








**Acta Botanica
Mexicana**

Optimización de las condiciones de producción de cápsulas con microestacas para aumentar el tiempo de almacenamiento de la planta medicinal mexicana *Castilleja tenuiflora* (Orobanchaceae)

Optimization of the production of capsules with microstakes to increase the storage time of the Mexican medicinal plant *Castilleja tenuiflora* (Orobanchaceae)

Yatzil León-Romero¹ , José Luis Trejo-Espino^{1,2} , Guadalupe Salcedo-Morales¹ , Gabriela Trejo-Tapia¹ , Silvia Evangelista Lozano^{1,2} 

Resumen:

Antecedentes y Objetivos: *Castilleja tenuiflora* es una de las plantas mexicanas, silvestres y medicinales cultivadas *in vitro* que presentan actividad biológica antiinflamatoria y antiulcerogénica. La encapsulación de microestacas es una opción para propagar y prolongar el almacenamiento de esta planta. El objetivo de este estudio fue establecer un método para la encapsulación y conservación de microestacas de *C. tenuiflora* sin afectar el contenido de sus compuestos.

Métodos: Las cápsulas fueron elaboradas con alginato de sodio en complejo con cloruro de calcio dihidratado como matriz y microestacas de tejido proveniente de plántulas cultivadas *in vitro*. Se probaron diferentes concentraciones y tiempos de polimerización, así como diferentes tiempos de almacenamiento y temperatura, para posteriormente analizar los metabolitos mayoritarios de los extractos metanólicos mediante cromatografía (HPLC) de las plantas resultantes.

Resultados clave: La combinación para la producción de cápsulas con microestacas es alginato de sodio al 3% y cloruro de calcio dihidratado al 50 mM, con 25 minutos de polimerización. Las plántulas derivadas de semillas sintéticas, almacenadas por 100 días presentaron los mismos compuestos que las plantas donantes.

Conclusiones: La encapsulación de microestacas de *C. tenuiflora* con alginato de sodio y cloruro de calcio dihidratado permite el almacenamiento del material vegetal y se mantienen sus compuestos principales, por lo que es una alternativa para mantener el genotipo de plantas elite y contrarrestar el saqueo de plantas silvestres.

Palabras clave: conversión de plántulas, crecimiento de plántulas, encapsulado, micropropagación.

Abstract

Background and Aims: *Castilleja tenuiflora* is one of the Mexican, wild and medicinal plants cultivated *in vitro* which have anti-inflammatory and antiulcerogenic biological activity. The encapsulation of microstakes is an option to propagate and prolong the storage of this plant. Therefore, the objective of this study was to establish a method for the encapsulation and conservation of *C. tenuiflora* microstakes that does not affect the content of the compounds of interest of this plant.

Methods: Capsules were elaborated with sodium alginate in complex with calcium chloride dihydrate as matrix and tissue microstakes from seedlings grown *in vitro*. Different concentrations and polymerization times were tested, as well as different storage times and temperature, for later analysis of the major metabolites of the methanolic extracts by chromatography (HPLC) of the resulting plants.

Key results: The combination for the production of capsules with microstakes is 3% sodium alginate and calcium chloride dihydrate at 50 mM, with 25 minutes of polymerization. The seedlings derived from synthetic seeds and stored for 100 days presented the same compounds as the donor plants.

Conclusions: The encapsulation of *C. tenuiflora* microstakes with sodium alginate and calcium chloride dihydrate allows the storage of plant material and the main compounds are maintained. Hence, this method for the encapsulation and conservation of microstakes is an alternative to maintain the genotype of elite plants and counteract the illegal collection of wild plants.

Key words: conversion of seedlings, encapsulation, micropropagation, seedling growth.

1 Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI-IPN), carretera Yauhtepec-Jojutla km 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, 62731 Yauhtepec, Morelos, México.

2 Autor para la correspondencia: sevangel@ipn.mx, jtrejo@ipn.mx

Recibido: 4 de septiembre de 2018.

Revisado: 19 de octubre de 2018.

Aceptado por Marie-Stéphanie Samain: 8 de enero de 2019.

Publicado Primero en línea: 01 de febrero de 2019.

Publicado: Acta Botanica Mexicana 126 (2019).

Citar como:

León-Romero, Y., J. L. Trejo-Espino, G. Salcedo-Morales, G. Trejo-Tapia y S. Evangelista Lozano. 2019. Optimización de las condiciones de producción de cápsulas con microestacas para aumentar el tiempo de almacenamiento de la planta medicinal mexicana *Castilleja tenuiflora* (Orobanchaceae). Acta Botanica Mexicana 126: e1442. DOI: 10.21829/abm126.2019.1442



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 International).

e-ISSN: 2448-7589

Introducción

Castilleja tenuiflora Benth. es una planta herbácea perenne de la familia Orobanchaceae (Tank y Olmstead, 2008), conocida como hierba del cáncer, atzoyatl y cola de borrego, entre otros nombres (Hernández, 1943). Ha sido utilizada en la medicina tradicional mexicana desde el siglo XVI, en el tratamiento de tos, disentería, nervios, dolores menstruales e inflamación, cáncer y enfermedades gastrointestinales (Béjar et al., 2000).

En plantas silvestres y cultivadas *in vitro* se ha evaluado la actividad antiinflamatoria y antiulcerogénica en pruebas con ratones (Carrillo-Ocampo et al., 2013; Sanchez et al., 2013), se han reportado sus efectos citotóxicos (Moreno-Escobar et al., 2011), antioxidantes (López-Laredo et al., 2012) y antidepresivos (Herrera-Ruiz et al., 2015). Dicha actividad biológica está relacionada con metabolitos secundarios como iridoides glicosilados (aucubina y bartsíósido) (Jiménez et al., 1995; Carrillo-Ocampo et al., 2013), feniletanoides glicosilados (verbascósidos e isoverbascósidos) (Gómez-Aguirre et al., 2012; Sanchez et al., 2013), flavonoides (apigenina y quercetina) (López-Laredo et al., 2012) y lignanos (Herrera-Ruiz et al., 2015), que fueron identificados tanto en plantas silvestres, cultivadas *in vitro*, como en plantas aclimatadas en condiciones de vivero (López-Laredo et al., 2012).

La producción de semillas sintéticas, que consiste en estructuras vegetales de origen normalmente asexual que constan básicamente de un embrión encapsulado en un endospermo artificial formado por una matriz polimérica (Morales y Cano, 2012), puede ser una opción para prolongar el tiempo de almacenamiento y mantener el genotipo de plantas élite, facilitar el intercambio de germoplasma, contar con material disponible para cultivo *ex vitro*, impedir riesgos de contaminación y contrarrestar el saqueo de plantas de su hábitat natural, principalmente. Se ha utilizado la encapsulación en plantas como *Centella asiatica* (L.) Urban (Prasad et al., 2014), en análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), las plantas obtenidas de semillas sintética expresaron uniformidad cuantitativa y cualitativa de los compuestos de interés como los centellósidos. Los agentes encapsulantes más utilizados en la elaboración de semillas sintéticas son el alginato de sodio en complejo con cloruro de calcio dihidratado, ambos en diferentes concen-

traciones y tiempos de polimerización (Standardi y Micheli, 2012; Sharma et al., 2013), dependiendo de la especie con que se trabaje (Gantait et al., 2015). La elaboración de semillas sintéticas ha permitido la propagación y preservación a largo plazo de embriones somáticos de orquídeas (Teixeira da Silva et al., 2014) y agaves (Chandrasekhara et al., 2012). Por otro lado, el encapsulado de tejidos como segmentos nodales de plantas con importancia frutícola (Rai et al., 2009) se ha aplicado en cítricos (Nieves et al., 1998) en plantas medicinales como *Centella asiatica* (Prasad et al., 2014), y en alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Fujii et al., 1992). En caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) variedad CP-5243, los embriones encapsulados se han plantado directamente en campo (Nieves et al., 2003).

Castilleja tenuiflora es comercializada en los mercados de plantas medicinales. Se extrae de su ambiente natural en zonas altas y semiáridas de México entre 2300 y 3300 m s.n.m. (Calderón y Rzedowski, 2001), áreas que cada día son amenazadas por el deterioro humano (Salcedo-Morales et al., 2009). Debido a las propiedades medicinales de *C. tenuiflora*, es importante desarrollar métodos que permitan su preservación por tiempos prolongados, así como el mantenimiento de líneas de subcultivo, que contengan los principales compuestos de interés, para su disposición.

La propagación y conservación de microestacas en cápsulas se propone como un método alternativo para preservar plantas élite y contrarrestar el saqueo de individuos de su hábitat natural; además de brindar protección directa al explante, es posible aumentar el tiempo de almacenamiento, reducir la frecuencia de subcultivos, prevenir riesgos de contaminación y de variación somaclonal (Sharma et al., 2013) y mantener líneas de subcultivo de la misma planta para su disposición. Por lo anterior, el objetivo en este estudio fue desarrollar un método para la encapsulación de microestacas de *C. tenuiflora*, que después del proceso de encapsulación y almacenamiento no afecte el perfil químico de la planta.

Materiales y Métodos

Obtención del material vegetal

Se utilizaron microestacas (segmentos de tallo no apicales con un nodo) obtenidas de una línea de plantas *in vitro* de

C. tenuiflora proporcionada por el Laboratorio de Productos Naturales del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (CEPROBI-IPN). Esta línea se mantuvo mediante subcultivos de acuerdo con el método propuesto por Salcedo-Morales et al. (2009), para tener una fuente constante de material vegetal y producir las semillas sintéticas con los diferentes tratamientos. Las plantas fueron subcultivadas cada 21 días en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100% (4.4 g l⁻¹) con ácido indol butírico y 6-bencilaminopurina (0.1 mg l⁻¹ IBA y 0.25 mg l⁻¹ BAP), el pH ajustado a 5.8 y como agente gelificante Bactoagar al 0.8% (p/v). Se utilizaron cajas magenta como contenedores y se colocaron nueve explantes por caja, incubadas a 25±2 °C con intensidad luminosa de 1800 Lux, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/obscuridad.

El tejido de encapsulación consistió en microestacas (con un nodo y 2 mm de tallo por cada extremo) de *C. tenuiflora* de 5 mm de longitud aproximadamente, provenientes de plántulas con 35 días de cultivo *in vitro*. Las fracciones de tallo útiles para la encapsulación fueron el segundo, tercero y ocasionalmente el cuarto nodo de las plántulas subcultivadas.

Producción de las cápsulas con microestacas

Materiales encapsulantes

Las cápsulas se elaboraron de acuerdo con el protocolo propuesto por Gantait et al. (2015) y Sharma et al. (2013), quienes recomiendan como agentes encapsulantes al alginato de sodio (REASOL) en complejo con cloruro de calcio dihidratado (FERMONT).

Preparación de los componentes de la matriz de encapsulación

Este método consistió en realizar una solución base con medio Murashige y Skoog (1962) (MS) al 100% (4.4 g l⁻¹), adicionada con reguladores de crecimiento vegetal IBA (0.1 mg l⁻¹) y BAP (0.25 mg l⁻¹), sacarosa (3%), el pH ajustado a 5.8. En 300 ml de agua desionizada se adicionaron 1.3 g de MS, 33.8 µl de IBA, 30.5 µl de BAP y 9 g de sacarosa.

En matraces de 250 ml se colocaron 150 ml de la solución base y se adicionó el alginato de sodio para formar soluciones al 2, 3 y 4%, en otros matraces con solución base

se adicionó el cloruro de calcio dihidratado con diferentes concentraciones (50, 75 y 100 mM).

Las mezclas fueron sometidas a tres tiempos de polimerización (20, 25 y 30 min), para obtener distintos grados de dureza (Sharma et al., 2013; Gantait et al., 2015) (Cuadro 1). Los matraces de las seis soluciones con las diferentes concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio dihidratado fueron esterilizadas en autoclave de tres calores (AESA, modelo CV 300, serie 1577, Cd. Mx., México) a 15 lb de presión por 20 min.

Proceso de encapsulación

En condiciones asépticas, las microestacas se suspendieron una por una en la solución de alginato de sodio. Con una

Cuadro 1: Combinación y concentración de los agentes encapsulantes alginato de sodio (alg-Na %) y cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂ 2H₂O mM), en diferentes tiempos de polimerización.

Agentes encapsulantes	Concentración utilizada		Tiempo de polimerización (min)
Alginato de sodio (p/v)	2%, 3% y 4%		20, 25 y 30 min
CaCl ₂ ·2H ₂ O (mM)	50, 75 y 100		
Tratamientos	Agentes encapsulantes		Tiempo de polimerización (min)
	Alg-Na (%)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (mM)	
T1-1	2	50	20
T1-2	2	50	25
T1-3	2	50	30
T3-1	3	50	20
T3-2	3	50	25
T3-3	3	50	30
T4-1	3	75	20
T4-2	3	75	25
T4-3	3	75	30
T5-1	3	100	20
T5-2	3	100	25
T5-3	3	100	30
T6-1	4	75	20
T6-2	4	75	25
T6-3	4	75	30

micropipeta de 1000 μl cuya punta fue adaptada con una abertura de 7 mm, la microestaca fue revestida y aspirada con un volumen de 100 μl de alginato de sodio y se dejó caer a manera de gota en el matraz con la solución de cloruro de calcio dihidratado. Al entrar en contacto se inició la reacción de polimerización (Figs. 1A-F).

Para dar forma esférica a la semilla sintética, cada matraz fue colocado en un agitador orbital (Prendo, modelo AGO 60-40, Puebla, México), a 100 rpm. Las soluciones se dejaron reaccionar en estas condiciones durante 20, 25 y 30 min y una vez transcurrida la polimerización, las semillas sintéticas fueron recuperadas al decantar el cloruro de calcio dihidratado. Con agua desionizada esterilizada se realizaron tres lavados y se dejaron secar por un minuto sobre papel filtro en condiciones asépticas (Ara et al., 2000; Sharma et al., 2013).

Cada semilla fue sembrada de forma individual en viales de 10 cm de largo y 1 cm de diámetro, con 1.5 ml de fitagel (1.5 g l^{-1}) y se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, intensidad luminosa de 1800 Lux, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/obscuridad.

Efecto de las concentraciones de los agentes encapsulantes y el tiempo de polimerización

Las semillas sintéticas obtenidas fueron sembradas sobre fitagel (sin ningún medio nutritivo o regulador de crecimiento) para evaluar viabilidad, germinación, conversión y longitud de la planta. Las observaciones se realizaron a los 9, 12, 15, 18 y 21 días después de la siembra. El criterio para definir la germinación de la semilla sintética se definió cuando el brote rompió la cápsula (Asmah et al., 2011). La viabilidad fue considerada cuando los explantes encapsulados presentaron una apariencia verde, sin amarillamiento y sin partes necrosadas (Micheli et al., 2007). El porcentaje de conversión se consideró como la formación de una planta completa proveniente de una semilla sintética (Standardi y Micheli, 2012). La longitud de las plantas después de la germinación fue medida con escala milimétrica, desde la superficie de la cápsula.

Después de seleccionar la concentración óptima de alginato de sodio, cloruro de calcio dihidratado y el tiempo de exposición, se dio continuidad a los experimentos de almacenamiento en frío de las semillas sintéticas.

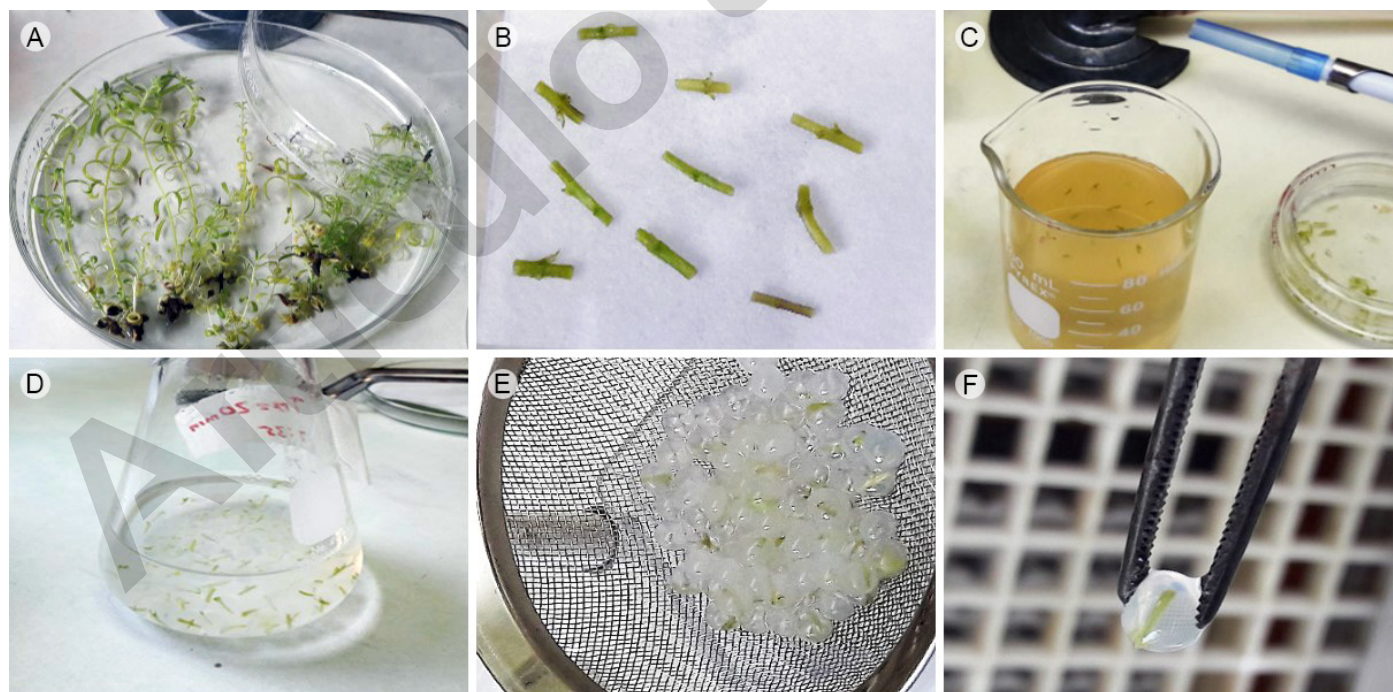


Figura 1: Elaboración de semillas sintéticas de *Castilleja tenuiflora* Benth.: A. plantas madre con 21 días de edad provenientes de cultivo *in vitro*; B. microestacas de *C. tenuiflora*; C. las microestacas se suspenden en la solución de alginato de sodio y luego se aspiran con una micropipeta; D. los explantes se vierten en forma de gota en la solución de cloruro de calcio; E. se decanta la solución de cloruro de calcio y las semillas sintéticas obtenidas se enjuagan 3 veces con agua desionizada estéril; F. obtención de una semilla sintética de *C. tenuiflora*.

Almacenamiento en frío

Con el fin de prolongar el tiempo de almacenamiento de las semillas sintéticas de *C. tenuiflora* se probaron tres temperaturas de almacenamiento (1.5, 4 y 25 °C) (Islam y Bari, 2012). A estas temperaturas, se evaluó la viabilidad (Fig. 2) de los explantes de las semillas sintéticas almacenadas a 20, 38 y 45 días. Con estos días de almacenamiento, se seleccionó la mejor temperatura y se certificó que los explantes contenidos en las semillas fueran viables.

Después de seleccionar la temperatura de almacenamiento y viabilidad, se procedió a ampliar el periodo de almacenamiento con la mejor temperatura (4 °C), los tiempos de almacenamiento: 30, 50, 100, 190 y 200 días.

Las condiciones de almacenamiento fueron semillas en grupos de 30 dentro de criotubos de 5 ml y envueltos con papel aluminio, con el fin de mantenerlos en condiciones de oscuridad. Bajo esta condición se evita el deterioro de la matriz encapsulante (San Andres et al., 2010). Además, es posible retardar el crecimiento de los tejidos vegetales (Engelmann, 2011).

Los grupos de semillas, al final del periodo de almacenamiento, fueron sembradas en fitagel y se incubaron por 30 días. Las plantas resultantes se utilizaron para la elaboración de extractos metanólicos, y el análisis del perfil fitoquímico.

Perfil químico por LC-MS de plántulas de *Castilleja tenuiflora* para la determinación de los compuestos mayoritarios

Se elaboraron extractos metanólicos de las plantas de *C. tenuiflora* provenientes de semillas sintéticas y obtenidas

de las pruebas de almacenamiento a 4 °C, con tiempo de almacenamiento de 30, 50 y 100 días. Estos fueron comparados con extractos metanólicos elaborados con plantas de *C. tenuiflora* provenientes de cultivo *in vitro* sin almacenar.

Para realizar el extracto, las muestras secas se colocaron en tubos Eppendorf de 2.5 ml y se molieron en el homogeneizador de tejidos de aire (QIAGEN, Tissue Lyser LT, Hilden, Alemania) durante 5 min a 100 rpm. Posteriormente, la muestra se suspendió en un criotubo de 5 ml con 1.5 ml de metanol (proporción de 1:50) y se sonicó durante una hora a temperatura ambiente. El extracto metanólico fue filtrado con papel filtro Wathman no. 1 y se dejó evaporar hasta sequedad. Los extractos fueron almacenados en la obscuridad hasta su análisis.

Para el análisis del perfil químico se utilizó un equipo de cromatografía líquida (Shimadzu, LC-MS 2020, Tokio, Japón), con un sistema de control CBM-20A^a, dos bombas LC-20AD, un desgasificador DGU-20A 5R, un muestreador automático SIL-20AC HT, un horno para columna CTO 20A^a y un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) SPD-M20A, acoplado a un espectrómetro de masas con una fuente de ionización por electrospray (ESI-MS) (Shimadzu, Tokio, Japón).

El análisis se realizó a 40 °C en una columna de alta resolución RP-18 de fase reversa (Chromolith[®], 100 mm por 4.6 mm, 5 µm) (Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil fue previamente tamizada en filtro de membrana de 0.45 µm (Millipore, Milford, EUA) y desgasificada por sonicación durante 15 min. Como fase móvil se ocupó agua Milli-Q (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). El método

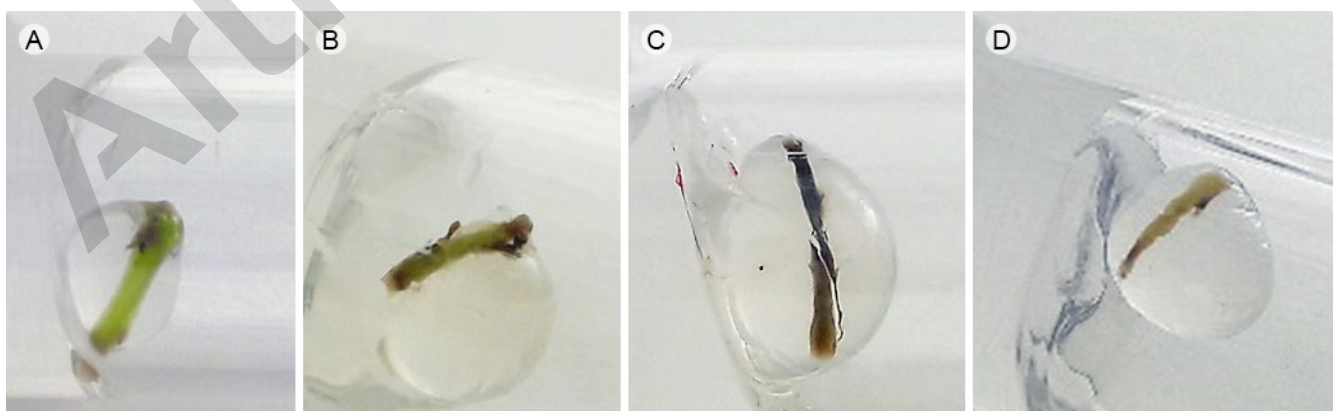


Figura 2: Criterios de evaluación de viabilidad en la semilla sintética de *Castilleja tenuiflora* Benth. después del almacenamiento: A. explante viable, que muestra apariencia verde; B. explante con extremos necrosados; C. explante ámbar; D. explante blanco.

cromatográfico fue en gradiente de la siguiente forma: 0-2.0 min, 100% A - 0% B; 2.01-5.0 min, 90% A - 10% B; 5.01-10.0 min, 85% A - 15% B; 10.01-14.0 min, 80% A - 20% B; 14.01-18.0 min, 75% A - 25% B; 18.01-23 min, 70% A - 30% B; 23.01-27.0 min, 0% A - 100% B; 27.01-30.0 min, 100% A - 0% B.

La absorbancia fue medida a 205, 240, 280, 330, 360 y 380 nm. El volumen de inyección fue de 20 µl con un flujo constante de 1 ml/min⁻¹. El análisis por espectrometría de masas se realizó en modo negativo en un intervalo de 100-1000 m/z (relación masa/carga de los iones que conforman el compuesto), bajo las siguientes condiciones: flujo del gas de nebulización (1.54 l min⁻¹), flujo de N₂ (10 l min⁻¹), voltaje de la interfase (4.5 kV) y voltaje del detector (1.2 kV). Los compuestos químicos mayoritarios fueron identificados mediante su espectro UV-VIS de absorción (λ), el tiempo de retención (tr) y la relación masa atómica/carga del ion (m/z).

Análisis estadístico

Para seleccionar la concentración de agentes encapsulantes y tiempos de polimerización, la n fue de 10 semillas y se consideró una semilla sintética como unidad experimental. En la prueba de almacenamiento se probaron 30 semillas sintéticas por tratamiento y como control se utilizaron semillas sintéticas sin almacenamiento. El resultado de ambas pruebas fue analizado con la prueba de Tukey (α=0.05) con el software Infostat (v. 2018 (Di Rienzo et al., 2018)).

Resultados

La mejor concentración de los agentes encapsulantes fue el alginato de sodio al 3% en complejo con el cloruro de calcio dihidratado al 50 mM con un tiempo de polimerización de 20-25 min. porque presentó el mayor porcentaje de viabilidad, conversión y las mejores longitudes. Además, la composición de las semillas sintéticas favoreció su manipulación y forma (Fig. 3).

En los tratamientos de alginato de sodio 2%, cloruro de calcio dihidratado 50 mM y 30 min (T1-3), la germinación fue de 50%, la conversión de 20%, la viabilidad de 80%, los explantes permanecieron verdes aunque no presentaron desarrollo; de 20% de las muestras que presentaron conversión, la longitud del brote fue de 2.1 mm.

El tratamiento de alginato de sodio al 3%, cloruro de calcio dihidratado 50 mM y 20 min (T3-1) presentó una germinación de 50%, una conversión de 70% y mostró una viabilidad de 100%, la longitud del brote fue de 4.3 mm. En la viabilidad en el resto de tratamientos de T3 (T3-2 y el T3-3) no hubo diferencias significativas entre ellos, los explantes permanecieron verdes aunque no presentaron desarrollo; la viabilidad no tuvo influencia sobre la germinación. Las semillas elaboradas con las mayores concentraciones de alginato de sodio (4%) en combinación con el cloruro de calcio dihidratado (75 mM) registraron porcentajes de germinación menores a 30%.

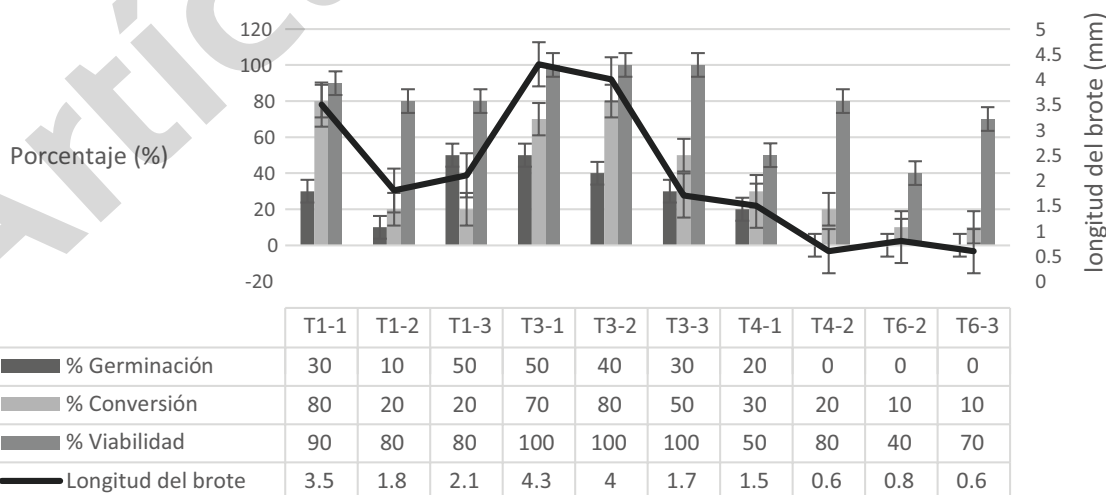


Figura 3: Efecto de las concentraciones de los agentes encapsulantes y tiempo de polimerización sobre el porcentaje de germinación (%), viabilidad (%), conversión (%) y longitud del brote (mm) a los 18 días de cultivo. Los tratamientos incluidos en el T3 registraron el mayor porcentaje de germinación de *Castilleja tenuiflora* Benth.

Aunque el tratamiento T1-1 obtuvo alto porcentaje de conversión y viabilidad (80 y 90% respectivamente), las características físicas de las semillas no favorecieron la forma y la manipulación (Fig. 4); mientras que en la forma de los tratamientos con mayor concentración (T4 y T6) las cápsulas fueron esféricas, de color opaco y el explante no fue visible. El tratamiento T3-2 fue el que se seleccionó para el resto de los experimentos por presentar el mayor porcentaje de conversión y las cápsulas fueron esféricas y transparentes.

En la prueba del efecto del almacenamiento en frío sobre la viabilidad del explante, los resultados muestran que el almacenamiento a 4 °C es la temperatura más efectiva debido a que las semillas sintéticas mostraron una apariencia viable en todos los periodos evaluados (Cuadro 2). En el almacenamiento a 1.5 °C, los explantes se mantuvieron viables hasta los 28 días; además, la cápsula presentó signos de deshidratación del polímero debido al almacenamiento en frío. Bajo la temperatura de almacenamiento a 25 °C no se observó la presencia de explantes viables en ningún periodo de almacenamiento. Debido a estos resultados se seleccionó como condición de almacenamiento la temperatura de 4 °C.

El tratamiento con 50 días de almacenamiento presentó los valores más altos y significativamente diferentes entre todos los tratamientos (Fig. 5). En este tratamiento se obtuvo una viabilidad de 93 y 77% de germinación, una longitud de planta promedio de 7.07 mm y un porcentaje de conversión de 70%.

Cuadro 2: Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de semillas sintéticas de *Castilleja tenuiflora* Benth.

Tiempo de almacenamiento (días)	Temperatura de almacenamiento (°C)		
	1.5	4	25
21	viable	viable	café
28	viable	viable	café
38	café	viable	café
45	café	viable	café

En los tiempos de almacenamiento 180 y 200 días ocurre una disminución significativa de las tres variables evaluadas, no hubo diferencias significativas entre ellos. La frecuencia de conversión a plantas para los diferentes tratamientos fue de la siguiente manera: almacenamiento de 50 días presentó 70 plantas; 100 días, 31 plantas y 30 días, 20 plantas (en las semillas almacenadas a 180 y 200 días no hubo conversión completa).

Perfil químico de compuestos mayoritarios en plantas de *Castilleja tenuiflora* obtenidas de semillas sintéticas después de un periodo de almacenamiento

Se identificaron los compuestos mayoritarios en muestras obtenidas de extractos metanólicos en plantas control y en

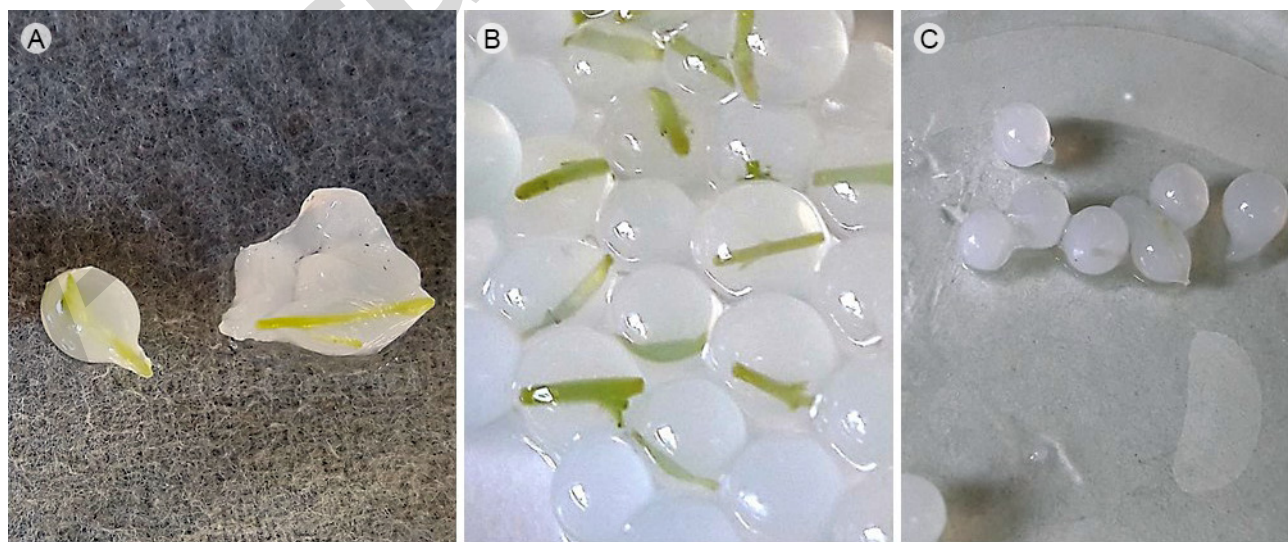


Figura 4: Efecto de las concentraciones sobre las características visuales de la semilla sintética de *Castilleja tenuiflora* Benth.: A. 2%, 50 mM; B. 3%, 50 mM; C. 4%, 75 mM.

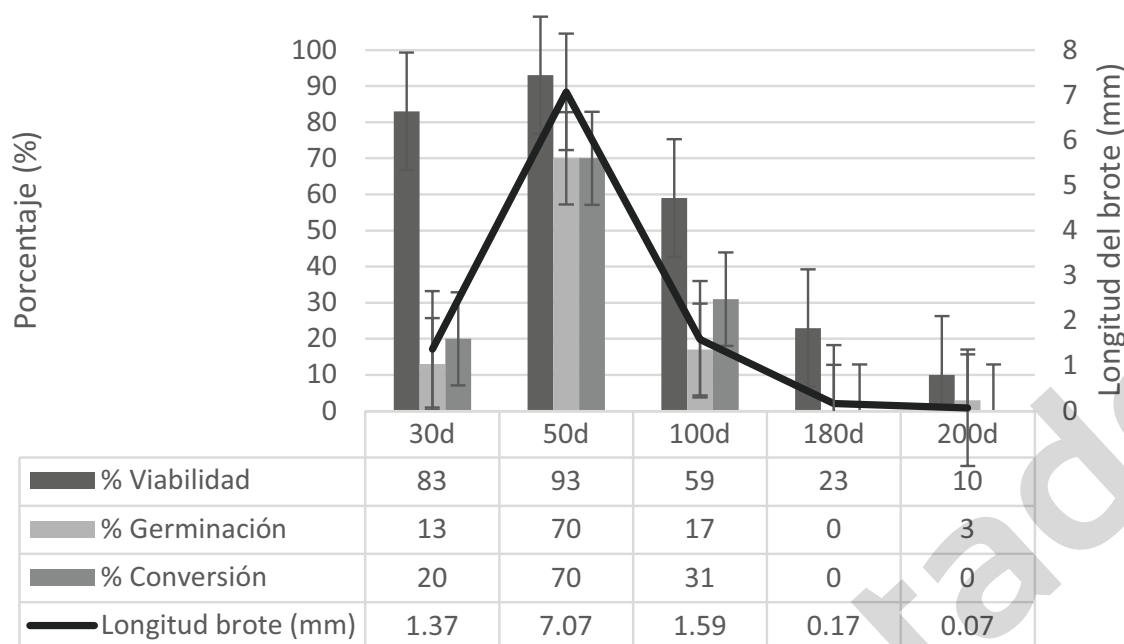


Figura 5: Efecto del tiempo de almacenamiento a 4 °C sobre el porcentaje de germinación (%), viabilidad (%), conversión (%) y longitud del brote (mm) a los 18 días de cultivo *in vitro* de *Castilleja tenuiflora* Benth.

las provenientes de semilla sintética con tiempos de almacenamiento: 30, 50 y 100 días (Cuadro 3). El grupo control presentó iridoides (aucubina y bartsióido), feniletanoides (verbascósido e isoverbascósido) y flavonoides (rutina y luteolina). Por otro lado, el iridoide aucubina, el feniletanoide verbascósido y el lignano se encontraron presentes en todas las plántulas provenientes de semilla sintética, mientras que la presencia de otros compuestos fue variable.

La elaboración de semillas sintéticas y el almacenamiento hasta por 100 días no influyeron en el perfil químico de los compuestos mayoritarios identificados en las plantas donantes de *C. tenuiflora*.

Discusión

La forma y la consistencia de las cápsulas fueron dependientes de la concentración y tiempo de polimerización de la matriz; los porcentajes de germinación, conversión y viabilidad, así como la longitud de los brotes fueron diferentes de acuerdo a los tratamientos. En especies como *Centella asiatica* (Prasad et al., 2014), la concentración del alginato de sodio fue del 4% y del cloruro de calcio a 75 mM y se obtuvo 85% de germinación. Cabe mencionar que en su medio de conversión agregaron medio de cultivo MS, y para *C. tenuiflora* (alginato de sodio 3%, 50 mM de cloruro de

calcio dihidratado) solamente se utilizó el agente gelificante (sin ningún medio nutritivo o regulador de crecimiento). Dichas condiciones fueron suficientes para obtener 80% de conversión. La eficiencia de la semilla sintética depende de la matriz de encapsulación y del medio de conversión, estos factores influyen sobre la viabilidad hasta la conversión a planta. Con esto se observó directamente el efecto de la concentración de los agentes encapsulantes sobre las variables evaluadas.

En este estudio el diseño de la composición de la matriz encapsulante incluye un medio nutritivo que se basó en el medio utilizado para micropropagar regularmente a *C. tenuiflora* en el laboratorio. El medio de conversión probado fue utilizando fitagel sin ningún medio nutritivo o regulador de crecimiento; estas condiciones fueron suficientes para la obtención de plantas. Sin embargo, si se desea alcanzar mayor tamaño en las plantas, es necesario optimizar tanto el medio nutritivo que incluye la matriz de encapsulación, como el medio de conversión.

Tsvetkov et al. (2006) estudiaron el efecto de la composición de la matriz encapsulante sobre el rebrote *in vitro* de microcortes encapsulados del híbrido *Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Mincx., determinando que la adición de nutrientes, una fuente de carbono (sacarosa) y regulado-

Cuadro 3: Compuestos químicos identificados en plantas de *Castilleja tenuiflora* Benth., provenientes de encapsulados almacenados a diferentes tiempos. tR: tiempo de retención; Ion (M-H): ion molecular menos un hidrógeno cargado negativamente; (m/z): ion molecular, masa cargada del compuesto; C: plantas control.

No.	tR (min)	Ion (M-H) (m/z)	Compuesto	Grupo químico	Tratamientos
1	4.36	345	Aucubina	Iridoide	C, 30 d, 50 d, 100 d
2	5.69	329	Bartsióside	Iridoide	C
3	7.31	389	8-epiloganina	Iridoide	50 d, 100 d
4	9.36	609	Rutina	Flavonoide	C, 30 d
5	11.23	623	Isoverbascósido	Feniletanoide	C, 30 d, 50 d, 100 d
6	12.21	623	Verbascósido	Feniletanoide	C, 30 d, 50 d, 100 d
7	20.25	299	Flavonoide	Luteolina	C

res de crecimiento vegetal, dan condiciones que favorecen el desarrollo inicial del explante encapsulado. Así también lo mencionan Sundararaj et al. (2010) al aumentar la concentración de elementos nutritivos (MS-solución base) en la matriz de encapsulación, se favorece la formación de brotes en microcortes encapsulados de *Zingiber officinale* Rosc. Estos resultados son similares al estudio realizado por Saiprasad (2001) aplicado en embriones somáticos.

Sin embargo, los requerimientos para la disponibilidad de ciertos ingredientes de la matriz de hidrogel son especie específico, por lo que se debe de dar atención especial en los requerimientos de la especie de interés (Tsvetkov et al., 2006). Por ejemplo, estos autores mencionan que en particular la fuente de carbono, presente en forma de sacarosa, representa un elemento clave para dar inicio al evento de re-crecimiento en explantes de *Populus*, y se comprobó que este elemento tiene mayor influencia sobre la longitud del brote comparado con 6-bencilaminopurina (BAP). Cabe mencionar el estudio realizado en *Beta vulgaris* L. (Rizkalla et al., 2012) donde se evaluó el efecto de la concentración de la fuente de carbono en la matriz encapsulante sobre el porcentaje de germinación. Los mejores resultados de germinación para la especie se obtuvieron al adicionar medio MS con sacarosa (30 g/l) a la matriz de encapsulación y al aumentar esta concentración se afectó el porcentaje de conversión negativamente.

Es posible que en el presente estudio la aplicación conjunta de ácido indol butírico (IBA), BAP y sacarosa, favorecieran la formación de brotes en las microestacas encapsuladas ya que estimulan la progresión del ciclo celular y

son las hormonas claves para inducir la formación de novo de brotes en diversos explantes *in vitro* (hojas, raíces, médula, cotiledones) (Jordán y Casaretto, 2006).

En este estudio, el medio de conversión no fue enriquecido con nutrientes ni reguladores de crecimiento para observar de forma directa el potencial de la semilla sintética para obtener plantas debido a que la conversión es el aspecto más importante de esta tecnología para su uso comercial (Standardi y Piccioni, 1997).

Standardi y Piccioni (1997) dicen que el medio de conversión puede optimizarse con reguladores de crecimiento vegetal (RCV) o aumentando otras fuentes como la de carbono y elementos nutritivos (Sundararaj et al., 2010), así como antibióticos, herbicidas, biocontroladores y biofertilizantes, entre otros (Islam y Bari, 2012).

Las concentraciones seleccionadas en este estudio favorecieron la viabilidad, germinación, conversión de la planta de *C. tenuiflora* y su forma; por lo tanto, se facilitó su manipulación, caso contrario con las concentraciones menores. Esto también se observa en plantas medicinales, como lo muestran los resultados expuestos por Lata et al. (2009) en *Cannabis sativa* L., donde el tamaño promedio de sus cápsulas fue de 5 mm, semejantes a este estudio.

Gantait et al. (2012) reportan que el uso de diferentes concentraciones de alginato de sodio presenta diferencia en la morfología de las cápsulas (opacidad y forma), concluyendo que las concentraciones de alginato de sodio pueden variar según la fuente comercial y la especie con la que se trabaje. Lo más importante es producir cápsulas que faciliten la manipulación durante el cultivo *in vitro*, siembra

o almacenamiento. Elaborar semillas esféricas, uniformes y firmes son indicativos cualitativos que pueden funcionar como indicador para tal propósito.

Standardi y Piccioni (1997) explican que la característica más deseable de un microcorte encapsulado es su capacidad de mantener la viabilidad en términos de rebrote y crecimiento incluso después de un periodo de almacenamiento. En este estudio fue posible obtener valores mayores a 70% en los parámetros de viabilidad, germinación y conversión en el tiempo de almacenamiento de 50 días a 4 °C para semillas sintéticas de *C. tenuiflora*. Al respecto, es importante mencionar que en las zonas nodales de una planta se encuentran los meristemas, células morfológicamente indiferenciadas que contienen toda la información genética para dividirse de manera ordenada proporcionando a las plantas una mayor actividad celular y dando como resultado la formación de nuevos brotes. Las zonas nodales podrían requerir mayor cantidad de nitrógeno, ya que este elemento es esencial para que las plantas sintetizen ácidos nucleicos y aminoácidos, entre otros compuestos. Por otro lado, Tacoronte et al. (2017) reportan que el contenido de nitrógeno favorece el crecimiento de explantes de papa en condiciones *in vitro* en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual se caracteriza por su alto contenido de nitratos y amonio. El valor de las variables disminuye cuando el tiempo de almacenamiento aumenta (100, 180 y 200 días). Este mismo efecto se observa en el estudio realizado por Sundararaj et al. (2010).

Finalmente, se observó que el grupo control y las plantas derivadas de semillas sintéticas comparten los principales compuestos de interés. Tal es el caso de compuestos del tipo iridoide (aucubina) y el feniletanoide (verbascósido), mientras que la presencia de otros compuestos fue variable, ya que la producción de metabolitos secundarios es consecuencia de la respuesta al estrés y a las variaciones ambientales (Chaves et al., 2001). Otro ejemplo es el contenido de D9-tetrahidrocannabinol, de las plantas de *Cannabis sativa* provenientes de explantes encapsulados, que fue similar en relación a las plantas donantes después de 168 días (24 semanas) de almacenamiento a 15 °C (Lata et al., 2012); por lo que la tecnología de semillas sintéticas es una buena alternativa como método para la conservación de germoplasma. Es nece-

sario realizar estudios detallados sobre la caracterización bioquímica de las plantas derivadas de semillas sintéticas para poder explicar el comportamiento de los metabolitos secundarios durante el proceso de encapsulación de microestacas (Faisal et al., 2013).

Conclusiones

En este estudio se demostró que es posible obtener plantas de *C. tenuiflora* a partir de semillas sintéticas de microestacas elaboradas con los agentes encapsulantes de alginato de sodio en complejo con el cloruro de calcio dihidratado. Este también fue un método efectivo para su propagación y almacenamiento *in vitro*.

Las condiciones de encapsulación de microestacas de *C. tenuiflora* que se proponen, permitió el almacenamiento del material vegetal manteniendo los principales compuestos mayoritarios identificados en esta planta. Se considera entonces que el método para la encapsulación y conservación de microestacas es una alternativa para mantener el genotipo de plantas élite, facilitar el intercambio de germoplasma, contar con materia prima disponible para el cultivo *ex vitro*, minimizar los riesgos de contaminación y contrarrestar el saqueo de plantas de su hábitat natural.

Contribución de autores

YLR, JLTE, GSM, GTT y SEL concibieron y diseñaron el estudio. YLR realizó los análisis. YLR, JLTE, GSM, GTT y SEL contribuyeron a la adquisición de datos y la interpretación. YLR escribió el manuscrito con la ayuda de JLTE, GSM, GTT y SEL. Todos los autores contribuyeron a la discusión, revisión y aprobación del manuscrito final.

Financiamiento

Este estudio fue apoyado por la Secretaría de Investigación y posgrado del Instituto Politécnico Nacional proyectos SIP20180601 y 20181383 y por una beca de posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Agradecimientos

Se agradece al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos y Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (IPN) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Literatura citada

- Ara, H., U. Jaiswal y V. S. Jaiswal. 2000. Synthetic seed: Prospects and limitations. *Current Science Association* 78(12): 1438-1444.
- Asmah, N. H., N. H. Hasnida, N. Zaimah, A. Noraliza y N. Salmi. 2011. Synthetic seed technology for encapsulation and regrowth of in vitro-derived *Acacia* hybrid shoot and axillary buds. *African Journal of Biotechnology* 10(40): 7820-7824. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB11.492>
- Béjar, E., R. Reyes-Chilpa y M. Jiménez-Estrada. 2000. Bioactive compounds from selected plants used in the XVI century Mexican traditional medicine. *Studies in Natural Products Chemistry* 24(Part E): 799-844. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1572-5995\(00\)80055-1](http://doi.org/10.1016/S1572-5995(00)80055-1).
- Calderón, G. y J. Rzedowski. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A.C. 2da ed. Pátzcuaro, México. Pp. 40-43.
- Carrillo-Ocampo, D., S. Bazaldúa-Gómez, J. Bonilla-Barbosa, R. Aburto-Amar y V. Rodríguez-López. 2013. Anti-Inflammatory Activity of Iridoids and Verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. *Molecules* 18(10): 12109-12118. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules181012109>
- Chandrasekhara, R. M., K. S. M. Rama y T. Pullaiah. 2012. Synthetic seeds: A review in agriculture and forestry. *African Journal of Biotechnology* 11(78): 14254-14275.
- Chaves, N., T. Sosa y J. C. Escudero. 2001. Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of *Cistus ladanifer* and in associated soils. *Journal of Chemical Ecology* 27(3): 623-631. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1010388905923>
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez y M. Tablada. 2018. InfoStat versión X. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar> (consultado julio de 2018).
- Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 47(1): 5-16. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>
- Faisal, M., A. A. Alatar y A. K. Hegazy. 2013. Molecular and biochemical characterization in *Rauvolfia tetraphylla* plantlets grown from synthetic seeds following *in vitro* cold storage. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169(2): 408-417. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9977-0>
- Fujii, J. A. A., D. Slade, J. Aguirre-Rascon y K. Redenbaugh. 1992. Field planting of alfalfa artificial seeds. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 28(2): 73-80. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02823022>
- Gantait, S., S. Bustam y U. R. Sinniah. 2012. Alginate-encapsulation, short-term storage and plant regeneration from protocorm-like bodies of *Aranda Wan Chark Kuan* 'Blue' × *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl. (Orchidaceae). *Plant Growth Regulation* 68(2): 303-311. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9699-x>
- 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(5): 98. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1847-2>
- Gómez-Aguirre, Y. A., A. Zamilpa, M. González-Cortazar y G. Trejo-Tapia. 2012. Adventitious root cultures of *Castilleja tenuiflora* Benth. as a source of phenylethanoid glycosides. *Industrial Crops and Products* 36(1): 188-195. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.09.005>
- Hernández, F. 1943. Capítulo LI: Del *Ahoaxocotl* o ciruelo encino. In: Ochoterena, I. (ed.). La historia de las plantas de la Nueva España, Tomo 1, Libro primero, índice general. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Mx., México. Pp. 50. http://www.ibiologia.unam.mx/plantasnuevaspana/pdf/historia_de_las_plantas_I_1.pdf#page=49 (consultado diciembre de 2018).
- Herrera-Ruiz, M., R. López-Rodríguez, G. Trejo-Tapia, B. E. Domínguez-Mendoza, M. González-Cortazar, J. Tortoriello y A. Zamilpa. 2015. A new furofuran lignan diglycoside and other secondary metabolites from the antidepressant extract of *Castilleja tenuiflora* Benth. *Molecules* 20(7): 13127-13143. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules200713127>
- Islam, M. S. y M. A. Bari. 2012. *In vitro* regeneration protocol for artificial seed production in an important medicinal plant *Mentha arvensis* L. *Journal of Bio-Science* 20: 99-108. DOI: <https://doi.org/10.3329/jbs.v20i0.17722>
- Jiménez, M., M. Padilla, Ch. Reyes, L. Espinosa, E. Melendez y A. Lira-Rocha. 1995. Iridoid glycoside constituents of *Castilleja tenuiflora*. *Biochemical Systematics and Ecology* 23: 455-456. DOI: [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(95\)00027-R](https://doi.org/10.1016/0305-1978(95)00027-R)
- Jordán, M. y J. Casaretto. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. In: Squeo, F. A. y L. Cardemil (eds.). Fisiología Vegetal. Ediciones Universidad de La Serena. La Serena, Chile. 28 pp.

- Lata, H., S. Chandra, I. A. Khan y M. A. ElSohly. 2009. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. an important medicinal plant. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 15(1): 79-86. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-009-0008-8>
- Lata, H., S. Chandra, Z. Mehmedic, I. A. Khan y M. A. ElSohly. 2012. *In vitro* germplasm conservation of high D9-tetrahydrocannabinol yielding elite clones of *Cannabis sativa* L. under slow growth conditions. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 743-750. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0874-x>
- López-Laredo, A. R., Y. A. Gómez-Aguirre, V. Medina-Pérez, G. Salcedo-Morales, G. Sepúlveda-Jiménez y G. Trejo-Tapia. 2012. Variation in antioxidant properties and phenolics concentration in different organs of wild growing and greenhouse cultivated *Castilleja tenuiflora* Benth. *Acta Physiologiae Plantarum* 34(6): 2435-2442. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1025-8>
- Micheli, M., I. A. Hafiz y A. Standardi. 2007. Encapsulation of *in vitro*-derived explants of olive (*Olea europaea* L. cv. Moraiolo): II. Effects of storage on capsule and derived shoots performance. *Scientia Horticulturae* 113(3): 286-292. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.04.001>
- Morales, E. J. y J. S. Cano. 2012. Semillas sintéticas: El campo del futuro. *Ciencia y Desarrollo* s.n. <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/258/articulos/semillassinteticas.html> (consultado diciembre de 2018).
- Moreno-Escobar, J., S. Bazaldúa, M. Villarreal, J. Bonilla-Barbosa, S. Mendoza y V. Rodríguez-López. 2011. Cytotoxic and antioxidant activities of selected Lamiales species from Mexico. *Pharmaceutical Biology* 49(12): 1243-1248. DOI: <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.589454>
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nieves, N., J. C. Lorenzo, M. A. Blanco, J. González, H. Peralta, M. Hernández, R. Santos, O. Concepción, C. G. Borroto, E. Borroto, R. Tapia, M. E. Martínez, Z. Fundora y A. González. 1998. Artificial endosperm of *Cleopatra tangerine* zygotic embryos: A model for somatic embryo encapsulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54(2): 77-83. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1006101714352>
- Nieves, N., Y. Zambrano, R. Tapia, M. Cid, D. Pina1 y R. Castillo. 2003. Field performance of artificial seed-derived sugarcane plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75(3): 279-282. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1025855611981>
- Prasad, A., M. Singh, N. Prasad, A. Kumar y A. Mathur. 2014. Molecular, chemical and biological stability of plants derived from artificial seeds of *Centella asiatica* (L.) Urban-An industrially important medicinal herb. *Industrial Crops and Products* 60: 205-211. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.022>
- Rai, M. K., P. Asthana, S. K. Singh, V. S. Jaiswal y T. Jaiswal. 2009. The encapsulation technology in fruit plants-A review. *Biotechnology Advances* 27(6): 671-679. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.025>
- Rizkalla, A., A. M., M. Badr-Elden, O. El-Sayed, M. I. Nasr y N. M. Esmail. 2012. Development of Artificial Seed Technology and Preservation in Sugar Beet. *Sugar Technology* 14(3): 312-320. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12355-012-0146-0>
- Saiprasad, G. V. S. 2001. Artificial seeds and their applications. *Resonance* 6(5): 39-47. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02839082>
- Salcedo-Morales, G., G. Rosas-Romero, N. Nabor-Correa, K. Bermúdez-Torres, A. R. López-Laredo y G. Trejo-Tapia. 2009. Propagation and conservation of *Castilleja tenuiflora* Benth. (hierba del cáncer) through *in vitro* culture. *Polibotánica* (28): 119-137.
- San Andrés, M., R. Chércoles, J. M. de La Roja y M. Gómez. 2010. Factores responsables de la degradación química de los polímeros, efectos provocados por la radiación lumínica sobre algunos materiales utilizados en conservación: primeros resultados. *Proceedings XI Jornada de Conservación de Arte Contemporáneo*. Museo Nacional Centro de Arte Reina Sofía-Grupo Español de Conservación (GEIC). Madrid, España, Pp. 331-358.
- Sánchez, P. M., M. L. Villarreal, M. Herrera-Ruiz, A. Zamilpa, E. Jiménez-Ferrer y G. Trejo-Tapia. 2013. *In vivo* anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of extracts from wild growing and in vitro plants of *Castilleja tenuiflora* Benth. (Orobanchaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 150(3): 1032-1037. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2013.10.002>
- Sharma, S., A. Shahzad y J. A. Teixeira da Silva. 2013. Synseed technology-A complete synthesis. *Biotechnology Advances* 31(2): 186-207. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.007>

- Standardi, A. y M. Micheli. 2012. Encapsulation of *in vitro*-derived explants: an innovative tool for nurseries. In: Lambardi, M., E. Ozudogru y S. Jain (eds.). Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Chapter IV: Applications of *in vitro* propagation. Humana Press. Totowa, USA. Pp. 397-418. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8>
- Standardi, A. y E. Piccioni. 1997. Rooting Induction in Encapsulated Buds of M.26 Apple Rootstock for Synthetic Seed. In: Altman, A. e Y. Waisel (eds.). Biology of Root Formation and Development. Basic Life Sciences, vol 65. Springer. Boston, USA. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5403-5_66
- 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(4): 761-766. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.06.001>
- Tacoronte, M., M. Vielma, A. Olivo y N. Chacón. 2017. Efectos de los nitratos y la sacarosa en la propagación *in vitro* de tres variedades de papa nativa. Revista Colombiana de Biotecnología 19(2): 63. DOI: <http://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.70160>
- Tank, C. D. y G. R. Olmstead. 2008. From annuals to perennials: phylogeny of subtribe Castillejinae (Orobanchaceae). American Journal of Botany 95(5): 608-625. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.2007346>
- Teixeira da Silva, J. A., Z. Songjun, R. Fernandes, J. Dobránszki, J. C. Cardoso y W. A. Vendrame. 2014. *In vitro* conservation of *Dendrobium* germplasm. Plant Cell Reports 33: 1413-1423. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1631-6>.
- Tsvetkov, I., L. Jouve y J. F. Hausman. 2006. Effect of alginate matrix composition on regrowth of *in vitro*-derived encapsulated apical microcuttings of hybrid aspen. Biologia Plantarum 50(4): 722-724. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0115-0>