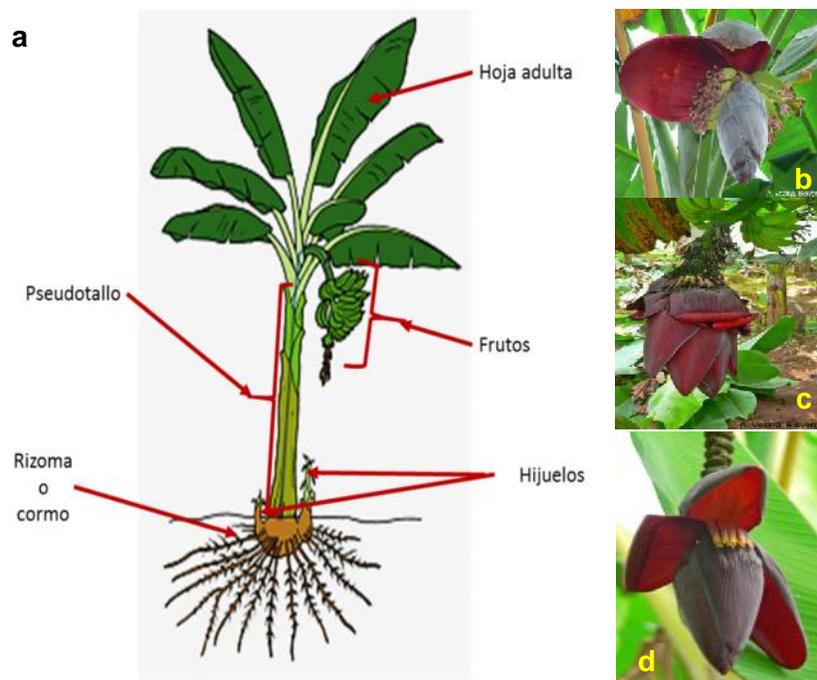


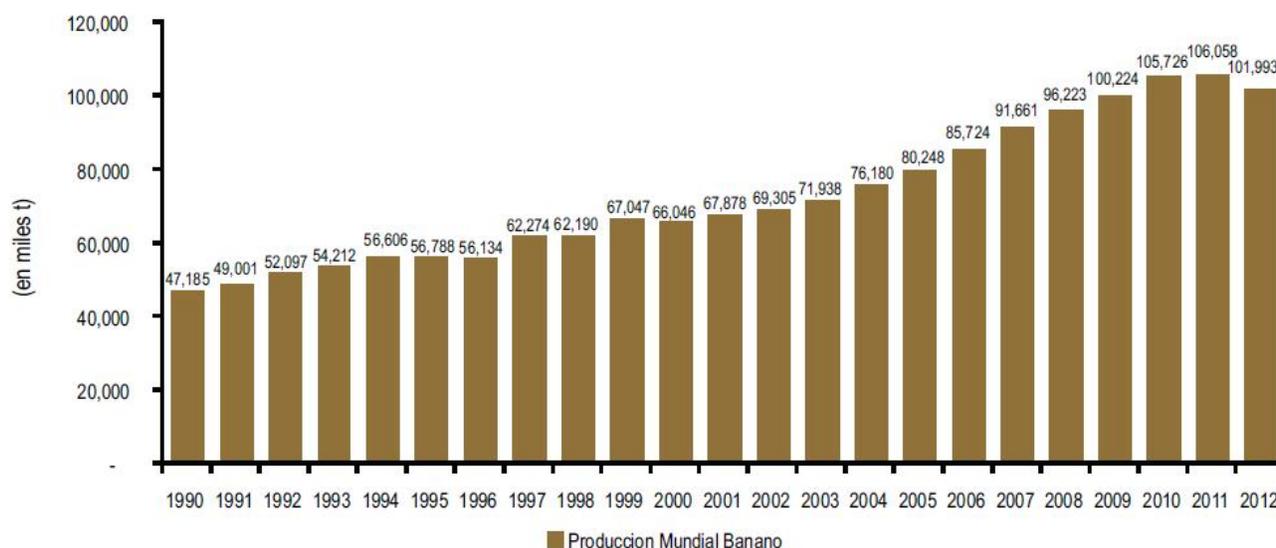
Figura 11.1 Morfología de *Musa*. a. Partes que conforman la planta de plátano; b. Flores femeninas (frutos); c. Flores hermafroditas y d. Flores masculinas.

1.2 PRODUCCIÓN DE PLÁTANO

El plátano es uno de los cultivos vegetales más cosechados en, al menos, 130 países de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Estos frutos son de importancia nutricional y terapéutica en la dieta humana. La producción se da durante todo el año y,

además, es relativamente económica; esto es, en el sentido de su fácil desarrollo bajo diferentes condiciones ambientales (Menon, 2016).

La FAO reportó un incremento en la producción mundial de plátano en el año 2000, con un volumen de producción de 66.045 millones de toneladas. En el 2004, este mismo organismo declaró una producción mundial de 76.1 millones de toneladas, en el 2008 ya era de 96.2 millones de toneladas y en 2011, se registró la mayor producción mundial de banano con 106 millones de toneladas (Figura 1.2). Sin embargo, en 2012 la producción mundial se redujo en 3.8%, con relación al año anterior debido a los problemas climatológicos que enfrentaron algunos países productores, como Ecuador y la India y en el 2014, la producción anual de plátano fue de 103.3 millones de toneladas métricas por un área de 5.14 millones de hectáreas (Menon, 2016).



Fuente: FAOSTAD
Elaboración: DGPA-DEEIA/MINAGRI

Figura 1.12 Evolución de la producción mundial del plátano.

1.2.1 PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE PLÁTANO

En los años sesenta, aproximadamente 105 países cubrían la demanda mundial del plátano; sin embargo, cuando la demanda se incrementó, otros países comenzaron a cultivarlo. De manera que, en el 2012, aproximadamente 130 países producían este

cultivo.

Asia destaca con el 56% de la producción mundial (57 millones de toneladas en 2012), resaltando países como India, China, Filipinas, Indonesia, Tailandia, Vietnam, Bangladesh, Laos y Malasia, en ese orden de importancia. En el 2012, Sudamérica (Ecuador, Brasil y Colombia, principalmente) contribuyó con el 16.6% de la producción mundial (16.9 millones de toneladas). En África, se produjo el 15.5% del total (15.9 millones de toneladas), siendo los países más importantes Angola, Tanzania, Camerún, Kenia, Burundi y Egipto, entre otros. Centroamérica participó con 8.3 millones de toneladas (8.1% de la producción mundial), destacando Guatemala, México y Costa Rica.

En el cuadro 1.1 se puede observar el listado de los 20 principales países productores, que en conjunto representan el 88.6% del total mundial (90.4 millones de toneladas). En 2012, India, Ecuador, Brasil y Tanzania tuvieron producciones menores debido a serios problemas climatológicos.

Cuadro 1.1 Principales países productores de plátano (en miles de toneladas) (FAO, 2014).

Países	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Total mundo	66 046	67 878	69 305	71 938	76 180	80 248	85 724	91 661	96 223	100 224	105 726	106 058	11 993
India	14 137	14 210	13 304	13 857	16 745	18 888	20 998	23 823	26 217	26 470	29 780	28 455	24 869
Rep. Pop. China	4 941	5 272	5 557	5 903	6 021	6 518	6 901	7 797	7 835	8 834	9 561	10 400	10 550
Filipinas	4 930	5 059	5 275	5 369	5 631	6 298	6 795	7 484	8 688	9 013	9 101	9 165	9 226
Ecuador	6 477	6 077	5 611	6 454	6 132	6 118	6 127	6 002	6 701	7 637	7 931	7 428	7 012
Brazil	5 663	6 177	6 423	6 801	6 584	6 703	6 956	7 098	6 998	6 783	6 969	7 329	6 902
Indonesia	3 747	4 300	4 384	4 177	4 874	5 178	5 037	5 454	6 005	6 374	5 755	6 133	6 189
Angola	300	350	480	650	800	960	1 100	1 398	1 723	1 985	2 048	2 646	2 991
Guatemala	955	1 100	1 150	1 050	1 110	1 231	1 649	2 246	2 448	2 544	2 637	2 680	2 700
Tanzania	701	752	2 205	1 900	2 489	2 007	3 507	3 083	2 447	3 006	3 156	3 144	2 525
México	1 863	2 028	1 997	2 066	2 361	2 250	2 196	1 965	2 151	2 232	2 103	2 139	2 204
Costa Rica	2 181	2 061	1 975	2 144	2 118	1 875	2 268	2 350	2 127	1 795	2 020	2 125	2 136
Colombia	1 594	1 470	1 561	1 648	1 703	1 799	1 864	1 820	1 988	1 994	2 020	2 043	1 983
Tailandia	2 030	2 021	2 061	1 966	1 402	1 623	1 676	1 929	1 540	1 528	1 585	1 600	1 650
Viet Nam	1 125	1 126	1 097	1 282	1 329	1 344	1 350	1 355	1 400	1 428	1 490	1 523	1 560
Camerún	626	632	693	743	798	930	970	1 024	1 078	1 223	1 334	1 395	1 400
Kenya	1 028	1 084	1 073	1 019	1 036	1 256	1 238	1 187	1 687	1 687	1 583	1 198	1 394
Burundi	1 514	1 549	1 603	1 760	1 587	1 625	1 607	1 701	1 760	1 846	1 913	1 849	1 184
Papua Nueva Guinea	810	832	860	870	880	900	920	940	970	980	1 050	1 100	1 180
Egipto	761	849	878	871	875	923	855	945	1 062	1 121	1 029	1 054	1 130
Republica Dominicana	422	442	503	515	468	547	501	518	447	590	735	830	872
Honduras	469	516	659	735	811	887	613	690	691	719	751	755	765
Otros	9 773	9 970	9 956	10 159	10 426	10 387	10 595	10 852	10 261	10 435	11 176	11 067	11 569

1.2.2 PRODUCCIÓN DE PLÁTANO EN MÉXICO

El cultivo de banano en México ocupó una superficie de 77,303.66 Ha que produjeron 2,138,686.85 toneladas de fruta, de las cuales el 95% se destinó para el consumo nacional y el 5% restante fue para exportar (SIAP, 2011). Los principales estados productores de banano fueron: Chiapas, Tabasco, Veracruz, Colima y Michoacán. Yucatán, aunque minoritario, también se ubica entre los estados productores (Cuadro 1.2).

Para el 2014, la producción total fue de 2,150,519.90 toneladas en un área de 74,584.52, siendo Chiapas, Tabasco y Veracruz los principales productores de plátano (SIAP, 2016).

Cuadro 1.2 Producción de plátano en México.

Ubicación	Sup. Sembrada	Sup. Cosechada	Producción	Rendimiento	PMR	Valor Producción
	(Ha)	(Ha)	(Ton)	(Ton/Ha)	(\$/Ton)	(Miles de Pesos)
Chiapas	23,456.07	23,376.07	701,394.19	30	2,457.80	1,723,885.15
Tabasco	10,506.05	10,506.05	541,986.00	51.59	3,936.18	2,133,356.49
Veracruz	15,190.72	14,683.72	291,090.14	19.82	2,360.05	686,987.86
Colima	5,023.79	4,701.29	156,740.55	33.34	2,672.13	418,831.09
Michoacán	6,303.00	5,965.00	147,752.04	24.77	2,403.95	355,188.99
Jalisco	3,430.14	3,428.14	124,266.49	36.25	2,637.70	327,778.29
Oaxaca	3,584.85	3,300.25	68,799.60	20.85	3,623.13	249,270.21
Guerrero	3,099.90	2,577.90	45,406.57	17.61	4,055.23	184,134.01
Nayarit	3,090.60	3,090.60	36,421.71	11.78	2,902.01	105,696.26
Puebla	1,993.00	1,993.00	26,669.25	13.38	3,010.44	80,286.20
Quintana Roo	630.5	551.5	6,681.66	12.12	3,686.38	24,631.12
Campeche	120.5	118.5	1,416.60	11.95	5,107.66	7,235.51
Yucatán	252.5	248.5	1,270.90	5.11	4,304.76	5,470.92
Morelos	14	14	408.8	29.2	4,409.59	1,802.64
México	18	18	185.4	10.3	6,420.44	1,190.35
Hidalgo	12	12	30	2.5	1,500.00	45
	76,725.62	74,584.52	2,150,519.90	28.83	2,932.22	6,305,790.11

1.3 PROPAGACIÓN DE PLÁTANO

La propagación de plantas de plátanos partenocárpicas se realiza mediante métodos vegetativos, usando cormos e hijuelos de espada y escasamente, semillas (Kacar y Faber, 2012). Los cultivares utilizados para la dieta humana, en su mayoría, no poseen semillas; sin embargo, algunas variedades, como la “Pisang Awak”, producen semillas cuando crecen cerca de una fuente fértil de polen, ya que a pesar de ser triploides (ABB), poseen cierta fertilidad femenina residual (Uma y Sathiamoorthy, 2007)

1.3.1 PROPAGACIÓN TRADICIONAL

El plátano (*Musa* spp.) se propaga a partir de porciones vegetativas que contienen yemas con capacidad de regeneración. Esta propagación es de tipo asexual y garantiza que las características específicas de una planta sean perpetuadas. La colecta de hijuelos, que consiste en la división de la parte vegetativa del rizoma, es el método más común para la

obtención de material biológico “semilla” para la propagación del plátano. Los hijuelos de espada (Figura 1.3a) se encuentran conectados directamente a la planta madre saludable y en fructificación, por lo tanto, son más vigorosos para regenerar plantas adultas.

Una característica particular de estos hijuelos son sus hojas pequeñas en forma de espada. Los hijuelos de espada se pueden obtener de plantas madre dedicadas exclusivamente a la producción de hijuelos. Prácticas, como mayor iluminación (por eliminación de hojas de las plantas madre) y fertilización antes de la recolección de hijuelos, son recomendables para mejorar la viabilidad. Los hijuelos están listos para ser removidos de la planta madre cuando tiene como mínimo 15 cm de diámetro y 50 cm de altura por encima del suelo (Stover y Simmonds, 1987).



Figura 1.13 Hijuelos de plátano. a. Hijuelo de espada; b. Hijuelo de agua. Consultado en: <http://farmextensionmanager.com/English/Banana%20technology%20bank/Planting%20operations/Selection%20of%20the%20Suckers.htm>

1.3.2 PROPAGACIÓN POR CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El incremento de la población mundial, aunado a la alta demanda de alimentos en los últimos años, ha provocado un gran interés en la biotecnología vegetal para el desarrollo

de metodologías *in vitro* que produzcan plantas completas a partir de una sola célula (i.e. microesporas o células somáticas), con el propósito de mejorar cultivares, adaptarlos a diferentes condiciones climáticas y edafológicas y obtener metabolitos de interés comercial (Pérez-Ponce, 1998).

Sin embargo, el uso de estas metodologías y los resultados que se puedan obtener están estrechamente relacionados con el genotipo de la especie de interés (Henry *et al.*, 1994).

Entre las ventajas que tiene el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales para la producción de plantas y productos naturales de interés están: 1) la producción de plantas sanas, lo que permite incrementar los rendimientos, 2) la independencia del clima, suelo, distribución geográfica y problemas socio-políticos, 3) la capacidad de establecer un sistema de producción definido, en relación a las demandas del mercado, 4) el cultivo de especies no domesticadas y/o difíciles de cultivar en campo, 5) la conservación del germoplasma de plantas de interés comercial o en vías de extinción, 6) la posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético más rápidos por técnicas biotecnológicas e ingeniería genética, 7) la producción de compuestos químicos conocidos provenientes de plantas de crecimiento lento o difíciles de obtener por extracción o por síntesis química, 8) la síntesis de nuevos productos químicos expresados únicamente en los cultivos *in vitro*, 9) la obtención de enzimas y sistemas de biotransformaciones para ser usados solos o combinados con la síntesis química y 10) la producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, a herbicidas o a estrés abiótico, con mejor calidad nutricional, que actúen como biorreactores en la producción de proteínas, carbohidratos o lípidos o que secuestren metales pesados de suelos contaminados, entre otras.

El conocimiento sobre la totipotencialidad de las células vegetales permite generar plantas completas a partir de una sola célula vegetal no sexual, mediante el cultivo *in vitro* de tejidos (Cardoza, 2008).

Un ejemplo de las bondades del cultivo de tejidos es la generación de plantas de plátano mediante embriogénesis somática a partir de diferentes explantes, incluyendo embriones cigóticos jóvenes (Grapin *et al.*, 2000).

1.3.2.1 EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA

La embriogénesis cigótica, como ocurre en todas las angiospermas, inicia con el proceso de la doble fertilización de tres de los núcleos del saco embrionario, que involucra la fertilización de la célula huevo (ovocélula) con un núcleo espermático del polen, y de las células madre del endospermo por el otro núcleo espermático. Este proceso da lugar al cigoto diploide y al endospermo, triploide.

El cigoto se divide de forma asimétrica, dando lugar a las células apicales y basales, así como la formación del suspensor. En esta fase se considera que el embrión se encuentra en estado globular (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Posteriormente, ocurren una serie de eventos que garantizan la formación y adaptación de los diversos tejidos y órganos, como los meristemos, los cotiledones y el hipocótilo dentro del embrión (Santos-Mendoza *et al.*, 2008).

En el caso de *Arabidopsis thaliana*, el embrión se encuentra en el estadio acorazonado después de siete días de la fertilización. Durante este periodo, ocurren los procesos de división y diferenciación celular. Esto implica que el protodermo se ha diferenciado en la epidermis para la formación de los sistemas vasculares, a partir de los paquetes pro-vasculares. Posteriormente, ocurre la organización de los meristemos apico-basales (brote y raíz), y la formación de los cotiledones simétricos, lo cual determina, en gran medida, la forma completa del embrión (Santos-Mendoza *et al.*, 2008).

Los estadios torpedo y cotiledonario son los últimos estadios del desarrollo del embrión (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Este es el caso en dicotiledóneas; sin embargo, en monocotiledóneas, los procesos son idénticos solamente hasta la formación del embrión globular (Hartmann *et al.*, 2014).

Los estadios de desarrollo del embrión cigótico en monocotiledóneas ocurre en el siguiente orden: globular, escutelar y coleoptilar (Figura 1.4).

El estadio globular es similar al de dicotiledóneas, excepto que el suspensor no es unicelular y está menos diferenciado. El estadio escutelar se caracteriza por la presencia de un único cotiledón, al que se le llama escutelo. Esto es diferente respecto a las dicotiledóneas, en las cuales se observa un par de cotiledones. En el estadio coleoptilar,

el eje del embrión se diferencia, dando origen a la plúmula y la radícula. También se observa un tejido especializado, llamado coleorriza, que rodea el tejido foliar y radicular, que contribuye a la germinación del embrión (Hartmann *et al.*, 2014).

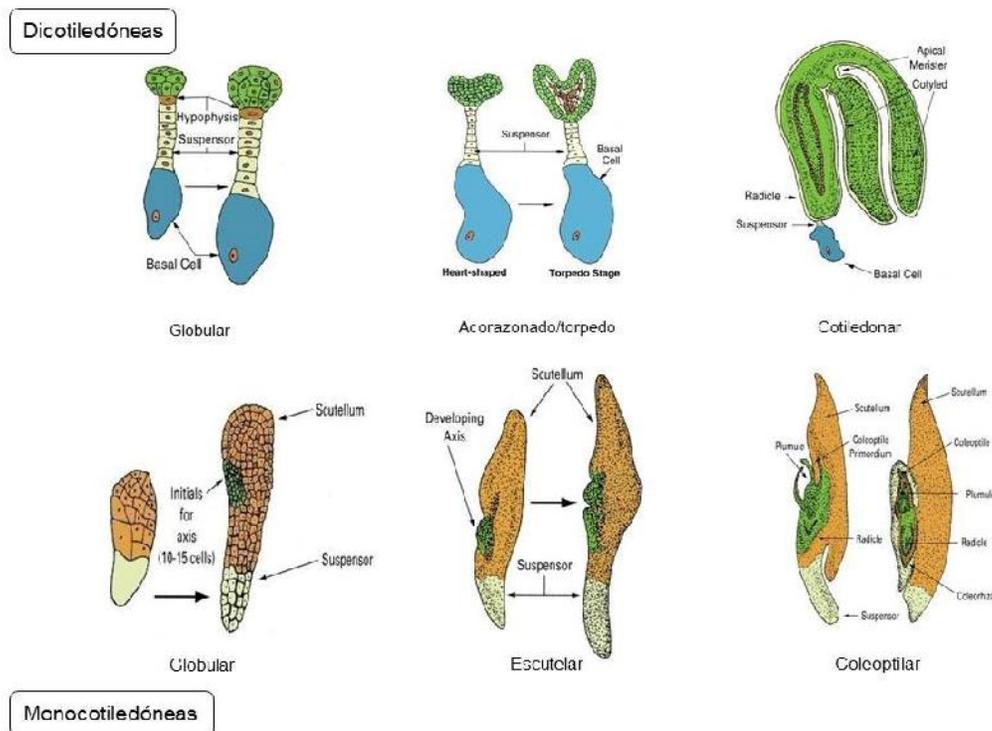


Figura 1.14 Embriogénesis cigótica en dicotiledóneas y monocotiledóneas (Hartmann *et al.*, 2014).

1.3.2.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

En bananos, la embriogénesis somática (ES) se ha utilizado como una técnica de alto rendimiento para la micropropagación y la conservación de germoplasma, así como un sistema eficiente de regeneración para la aplicación de técnicas de ingeniería genética, como la transformación e hibridación somática y la producción de semillas artificiales (Youssef *et al.*, 2010; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). La ES en banano requiere del uso de reguladores del crecimiento (principalmente auxinas) para inducir la formación de callo, a partir del explante inicial (desdiferenciación) y posteriormente, la formación de callo embriogénico. Este último es usado como material de inicio para la obtención de células

en suspensión, las cuales se pueden diferenciar para desarrollar embriones, y luego, regenerar plantas.

Se han empleado diversos tipos de explantes para inducir callos embriogénicos en *Musa* spp., entre ellos, se pueden encontrar embriones cigóticos inmaduros (Maldonado-Borges *et al.*, 2013), segmentos de cormo y bases foliares (Novak *et al.*, 1989), meristemas apicales del rizoma (escalpo) cultivados *in vitro* y flores jóvenes masculinas (Escalant *et al.*, 1994) y femeninas (Grapin *et al.*, 2000). Las flores masculinas jóvenes sobresalen en las variedades partenocárpicas como los explantes más reactivos para iniciar la ES en bananos tipo Cavendish, aunque existen reportes de mayor eficiencia mediante el uso de escalpos (Strosse *et al.*, 2006).

El empleo de flores masculinas conlleva una variación en la capacidad de formar callo embriogénico. Por ejemplo, cuando se evaluaron cinco genotipos de banano, se presentó un 37% de formación de callo embriogénico (Escalant *et al.*, 1994), mientras que con el cv. Enano Gigante se observó una respuesta que varió entre 2 y 6% (Navarro *et al.*, 1997). En promedio, se ha obtenido un porcentaje de callo embriogénico del 8% (Strosse *et al.*, 2003). Al comparar la edad fisiológica del explante de dos genotipos de banano, se encontró que la respuesta de formación de callo embriogénico varía en un rango de 0.7 a 10% (Youssef *et al.*, 2010). En el caso de *M. acuminata* Colla, AAA, subgrupo Cavendish, cv. Dwarf Cavendish, al usar flores masculinas jóvenes aisladas de plantas adultas con el fin de inducir la formación y proliferación de nuevas yemas florales *in vitro*, se obtuvo un 12.5 y 25% en la formación de callo embriogénico en medio semisólido y líquido, respectivamente (Perez-Hernández y Rosell-García, 2008). Diversas estrategias pueden utilizarse, tales como el uso directo de las yemas florales en proliferación para el establecimiento de suspensiones celulares, la inducción de callo embriogénico en medio semisólido e incluso la inducción de la organogénesis para la obtención directa de brotes (Darvari *et al.*, 2010).

1.4 ENFERMEDADES DEL PLÁTANO

Las variedades de plátanos con genoma triploide, además de ser estériles, poseen un acervo genético reducido. Esta disminución en la variabilidad genética provoca un mayor

grado de susceptibilidad al ataque de fitopatógenos. Estos factores bióticos afectan la productividad de las plantaciones, aumentando los costos de producción dada la necesidad de usar fungicidas para abatirlos, lo que tiene un fuerte impacto en la rentabilidad y en la contaminación ambiental (Pérez, 2009).

Entre las enfermedades fúngicas de las plantas de plátano destacan: sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*), sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), marchitez (*Fusarium oxysporum*), mancha foliar (*Cordana musae*) y punta de cigarro o “cigar-end rot” (*Verticillium theobromae*) (Figura 1.5). Por otro lado, entre aquellas ocasionadas por bacterias están la enfermedad del moko (*Pseudomonas solanacearum*) y la pudrición blanca del pseudotallo y del cormo (*Erwinia carotovora*), mientras que entre las de tipo viral, se cuentan al virus del mosaico del pepinillo y enfermedad del rayado de Guineo (Almodóvar *et al.*, 2002).



Figura 1.15 Ejemplos de algunas enfermedades del plátano. a. Sigatoka amarilla; b. Mal de Panamá; c. Moko y d. Enfermedad del rayado de Guineo.

1.5 SEMILLAS SINTÉTICAS

El concepto de semilla sintética se deriva del inglés “synseed”, que puede ser traducido también como semilla artificial o semilla somática. La primera vez que se utilizó este término fue en 1977 por Toshio Murashige. Posteriormente, Sherry Kitto y Jules Janick de la Universidad de Purdue adoptaron esta idea para generar semillas sintéticas desecadas. Por otra parte, las semillas sintéticas hidratadas fueron utilizadas por Keith Redenbaugh y colaboradores en Plant Genetics Inc. (PGI, Davis, CA). Otros autores describen las semillas sintéticas como embriones somáticos, brotes axilares y otros tejidos meristemáticos encapsulados artificialmente, que pueden usarse como semillas funcionales, ya que poseen la habilidad de convertirse en plantas completas bajo condiciones *in vitro* o *ex vitro* (Ara *et al.*, 2000; Capuano *et al.*, 1998).

Estos métodos involucran la encapsulación de propágulos en hidrogeles para su producción (Redenbaugh y Walker, 1990), los cuales deben proporcionar los nutrientes

que el explante necesita para su desarrollo (función de endospermo). Debido a la naturaleza artificial de su cubierta, las semillas sintéticas, en muchos casos, tienen baja capacidad de conversión (Arun Kumar *et al.*, 2005). Para facilitar el desarrollo y supervivencia de los propágulos encapsulados, se les pueden añadir reguladores de crecimiento y agentes antimicrobianos, como los antibióticos, fungicidas, etc. (Bapat y Mhatre, 2005; Gray, 1989; Redenbaugh *et al.*, 1987). Para la encapsulación, se emplean diversos agentes gelificantes, como son el alginato de sodio, el alginato de potasio, la carragenina, el alginato de sodio con gelatina, entre otros. Sin embargo, el más empleado es el alginato de sodio (Ara *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 1998; Redenbaugh *et al.*, 1987).

Desde entonces, se ha conseguido una mejor comprensión de la embriogénesis somática, factor limitante para la producción de semillas sintéticas y finalmente, para su comercialización.

Actualmente se cuenta con información sobre la producción de semillas sintéticas en varias especies medicinales, ornamentales e incluso frutales; entre las medicinales, está *Vitex trifolia*, mientras que entre las frutales están el mango, guayaba (Figura 1.6), piña, manzana y papaya (Gantait *et al.*, 2015; Rai *et al.*, 2009).

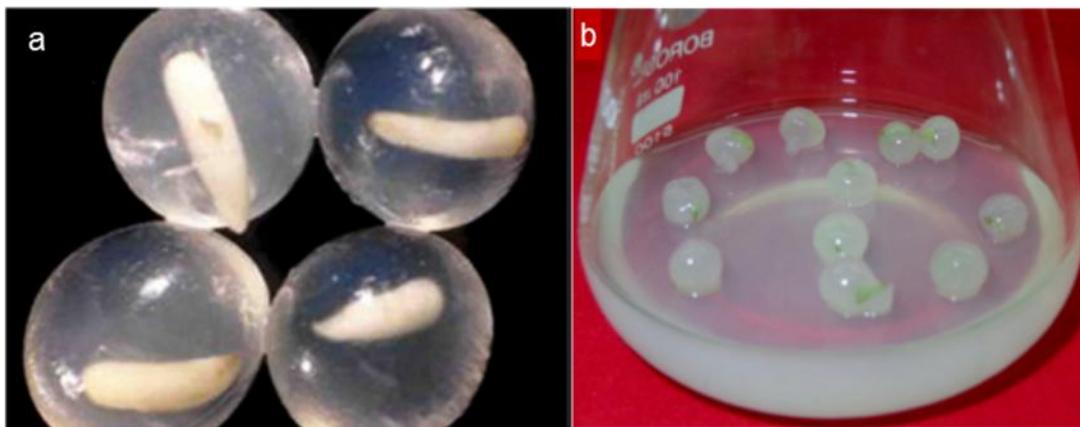


Figura 1.16 Semillas sintéticas de guayaba. a. Embriones somáticos de guayaba encapsulados en alginato de calcio y b. Germinación de semillas sintéticas de *V. trifolia*.

1.5.1 TIPOS DE SEMILLA SINTÉTICA

Actualmente existen dos tipos principales de semillas sintéticas: las hidratadas y las desecadas. En éstas, el tejido puede estar desnudo o encapsulado, es decir dentro de una matriz que lo recubre, como se muestra en la Figura 1.7.

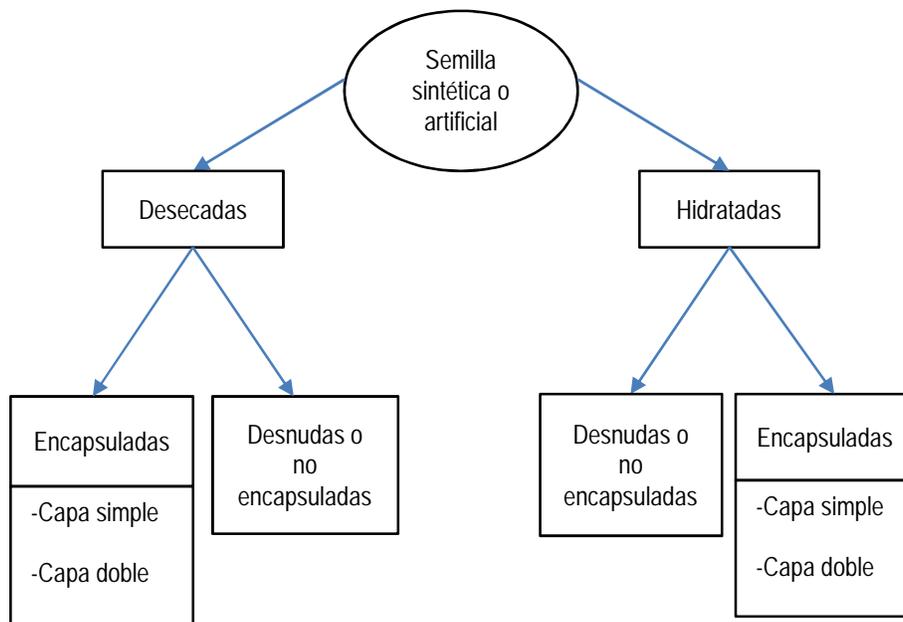


Figura 1.17 Tipos de semilla sintética.

1.5.1.1 SEMILLAS SINTÉTICAS DESECADAS NO ENCAPSULADAS

Este tipo de semilla fue descrito por primera vez por L.H. Jones en 1974 (Redenbaugh, 1993), empleando embriones somáticos provenientes de especies capaces de soportar el proceso de desecación. Es un sistema sencillo, en el cual el material vegetal es deshidratado por diferentes métodos hasta alcanzar un 8-20% de humedad. Este proceso induce la quiescencia del tejido, además de proporcionar mayor flexibilidad en la manipulación del mismo durante la producción de semilla artificial a gran escala.

La desecación se puede inducir utilizando soluciones con potenciales osmóticos altos, o

bien, limitando la disponibilidad de agua al aumentar la concentración del gelificante empleado, originando el eflujo de agua desde el tejido. En el caso del jengibre, la deshidratación por medio del uso de soluciones con concentraciones crecientes de sacarosa fue muy efectiva (Sundararaj *et al.*, 2010). Este proceso puede realizarse lentamente, durante un periodo de una a dos semanas, usando cámaras que disminuyan la humedad relativa, o de manera rápida, incubando toda la noche en cajas de Petri sin sellar (Ara *et al.*, 2000). Cabe señalar que la velocidad de secado es un factor muy importante para la supervivencia efectiva del tejido y de su posterior almacenamiento, así como tener un papel crítico en las etapas de maduración y conversión a planta (Sharma *et al.*, 2013).

1.5.1.2 SEMILLAS SINTÉTICAS DESECADAS ENCAPSULADAS

Los tejidos desecados también pueden ser encapsularlos con varios tipos de matrices para la obtención de semillas sintéticas. Este tipo de semillas sintéticas son capaces de resistir bajas temperaturas, por lo que pueden almacenarse en refrigeradores o a temperatura ambiente por periodos cortos. La encapsulación de los propágulos brinda protección contra el daño mecánico que pudieran sufrir durante su manipulación. Es importante señalar que la cubierta puede contener nutrimentos y otros compuestos necesarios para un mejor desarrollo y protección contra la desecación del material biológico durante las etapas tempranas de la germinación. Los resultados han mostrado que, si bien es factible lograr que el material sobreviva, el porcentaje de conversión a planta es realmente bajo (Pond y Cameron, 2003).

1.5.1.3 SEMILLAS SINTÉTICAS HIDRATADAS NO ENCAPSULADAS

Este sistema es el más directo para la obtención de semilla sintética, ya que consiste en emplear el material tal y como resulta del proceso de cultivo *in vitro*, sin ningún tipo de cubierta protectora. Podría parecer que el costo de su producción fuera relativamente bajo si se toma en cuenta sólo el medio de cultivo utilizado; sin embargo también debe considerarse lo que se gastaría en la manipulación tanto en el laboratorio, como durante el proceso de germinación. Este tipo de material es muy sensible y vulnerable a diversos factores físicos, químicos y biológicos, por lo que requiere de un cuidado individualizado.

Este método puede aplicarse a especies ornamentales de alto valor comercial, pues el precio final en que se puede vender cada planta justifica con creces la inversión realizada para obtenerlas. Ejemplo del uso de este tipo de semillas es la propagación del abeto azul (*Picea pungens*) y la azucena blanca (*Lilium longiflorum*) entre otras (Pond y Cameron, 2003; Tribulato *et al.*, 1997).

1.5.1.4 SEMILLAS SINTÉTICAS HIDRATADAS ENCAPSULADAS

En general, este sistema es el que se emplea comúnmente para la producción de semillas sintéticas, debido a que tiene la ventaja de que el propágulo que va a ser encapsulado en una matriz no está sujeto al proceso de desecación, el cual en muchos casos es el responsable de las bajas tasas de conversión a plántula (Rai *et al.*, 2009; Ara *et al.*, 2000). La cubierta tiene la finalidad de proporcionar no sólo protección contra el daño mecánico, sino al mismo tiempo brindarle al explante los nutrimentos necesarios para su germinación. Sin embargo, el uso de matrices puede presentar ciertas desventajas como inducir la vitrificación del embrión (Pond y Cameron, 2003).

Esta metodología ha sido aplicada con éxito en diversas especies vegetales frutales, entre las que se encuentran plátano (*Musa spp.*), manzana (*Malus spp.*) y mango (*Mangifera indica* L.), entre otras (Rai *et al.*, 2009), así como en plantas medicinales, como es la *Cassia angustifolia* Vahl. (Gantait *et al.*, 2015; Bukhari *et al.*, 2014).

1.5.2 TIPOS DE ENCAPSULACIÓN

La cubierta que rodea a la semilla sintética no sólo debe protegerla de cualquier daño físico que pudiera sufrir, sino que además debe permitir el paso de los nutrientes necesarios para su desarrollo. En algunos casos, esta matriz puede contener nutrimentos y/u otros compuestos que coadyuven no sólo a su bienestar, sino a su germinación. Para la encapsulación, se emplean diversos agentes gelificantes, como son el alginato de sodio, el alginato de potasio, la carragenina, el alginato de sodio con gelatina, entre otros. Sin embargo, el alginato de sodio es el compuesto más utilizado para estos fines, dado que permite la formación de una estructura tridimensional que permite el libre intercambio de agua y nutrimentos, y además, es susceptible de albergar sustancias necesarias para la posterior germinación de la semilla.

El método más común para obtener las semillas artificiales es el goteo directo de una suspensión de los explantes en alginato de sodio a un volumen de una solución de cloruro de calcio, activándose su polimerización y la formación de pequeñas esferas de alginato (producción de semilla sintética de capa simple) (Winkelmann *et al.*, 2004). No obstante, en los últimos años, esta tecnología de encapsulación ha sufrido modificaciones para dar lugar a la semilla sintética de capa doble y la semilla sintética de cápsula hueca (Figura 1.8). Eventualmente, estas cápsulas pueden ser recubiertas con polioxietilenglicol para evitar la desecación.

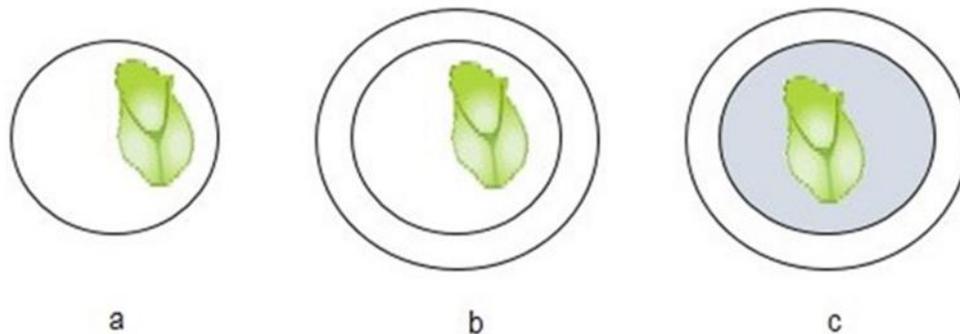


Figura 1.18 Tipos de semilla sintética. (a) Capa simple; (b) Capa doble; (c) Cápsula hueca.

1.5.2.1 SEMILLA SINTÉTICA DE CAPA SIMPLE

Es la manera más sencilla de encapsular material vegetativo para la producción de semillas sintéticas. Para ello, los explantes, cuyo origen puede ser de cultivos *in vitro* o de plantas, se aíslan y transfieren a una solución del hidrogel (Cameron, 2008; Martinsen *et al.*, 1989). Éste formará una cubierta, cuya dureza dependerá de su concentración, la del agente gelificante, así como del tiempo de gelificación. Estos factores afectarán directamente la permeabilidad de la semilla sintética, siendo entonces de fundamental interés el determinar las condiciones óptimas para la formación de cápsulas (Saiprasad, 2001). Se señala que la mejor combinación para producir cápsulas flexibles y permeables es la de alginato de sodio al 3% (p/v) y cloruro de calcio 100 mM, con un tiempo de

gelificación de 20 a 30 min (Alatar y Faisal, 2012; Hung y Trueman, 2012 a, b; Hung y Trueman, 2011; Ozudogru *et al.*, 2011; Ahmad y Anis, 2010; Tabassum *et al.*, 2010; Sarkar y Naik, 1998).

1.5.2.2 SEMILLA SINTÉTICA DE CAPA DOBLE

El procedimiento para producir una semilla sintética de capa doble consiste en recubrir la semilla sintética de capa simple con una cubierta más de la combinación empleada de alginato de sodio y cloruro de calcio en el primer paso. Esta semilla doblemente encapsulada tiene la ventaja de proporcionar una mejor protección a los propágulos (Sharma *et al.*, 2013).

1.5.2.3 SEMILLAS SINTÉTICAS DE CÁPSULA HUECA

Al utilizar este procedimiento, la cápsula resultante consiste de un centro líquido rodeado por una membrana de alginato de calcio, cuyo grosor puede ser ajustado con base en la concentración del gelificante y el tiempo de gelificación (Figura 1.9). En las semillas sintéticas de capa simple, los explantes, por lo general, se localizan cerca de la superficie de la cápsula, lo cual le confiere una protección incompleta comparada con la semilla cigótica, donde el endospermo protege al embrión.

Este tipo de semillas ha resultado ser una opción prometedora, ya que ofrecen una protección completa al explante, en comparación con aquellas de capa simple y de capa doble (Sharma *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2000).

1.6 MATRICES UTILIZADAS EN LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS SINTÉTICAS

Entre las matrices más utilizadas para la obtención de semilla sintéticas se encuentran los hidrogeles. Dadas las bondades de su empleo en esta metodología, se llevan a cabo grandes esfuerzos a nivel mundial para encontrar nuevos materiales que hagan más eficiente el proceso de encapsulación, así como que permitan además incorporar otros elementos a dicha matriz, tales como constituyentes del medio de cultivo, productos fitosanitarios e incluso, microorganismos benéficos para el desarrollo de la semilla

(González-Paneque *et al.*, 2004).

Parte fundamental para el éxito en la germinación y la posterior conversión de la semilla artificial en una planta vigorosa radica en la naturaleza de la matriz empleada para la encapsulación, se pueden emplear diversos agentes gelificantes, como son el Poliox (resina soluble en agua), Polico 2133, agar, agarosa, alginato de sodio, alginato de potasio, carboximetil celulosa, goma guar, Gelrite, carragenina, goma tragacanto, nitrocelulosa y la combinación de alginato de sodio con gelatina, entre otros. Sin embargo, el más empleado por las ventajas que ofrece es el alginato de sodio, tales como su baja toxicidad, bajo costo, rápida gelificación, disponibilidad y características de biocompatibilidad (Reddy *et al.*, 2012; Ara *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 1998; Redenbaugh *et al.*, 1987).

1.7 ALGINATO

El alginato o ácido algínico y sus sales se obtienen a partir de las algas pardas, especies pertenecientes a la familia de las Feofíceas. El alginato es un biopolímero polielectrolito (polímero que posee numerosos grupos electrolíticos), conformado por dos tipos de unidades monoméricas: el ácido -D-manurónico (M) y el ácido -L-gulurónico (G). La estructura de la cadena está formada por largas secuencias de bloques-M, bloques-G y bloques-MG (McHugh, 1987). La capacidad gelificante está directamente relacionada con la cantidad de bloques-G presentes a lo largo de la cadena, ya que éstos tienen sitios de unión para cationes divalentes (*i.e.* calcio) que le permiten formar cavidades, que se explican perfectamente con el modelo de “caja de huevo” (Figura 1.9). El uso de este biopolímero ha adquirido una gran relevancia, ya que es utilizado en diversos campos, desde la industria farmacéutica para embeber fármacos hasta la protección ambiental, particularmente en el tratamiento de aguas residuales. En la actualidad, se manufacturan más de 200 tipos de alginatos diferentes (Vicini *et al.*, 2015).

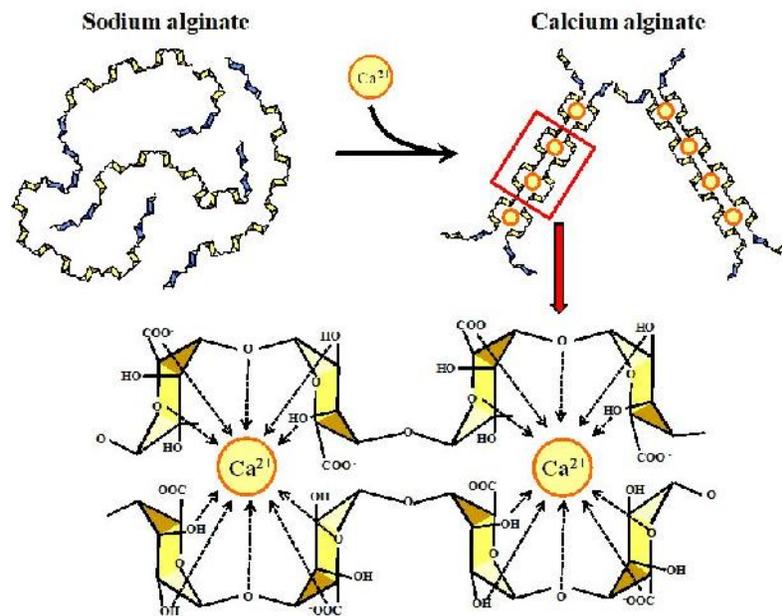


Figura 1.19 Entrecruzamiento del alginato de sodio con un catión divalente (Ca^{2+}). Modelo de la caja de huevo (Kashima e Imai, 2012).

1.7.1 USOS DEL ALGINATO DE SODIO

Al alginato como un polisacárido de origen natural, se le han dado muchas aplicaciones, por ejemplo, en la industria culinaria, se usa ampliamente como un emulsificador y un estabilizador en los sustitutos de productos bajos en grasa por su inherente propiedad de interaccionar con las proteínas, grasas o fibras. Este biopolímero también se utiliza como agente gelificante en productos alimenticios, como mezclas de alginato-pectina, independientemente del contenido de azúcar, para producir productos bajos en calorías (Augst *et al.*, 2006). Por otro lado, debido a su baja toxicidad, también se emplea en las industrias de bioingeniería, farmacéutica (como excipiente de drogas y material de impresión dental) y biomedicina, en esta última se utiliza como material de apósitos para heridas agudas o crónicas (Faried *et al.*, 2016; Lee y Mooney, 2012).

1.7.2 PROPIEDADES DEL ALGINATO

Entre las propiedades físicas destacables del alginato está su amplia solubilidad en agua,

la cual está limitada por tres parámetros: 1) pH del disolvente, 2) fuerza iónica del medio y 3) la presencia de iones gelificantes en el disolvente. Para que los alginatos sean solubles, es esencial que la solución alcance un valor de pH tal que permita que los grupos carboxílicos se desprotonen. El alginato se hidroliza en condiciones ácidas. El mecanismo de hidrólisis ácida de los enlaces glucosídicos presentes en este polímero fue descrito por Timell (1964), el cual involucra tres etapas: 1) protonación del oxígeno glucosídico para producir un ácido conjugado, 2) heterólisis del ácido conjugado para dar origen a un grupo terminal no reducido y a un ión carbonio-oxonio y 3) adición rápida de agua para el ión carbonio-oxonio, formando un grupo terminal reducido.

Un cambio en la fuerza iónica del medio también afecta la conformación, la extensión de la cadena y la viscosidad del polímero y finalmente, su solubilidad. Esta propiedad puede cambiar al aumentar la masa molecular del alginato, lo cual no es muy deseable. El alginato gelifica en presencia de iones divalentes como Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} . Es por eso que para que permanezca soluble debe estar libre de iones de entrecruzamiento (Lee y Mooney, 2012; Pawar y Edgar, 2012).

El alginato en polvo puede durar varios meses sin degradarse, si se almacena en un lugar fresco, seco y en oscuridad; sin embargo, si se guarda en un lugar frío, su vida se puede extender hasta por varios años. Por otro lado, se sabe que el ácido algínico se degrada más rápidamente que el alginato de sodio. La razón de la velocidad de degradación está dada por la catálisis intramolecular de los grupos carboxilos C-5 (Pawar y Edgar, 2012).

1.8 EXPLANTES EMPLEADOS PARA SEMILLA ARTIFICIAL

Los embriones representan el tejido ideal para producir semilla sintética; sin embargo, cuando el sistema de producción de ES no está completamente desarrollado, debido a la dificultad del tejido para producir embriones o a problemas con la maduración de los mismos, otro tipo de tejido puede ser empleado como propágulo. Entre los tejidos empleados con mayor frecuencia se citan a los brotes axilares, brotes adventicios, callos, protocormos, segmentos nodales y raíces transformadas, entre otros. Todos ellos tienen la posibilidad de transformarse en una planta completa y por lo tanto, considerarse como

semillas artificiales (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3 Tipos de explantes empleados para la producción de semillas sintéticas.

Tipo de explante	Especie	Referencia
Brote axilar	<i>Ocimum americanum</i> (Albahaca)	Mandal <i>et al.</i> , (2000)
Callo	<i>Allium sativum</i> (Ajo)	Kim y Park (2002)
Protocormo	<i>Cremastra appendiculata</i> (D. Don) Makino	Zhang <i>et al.</i> , (2009)
Segmentos nodales	<i>Dalbergia sissoo</i> Roxb.	Chand y Singh, (2004)
Raíz transformada	<i>Armoracia rusticana</i>	Uozumi <i>et al.</i> , (1992)
Embrión somático	<i>Vitis vinifera</i> L.	Nirala <i>et al.</i> , (2010)

1.9 SEMILLAS SINTÉTICAS DE ESPECIES FRUTALES

La aplicación de la tecnología de encapsulación para generar semillas sintéticas tiene como finalidad conservar y propagar especies vegetales, con el propósito de mejorar el intercambio de germoplasma, como en las especies ornamentales, los cereales, las plantas medicinales y las especies frutales (Rai *et al.*, 2009). Entre las especies frutales en las que la tecnología de encapsulación para la producción de semillas sintéticas ha resultado en un éxito, destacan principalmente los cítricos, el mango, la papaya y el plátano, por mencionar algunos ejemplos.

En el caso de los cítricos, los cuales son una excelente fuente de vitamina C y flavonoides, se han probado diferentes explantes. En el caso de *Citrus reticulata* Blanco, se emplearon ES encapsulados en alginato de sodio, a los que se adicionó GA₃ (ácido giberélico) al endospermo artificial, presentando una mayor capacidad de conversión a plántula en un medio semisólido, en comparación con ES no encapsulados (Antonietta *et al.*, 1998). La adición del fitorregulador les permitió almacenar la semilla a una temperatura de 4°C durante un mes, sin que perdiera su capacidad de germinación.

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los cultivos frutales de mayor importancia en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Su pulpa se emplea como fuente de provitamina A. En los primeros intentos (Ara *et al.*, 1999), se encapsularon ES de mango cv. Amrapali en alginato de sodio al 2% y el entrecruzamiento se realizó en una solución de cloruro de calcio 100 mM. La conversión a plántulas fue exitosa en aquellos embriones encapsulados que fueron cultivados en un medio con los macronutrientes del medio B₅ (Gamborg *et al.*, 1968), los micronutrientes del MS (Murashige y Skoog, 1962), 0.6% de agar, 3% de sacarosa y ácido giberélico 2.9 mM. Adicionalmente, se observó que la conversión a plántulas de los ES encapsulados se veía afectada por la fuerza iónica de los macronutrientes en el medio; la conversión máxima se logró en el medio que contenía la fuerza iónica completa de macronutrientes del medio B₅. Debido a que las semillas de mango son recalcitrantes y no pueden almacenarse por largo periodos, esta metodología resulta ser una alternativa ideal para la conservación del germoplasma de mango.

La papaya (*Carica papaya* L.) es una especie frutal de gran importancia en las tierras bajas del trópico, debido a que da frutos todo el año y por tanto, se puede obtener recursos de su cosecha. Sus frutos son una buena fuente de vitamina C y A (Manshardt, 1992). Se encapsularon ES en estadio cotiledonar en alginato de sodio, utilizando cloruro de calcio como agente de entrecruzamiento para la producción de semillas sintéticas de papaya (Castillo *et al.*, 1998). La frecuencia de regeneración se vio afectada significativamente por la concentración de alginato de sodio empleado, con la presencia o ausencia de nutrimentos en la cápsula y con el tiempo de exposición al cloruro de calcio.

Por otra parte, el plátano (*Musa* spp.) es un cultivo de importancia a nivel mundial, ya que constituye una fuente alternativa de almidón en países tropicales. Su forma de propagación es principalmente vegetativa (por medio de hijuelos), por lo que su producción anual es escasa. En los últimos años, se han desarrollado metodologías que utilizan meristemos apicales para obtener semillas sintéticas (Suprasanna *et al.*, 2001; Ganapathi *et al.*, 2001; Ganapathi *et al.*, 1992). Para la obtención de estas semillas, se emplearon meristemos apicales encapsulados en alginato de sodio al 3% en combinación con fitorreguladores y el medio MS (Ganapathi *et al.*, 1992). Cuando estos meristemos apicales encapsulados se colocaron en diferentes sustratos (papel filtro, algodón, soilrite y medio de cultivo) para su desarrollo, se observó que el medio de White (1943) resultaba

ser el más efectivo para una máxima conversión a plántulas. Sin embargo, estos meristemas apicales a pesar de estar encapsulados eran vulnerables a las infecciones bacterianas y tendían a oxidarse con facilidad. No obstante, estos problemas se solucionaron mediante la adición de 0.1% de carbón activado y una mezcla de antibióticos (rifampicina, cefatoxima y tetraciclina) al endospermo artificial.

Entre los objetivos de la producción de semilla sintética están el transporte e intercambio de material vegetativo sano, libre de microorganismos endógenos. Esto redundaría en un ahorro sustancial en el uso de pesticidas cuando se establecen nuevas plantaciones (Ganapathi *et al.*, 1992).

Ganapathi y colaboradores (2001) reportaron la primera encapsulación de ES de plátano cv. Rasthali (grupo genómico AAB) para producir semillas sintéticas, utilizando diferentes matrices de encapsulación, así como diferentes sustratos para el desarrollo de la planta. La frecuencia máxima de conversión (66%) de las semillas sintéticas a plantas se obtuvo cuando los ES se encapsularon en alginato de sodio al 5% y se cultivaron en medio MS basal.

OBJETIVO GENERAL

Establecer un protocolo para producir semillas artificiales mediante la encapsulación de embriones somáticos de plátano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarizar los parámetros metodológicos de encapsulación empleando alginato de calcio

Determinar el porcentaje de germinación de las semillas sintéticas en un sistema *in vitro*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

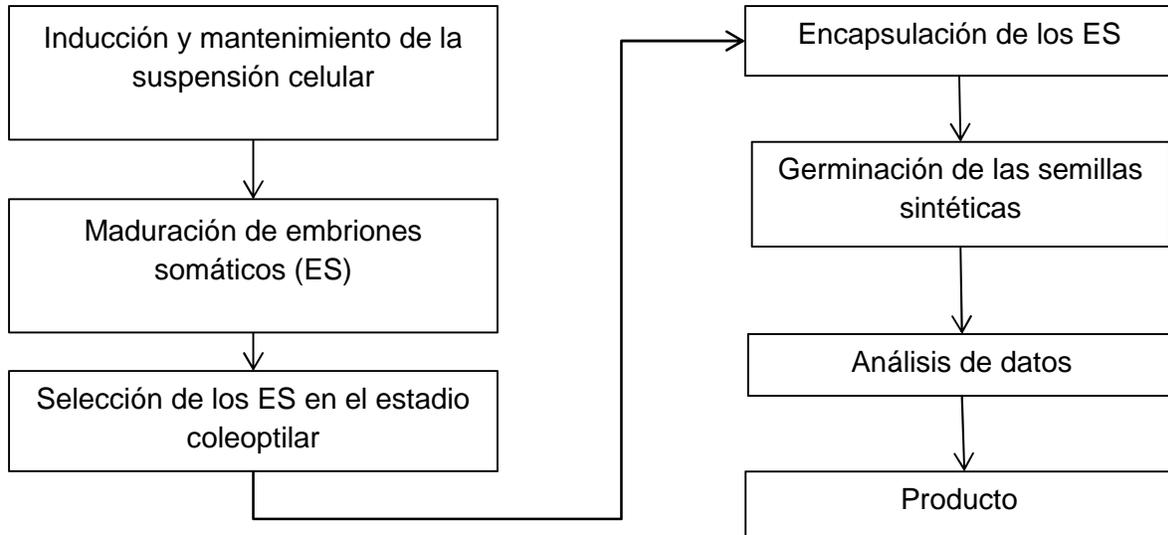


Figura 1.20 Estrategia experimental.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Los callos embriogénicos, material donado por el grupo de la Dra. Rosa Ma. Escobedo, se indujeron a partir de flores femeninas jóvenes plátano macho cv. Chifle (AAB), colectadas de plantas de la colección de germoplasma de Musáceas del CICY, que se encuentra ubicada en el sitio experimental Uxmal del INIFAP (INIFAP-Uxmal).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 INDUCCIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE

Partiendo de callo embriogénico ideal (Figura 3.1B), se pesaron 1.5 g de dicho material, el cual fue transferido a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio líquido M2 (Anexo 1), incubándose en condiciones de oscuridad en un orbitador a 90 rpm y 25 ± 2 °C. El medio se renovó cada semana.

Después de cuatro semanas del establecimiento de la suspensión embriogénica, ésta se filtró a través de una malla de acero inoxidable de 0.425 mm de abertura del poro en un embudo de punta corta a un tubo Falcon de 50 mL estéril. Se dejó sedimentar el paquete celular durante 20 min y transcurrido este tiempo, se sustituyeron dos terceras partes del medio antiguo con medio M2 (Anexo 1) nuevo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Este último procedimiento se repitió semanalmente manteniendo un 3% de paquete de volumen celular (PVC).

Por otra parte, a aquellos cultivos con agregados celulares de mayor tamaño también se les renovó el medio para continuar con su proliferación. Esto se realizó ajustando, en cada resiembra, a un paquete celular de 3% (v/v, correspondiente a 1.5 mL) en 45 ml de medio (30 mL de medio nuevo y 15 mL de medio proveniente de la suspensión filtrada). El

procedimiento se llevó a cabo semanalmente, siendo los cultivos mantenidos en oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en un orbitador a 90 RPM.

2.2.2 MADURACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE

La suspensión celular filtrada, con 18 días de incubación, se lavó dos veces con medio M2 (Anexo 1), pero sin regulador del crecimiento y se resuspendieron en 50 mL a una razón de 3% PCV con este mismo medio. Posteriormente, se inocularon volúmenes de 250 μL en cajas de Petri sobre medio de maduración Mma (Anexo 1). Las cajas Petri se incubaron en oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 80 días, tiempo en el que aparecen ES en los cuatro estadios (globular, tipo corazón, escutelar y coleoptilar). Transcurridos este tiempo, se procedió a seleccionar los embriones en el estadio coleoptilar para su encapsulación, lo cuales resultaron ser lo más adecuados para la producción de semillas sintéticas de plátano.

2.2.3 SELECCIÓN Y ENCAPSULACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE

Los embriones seleccionados, aquellos con una coloración blanco-opaca y presencia visible de la hendidura cotiledonaria (estadio coleoptilar), fueron colocados en una solución al 5% de alginato de sodio disuelto en medio MS (Anexo 2) sin fitorreguladores [25 embriones somáticos por cada tratamiento (Anexo 2)]. Luego de esta etapa, con una micropipeta de 1000 μL y puntas cortadas, se succionó la suspensión de embriones y se gotearon en una solución de cloruro de calcio al 2%. Solamente se conservaron las esferas que contenían un solo embrión en el estadio coleoptilar. Se desecharon aquellas cápsulas que tenían embriones en estadios más tempranos de desarrollo o que presentaban fenolización.

2.2.4 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS SINTÉTICAS

Para la germinación de las semillas sintéticas y los testigos positivos (ES sin encapsular), se utilizó el medio Gma (Anexo 1). Se colocaron 5 semillas por frasco con 5 réplicas, con sus respectivos controles positivos, y se incubaron en oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante ocho días. Transcurrido este periodo, los frascos se trasladaron al cuarto de fotoperiodo (16 h luz /8 h oscuridad) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. El experimento se llevó a cabo con tres réplicas biológicas. Se determinó el índice de germinación, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de germinación} = \frac{\text{semillas germinadas}}{\text{total de semillas inducidas a germinacion}} \times 100$$

Una vez que las plántulas tenían aproximadamente 3 cm de altura y al menos tres hojas expandidas, se transfirieron al medio de crecimiento (Anexo 1) para su enraizamiento. Para esto, se utilizaron cajas Magenta® de 375 mL, con 50 mL de medio de cultivo semisólido de crecimiento, las cuales se incubaron en condiciones de fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante un mes, tiempo necesario para que las plántulas desarrollaran raíces verdaderas para pasar al periodo de aclimatación.

2.2.5 ACLIMATACIÓN DE LAS PLANTAS PROVENIENTES DE LAS SEMILLAS SINTÉTICAS

Las plántulas que presentaron mayor vigor se sacaron de las cajas y sus raíces se lavaron con agua de la llave para eliminar el medio de cultivo excedente. Para prevenir una posible contaminación con microorganismos, las raíces se sumergieron en una solución bactericida-fungicida [2 g L^{-1} de oxitetraciclina y 1 mL L^{-1} de propiconazol (Tilt 250CE®)]. Después de este tratamiento, las plántulas se transfirieron a bolsas que contenían tierra combinada con la mezcla Sunshine #3 (Mezcla de turba fibrosa, vermiculita, cal dolomítica, yeso y agente de humedecimiento, ideal para un amplio rango de cultivos) en proporción 3:1. Las plántulas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero con riego constante cada tercer día.

2.2.6 ANÁLISIS DE DATOS

Todos los experimentos se realizaron de manera independiente al menos tres veces. Los datos fueron registrados y analizados estadísticamente mediante el análisis de variación de una vía, seguido por las pruebas de rango múltiple de Tukey, con un nivel de significancia de $p=0.05$, usando el software Minitab 17.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 INDUCCIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE

Para la inducción de estas suspensiones, se contó con callos embriogénicos provenientes de flores femeninas inmaduras. Estos callos tenían una coloración blanca cremosa (Figura 3.1A), de consistencia friable y presencia de embriones en estadios tipo globular y acorazonado (Figura 3.1B). Esta última característica permitió su fácil disgregación en el medio líquido M2 (Anexo 1).

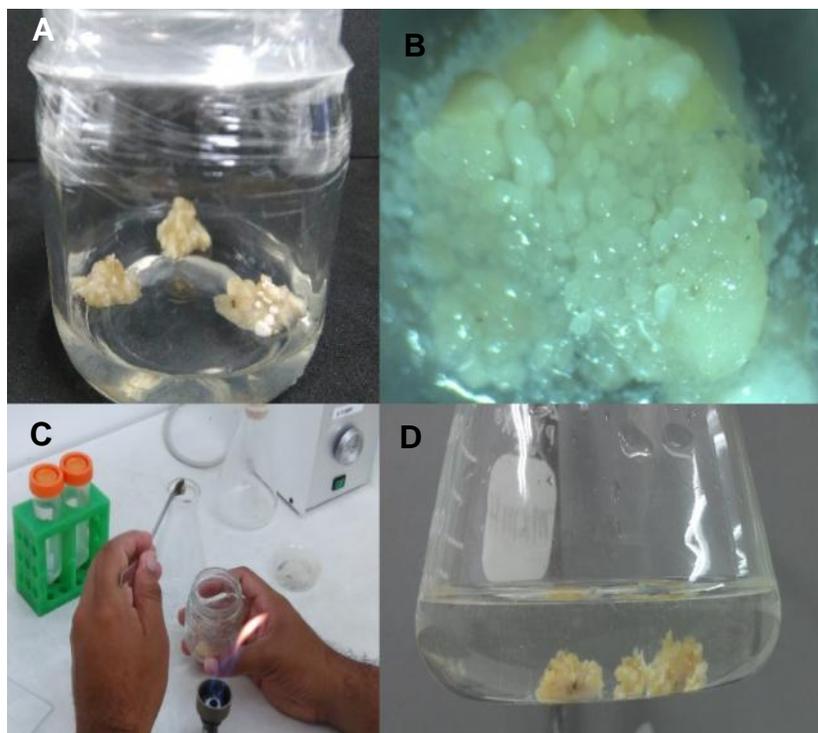


Figura 3.1 Inducción de la suspensión embriogénica de plátano macho cv. Chifle. A. Callo embriogénico; B. Acercamiento de callo embriogénico de plátano; C. Transferencia de callo embriogénico a un medio líquido y D. Inducción de la suspensión celular.

Después de la tercera resiembra semanal, se pudieron observar agregados embriogénicos, pro-embriones (4-8 células) y embriones globulares en el medio líquido, en el que se encontraban las suspensiones. A la cuarta semana de inducción, además de los agregados, se detectó la presencia de un sedimento que tenía la apariencia de arenilla en el fondo del matraz, que parecería corresponder a agregados de células pro-embriogénicas y embriones globulares que se habrían liberado del callo (Figura 3.2). Este hecho puso de manifiesto la existencia de numerosas células embriogénicas globulares, así como en estadios más avanzados de desarrollo, pues ya se podían observar embriones somáticos de los tipos corazón y escutelar (Strosse *et al.*, 2003). No obstante, también se observaron agregados heterogéneos, de formas irregulares, conformados por numerosas células en activa división.

Con el fin de ir seleccionando aquellas células que se estaban convirtiendo en embriones y para tratar de aumentar la población de éstas mismas en las suspensiones, se decidió filtrar las suspensiones madre a través de una malla de 0.425 mm de tamaño de poro (Figura 3.2).

Los agregados celulares de mayor tamaño fueron resembrados en el medio M2, a razón de 3% de paquete celular con respecto al medio, para que continuaran proliferando y liberando más células con potencial embriogénico. Debe mencionarse que el medio de resiembra estaba constituido por dos partes de medio nuevo y una parte de medio condicionado, i.e. el medio en que originalmente se encontraban las células

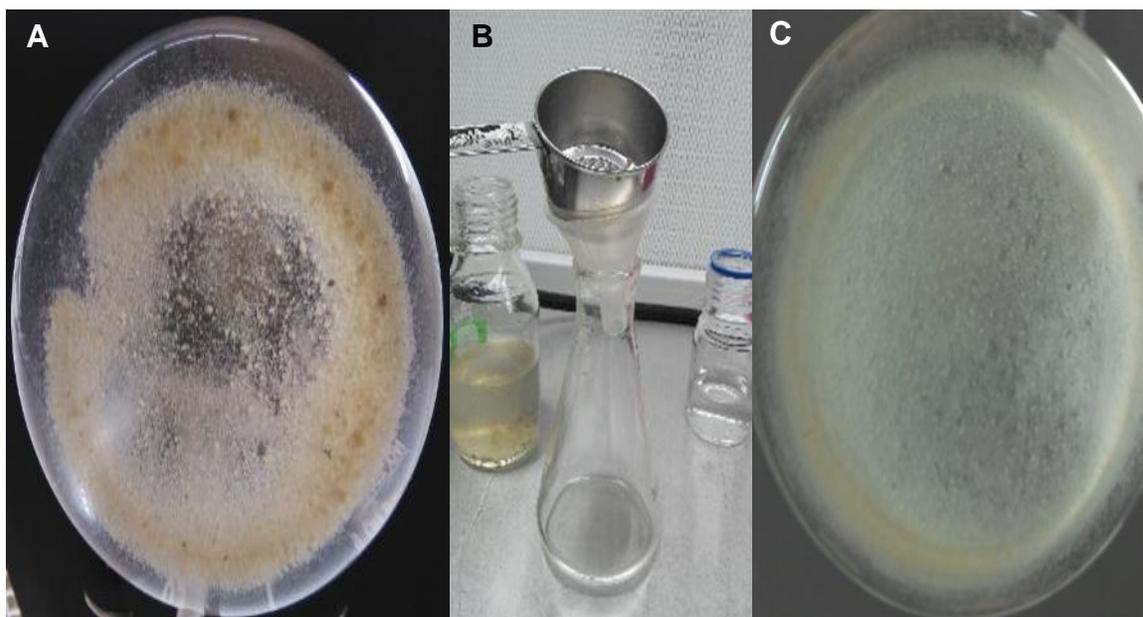


Figura 3.2 Filtración de la suspensión embriogénica. A. Suspensión celular embriogénica madre antes de filtrar; B. Proceso de filtrado de la suspensión celular y C. Suspensión embriogénica filtrada.

Es importante señalar que en este trabajo se utilizaron suspensiones embriogénicas del cv. Chifle, debido a las dificultades que presentó el mantenimiento de las suspensiones embriogénicas del cv. Manzano (Figura 3.3). En este caso, se observó la presencia de células oxidadas, posiblemente debido a la acumulación de compuestos fenólicos (Figura 3.3 A). Sin embargo, la suspensión pudo recuperarse al eliminar aquellas células oxidadas mediante filtración (Figura 3.3 B). Este proceso debió hacerse en dos pasos, dado que, durante el primero, no se lograron eliminar todas las células oxidadas. En la siguiente resiembra y filtración, se eliminaron el resto de células oxidadas (Figura 3.3 C), para volver a contar con una suspensión celular embriogénica en crecimiento (Figura 3.3 D).

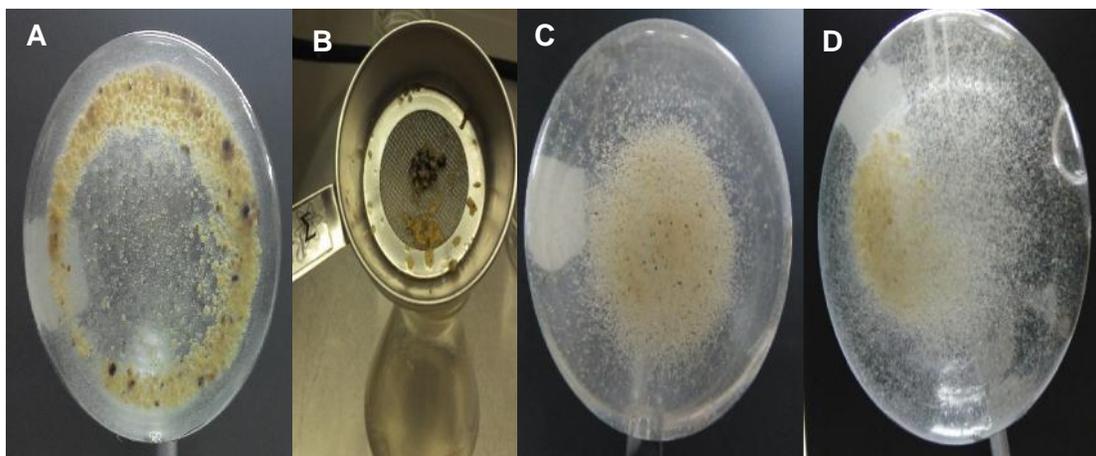


Figura 3.3 Mantenimiento y limpieza de las suspensiones celulares que presentaban oxidación. A. Suspensiones celulares con algunos agregados celulares oxidados; B. Filtrado de la suspensión; C. Suspensión celular resultante de la primera etapa de limpieza y D. Suspensión celular sin células oxidadas, es decir, con células en franca proliferación.

3.2 MADURACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE

Es importante mencionar que a las suspensiones filtradas se les permitió estabilizarse mediante su resiembra en medio M2 durante 18 días, con cambio de medio semanal. Entonces, se procedió a una segunda filtración a través del mismo tipo de malla (425 micras), con la finalidad de separar embriones de mayor grado de diferenciación de los agregados embriogénicos de menor tamaño (Figura 3.4). Esto permitió enriquecer la suspensión de embriones en los estadios adecuados para continuar el proceso (Ibaraki y Kurata, 2001).

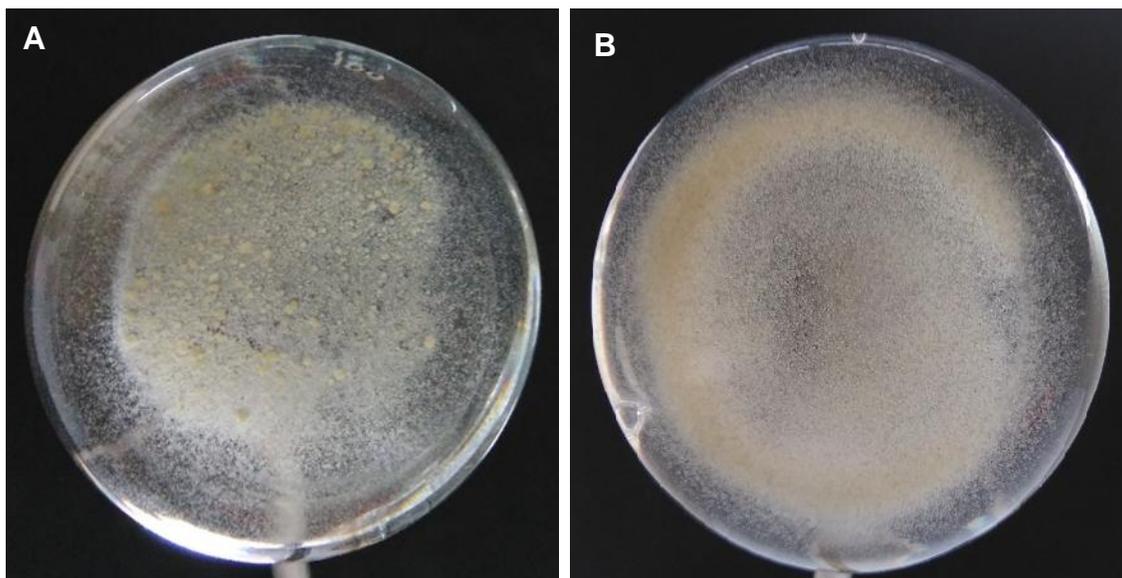


Figura 3.4 Suspensiones celulares embriogénicas de plátano macho cv. Chifle. A. Suspensiones madre sin filtrar y B. Suspensión embriogénica filtrada.

Es de gran importancia tener en cuenta la densidad de la suspensión celular o PVC (paquete del volumen celular) del inóculo, ya que una elevada densidad conduciría a una proliferación excesiva durante la fase de maduración, limitando tanto los nutrientes como el espacio para un correcto desarrollo de los embriones somáticos (Montalban *et al.*, 2010). Por lo tanto, el PVC que se usó en este trabajo fue de 3%. Así mismo, se debe mencionar que, antes de introducir alícuotas de esta suspensión filtrada a la siguiente fase, se eliminaron los fitorreguladores, mediante lavados con el medio M2.

En la figura 3.5, se observan diferentes aspectos del proceso de maduración de los embriones de plátano. La maduración de los embriones se llevó a cabo en el medio Mma, que carece de reguladores del crecimiento y al que se le han añadido las vitaminas del medio de Morel y Wetmore y KH_2PO_4 1.47 mM, así como se han aumentado las concentraciones de sacarosa y gelrite (131 mM y 3% p/v, respectivamente).

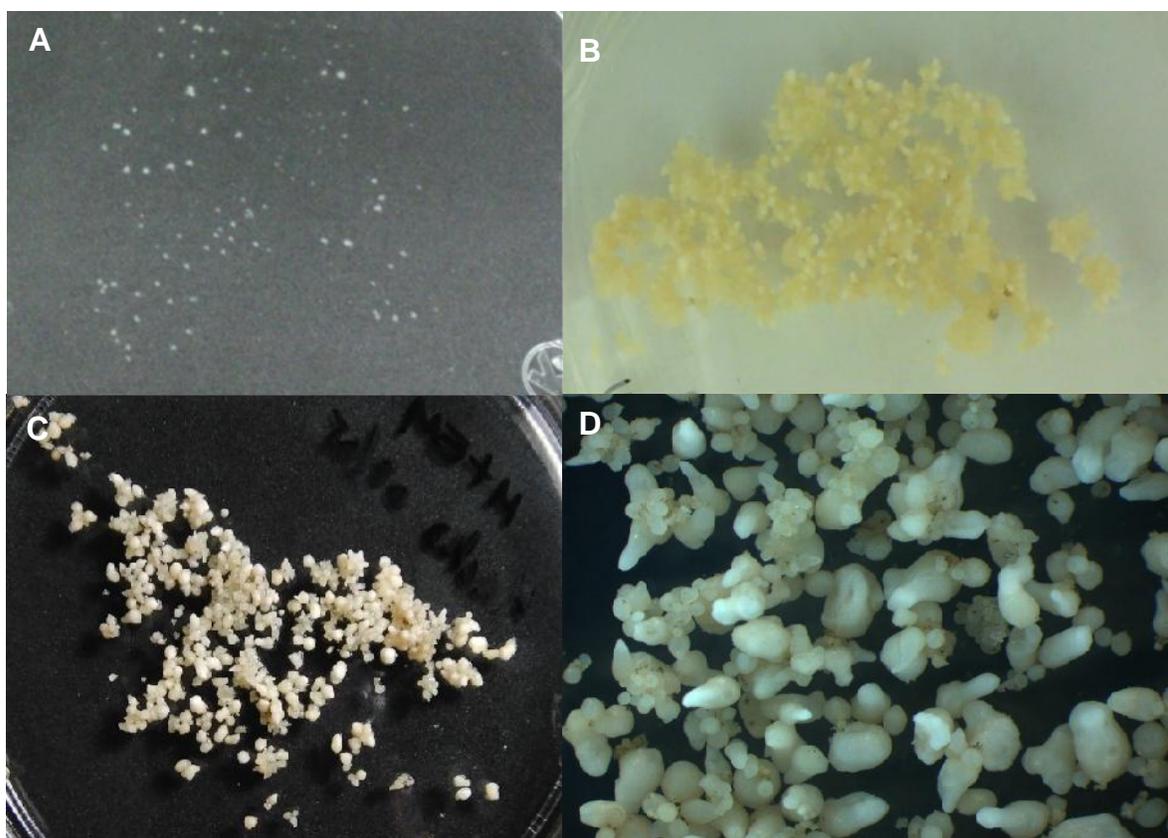


Figura 3.5 Desarrollo y maduración de embriones somáticos de plátano macho cv. Chifle a partir de suspensiones embriogénicas plaqueadas en medio semisólido. A. Embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo a las dos semanas de maduración; B. Embriones somáticos en maduración de 30 días; C. Embriones en maduración de 45 días y D. Embriones en maduración de 80 días.

A través del tiempo de incubación, se pudieron observar algunas características clásicas de las estructuras embrionarias de monocotiledoneas. A tiempos cortos, la mayoría de las estructuras presentaron una forma globular y al pasar el tiempo, se pudieron distinguir poblaciones de los otros estadios de desarrollo: acorazonado, escutelar e incluso coleoptilar en períodos más largos (80 días).

Con el fin de ilustrar las dificultades que se pueden presentar en esta etapa, se incluyen los siguientes datos sobre la fase de maduración, pero con el cultivar Manzano. Se pudo observar que a los 60 días de incubación, los embriones empezaron a tener una apariencia vítrea y se tornaron de color café. Al correr los días, esta situación empeoró

hasta alcanzar la oxidación completa de las células y por tanto, la pérdida de los embriones somáticos en maduración, como se observa en la placa (Figura 3.6).

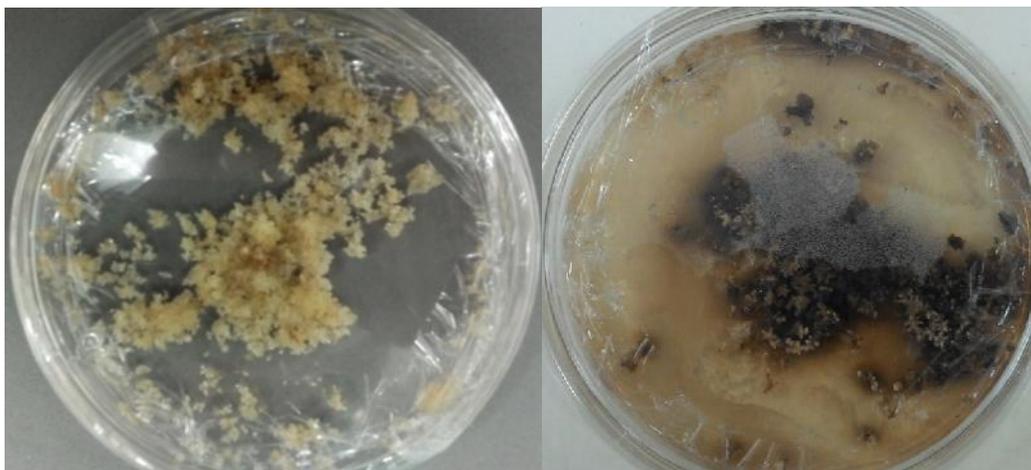


Figura 3.6 Embriones de plátano cv. Manzano. A. Embriones con apariencia vítrea a los 60 días de incubación y B. Embriones completamente oxidados (80 días de incubación).

3.3 SELECCIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE PARA LA ENCAPSULACIÓN

El desarrollo de embriones somáticos de plátano macho cv. Chifle se llevó a cabo en el medio sin reguladores de crecimiento (Mma). En este medio, se pudo observar el desarrollo de embriones en diferentes estadios (Figura 3.7).

Se seleccionaron embriones del estadio coleoptilar bien desarrollados, de una edad de ochenta días, para su posterior encapsulación en alginato.

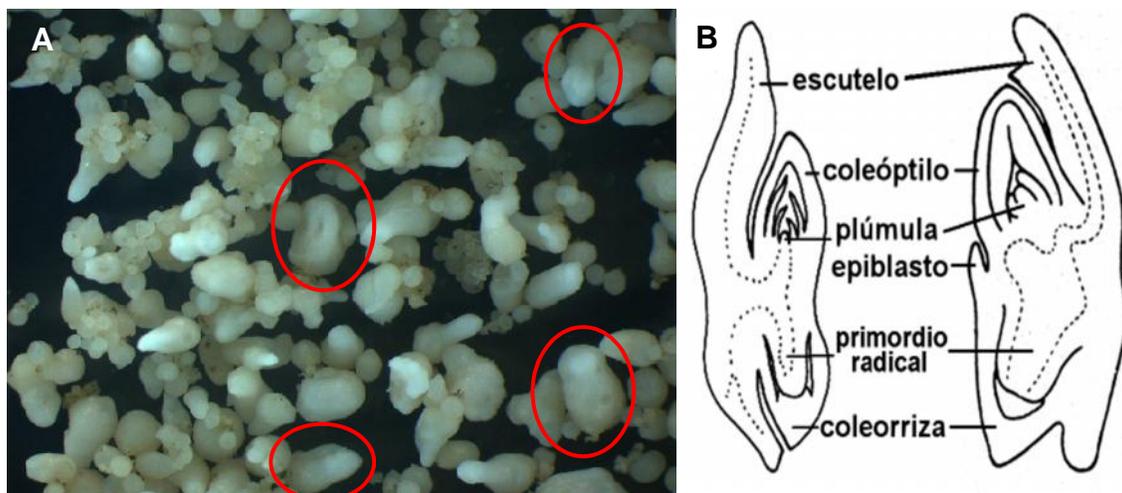


Figura 3.7 Embriones somáticos de plátano macho cv. Chifle de ochenta días. A. Embriones somáticos en estadio coleoptilar de plátano (círculos en rojo) y B. Características de desarrollo de un embrión coleoptilar (izquierda) vs uno de tipo escutelar (derecha).

3.4 ENCAPSULACIÓN DE EMBRIONES SÓMATICOS DE PLÁTANO MACHO CV. CHIFLE

Las cápsulas diferían entre sí en su forma, en función de las variables evaluadas (concentración de alginato y calcio). La estructura de las semillas, su forma y transparencia varió de acuerdo con la cantidad de alginato de sodio usado (3% y 5%), así como cuando se combinaron con las diferentes concentraciones de cloruro de calcio (1%, 2% y 3%) (Cuadro 3.1). Es importante mencionar que el alginato estaba disuelto en medio MS, sin fitorreguladores.

Cuadro 3.1 Características de las semillas sintéticas.

Alginato / cloruro de calcio	Consistencia de la cápsula
Alginato 3%/CaCl ₂ 1%	No se formaron
Alginato 3%/CaCl ₂ 2%	No se formaron
Alginato 3%/CaCl ₂ 3%	Muy firme, pero frágil
Alginato 5%/CaCl ₂ 1%	No se formaron
Alginato 5%/CaCl ₂ 2%	Firme
Alginato 5%/CaCl ₂ 3%	Muy firme, pero frágil

Cuando se usó la concentración más baja de cloruro de calcio (1%), en combinación con cualquiera de las concentraciones de alginato de sodio (3% ó 5%), no se lograron obtener esferas. El alginato solamente recubrió la superficie del embrión (Figura 3.8). Algo similar ocurrió al utilizar una concentración de cloruro de calcio al 2% combinada con la solución de alginato de sodio al 3%. Con base en estos resultados, estas combinaciones fueron descartadas.



Figura 3.8 Semillas sintéticas de plátano macho cv. Chifle, producto de la combinación de alginato de sodio. A. 3% y B. 5%. En ambos casos, se empleó cloruro de calcio al 1%.

Por el contrario, en el caso de las combinaciones cruzadas del cloruro de calcio al 3% con ambas soluciones de alginato de sodio (3% y 5%), las semillas sintéticas eran muy firmes, pero frágiles, ya que las cápsulas se desmoronaban al manipularlas (Figura 3.9).



Figura 3.9 Semillas sintéticas de plátano macho cv. Chifle, producto de la combinación de alginato de sodio. A. 3% y B. 5%. En ambos casos, se empleó cloruro de calcio al 3%.

Una semilla sintética debe presentar una consistencia firme que permita su manipulación y almacenamiento. En este caso, las esferas que tuvieron esta característica fueron aquellas obtenidas con la combinación de alginato de sodio al 5% y cloruro de calcio al 2% (Figura 3.10).



Figura 3.10 Semillas sintéticas de plátano macho cv. Chiffle. En este caso, la combinación que produjo la consistencia deseada fue alginato de sodio al 5% y cloruro de calcio al 2%.

3.5 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS SINTÉTICAS

Una vez obtenidas las semillas sintéticas, se colocaron a razón de cinco semillas por frasco, en medio Gma, que contenía las vitaminas del MS y KH_2PO_4 1.47 mM y se disminuyó la concentración de sacarosa, pero no la del gelrite (87.6 mM y 3% p/v, respectivamente), con respecto al medio Mma. Como testigos positivos, se utilizaron embriones sin encapsular. Se realizaron evaluaciones semanales para detectar la germinación, que se definió como emergencia de la radícula.

En la figura 3.11, se puede observar que durante el periodo de germinación (30 días), no se presentaron diferencias entre los embriones somáticos sin encapsular (testigo positivo) y las semillas sintéticas del cultivar Chifle. Esto parece indicar que la selección de los embriones somáticos no fue homogénea, lo que quiere decir que no se seleccionaron en el mismo estadio de maduración.

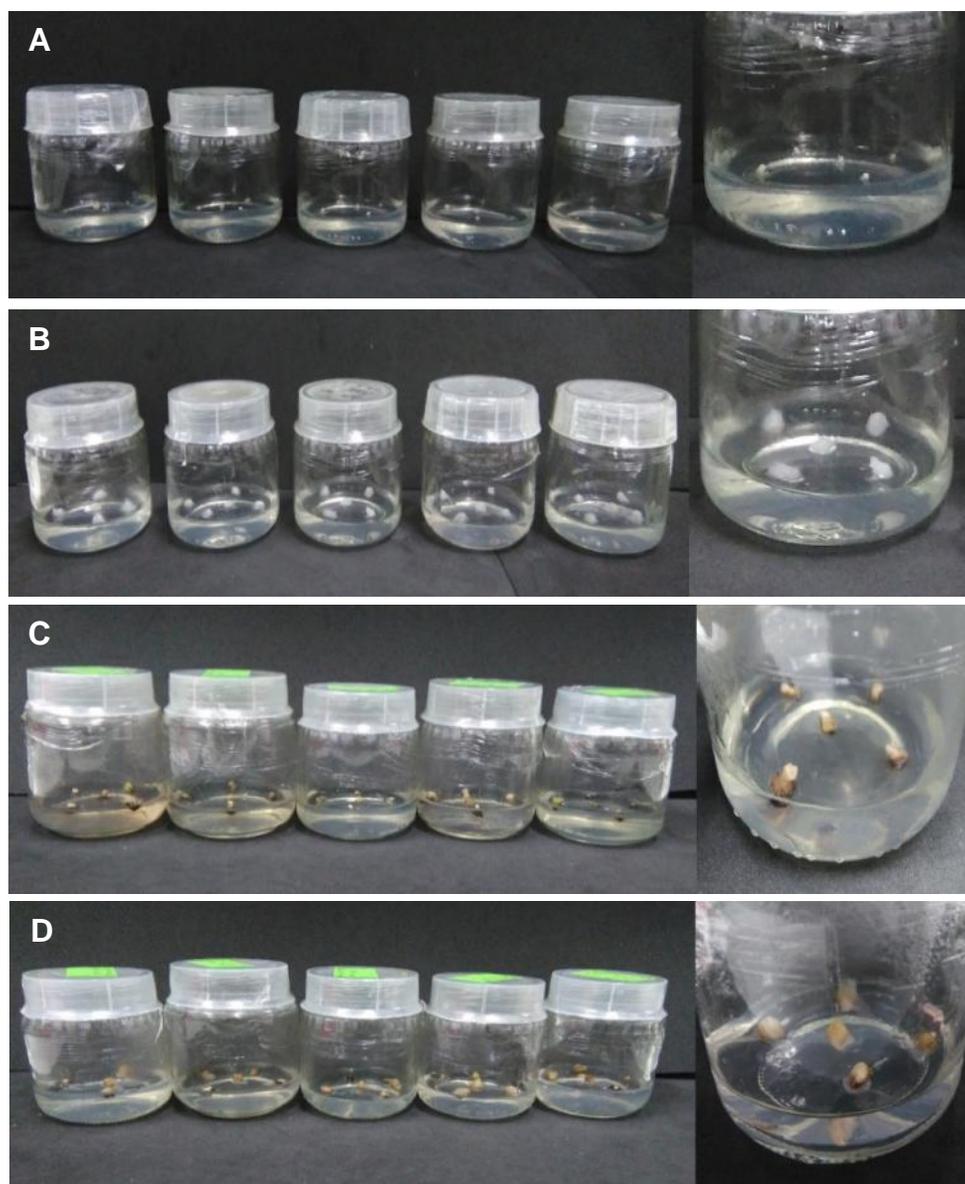


Figura 3.11 Germinación de embriones somáticos encapsulados y sin encapsular de plátano macho cv. Chifle. A. ES sin encapsular (testigo positivo) recién sembrados, a la derecha, un

acercamiento de uno de los frascos; B. ES encapsulados recién sembrados, a la derecha, un acercamiento de uno de los frascos; C. ES sin encapsular (testigo positivo) después de 30 días de incubación, a la derecha, un acercamiento de uno de los frascos y D. ES encapsulados después de 30 días de incubación, a la derecha, un acercamiento de uno de los frascos.

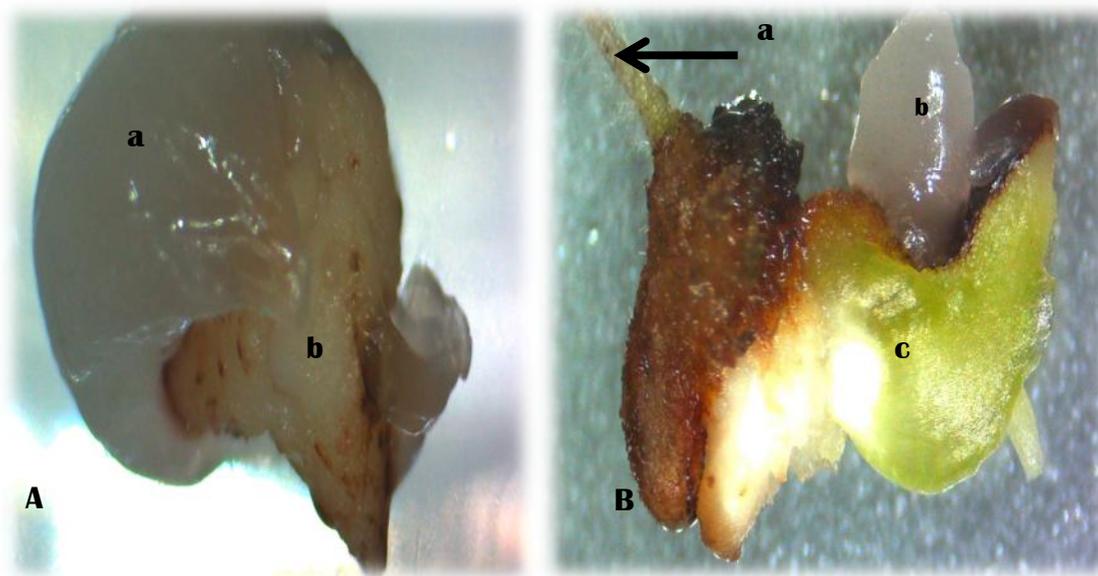


Figura 3.12 Germinación del embrión somático de *Musa* cv. Manzano encapsulado después de 60 días. A. Emergencia de la radícula. (a) Cápsula de alginato; (b) Radícula emergente. B. Embrión germinado de *Musa*. (a) Radícula; (b) Fragmento de la cápsula de alginato y (c) Plúmula.

En la figura 3.12A se observa una imagen de la germinación de un embrión somático encapsulado del cv. Manzano a los 60 días de cultivo; mientras que en la figura 3.12B, se puede visualizar el desarrollo de la radícula y la plúmula en embriones que ya han geminado.

En el cuadro 3.1 se presentan los resultados del porcentaje de germinación de las semillas sintéticas del cv. Manzano, en las que se utilizaron combinaciones de dos concentraciones de alginato y tres de cloruro de calcio. Al realizar un análisis de varianza con una $p < 0.05$, se pudieron descartar las primeras combinaciones que no mostraron significancia entre sí (Alginato 5%/CaCl₂ 1% y Alginato 3%/CaCl₂ 1%), ya que en ambos casos el hidrogel solamente formaba una delgada capa irregular sobre la superficie de los

embriones. En el caso de las combinaciones de alginato de sodio (3% y 5%) con el cloruro de calcio al 3%, también se descartaron pues las cápsulas resultantes presentaron gran firmeza, pero también fueron demasiado frágiles al momento de la manipulación. Además, en estas semillas se observaron los porcentajes de germinación más bajos (64 y 52%, respectivamente) en comparación de las otras combinaciones.

En general, al aumentar el contenido de alginato y calcio disminuyó el porcentaje de germinación (véase combinación alginato 5%/CaCl₂ 3%). El calcio es necesario para la polimerización del alginato y el aumento en su concentración modifica la rigidez de la capsula, por lo que es probable que el efecto adverso observado sobre el porcentaje de germinación esté relacionado con la resistencia mecánica que oponga esta matriz a la emergencia de la radícula.

La combinación alginato 3%/CaCl₂ 2% también se descartó, pues de manera similar a las combinaciones alginato 3%/CaCl₂ 1% y 5%/CaCl₂ 1%, solamente se formó una capa irregular sobre el embrión. Con base en los resultados presentados, se eligió la combinación de alginato 5%/CaCl₂ 2%, que aun cuando no tenía el mayor porcentaje de germinación, las cápsulas obtenidas presentaban una consistencia firme que cubría por completo al embrión y eran de fácil manipulación.

Cuadro 3.2 Porcentaje de los ES encapsulados del cv. Manzano que germinan a los 60 días en las diferentes concentraciones de alginato y CaCl_2

Alginato \ CaCl_2	1%	2%	3%
3%	84 % \pm 2 ^a	72 % \pm 2 ^{ab}	64 % \pm 2 ^{ab}
5%	88% \pm 2 ^a	72 % \pm 5 ^{ab}	52 % \pm 2 ^b

El análisis estadístico indica que no hay diferencia significativa en el porcentaje de germinación entre tratamientos, excepto el tratamiento de 5% alginato y 3% CaCl_2 ; sin embargo, el factor de discriminación que llevó a elegir una entre las diferentes combinaciones fue la consistencia de la semilla sintética.

A partir de los datos obtenidos de los ensayos del cv. Manzano, se realizaron pruebas con el cv. Chifle, donde se compararon los porcentajes de germinación de las semillas sintéticas con los de ES sin encapsular. Los embriones sin encapsular presentaron una germinación que vario de 3 a 9% de germinación, mientras que en las semillas sintéticas fue un 5 a 12% de germinación, en tres experimentos independientes con $n=25$ (Figura 3.13).

El experimento de germinación se llevó a cabo usando ES de plátano macho cv. Chifle de tres líneas celulares independientes utilizando cinco réplicas por tratamiento. Cada réplica constó de 5 ES por frasco.

El análisis de la prueba t de Student indicó que el porcentaje de germinación de las semillas sintéticas de plátano macho cv. Chifle, producto de la combinación alginato de sodio 5%/ CaCl_2 2%, no presentó una diferencia significativa respecto al testigo (ES sin encapsular), $p < 0.05$ en los dos primeros experimentos; sin embargo, en el tercer experimento se observaron diferencias claras entre los testigos y las semillas sintéticas (Figura 3.13).

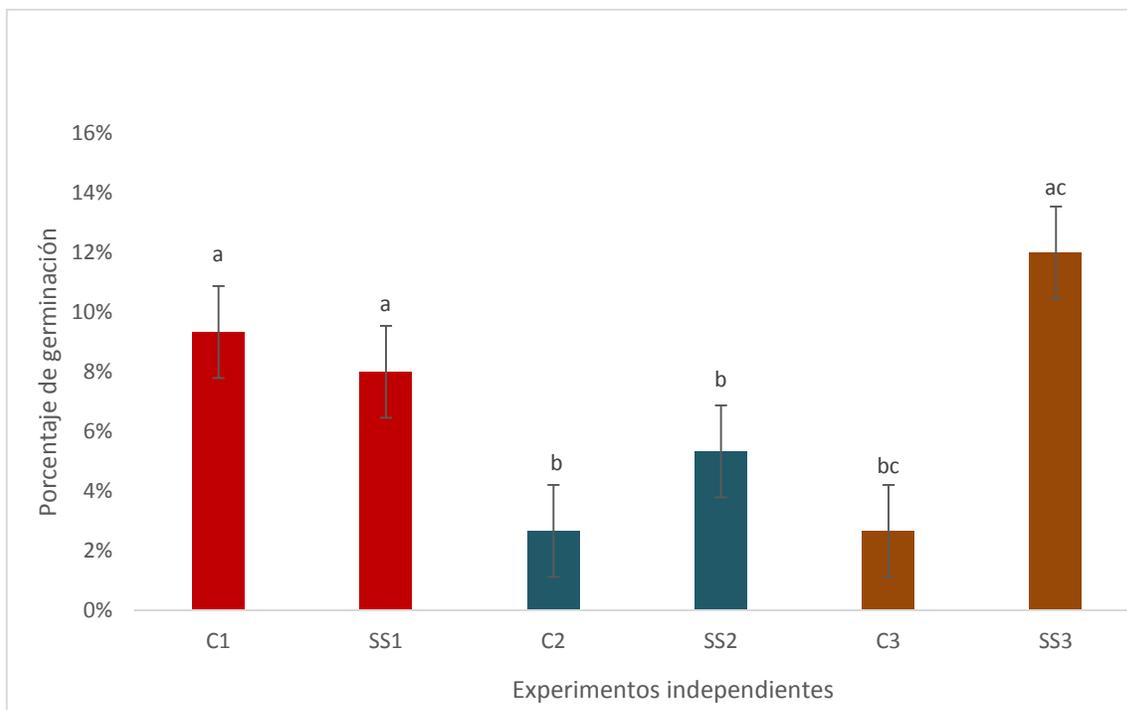


Figura 3.13 Porcentajes de germinación de las semillas sintéticas (SS1, SS2, SS3) de plátano macho cv. Chifle (3 experimentos independientes).

En la figura 3.14, se muestra el proceso completo de la obtención de las semillas sintéticas hasta la obtención de plántulas *in vitro* de plátano macho cv. Chifle, que inicia con la maduración de la suspensión embriogénica y que requiere de un monitoreo semanal. Este monitoreo implica observar que los embriones maduren de manera adecuada, ya que, si esto no se cumple, se necesita repetir el paso de maduración. En caso de que los embriones maduren en tiempo y forma, se procede a seleccionar aquellos embriones que han alcanzado el estadio coleoptilar (después de 80 días de incubación) y se transfieren a la solución de alginato. La suspensión de embriones en alginato se hace gotear en el cloruro de calcio para provocar la formación de las cápsulas de hidrogel. Después de 15 minutos en agitación, se separan las esferas y se elimina el exceso de cloruro de calcio con agua destilada estéril. Por último, las semillas se transfieren a cajas de Petri con papel absorbente estéril para eliminar el exceso de agua y de ahí, al medio de germinación.

De manera gráfica, el proceso completo de la obtención de las semillas sintéticas hasta la obtención de plántulas *in vitro* de plátano macho cv. Chifله se presenta a continuación.

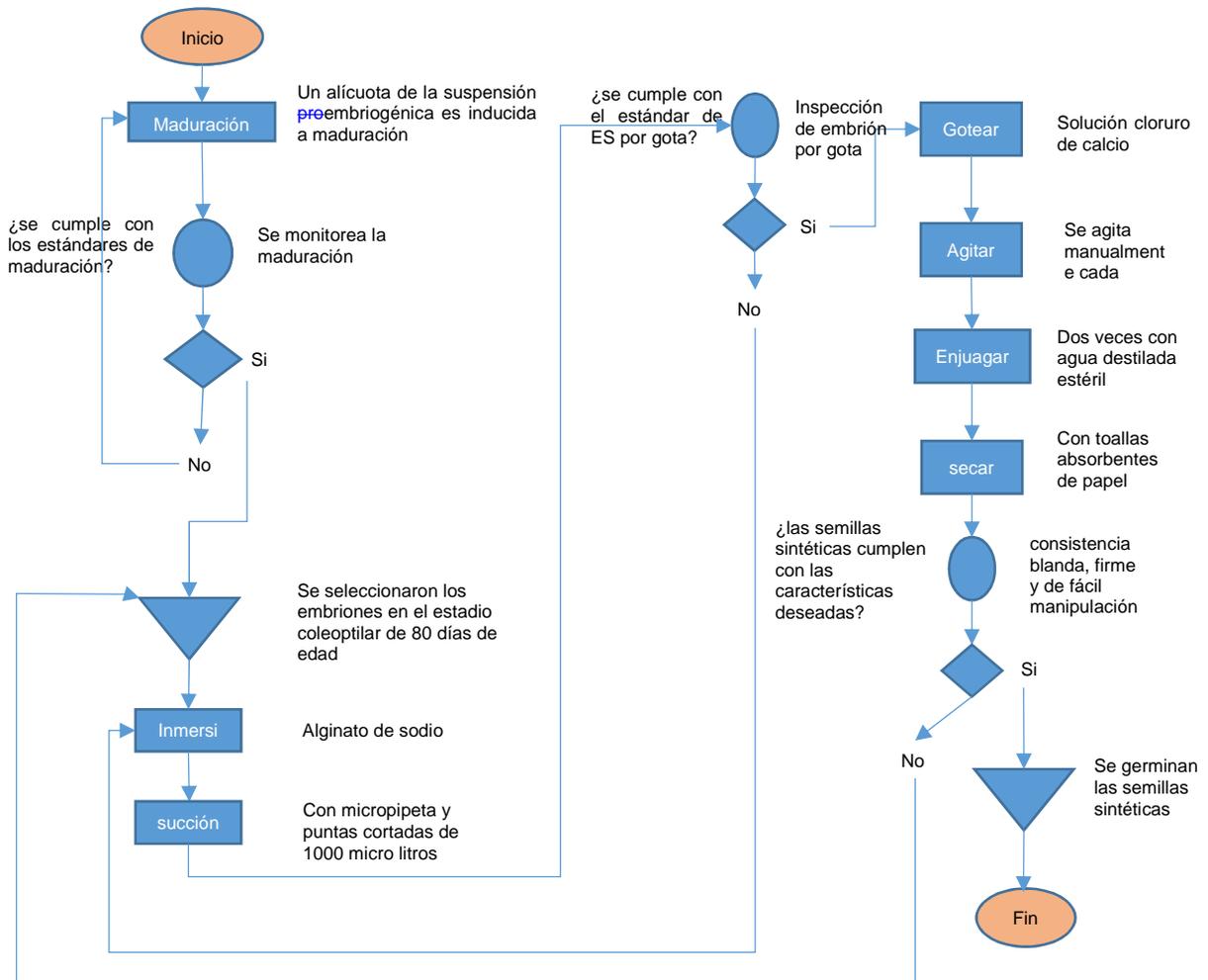


Figura 3.14 Diagrama de proceso para la producción de semillas sintéticas de plátano.

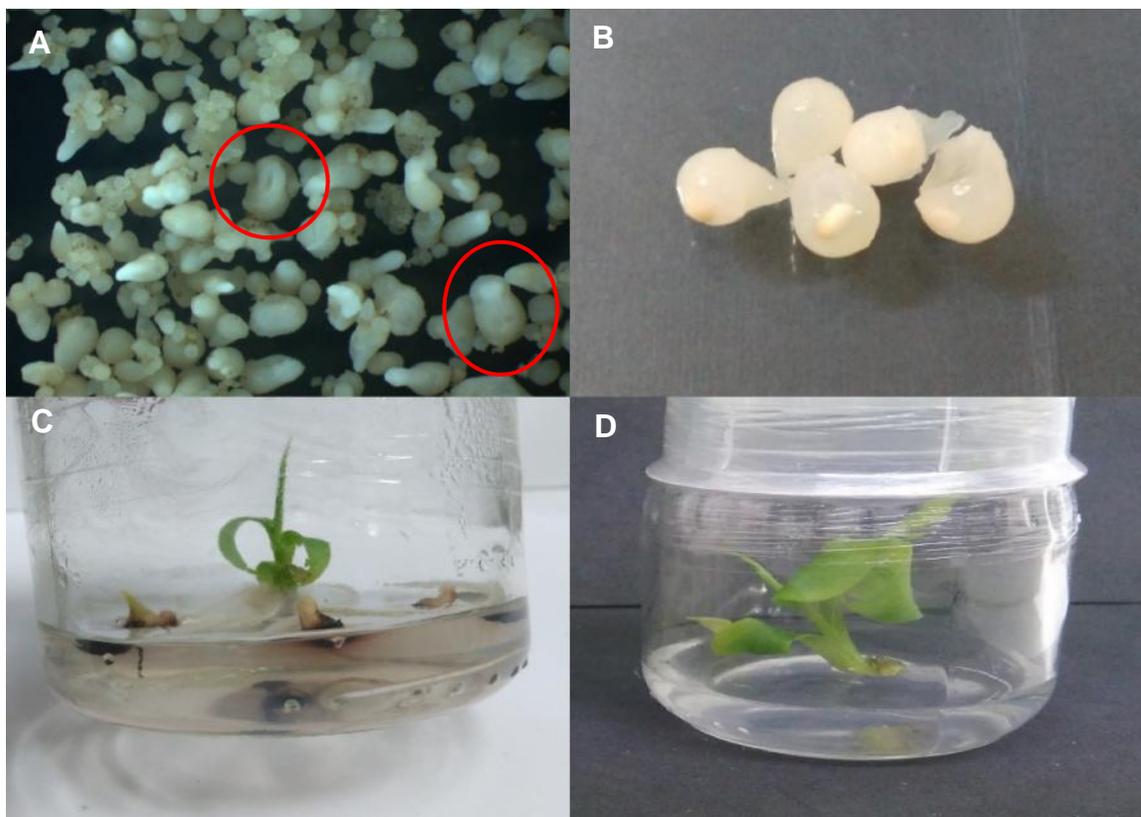


Figura 3.15 Obtención y germinación de las semillas sintéticas. A. Embriones somáticos de ochenta días de incubación; B. Semillas sintéticas de plátano macho cv. Chifle; C. Germinación de las semillas sintéticas a las ocho semanas de incubación y D. Plantas de plátano en medio Cr.

Se presentan los siguientes datos como evidencia de que es factible el obtener plantas sanas, listas para su introducción en plantación, haciendo uso de las semillas sintéticas. Los datos obtenidos corresponden al cv. Manzano. En la figura 3.16, se ilustra el proceso de aclimatación de las plántulas a condiciones de invernadero. Primero, las plántulas se colocaron en el medio Cr (Anexo 1) para la inducción de raíces. Después de 10 días, se pudo detectar la presencia de raíces verdaderas, por lo que se transfirieron a cajas magentas. A los 20 días, se retiraron las cajas que servían de tapas y se sustituyeron por bolsas de plástico. Después fueron transferidas al invernadero.

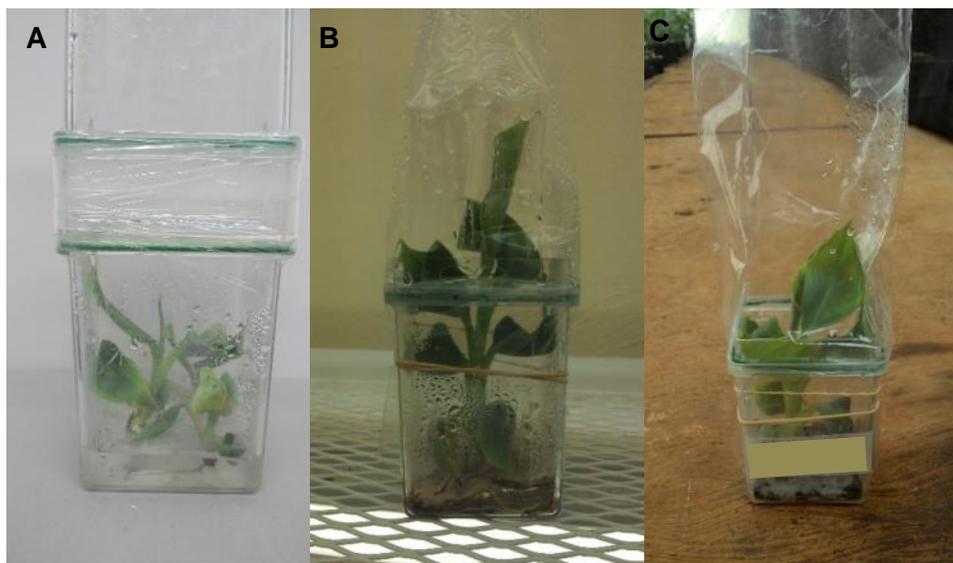


Figura 3.16 Aclimatación de plántulas de plátano cv. Manzano. A. Inducción de la formación de raíces de la plántula; B. Aclimatación de la plántula al ambiente del cuarto de cultivo y C. Transferencia de la planta a condiciones de invernadero.

Por último, estas plántulas ya acondicionadas se transfirieron a bolsas con sustrato conformado por tierra y la mezcla Sunshine #3 (Mezcla de turba fibrosa, vermiculita, cal dolomítica, yeso y agente de humedecimiento ideal para un amplio rango de cultivos) en proporción 3:1. Las plántulas que desarrollaron raíces y de 5 a 6 hojas en un periodo de cuatro meses, se trasplantaron a campo (Figura 3.17).



Figura 3.17 Aclimatación de las plantas a condiciones de invernadero. A. Plantas con 30 días en condiciones de invernadero; B. Plantas con 60 días en condiciones de invernadero; C. Plantas con 90 días en condiciones de invernadero y D. Plantas con 120 días en condiciones de invernadero.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Los embriones somáticos (ES) son estructuras bipolares que contienen la misma información genética al originarse de una célula somática totipotente, que poseen un meristemo apical y un meristemo radicular, regiones capaces de originar un brote y la raíz respectivamente. Los ES son similares a los embriones cigóticos de las semillas de los frutos, ya que poseen características que permiten el desarrollo de una planta (Saiprasad, 2001).

Sin embargo, estos embriones somáticos difieren de los cigóticos al no presentar una cubierta que los proteja de las adversidades del entorno. Esto lleva a la idea de utilizar a este embrión como explante y proporcionarle una cubierta artificial, propuesta hecha por Murashige en los 70's (Redenbaugh *et al.*, 1991).

Este enfoque ha tenido un amplio rango de aplicabilidad. Entre las metodologías que se han desarrollado a partir de ese momento está la encapsulación en hidrogeles para la producción de semillas sintéticas, lo que coadyuvaría en la conservación y el intercambio de germoplasma. Las semillas sintéticas se han utilizado en la micropropagación de especies híbridas únicas y raras, de genotipos de interés, de plantas genéticamente inestables sin semillas o de aquellas que necesitan estar en contacto con micorrizas para su germinación (Gantait *et al.*, 2015).

La encapsulación permite proteger a los diferentes explantes producidos mediante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, tales como meristemos apicales, meristemos radiculares, segmentos nodales y ES, con cubiertas artificiales que simulan los endospermos de las semillas cigóticas (Rai *et al.*, 2009).

Las cubiertas que se han probado han sido muy diversas, como son el Poliox (resina soluble en agua), Polico 2133, agar, agarosa, alginato de sodio, alginato de potasio, carboximetil celulosa, goma guar, Gelrite, carragenina, goma tragacanto, nitrocelulosa y la combinación de alginato de sodio con gelatina, entre otras. Sin embargo, el más empleado es el alginato de sodio por las ventajas que ofrece, como son su baja toxicidad, bajo costo, rápida gelificación, disponibilidad y características de biocompatibilidad (Reddy *et al.*, 2012; Ara *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 1998; Redenbaugh *et al.*, 1987).

Esta innovadora tecnología ha sido aplicada para diversas especies tanto medicinales, ornamentales e incluso frutales; entre las medicinales está *Vitex trifolia*, *Stevia rebaudiana*, *Dendrobium nobile*, *Begonia semperflorens* y de las frutales están el plátano, mango, guayaba, piña, manzana y papaya (Gantait *et al.*, 2015; Mohanty *et al.* 2013, Sakhanokho *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2012; Rai *et al.*, 2009). De las especies frutales, en el caso del plátano ha habido grandes avances respecto a la obtención exitosa de una suspensión pro-embriogénica (Jafari *et al.*, 2015).

Uno de los principales problemas que se presentó en este estudio fue la muerte de la suspensión embriogénica del cultivar Manzano por alteraciones en la aireación del cultivo al permanecer estático durante un tiempo indeterminado. Las suspensiones celulares en general deben permanecer en movimiento orbital a una velocidad óptima para evitar la sedimentación de los agregados (baja velocidad) o el daño mecánico en las células (exceso de velocidad), como se determinó para *Azadirachta indica*, donde los cultivos que fueron cultivados bajo diferentes velocidades de rotación presentaron cambios en la viabilidad celular (Prakash y Srivastava, 2007).

A partir de este suceso y con la experiencia obtenida del trabajo en el cv. Manzano, se decidió realizar los ensayos con el cv. Chifle, del cual se contaba con una suspensión embriogénica generada a partir de los callos con buena respuesta a la embriogénesis. Estos callos presentaban una coloración blanca cremosa, de consistencia friable, lo que dio lugar a su fácil disgregación en el medio de cultivo, resultando en una suspensión celular que fue mantenida por resiembra con un PVC de 3%, similar al determinado por Strosse y colaboradores (2003) para diferentes cultivares de *Musa* spp. y confirmado por Barranco-Olivera y colaboradores (2009), quienes encontraron que, a esta densidad, las células se encuentran biológicamente activas y no compiten por los nutrientes del medio.

El paso de filtración permitió el enriquecimiento de la población de células embriogénicas, así como inducir el buen desarrollo y diferenciación de los embriones somáticos (Ibaraki y Kurata, 2001). Las células embriogénicas que se filtraron se estuvieron resembrando durante dos semanas y tres días, renovando dos terceras partes del medio líquido antiguo.

La suspensión celular fue plaqueada en cajas Petri con medio semisólido e incubada en condiciones de oscuridad a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 30 a 40 días. Transcurrido este tiempo, se observó que el porcentaje de embriones maduros incrementaba, lo que coincide con los resultados de Aguilar *et al.* (2008), quienes reportaron que entre los días 20 y 30, la masa de embriones se incrementaba y la maduración de éstos se había obtenido con éxito.

El trabajo realizado por el grupo de la Dra. Gracia-Medrano indica que las suspensiones embriogénicas deben incubarse en el medio de maduración durante 40-90 días para alcanzar el estadio de desarrollo adecuado de los embriones somáticos (Enríquez Valencia, 2013). Los datos indicaron que, al aumentar el tiempo de incubación a 80 días, se obtenían mejores resultados en cuanto a madurez y cantidad de embriones en el estadio correcto.

En el presente trabajo, se empleó un periodo de maduración de las suspensiones embriogénicas del cv. Chifle de ochenta días de incubación para la obtención de ES en el estadio coleoptilar [ES con una coloración blanco-opaca y presencia visible de la hendidura cotiledonaria (sección 1.3.2.1)]. Durante este estadio, se observa de manera clara, mediante cortes histológicos, que el embrión bipolar cuenta ya con un meristemo radicular y el foliar, así como un coleóptilo organizado (Kackar *et al.*, 1993).

Los ES que presentaban las características mencionadas fueron seleccionados y transferidos a diferentes combinaciones de concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio con la finalidad de obtener semillas sintéticas de consistencia firme para su fácil manipulación. Esto último se consiguió con la combinación alginato de sodio al 5% y cloruro de calcio al 2%, resultado similar al de Ganaphati y colaboradores (2001), quienes al encapsular ES emplearon una combinación de alginato 5% y cloruro de calcio al 2.5%.

Las semillas sintéticas del cv. Manzano obtenidas con esta última combinación presentaron un porcentaje de germinación del $72 \pm 5\%$. En el caso del cv. Chifle, el porcentaje de germinación de los embriones encapsulados estuvo en el rango de 5 a 12%, muy por debajo de los datos obtenidos por el grupo de la Dra. Escobedo (datos no publicados) para este cultivar (90 a 95%). Es posible que la variación observada en la respuesta de germinación de los ES encapsulados en los tres experimentos

independientes respecto de los testigos sin encapsular, se pueda deber a que no hubo una homogénea selección del estadio de desarrollo de los ES y que, por ejemplo, se hayan seleccionado ES en estadio escutelar, en vez del coleoptilar.

Por otra parte, la diferencia en los porcentajes de germinación también podría deberse a que las suspensiones embriogénicas que se indujeron a maduración no presentaban las características deseables para el plaqueo. Las suspensiones embriogénicas deben ser homogéneas, esto es deben tener un número mayor de células embriogénicas y proembriones globulares que de células diferenciadas, conocidas como suspensiones de tipo II o III, para que los embriones que se desarrollen y diferencien tengan una mejor respuesta de germinación (80 y 90%), respectivamente (Domergue *et al.*, 2000).

Con las semillas sintéticas de plátano obtenidas para el cv. Manzano, se obtuvo la emergencia de brotes en 2-3 semanas y el desarrollo completo de la planta a las 4 semanas. Es de notarse que hay diferencias importantes en este parámetro dependiendo del sustrato en que se germinan las semillas; por ejemplo, si el sustrato empleado es el medio MS preparado con agua destilada, la tasa de germinación fue del 33%, mientras que el uso del mismo medio preparado con agua corriente dio lugar a un 53.3% (Ganapathi *et al.*, 2001).

Por lo tanto, se sugiere el planteamiento de una estrategia para la propagación y el establecimiento de encapsulamiento de embriones somáticos para la obtención de semillas artificiales, para promover la conservación y el aprovechamiento sostenible de plátano. Esto deberá fomentar la investigación anatómica, histológica y embriológica en la propagación *in vitro* de otras especies de Musáceas, en las cuales la obtención de semillas se dificulte y se encuentren amenazadas o en peligro de extinción, manteniendo así, bancos de germoplasma para su conservación ante un mundo cambiante que pone en riesgo la supervivencia de la biodiversidad, no solamente mexicana, sino del mundo.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

Se estableció la metodología para la producción de semillas sintéticas de plátano *Musa* spp., determinándose que la concentración óptima de alginato de sodio, así como la de cloruro de calcio para la encapsulación de embriones somáticos de plátano del cv. Manzano y del cv. Chifle fueron 5% y 2%, respectivamente.

El establecimiento de un buen monitoreo de las suspensiones celulares embriogénicas antes del plaqueo es un punto crítico de control para la obtención de una buena tasa de maduración, así como la correcta y homogénea selección de embriones en estadio coleoptilar es vital para obtener una mayor tasa de germinación de los ES.

Se observó que las semillas sintéticas producidas de ambos cultivares germinaron adecuadamente, dando lugar a plántulas; solamente en el caso del cv. Manzano, fue posible obtener plantas completas.

PERSPECTIVAS

La tecnología de encapsulación para la producción de semillas sintéticas es una técnica que tiene como propósito la conservación de diferentes especies vegetales. Esta técnica permite una mayor versatilidad para la manipulación y el intercambio de germoplasma.

Debido al aumento en la demanda de recursos fitogenéticos, la tecnología de encapsulación y el cultivo de tejidos *in vitro* ofrecen alternativas para cubrir la demanda de estos recursos, debido a que con estas técnicas de propagación se puede obtener material viable, libre de patógenos, que aumente su probabilidad de conversión a plantas y, por lo tanto, de aumentar la producción de especies agrícolas que hasta hoy se ven limitadas por problemas en su propagación.

En el mediano plazo, se espera que las semillas sintéticas tengan la capacidad de germinar en condiciones *ex vitro*, sin el temor a la contaminación por agentes biológicos y para aumentar la productividad de los cultivos.

ANEXOS

ANEXO 1

Medios de cultivo empleados para la regeneración *in vitro* del plátano macho cv. Chifle (López-Gómez, 2015).

Componentes	ESI-2					
	Inducción de CE (MA)	Proliferación de CE (MA1)	Suspensiones celulares (M2)	Maduración (Mma)	Germinación (Gma)	Crecimiento (Cr)
Macroelementos	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Microelementos	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS	Morel y Wetmore	MS	MS
KH ₂ PO ₄ (mM)				1.47	1.47	1.47
Biotina (µM)	4.1	4.1	4.1			
Reguladores						
2,4-D (µM)	18	4.5	4.52			
AIA (µM)	5.71	1.4275				
ANA (µM)	5.4	1.35				
Suplementos						
Extracto de malta (mg L ⁻¹)			100			
Glutamina (µM)			680			
Sacarosa (mM)	87.6	87.6	87.6	131	87.6	87.6
Gelrite (g L ⁻¹)	2	2		3	3	2
Luz/oscuridad (h)	0/24	0/24	0/24	0/24		Medio
Subcultivos (d)	30	31	7	90	30	30
Duración (d)	60 d de inducción sin subcultivo	150 d de proliferación con subcultivos	90	90	60	30
pH	5.7	5.7	5.3	5.8	5.8	5.8

ANEXO 2

Formulación del medio MS (Murashige y Skoog, 1962)

Sales principales (macronutrientes)

- Nitrato de amonio (NH_4NO_3) 1,650 mg/l
- Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 440 mg/l
- Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 370 mg/l
- Fosfato de potasio (KH_2PO_4) 170 mg/l
- Nitrato de potasio (KNO_3) 1,900 mg/l

Sales menores (micronutrientes)

- Ácido bórico (H_3BO_3) 6.2 mg/l
- Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.025 mg/l
- Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.025 mg/l
- Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 27.8 mg/l
- Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 22.3 mg/l
- Yoduro de potasio (KI) 0.83 mg/l
- Molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25 mg/l
- Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8.6 mg/l
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.2 mg/l

Vitaminas

- i-Inositol 100 mg/l
- Niacina 0.5 mg/l
- Piridoxina · HCl 0.5 mg/l
- Tiamina · HCl 0.1 mg/l
- Glicinas 2 mg/l
- Edamina (opcional) 1 g/l

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M.E., V. Ortiz y J.A. Sandoval (2008). Embriogénesis somática en plátanos y bananos: perspectivas y limitaciones, en: Turrialba CR (ed). CATIE-Serie técnica. Boletín Técnico No. 27. CATIE, San José. 50 pp.
- Ahmad, N. y M. Anis (2010). Direct plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Vitex negundo*. *Biologia Plantarum*, 54, 748-752.
- Ahmed, M.R., M. Anis y H.A. Al-Etta (2015). Encapsulation technology for short-term storage and germplasm exchange of *Vitex trifolia* L. *Rend. Fiss. Acc. Lincei*, 26, 133-139.
- Alatar, A.A. y M. Faisal (2012). Encapsulation of *Rauvolfia tetraphylla* microshoots as artificial seeds and evaluation of genetic fidelity using RAPD and ISSR markers. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 1367-1374.
- Ali, A., I. Gull, A. Majid, A. Saleem, S. Naz y N.H. Naveed (2012). *In vitro* conservation and production of vigorous and desiccation tolerant synthetic seeds in *Stevia rebaudiana*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 1327-1333.
- Almodóvar, W., M. Díaz y A. Alvarado (2002). Enfermedades de plátano y guineo [online] Disponible: <http://www.uprm.edu/agricultura/sea/clinica/PLAT&GUINEO2002.pdf> (071109)
- Antonietta, G.M., P. Emanuele y S. Alvaro (1998). Effects of encapsulation on *Citrus reticulata* Blanco somatic embryo conversion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55(3), 235-238.
- Ara, H., U. Jaiswal, y V.S. Jaiswal (1999). Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (*Mangifera indica* L.). *Plant Cell Reports*, 19(2), 166-170.
- Ara, H., U. Jaiswal y V.S. Jaiswal (2000). Synthetic seed: prospects and limitations. *Current Science*, 78, 1438-1444.

- Arun Kumar, M.B., V. Vakeswaran y V. Krishnasamy (2005). Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 81, 97-100.
- Augst, A.D., H.J. Kong y D.J. Mooney (2006). Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6, 623-633.
- Australian Government (2008). The biology of *Musa L.* (banana). Version 1. Department of Health and Ageing, Office of the Gene Technology Regulation. Disponible en: <http://www.ogtr.gov.au/>.
[Acceso 29 de septiembre 2017]
- Bapat, V.A. y M. Mhatre (2005). Bioencapsulation of somatic embryos in woody plants, en: *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Jain, S.M. y P.K. Gupta (eds.). Springer, Dordrecht. pp. 539-552.
- Barranco-Olivera, L.A., R. Gómez Kosky, M. Reyes Vega L. Posada Pérez, M. Frerie Seijo y I. Herrera O'Farrill (2009). Efecto de la densidad de inóculo en la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar híbrido de banano FHIA-18 (*Musa* spp. AAAB). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11, 40-47.
- Bukhari, N.A., I. Siddique, K. Perveen, I. Siddiqui y M.S. Alwahibi (2014). Synthetic seed production and physio-biochemical studies in *Cassia angustifolia* Vahl.- a medicinal plant. *Acta Biologica Hungarica*, 65(3), 355-367.
- Cameron, S.I. (2008). Plant tissue culture gelling agents and supports: history, development and function, en: *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. Teixeira da Silva, J.A. (ed.). 1st ed, vol. V, Global Science Books, Isleworth. pp. 171-190.
- Capuano, G., E. Piccioni y A. Standardi (1998). Effect of different treatments on the conversion of M.26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73, 299-305.

- Cardoza, V. (2008). Tissue culture: The manipulation of plant development, en: Plant Biotechnology and Genetics. Stewart, C.N.Jr. (ed.). John Wiley & Sons, Hoboken. pp. 113-134.
- Castillo, B., M.A.L. Smith y U.L. Yadava (1998). Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. Plant Cell Reports, 17(3), 172-176.
- Chand, S. y A.K. Singh (2004). Plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Dalbergia sissoo* Roxb., a timber-yielding leguminous tree species. Journal of Plant Physiology, 161, 237-243.
- Darvari, F.M., M. Sariah, M.P. Puad y M. Maziah (2010). Micropropagation of some Malaysian banana and plantain (*Musa* sp.) cultivars using male flowers. African Journal of Biotechnology, 9(16), 2360-2366.
- Domergue, F.G.R., N. Ferrière y F.X. Côte (2000). Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. Grande Naine) embryogenic cell suspension. Plant Cell Reports, 19, 748-754.
- Enríquez-Valencia, A.J. (2013). Transcritos involucrados en la maduración del embrión somático de *Musa*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 103 pp.
- Escalant, J.V., C. Teisson y F. Cote (1994). Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 30P, 181-186.
- FAO (2014). Banana Market Review and Banana Statistics 2012-2013.
Disponible: <http://www.fao.org/docrep/019/i3627e/i3627e.pdf>
[Acceso 27 de septiembre 2017].
- Faried, M., K. Shameli, M. Miyake, Z. Zakaria, H. Hara, N.A. Khairudin y M. Etemadi (2016). Ultrasound-assisted in the synthesis of silver nanoparticles using sodium alginate mediated by green method. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 11, 547-552.

- Gamborg, O.L., R.A. Miller y K. Ojima (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 151-158.
- Ganapathi, T.R., L. Srinivas, P. Suprasanna y V.A. Bapat (2001). Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryos of banana cv. Rasthali (*Musa* spp. AAB group). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37(2), 178-181.
- Ganapathi, T.R., P. Suprasanna, V.A. Bapat y P.S. Rao (1992). Propagation of banana through encapsulated shoot tips. *Plant Cell Reports*, 11(11), 571-575.
- Gantait, S., S. Kundu, N. Ali y N.C. Sahu (2015). Synthetic seed production of medicinal plants: a review on influence of explants, encapsulation agent and matrix. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1-12.
- González-Paneque, O.S., S. Pupo, R. José y R.A. Espinosa (2004). La semilla artificial. Una solución en la biodiversidad mundial, en: Cuadernos de Biodiversidad. Galante, E. (ed.). Centro Iberoamericano de Biodiversidad (CIBIO), Universidad de Alicante, España. 15, 17-22.
- Grabin, A., J.L. Ortiz, T. Lescot, N. Ferriere y F.X. Côte (2000). Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn plantain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61, 237-244.
- Gray, D.J. (1989). Synthetic seed for clonal production of crop plants, en: *Recent Advances in the Development and Germination of Seeds*. Taylorson, R.B. (ed.). Plenum Press, New York. pp. 29-45.
- Hartmann, H., D. Kester, F. Davies y R. Geneve (2014). Seed development, en: *Plant Propagation: Principles and Practices*, Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies y R.L. Geneve Jr. (eds.), 8a ed. Pearson, USA. pp. 116-146.
- Henry, Y., P. Vain y J. De Buyser (1994). Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Euphytica*, 79, 45-58.

- Hung, C.D. y C.D. Dung (2015). Production of chrysanthemum synthetic seeds under non-aseptic conditions for direct transfer to commercial greenhouses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(3), 639-648.
- Hung, C.D. y S.J. Trueman (2011). Encapsulation technology for short-term preservation and germplasm distribution of the African mahogany *Khaya senegalensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107, 397-405.
- Hung, C.D. y S.J. Trueman (2012a). Alginate encapsulation of shoot tips and nodal segments for short-term storage and distribution of the eucalypt *Corymbia torelliana* × *C. citriodora*. *Acta Physiologia Plantarum*, 34, 117-128.
- Hung, C.D. y S.J. Trueman (2012b). Preservation of encapsulated shoot tips and nodes of the tropical hardwoods *Corymbia torelliana* × *C. citriodora* and *Khaya senegalensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109, 341-352.
- Ibaraki, Y. y K. Kurata (2001). Automation in somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65, 179-199.
- Jafari, N., R.Y. Othman, B.C. Tan y N. Khalid (2015). Morphohistological and molecular profiles during the developmental stages of somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. 'Berangan'(AAA). *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 45.
- Janeiro, L.V., A. Ballester y A.M. Vieitez (1997) *In vitro* response of encapsulated somatic embryos of camellia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 119-125.
- Jones, L.H. (1974). Long term survival of embryoids of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Science Letters*, 2, 221-224.
- Kacar, Y.A. y B. Faber (2012). Micropropagation of Banana, en: *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology, (Methods and Protocols)*, vol. 877, Loyola-Vargas, V.M. y N. Ochoa-Alejo, (eds.). Humana Press, Totowa. pp. 143-151.
- Kackar, A., S.R. Bhat, K.P.S. Chandel y S.K. Malik (1993). Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(3), 289-292.

- Kashima, K. y M. Imai (2012). Advanced membrane material from marine biological polymer and sensitive molecular-size recognition for promising separation technology, en: *Advancing Desalination*. Ning, R.Y. (ed.). InTech. Disponible: <http://dx.doi.org/10.5772/50734>
- Kim, M.A. y J.K. Park (2002). High frequency plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L) calli immobilized in calcium alginate gel. *Biotechnology and Bioprocessing Engineering*, 7, 206-211.
- Kitto, S. y J. Janick (1982). Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. *HortScience* 17: 448.
- Lassoudière, A. (2007). *Le bananier et sa culture*. Editions Quae, France. 383 pp.
- Lee, K.Y. y D.J. Mooney (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37, 106-126.
- López-Gómez, P.L. (2015). Regeneración *in vitro* y variación somaclonal en *Musa* spp. evaluada mediante marcadores moleculares. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 166 pp.
- Maldonado-Borges, J.I., J.R. Ku-Cauich y R.M. Escobedo-GM (2013). Annotation of differentially expressed genes in the somatic embryogenesis of *Musa* and their location in the banana genome. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-7.
- Mandal, J., S. Pattnaik y P.K. Chand (2000). Alginate encapsulation of axillary buds of *Ocimum americanum* L. (hoary basil), *O. basilicum* L. (sweet basil), *O. gratissimum* L. (shrubby basil) and *O. sanctum* L. (sacred basil). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 36, 287-292.
- Manshardt, R.M. (1992). Papaya, en: *Biotechnology in Agriculture No.8: Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. Hammerschlag, F.A. y R.E. Litz (eds.). CABI, Wallingford. pp 489-511.
- Manzo-Sánchez, G., M.T. Buenrostro-Nava, S. Guzmán-González, M. Orozco-Santos, M. Youssef y R.M.E.G. Medrano (2015). Genetic diversity in bananas and plantains

- (*Musa* spp.), en: Molecular Approaches to Genetic Diversity, Caliskan, M., G.C. Oz, I.H. Kavakli y B. Ozcan (eds.), InTech, DOI: 10.5772/59421. pp. 93-121.
- Martinsen, A., G. Skjåk-Bræk y O. Smidsrød (1989). Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 79-89.
- McHugh, D.J. (1987). Production, properties and uses of alginates, en: Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. FAO Fisheries Technical Paper. 288, 58-115. Disponible: <http://www.fao.org/docrep/X5822E/x5822e00.HTM>
- Menon, R. (2016). Banana breeding, en: Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement, Mohandas S. y K.V. Ravishankar (eds.). Springer, Bangalore. pp. 13-34.
- Mohanty, P., P. Nongkling, M.C. Das, S. Kumaria y P. Tandon (2013). Short-term storage of alginate-encapsulated protocorm-like bodies of *Dendrobium nobile* Lindl.: an endangered medicinal orchid from North-east India. *3 Biotech*, 3(3), 235-239.
- Montalbán, I.A., N. De Diego y P. Moncaleán (2010). Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. *Trees*, 24, 1061-1071.
- Murashige, T. (1977). Plant cell and organ cultures as horticultural practices. *Acta Horticulturae*, 78, 17-30.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Navarro, C., R.M. Escobedo y A. Mayo (1997). *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid Cavendish banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 17-25.
- Nirala, N.K., D.K. Das, M.K. Reddy, P.S. Srivastava, S.K. Sopory y K.C. Upadhyaya (2010). Encapsulated somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.): An efficient way for storage, transport and multiplication of pathogen free plant material. *Asian Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 18, 159-162.

- Novak, F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Conger y T. Xiaolang (1989). Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Nature Biotechnology*, 7(2), 154-159.
- Ortiz-Vega, R.A., A. López Morales, S. Ponchner Geller y A. Segura Monge (1999). El cultivo del banano. San José, CR. EUNED, p.185.
- Ozudogru, E.A., E. Kirdok, E. Kaya, M. Capuana, A. De Carlo y F. Engelmann (2011). Medium-term conservation of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) *in vitro* shoot cultures and encapsulated buds. *Scientia Horticulturae*, 127, 431-435.
- Patel, A.V., I. Pusch, G. Mix-Wagner y K.D. Vorlo (2000). A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. *Plant Cell Reports*, 19, 868-874.
- Pawar, S.N. y K.J. Edgar (2012). Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33, 3279-3305.
- Pérez, J. (2009). Enfermedades de banano y plátano: Análisis retrospectivo y perspectivas. *Producción Agropecuaria*, 2, 11-18.
- Pérez-Hernández, J.B. y P. Rosell-García (2008). Inflorescence proliferation for somatic embryogenesis induction and suspension-derived plant regeneration from banana (*Musa* AAA, cv. Dwarf Cavendish) male flowers. *Plant Cell Reports*, 27(6), 965-971.
- Pérez-Ponce, J.N. (1998). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Ediciones GEO, Santa Clara, Cuba.
- Pond, S. y S. Cameron (2003) Tissue culture: artificial seeds, en: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Thomas, B., D.J. Murphy y B.G. Murray (eds.). Elsevier Academic Press, Amsterdam. pp. 1379-1388.
- Prakash, G. y A.K. Srivastava (2007). Azadirachtin production in stirred tank reactors by *Azadirachta indica* suspension culture. *Process Biochemistry*, 42, 93-97.

- Quiroz-Figueroa, F.R., R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos y V.M. Loyola-Vargas (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 285-301.
- Rai, M.K., P. Asthana, S.K. Singh, V.S. Jaiswal y U. Jaiswal (2009). The encapsulation technology in fruit plants - a review. *Biotechnology Advances*, 27, 671-679.
- Rao, P.S., P. Suprasanna, T.R. Ganapathi y V.A. Bapat (1998). Synthetic seeds: concepts, methods and application, en: *Plant Tissue Culture and Molecular Biology*. Srivastava, P.V. (ed.). Narosa, India. pp. 607-619.
- Reddy, M.C., K.S.R. Murthy y T. Pullaiah (2012). Synthetic seeds: A review in agriculture and forestry. *African Journal of Biotechnology*, 11, 14254-14275.
- Redenbaugh, K. (1993). *Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*. CRC Press Inc., Boca Ratón, USA.
- Redenbaugh, K., J. Fujii, D. Slade, P. Viss, y M. Kossler (1991). Artificial seeds - encapsulated somatic embryos, en: *High-Tech and Micropropagation I*. Bajaj Y.P.S. (ed). Springer, Berlin. pp. 395-416.
- Redenbaugh, K., D. Slade, P.R. Viss y J.A. Fujii (1987). Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *Horticultural Science*, 22, 803-809.
- Redenbaugh, K. y K. Walker (1990). Role of artificial seeds in alfalfa breeding, en: *Plant tissue culture: applications and limitations*. Bhojwani, S.S. (ed.). Elsevier, New York. pp. 102-135.
- Robinson, J.C. y V. Galán-Saúco (2010). Bananas and plantains, en: *Morphological Characteristics and Plant Development. Bananas and Plantains*, 2nd ed., Robinson, J.C. y V. Galán- Saúco (eds.). CABI, Wallingford. pp. 51-66.
- Saiprasad, G.V.S. (2001). Artificial seeds and their applications. *Resonance*, 6, 39-47.

- Sakhanokho, H.F., C.T. Pounders y E.K. Blythe (2013). Alginate encapsulation of *Begonia* microshoots for short-term storage and distribution. *Scientific World Journal*, 2013, 1-7.
- Santos-Mendoza, M., B. Dubreucq, S. Baud, F. Parcy, M. Caboche y L. Lepiniec (2008). Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 54, 608-620.
- Sarkar, D. y P.S. Naik (1998). Synseeds in potato: An investigation using nutrient-encapsulated *in vitro* nodal segments. *Scientia Horticulturae*, 73, 179-184.
- Scot, C., R. Nelson, C. Ploetz y A. Kepler (2006). *Musa* species (banana and plantain). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Traditional Tree Initiative, Version 2.2. Disponible en: www.traditionaltree.org [Acceso 27 de septiembre de 2017].
- Sharma, S., A. Shahzad y J.A. Teixeira da Silva (2013). Synseed technology - A complete synthesis. *Biotechnology Advances*, 31, 186-207.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2011). Producción nacional en México [on line]. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/> [Acceso 27 de septiembre 2017].
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2016). Producción nacional en México [on line]. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/> [Acceso 27 de septiembre 2017].
- Singh, B., J.P. Singh, A. Kaur y N. Singh (2016). Bioactive compounds in banana and their associated health benefits - A review. *Food Chemistry*, 206, 1-11.
- Soto, M. (1992). Bananos: Cultivo y Comercialización. 2da. ed. Litografía e Imprenta Lil, San José. pp. 649.
- Standardi, A. y M. Micheli (2013). Encapsulation of *in vitro*-derived explants: An innovative tool for nurseries, en: *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-*

- Important Horticultural Plants. Lambardi, M., E.A. Ozudogru y S.M. Jain (eds.). Methods in Molecular Biology, vol. 994. Springer-Humana Press. pp. 397-418.
- Stover, R.H. y N.W. Simmonds (1987). Bananas, Tropical Agriculture Series. Wrigley Essex, G. (ed). Longman Scientific & Technical, U.K. pp. 468.
- Strosse, H., R. Domergue, B. Panis, J.V. Escalant y F. Cote (2003). Banana and plantain embryogenic cell suspensions. Vézina A. y C. Picq (eds). INIBAP, Technical Guidelines 8. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montellier, France. 32 pp.
- Strosse, H., H. Schoofs, B. Panis, E. Andre, K. Reyniers y R. Swennen (2006). Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). Plant Science, 170(1), 104-112.
- Sundararaj, S.G., A. Agrawal y R.K. Tyagi (2010). Encapsulation for *in vitro* short-term storage and exchange of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) germplasm. *Scientia Horticulturae*, 125, 761-766.
- Suprasanna, P., S. Anupama, T.R. Ganapathi y V.A. Bapat (2001). *In vitro* growth and development of encapsulated shoot tips of different banana and plantain cultivars. Journal of New Seeds, 3(1), 19-25.
- Tabassum, B., I.A. Nasir, A.M. Farooq, Z. Rehman, Z. Latif y T. Husnain (2010). Viability assessment of *in vitro* produced synthetic seeds of cucumber. African Journal of Biotechnology, 9, 7026-7032.
- Timell, T.E. (1964). The acid hydrolysis of glycosides: I. General conditions and the effect of the nature of the aglycone. Canadian Journal of Chemistry, 42, 1456-1472.
- Tribulato, A., P.C. Remotti, H.J.M. Löffler y J.M. van Tuyl (1997). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb. Plant Cell Reports, 17, 113-118.
- Uma, S. y S. Sathiamoorthy (2007). Status of genetic diversity in banana in India, en: Banana - Technological Advancements. Singh, H.P. y S. Uma (eds). Association

- for the Improvement in Production and Utilization of Banana (AIPUB), National Research Centre for Banana, Tiruchirapalli. pp. 71-84.
- Uozumi, N., Y. Nakashimada, Y. Kato y T. Kobayashi (1992). Production of artificial seed from horseradish hairy root. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 74, 21-26.
- Valdez-Ojeda, R., A. James-Kay, J.R. Ku-Cauich y R.M. Escobedo-GraciaMedrano (2014). Genetic relationships among a collection of *Musa* germplasm by fluorescent-labeled SRAP. *Tree Genetics and Genomes*, 10, 465-476.
- Vicini, S., M. Castellano, M. Mauri y E. Marsano (2015). Gelling process for sodium alginate: New technical approach by using calcium rich micro-spheres. *Carbohydrates Polymers*, 134, 767-774.
- White, P.R. (1943). *Handbook of Plant Tissue Culture*. Jacques Cattell Press, Lancaster, PA.
- Winkelmann, T., L. Meyer y M. Serek (2004). Germination of encapsulated somatic embryos of *Cyclamen persicum*. *HortScience*, 39, 1093-1097.
- Youssef, M., A. James, A. Mayo-Mosqueda, J.R. Ku-Cauich, R. Grijalva-Arango y R.M. Escobedo-GM (2010). Influence of genotype and age of explant source on the capacity for somatic embryogenesis of two Cavendish banana cultivars (*Musa acuminata* Colla, AAA). *African Journal of Biotechnology*, 9(15), 2216-2223.
- Zhang, M., S. Peng, X. Yang y L. Xu (2009). Preparation technique of *Cremastra appendiculata* synthetic seed. *China Journal Chinese Materia Medica*, 34, 1894-1897.