



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

**Caracterización morfológica y de producción
de metabolitos secundarios de plántulas *in vitro*
obtenidas mediante semillas sintéticas
de *Gomphrena globosa* L.**

TESIS

Para obtener el título de:

Ingeniero en Biotecnología

Presenta:

David Cruz Velasco

Directora de tesis:

Dra. Jacqueline Capataz Tafur

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca.

2018



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 02 de abril de 2018 a las 12 hr. los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Caracterización morfológica y producción de metabolitos secundarios de plántulas *in vitro* obtenidas mediante semillas sintéticas de *Gomphrena globosa* L.**" presentada por el alumno David Cruz Velasco, con número de matrícula 12090427, aspirante al título de **Licenciatura**.

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

Tuxtepec, Oaxaca, a 02 de abril de 2018.

ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Jacqueline Capataz Tafur
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis

Dr. Enrique Villalobos Amador
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Andrés Aguirre Cruz
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dra. Janet María León Morales
Profesor Investigador
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco
Revisor de Tesis

Dr. Edgar García López
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 13 de abril de 2018
Oficio No. JCIB/008/04/2018

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **David Cruz Velasco** titulado "**Caracterización morfológica y producción de metabolitos secundarios de plántulas *in vitro* obtenidas mediante semillas sintéticas de *Gomphrena globosa* L.**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en Ingeniería en **Biología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

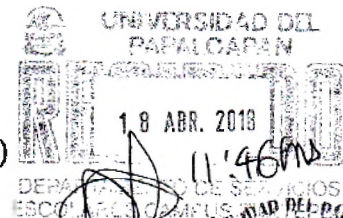
El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dr. Enrique Villalobos Amador (Presidente, UNPA)
Dr. Andrés Aguirre Cruz (Secretario, UNPA)
Dra. Janet María León Morales (Vocal, CIATEJ)
Dr. Edgar García López (Suplente Primero, UNPA)
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa (Suplente Segundo, UNPA)

Sin mas por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

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



JEFATURA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC
Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biología
Universidad del Papaloapan

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

c.c.p. Dra. Jacqueline Capataz Tafur. Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. David Cruz Velasco, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

DEDICATORIA

A MI MADRE Y MI HERMANO

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo incondicional que me han proporcionado durante este proceso principalmente a mi madre y mi hermano.

A mi directora de tesis, la Dra. Jacqueline Capataz Tafur por el apoyo incondicional y tiempo durante este proceso.

A mis amigos de laboratorio por aquellos momentos de compañía y asesoría durante mi estancia.

RECONOCIMIENTO

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales (CCV) de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, bajo la dirección de la Dra. Jacqueline Capataz Tafur.

PRODUCTOS

Cruz-Velasco, D., Capataz-Tafur, J. Semillas sintéticas como estrategia a la Micropropagacion de *G. globosa*. Poster. IV Encuentro Internacional sobre Biotecnología. 3 – 6 de diciembre. Tlaxcala México

ABREVIATURAS

CaCl₂: Cloruro de calcio

cm: centímetros

EA: Equivalente de amarantina

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EQ: Equivalente de quercetina

ES: Extracto seco

Fd: Fuerza de deformación

g: gramos

h: horas

L: litros

M: Molar

mm: milímetros

N: Newtons diferencias entre las dos

Ng: Número de semillas germinadas

NaAl: Alginato de sodio

Nb: Número de brotes

nm: nanómetros

NS: Número de semillas totales

Np: Número de plantas

p: peso

Ps: Peso seco

Pc: Porcentaje de conversión

Pg: Porcentaje de germinación

ppm: partes por millón

rpm: revoluciones por minuto

Tg: Tiempo de conversión

v: volumen

%: Porcentaje

µL: microlitros

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 <i>Gomphrena globosa</i> L.	2
2.2 Actividad Biológica de <i>Gomphrena globosa</i> L.	3
2.3 Fitoquímica	5
2.4. Micropropagación	8
2.4.1 Cultivo <i>in vitro</i>	8
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Gomphrena globosa</i> L.	9
2.5 Tecnología de las semillas sintéticas	11
2.5.1 Composición de la matriz encapsulante	11
2.5.2 Alginato de sodio	12
2.5.3 Estructura del alginato	13
2.5.4 Formación de la matriz de encapsulación	15
5. OBJETIVOS	20
6. METODOLOGÍA	21
6.1. Material vegetal.	21
6.2 Mantenimiento del cultivo <i>in vitro</i> de <i>G. globosa</i> L	21
6.3 Encapsulamiento de segmentos nodales de <i>G. globosa</i> L.	21
6.4 Medición de la fuerza de deformación	22
6.5 Medición del porcentaje y tiempo de germinación	23
6.6 Medición del porcentaje de conversión	23
6.7 Almacenamiento	24
6.8 Aclimatización y establecimiento de semillas sintéticas en suelo	24
6.9.1 Fenoles totales y Flavonoides	25
6.9.2 Betalaínas	26
6.10 Análisis estadístico	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28

7.1 Características de las cápsulas de alginato calcio y efecto de la matriz encapsulante en la formación de semillas sintéticas.	28
7.3 Efecto de las diferentes concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio sobre el porcentaje de germinación y conversión.	31
7.4 Conservación de germoplasma a corto plazo	34
7.5 Aclimatización y establecimiento de semillas sintéticas en suelo	36
7.6 Determinación del contenido de fenoles totales, flavonoides y betalaínas	37
8. CONCLUSIÓN	40
9. REFERENCIAS	41
10. ANEXOS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Núm. de tabla	Título	Pág
1	Taxonomía de <i>Gomphrena globosa</i> L.	3
2	Actividad biológica de algunos metabolitos secundarios de <i>G. globosa</i> L.	5
3	Principales metabolitos secundarios de <i>G. globosa</i> L.	6
4	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Gomphrena globosa</i> L.	10
5	Producción de semillas sintéticas en sus condiciones óptimas para diferentes especies de plantas medicinales.	16
6	Medio MS para la inducción de brotes.	21
7	Matriz para el encapsulamiento de segmentos nodales de <i>Gomphrena globosa</i> L.	22
8	Efecto de los niveles del agente de encapsulación (alginato de sodio) y de la matriz (CaCl ₂) en la encapsulación de segmentos nodales <i>in vitro</i> de <i>G. globosa</i> L.	28
9	Respuesta de los agentes encapsulantes sobre el Pg y Pc	32
10	Parámetros morfológicos de plántulas de <i>G. globosa</i> L. obtenidas a partir de semillas sintéticas vs micropropagadas.	34
11	Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el Pg y Pc	35
12	Contenido de fenoles, flavonoides y betalaínas de los extractos de raíz, tallo y hoja de <i>G. globosa</i> L.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm. de figura	Título	Pág
1	<i>Gomphrena globosa</i> L.	2
2	Alga parda de la familia de las feofíceas.	13
3	Monómeros de ácido alginico.	14
4	Bloques poliméricos de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G)	14
5	Representación esquemática de la asociación de las cajas de huevos de las Poli (L-Guluronato) de alginato entrecruzado por iones calcio (Ca ²⁺).	15
6	Secuencia de deformación de las cápsulas de alginato de calcio.	23
7	Cápsulas de Alginato de calcio	29
8	Etapas de desarrollo de las semillas sintéticas de <i>G. globosa</i> L	31
9	Desarrollo de semillas sintéticas bajo condiciones de sustrato	37

RESUMEN

Gomphrena globosa L. es una especie perteneciente a la familia Amaranthaceae, la cual se caracteriza por acumular compuestos bioactivos como fenoles, flavonoides y betalaínas los cuales pueden ser empleados para el tratamiento de algunas enfermedades como problemas de la próstata, hipertensión y bronquitis. El objetivo de este trabajo fue establecer un sistema de micropropagación de *G. globosa* L mediante semillas sintéticas que presentarán características morfológicas y de acumulación de metabolitos secundarios en forma similar a las plántulas *in vitro*. Para ello, se encapsularon segmentos nodales de plántulas *in vitro* de *G. globosa* en una matriz de alginato de sodio (NaAl) al 2, 3 y 4 % en complejo con cloruro de calcio (CaCl_2) al 50, 75 y 100 mM para la producción de semillas sintéticas. Luego se midió la fuerza de deformación de las semillas sintéticas, el porcentaje de germinación (Pg) y porcentaje de conversión (Pc). Las características fisiológicas y el contenido de metabolitos secundarios de las plántulas obtenidas de semillas sintéticas que mostraron un mayor Pg se compararon con respecto a las plántulas *in vitro*. Asimismo, al mejor tratamiento que mostró mayor Pg se realizó la conservación de germoplasma a corto plazo y finalmente las semillas sintéticas obtenidas fueron germinadas *in vitro* y *ex vitro* (en sustrato). Las semillas sintéticas obtenidas presentaron fuerza de deformación en el rango de 291.35 a 300.72 N. Con la combinación de 4% de NaAl y 50 mM de CaCl_2 se presentó el mejor Pg y de Pc (90 y 91%). Las plántulas obtenidas mediante semillas sintéticas presentaron características morfológicas similares a las plántulas micropropagadas *in vitro*. Sin embargo, mostraron mayor acumulación de metabolitos secundarios encontrándose que los extractos obtenidos a partir de hojas acumularon mayor contenido de fenoles totales (30.24 ± 0.27 mg EAG/g ES) y flavonoides (1.00 ± 0.02 mg EQ/g ES), mientras que en los extractos de tallos se obtuvo una mayor concentración de betalaínas (8.83 ± 0.02 mg EA/g ES). Las semillas sintéticas conservadas a corto plazo (1 mes) a 4°C presentaron bajo condiciones *in vitro* un Pg del 86% y un 95% de Pc, mientras que bajo condiciones *ex vitro* (sustrato) presentaron un Pg y Pc del 80%.

ABSTRACT

Gomphrena globosa L. is a species belonging to the family Amaranthaceae, which is characterized by accumulating bioactive compounds such as phenols, flavonoids and betalains which can be used for the treatment of some diseases such as prostate problems, hypertension and bronchitis. The objective of this work was to establish a micropropagation system of *G. globosa* L by means of synthetic seeds that will present morphological characteristics and of accumulation of secondary metabolites in a similar way to the *in vitro* seedlings. To this end, nodal segments of *in vitro* seedlings of *G. globosa* were encapsulated in a matrix of sodium alginate (NaAl) at 2, 3 and 4% in complex with calcium chloride (CaCl₂) at 50, 75 and 100 mM for production of synthetic seeds. Then the deformation force of the synthetic seeds, the percentage of germination (Pg) and percentage of conversion (Pc) were measured. The morphological characteristics and the content of secondary metabolites of the seedlings obtained from synthetic seeds that showed a higher Pg were compared with respect to the *in vitro* seedlings. Likewise, the best treatment that showed the highest Pg was the germplasm conservation in the short term and finally the synthetic seeds obtained were germinated *in vitro* and *ex vitro* (in substrate). The synthetic seeds obtained had deformation strength in the range of 291.35 to 300.72 N. With the combination of 4% NaAl and 50 mM CaCl₂, the best Pg and Pc (90 and 91%) were presented. The seedlings obtained by synthetic seeds presented morphological characteristics similar to micropropagated seedlings *in vitro*. However, they showed a greater accumulation of secondary metabolites and found that extracts obtained from leaves accumulated a higher content of total phenols (30.24 ± 0.27 mg EAG/g ES) and flavonoids (1.00 ± 0.02 mg EQ/g ES), While that a higher concentration of betalains was obtained in stem extracts (8.83 ± 0.02 mg EA/g ES). Synthetic seeds conserved in the short term (1 month) at 4 ° C showed, under *in vitro* conditions, a Pg of 86% and 95% of Pc, while under *ex vitro* conditions (substrate) they presented a Pg and Pc of 80%.

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos el hombre ha buscado en la flora de su entorno plantas que le ayuden a tratar sus problemas de salud. De esta manera, durante largo tiempo, el reino vegetal ha constituido la principal para la obtención de medicamentos utilizando una gran variedad de especies vegetales en forma empírica para el tratamiento de diversas enfermedades, como inflamatorias, infecciosas, gastrointestinales, etc. Por lo cual se llevó a la necesidad de propagar plantas medicinales utilizando métodos tradicionales tales como la reproducción por semilla y estacas obteniendo por lo general bajos rendimientos.

Actualmente, con la ayuda de la investigación científica en el campo de la micropropagación se han desarrollado nuevas herramientas como lo es el cultivo *in vitro* las cuales es posible realizar una micropropagación más eficiente de diferentes plantas medicinales controlando sus condiciones de crecimiento y de nutrición. Por otro lado, el uso de nuevas aplicaciones del cultivo *in vitro* como lo es la tecnología de la semilla sintética ha permitido obtener altos porcentajes de germinación y conversión de las plantas que presenten bajo rendimiento en cultivo *in vitro*, por ello se ha implementado como una tecnología innovadora en la micropropagación y en la conservación de germoplasma de plantas medicinales.

Gomphrena globosa es una planta de alto valor medicinal debido a los metabolitos presentes y a su actividad biológica, sin embargo, su propagación por semilla es anual siendo una limitante para la disponibilidad de su material vegetal. Por lo que en el presente trabajo se implementará el uso de la tecnología de las semillas sintéticas, con el objetivo de establecer un sistema de micropropagación de *Gomphrena globosa* mediante semillas sintéticas que presenten características morfológicas y de acumulación de metabolitos secundarios en forma similar a las plántulas *in vitro*.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Gomphrena globosa* L.

Comúnmente conocida como “amaranto globoso” es una planta herbácea que alcanza de 30 a 50 cm de altura ramificada desde la base (Rahman y Gulshana, 2014) con tallos engrosados en forma cilíndrica, presentan hojas opuestas de color verde vivo ovaladas y estrechas, sus inflorescencias presentan forma de cabezuelas globosas a hemiesféricas o cilíndricas terminales y axilares solitarias (Figura 1), es tolerante al calor (Kugler *et al.*, 2006) y presenta una gran capacidad de adaptación lo que permite su crecimiento en suelos con bajos contenidos de nutrientes o tierras frías (Silva *et al.*, 2012). Presenta características botánicas, composición química y sustancias activas definidas, que ofrece condiciones para ser aprovechado con fines ornamentales y medicinales. Su distribución natural se encuentra relacionada en diferentes países del centro y sur de América como: Brasil, Panamá y Guatemala (Roriz *et al.*, 2015) y de acuerdo a su clasificación taxonómica (Tabla 1) pertenece a la familia Amaranthaceae.

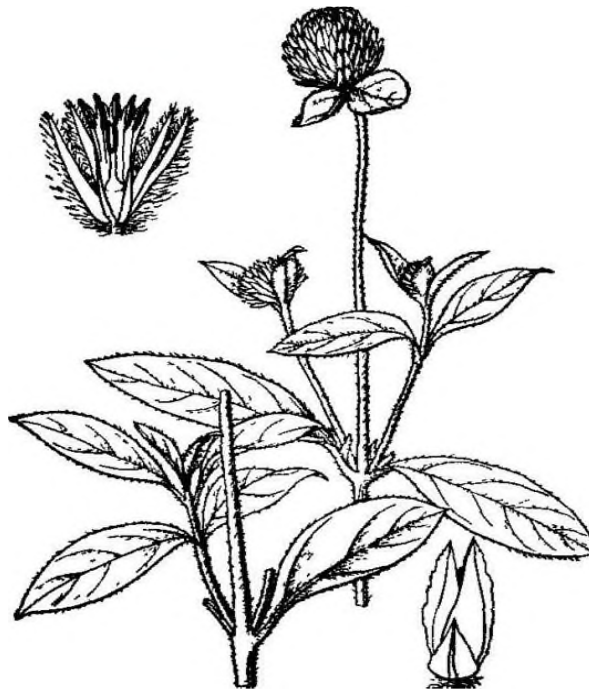


Figura 1. *Gomphrena globosa* L. (Tomado de Zhiwutong.com, 2018)

Tabla 1. Taxonomía de *Gomphrena globosa* L.

Taxonomía	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllale
Familia	Amaranthaceae
Genero	<i>Gomphrena</i>
Especie	<i>globosa</i> L.

Tomado de: Ilyas *et al.*, 2013.

2.2 Actividad Biológica de *Gomphrena globosa* L.

G. globosa contiene diferentes compuestos con actividad biológica que proporcionan numerosas propiedades terapéuticas los cuales la han llevado a su consumo en muchos países para tratar diversas enfermedades como inflamatorias respiratorias tales como asma bronquial, bronquitis aguda y crónica (Silva *et al.*, 2012). Como analgésico, tónico y carminativo (Babu *et al.*, 2012). Presenta además actividades antimaláricas y diuréticas. Toda la planta se utiliza como antipirética y diaforética, las hojas y las flores se usan como emolientes y para controlar la salivación sangrante; también tienen aplicación para tratar la fiebre, problemas renales, cólicos, diabetes, hipertensión, condiciones del sistema urinario y problemas de próstata (Roriz *et al.*, 2014); también presenta efecto expectorante, como anti-inflamatorio y anti-disentería como para curar la tos (Kusmiati *et al.*, 2017). Las hojas se usan como antimaláricas y para la caída de los dientes, para detener la hemorragia de la nariz, calmante de los nervios y la decocción de hojas se utiliza en la tos. La infusión de flor se utiliza para tratar el empacho (Rahman y Gulshana, 2014).

En América Latina y el Caribe se ha empleado para reducir el colesterol elevado y la ictericia. Por otra parte, en Nigeria y otros países se ha empleado para tratar varias enfermedades de la piel, así como las causadas por parásitos y otros agentes infecciosos como el agente causal de la gangrena (Ilyas *et al.*, 2013).

En la medicina tradicional, *G. globosa*, ha sido ampliamente usada como remedio para la oliguria, empacho, hipertensión, antioxidante, antimicrobiano (Upadhyaya y Saikia, 2011). Se ha usado también para tratar problemas asociados con los niños tales como: ronquera, tos, bronquitis y otras enfermedades respiratorias, como expectorante y en problemas de reproducción puesto que ha presentado una significativa actividad citotóxica y estrogénica

El conocimiento sobre las plantas medicinales a menudo simboliza la única opción terapéutica para muchas comunidades y grupos étnicos (Arcanjo *et al.*, 2011) Por esta razón los comentarios sobre el uso popular y la eficacia de las plantas medicinales propician la difusión de las propiedades terapéuticas de las mismas comúnmente utilizados por los efectos médicos que producen. No obstante, la mayoría de las veces no se conocen los constituyentes químicos (López, 2006).

En la tabla 2 se muestra la actividad biológica particular de metabolitos presentes en inflorescencias de *Gomphrena globosa*.

Tabla 2. Actividad biológica de algunos metabolitos secundarios de *G. globosa* L.

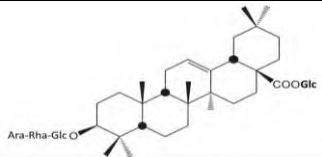
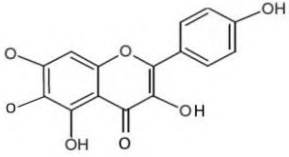
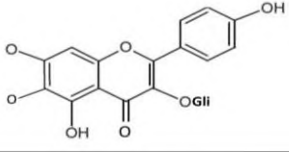
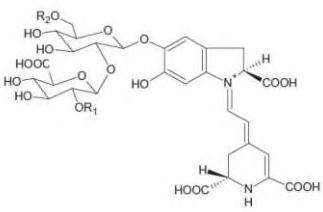
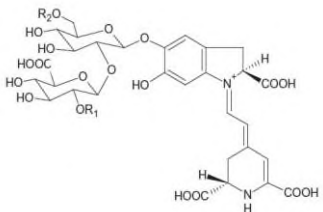
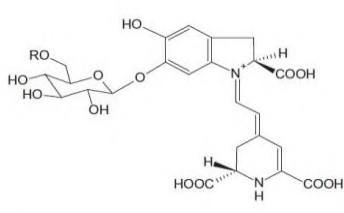
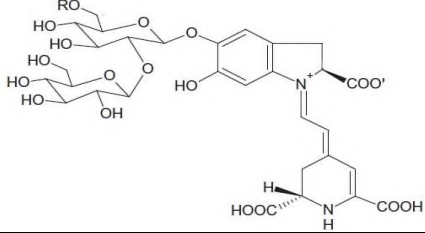
Metabolito	Actividad biológica	Referencia
Compuestos Fenólicos y Betacianinas	Antiinflamatoria (condiciones inflamatorias crónicas en los ovarios)	Ilyas <i>et al.</i> , 2013 Andrade <i>et al.</i> , 2012
Alcaloides, Esteroides, Glicósidos, Saponinas y Taninos, Hidroxioleananos Triterpénicos.	Antimicrobiana (antihelmíntico: <i>Taenia solium</i> . y <i>Fasciola hepatica</i> .) antibacterial (<i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Helicobacter pylori</i>).	Ilyas <i>et al.</i> , 2013; Cheng <i>et al.</i> , 2013
Flavonoides, Saponinas Terpenicas y Esteroidales	Hepatoprotectora	Salvador <i>et al.</i> , 2012 Avirutnant <i>et al.</i> , 1983
Fatsicarpainas e Hidroxioleananos	Gastroprotectora (ulcera gástrica y duodenal, adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico)	Cheng <i>et al.</i> , 2013
Flavonoides, compuestos fenólicos y Terpenoides	Anticancerígena (carcinoma de Ehrlich)	Ilyas <i>et al.</i> , 2013 Latha <i>et al.</i> , 2013
Saponinas, Alcaloides, Coumarinas y Azúcares reductores.	Efecto cardiovascular (disminuye la hipertensión)	Ilyas <i>et al.</i> , 2013 Arcanjo <i>et al.</i> , 2011
Betacianinas	Desordenes reproductivos (próstata)	Ilyas <i>et al.</i> , 2013
Flavonoides y compuestos fenólicos	Coagulante natural de la sangre.	Ilyas <i>et al.</i> , 2013

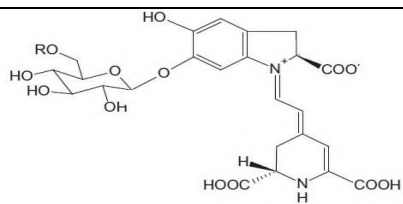
2.3 Fitoquímica

Entre las sustancias constituyentes de *G. globosa* se detectaron 27 compuestos fenólicos de los cuales 6 eran derivados de ácidos fenólicos, 15 flavonoides, otros derivados de flavonoides y 6 betacianinas con actividad antioxidante (Roriz *et al.*, 2014) tipo Gomphrenina: Gomphrenina I, Isogomphrenina I, Gomphrenina II, Isogomphrenina II, Gomphrenina III y Isogomphrenina III. Los extractos obtenidos de las partes aéreas presentan las siguientes actividades biológicas: larvicidas, antimicrobianos, antitumoral y estrogénica (Cai *et al.*, 2005).

En la tabla 3 se muestran las estructuras químicas de los principales metabolitos secundarios identificados en esta especie.

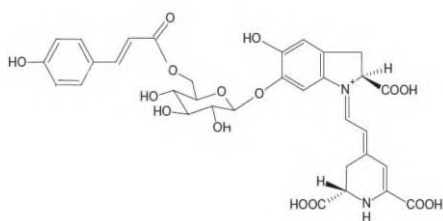
Tabla 3. Principales metabolitos secundarios de *G. globosa* L.

Metabolito (estructura química)	Nombre	Referencia
	<i>Gomphrenosido</i>	Yada <i>et al.</i> , 1998 Salvador <i>et al.</i> , 2012
	3,4-5-trihidroxi-6-7-metilenodioxi-flavonol	Bouillant <i>et al.</i> , 1978 Salvador <i>et al.</i> , 2012
	4-5-dihidroxi-6-7-metilenodioxi-3-O-β-D-glucosa flavonol	Salvador <i>et al.</i> , 2012 Chong <i>et al.</i> , 1981.
	Amarantina	Salvador <i>et al.</i> , 2012 Cai y Sun, 2001.
	Isoamarantina	Salvador <i>et al.</i> , 2012 Piattelli y Minale, 1964.
	Celosiaina	Salvador <i>et al.</i> , 2012, Piattelli y Minale, 1964.
	Gomphrenina I	Salvador <i>et al.</i> , 2012 Heuer <i>et al.</i> , 1992



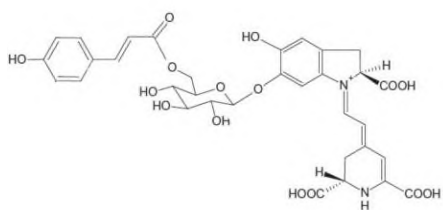
Gomphrenina II

Salvador *et al.*, 2012
Heuer *et al.*, 1992



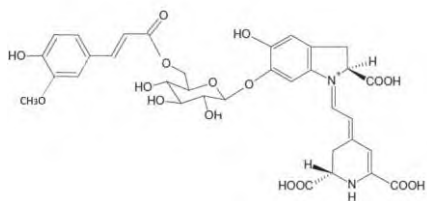
Gomphrenina III

Salvador *et al.*, 2012
Heuer *et al.*, 1992



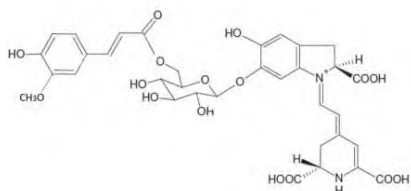
Gomphrenina IV

Salvador *et al.*, 2012.
Heuer *et al.*, 1992



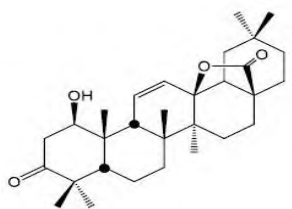
Gomphrenina V

Salvador *et al.*, 2012
Heuer *et al.*, 1992



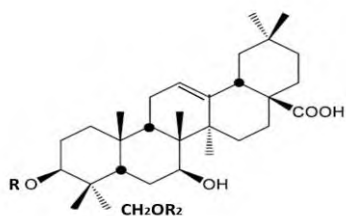
Gomphrenina VI

Salvador *et al.*, 2012
Heuer *et al.*, 1992



Hidroxioleano

Cheng, *et al.*, 2013



Oleano Triterpénico

Chang *et al.*, 2004

2.4. Micropropagación

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado (semi-sólido o líquido). El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento y micropropagación, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Manzanilla Ramírez, 2004). Dentro del proceso de micropropagación se pueden diferenciar varias etapas: 1) Desinfección del material vegetal: 2) Establecimiento de un cultivo *in vitro*: 3) Multiplicación de brotes: 4) Enraizamiento: 5) Aclimatización. Esta secuencia de etapas abarca un ciclo completo de la multiplicación de plantas *in vitro* y puede ser aplicada a cualquier especie vegetal (Jain y Nakhooda, 2017)

Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; la cual nos dice que todas las células vegetales poseen una copia íntegra del material genético de la planta lo cual le permite regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban. Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de Novo y embriogénesis somática (Jain y Nakhooda, 2017).

2.4.1 Cultivo *in vitro*

Se conoce como cultivo *in vitro* a la técnica donde el material vegetal se cultiva en recipientes de vidrio o de plástico transparente y consiste en cultivar un explante bajo condiciones asépticas aprovechando su potencialidad de diferenciación en

presencia de cantidades balanceadas de nutrientes y hormonas (Álvarez, 2011). Existen tres conceptos básicos que fundamentan el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales: totipotencialidad celular, dediferenciación y balance de reguladores de crecimiento vegetal (Hurtado y Merino, 1987). La capacidad para regenerar tejidos, órganos e incluso una planta entera es única en plantas. Al cultivo *in vitro* lo podemos definir como un conjunto de técnicas que nos permiten tener un relativo control sobre el tejido de estudio y sus procesos morfogénicos, fisiológicos y bioquímicos. Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ofrecer muchas ventajas para la micropropagación de plantas como las medicinales que llevan a cabo la producción de los compuestos activos, entre las que se pueden mencionar las siguientes: 1) un suplemento continuo de compuestos en forma óptima y bajo condiciones controladas; 2) la independencia de factores climáticos y de plagas presentes en plantas silvestres; 3) la propagación de especies con crecimiento muy lento o que se encuentran en peligro de extinción; y 4) la acumulación de compuestos que no se han podido identificar en la planta de origen y dentro de sus aplicaciones podemos encontrar: 1) propagación industrial de plantas; 2) obtención de plantas libres de virus; 3) obtención de metabolitos secundarios; 4) micropropagación; 5) conservación de germoplasma; 6) semillas sintéticas. Por otro lado, y al ser los cultivos *in vitro* sistemas altamente controlados, éstos pueden constituir modelos adecuados para realizar investigaciones bioquímicas y fisiológicas que ayuden a entender el metabolismo secundario de las plantas; así como a investigar aspectos básicos sobre sus mecanismos de especialización o diferenciación. Actualmente, algunos de los cultivos vegetales más utilizados en investigación y producción de fármacos son los cultivos de callos, de células en suspensión y de raíces transformadas (Jain y Nakhooda, 2017).

2.4 Cultivo *in vitro* de *Gomphrena globosa* L.

La propagación convencional de la planta se ve limitada debido a que la producción de semillas es anual, aunque no presentan grandes problemas para germinar, es necesario acudir a nuevos sistemas de propagación en grandes cantidades como

lo es el cultivo *in vitro*. Existen estudios en donde se ha reportado la obtención de callos de *G globosa* en donde reportan las condiciones óptimas para el crecimiento de callos pigmentados en combinación de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (Ruiz y Valadez, 1985). Por otro lado, Ghaffar *et al.*, (2007) estudio los efectos de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en la formación de callos obtenidos a partir de semillas, obteniendo callos friables, proliferativos y pigmentados, además de la obtención de brotes. En el laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, Méndez Sánchez (2016) observaron un 94% de germinación de las semillas de las *G. globosa* en 1 día tanto en el medio Gamborg's B5 (B5) como en el medio Murashige-Skoog (MS). Por otro lado, Méndez Sánchez, a partir hipocótilos de plántulas *in vitro* evaluó diferentes combinaciones de Fitorreguladores de los cuales se obtuvieron suspensiones celulares (Tabla 4).

Tabla 4. Cultivo *in vitro* de *Gomphrena globosa* L.

Especie	Explante	Cultivo obtenido	Condiciones de cultivo	Finalidad de cultivo	Referencia
<i>G. globosa</i> L.	Semilla	Callo con regeneración parcial de órganos (raíz y brotes)	MS, sacarosa, mio-inositol, tiamina, agar, BAP, NAA, GA ₃ .	Micropropagación	Ghaffar <i>et al.</i> , 2007
<i>G. globosa</i> L.	Semilla	Plántulas	MS y/o B5, Sacarosa y Fitigel	Micropropagación	Méndez-Sánchez <i>et al.</i> , 2016
<i>G. globosa</i> L.	Hipocótilos de plántulas <i>in vitro</i>	Callos friables	B5, sacarosa, 2,4D, KIN	Betalaínas	Méndez-Sánchez <i>et al.</i> , 2016
<i>G. globosa</i> L.	Callos friables	Suspensiones celulares	B5, sacarosa, 2,4D, KIN	Betalaínas y fenoles	Méndez, 2017

2.5 Tecnología de las semillas sintéticas

La semilla sintética, se puede definir como el encapsulado de cualquier propágulo vegetativo como las puntas de brotes, segmentos nodales, yemas, meristemas o simplemente un embrión somático (Standardi y Micheli, 2013). Para su propagación, nace como respuesta a la urgencia de establecer nuevos e innovadores métodos que reduzcan costos y tiempo en la etapa de la aclimatización a condiciones *ex vitro* de los materiales provenientes de laboratorio.

Las semillas sintéticas proporcionan las siguientes ventajas:

1. La matriz polimérica que puede estar adicionada con nutrientes y otros factores lo que le proporciona un buen desarrollo a la planta:
2. Brinda protección ante agentes contaminantes y desecación
3. Combina las ventajas de la reproducción asexual y sexual tales como:

Reproducción asexual

- Se mantiene la uniformidad y estabilidad genética de las plantas.
- Multiplicación de poblaciones idénticas.
- Crecimiento acelerado.

Reproducción sexual o por semilla

- Producción de grandes volúmenes en poco espacio y bajo costo.
- Almacenamiento por periodos cortos hasta prolongados.
- Facilidad de manipulación, transporte y protección del explante, entre otras.

2.5.1 Composición de la matriz encapsulante

La matriz de encapsulación debe de poseer ciertas características como lo son ser lo suficientemente rígida para proteger a los explantes de la manipulación mecánica y al mismo tiempo permitir la germinación que consiste en la expansión celular y reactivación del metabolismo de la semilla iniciando con la asimilación de agua y terminando con la elongación del eje embrionario que permite la emergencia de la

radícula a través de la cubierta de la semilla (Sánchez *et al.*, 2008). no ser tóxicos, permitir el intercambio gaseoso de dióxido de carbono y oxígeno, adherirse a la superficie del material vegetal, ser biodegradables y permitir la incorporación de macronutrientes, micronutrientes, reguladores de crecimiento, fuentes de carbono a la matriz, con el objetivo de proporcionarle al embrión todo lo necesario para su germinación, brotación y conversión donde se obtiene una planta genética y morfológicamente igual a la especie de la que derivan (Standardi y Micheli, 2013). Se han ensayado una gran cantidad de sustancias como encapsulantes entre las que destacan el alginato sódico con gelatina, alginato de potasio, poliico 2133, carboximetil celulosa y alginato de sodio (Flores, 2010). El alginato de sodio ha sido el más utilizado debido a su moderada viscosidad, baja capacidad de rotación de la solución y brindar todas las características anteriormente mencionadas.

2.5.2 Alginato de sodio

El alginato es un biopolímero natural de las algas pardas (Figura 2) de la familia de las “feoficeas”, entre las que destacan *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, y *Macrocystis pyrifera*, donde actúa como componente estructural en la pared celular y en los espacios intracelulares, promoviendo la rigidez y al mismo tiempo flexibilidad (Humberto *et al.*, 2008).

Los alginatos han sido utilizados con éxito durante muchos años en la industria de los alimentos, como un agente espesante y gelificante, y estabilizador coloidal además de poseer varias propiedades únicas que le han permitido ser utilizado como matriz para el atrapamiento y en la entrega de una variedad de proteínas y células. Estas propiedades incluyen: (i) relativamente inerte medio acuoso dentro de la matriz; (ii) una temperatura ambiente moderada para un proceso de encapsulación libre de solventes orgánicos; (iii) una alta porosidad de gel que permite altas velocidades de difusión de macromoléculas; (iv) la capacidad de controlar esta porosidad con procedimientos de recubrimiento simples y (v)

disolución y biodegradación del sistema bajo condiciones normales (Gombotz y Wee, 2012).

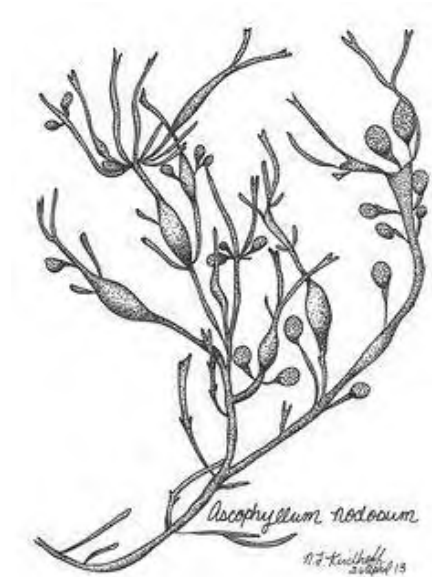


Figura 2. Alga parda de la familia de las feofíceas (Tomado de Pinterest, 2018)

Actualmente es ampliamente utilizado en la investigación científica principalmente en el cultivo *in vitro* donde sus propiedades para la formación de hidrogeles lo convierten en un biopolímero con gran potencial para la encapsulación de propágulos vegetativos como segmentos nodales, puntas de brotes, embriones somáticos para la obtención de semillas sintéticas (Flores, 2010).

2.5.3 Estructura del alginato

El ácido alginico y sus sales son polisacáridos lineales no ramificados. Está compuesta por cantidades variables de dos unidades monoméricas (Figura 3), ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico (Gombotz y Wee, 2012).

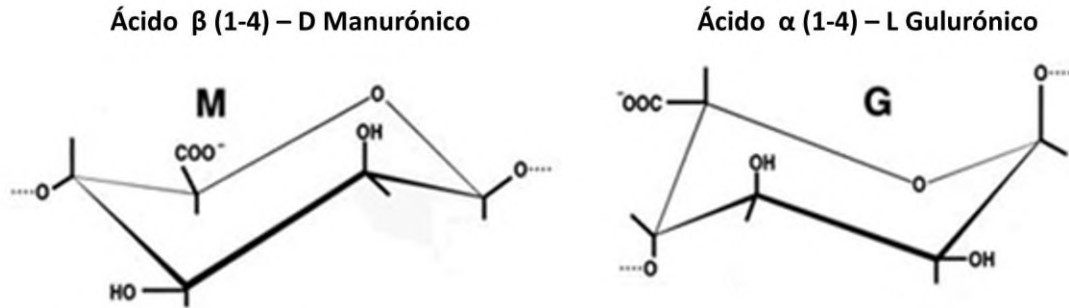


Figura 3. Monómeros de ácido alginico (Adaptado de Aravamudhan *et al.*, 2014).

Típicamente, el ácido alginico está conformado como copolimero en bloques con secciones de unidades manurónicas alternadas con secciones de unidades gulurónicas (Figura 4). la estructura de un ácido alginico en particular depende de la especie de alga que se utilice como materia prima.

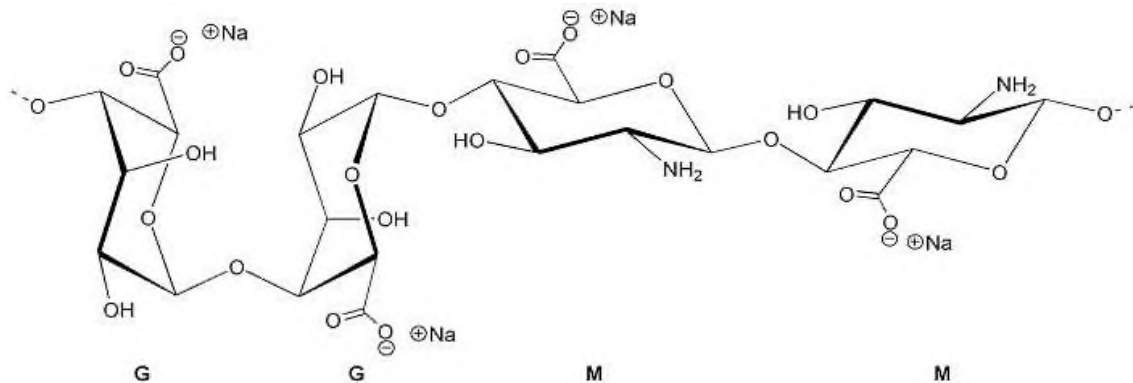


Figura 4. Bloques poliméricos de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G), (Adaptado de Aravamudhan *et al.*, 2014).

El grado de polimerización de un alginato es una medida del peso molecular promedio de sus moléculas y corresponde al número de unidades de ácidos manurónico y gulurónico de la cadena polimérica (Flores, 2010).

2.5.4 Formación de la matriz de encapsulación

La formación de cápsulas sintéticas se logra por goteo de la solución de alginato de sodio de concentración definida a una solución de un metal divalente como el calcio a alta concentración posteriormente se coloca en una mesa de agitación de 20 a 30 min obteniendo una estructura en forma de gel insoluble de alginato de calcio y, por consiguiente, queda constituida una matriz sintética. Se ha mencionado que las sales del ácido algínico están formadas por tres bloques: bloques M, bloques G y bloques MG. Cuando dos cadenas de bloque G se alinean, se forma sitios de coordinación debido a la forma de bucles de estas cadenas, las cavidades permanecen entre ellas y éstos tienen el tamaño adecuado para acomodar al ion Ca^{++} y además están revestidos con grupos carboxílicos y otros átomos de oxígenos electronegativos los cuales son ligandos favorables y permiten un alto grado de coordinación de los iones calcio (Gombotz y Fong, 2012). Por esta razón este modelo es llamado el modelo de la caja de huevos (Figura 5).

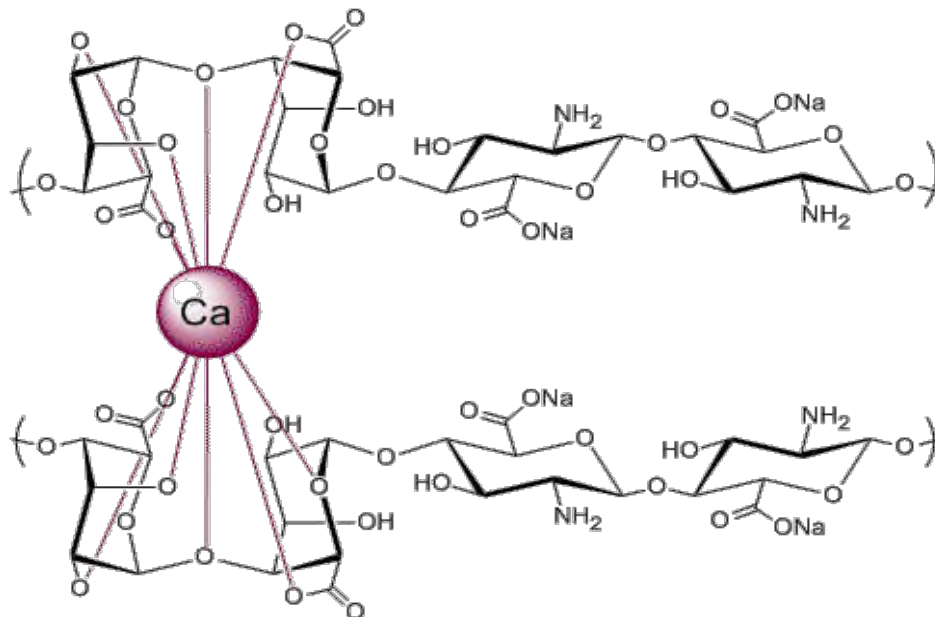


Figura 5. Representación esquemática de la asociación de las cajas de huevos de las Poli (L-Guluronato) de alginato entrecruzado por iones calcio (Ca^{+2}). La sección superior de la estructura, muestra la conversión de la misma en forma de cinta

anclada o unida a los iones Ca^{2+} . La sección inferior muestra la estereoquímica propuesta del complejo de iones Ca^{2+} . Los átomos de oxígeno involucrados en la esfera de coordinación se muestran como círculos rellenos. (Adaptado de Aravamudhan *et al.*, 2014).

La tecnología de la semilla sintética es y ha sido probada en una amplia variedad de especies vegetales (Tabla 5) en donde se han obtenido porcentajes de germinación relativamente altos, utilizando como explantes de encapsulación embriones somáticos, segmentos nodales, puntas de brotes, callos, células en suspensión y raíces (Gantait *et al.*, 2015).

Tabla 5. Producción de semillas sintéticas en sus condiciones óptimas para diferentes especies de plantas medicinales

Especie	Tipo de explante	Alginato de sodio (%)	Concentración de cloruro de calcio (mM)	Regeneración (%)	Referencias
<i>Rotula aquatic</i>	SE	3	50	100	Chithra <i>et al.</i> , 2005
<i>Chonemorpha grandiflora</i>	ST	3	50	95	Nishitha <i>et al.</i> , 2006
<i>Cannabis sativa</i>	NS	5	50	100	Lata <i>et al.</i> , 2009
<i>Spilanthes acmella</i>	ST	3	100	100	Singh <i>et al.</i> , 2009
<i>Eclipta alba</i>	ST, NS	3	100	94.3	Ray y Bhattacharya, 2010
<i>Eclipta alba</i>	NS	3	100	100	Singh <i>et al.</i> , 2010
<i>Stevia rebaudiana</i>	ST, NS	3	100	100	Ali <i>et al.</i> , 2012
<i>Hemidesmus indicus</i>	SE	3	75	100	Cheruvathur <i>et al.</i> , 2013
<i>Ceropegia bulbosa</i>	NS	3	100	100	Dhir y Shekhawat 2013
<i>Phyllanthus fraternus</i>	NS	3	100	92.5	Upadhyay <i>et al.</i> , 2014

NS segmentos nodales, SE embriones somáticos, ST puntas de brotes.

Las diferentes concentraciones de las soluciones encapsulantes alginato de sodio y cloruro de calcio demuestran tener un impacto significativo sobre el porcentaje de germinación debido a que si se emplean concentraciones muy altas se obtiene una matriz muy dura la cual es una limitante para la germinación, de igual forma si se obtiene una matriz muy débil el explante no se adhiere a la matriz y tiende a salirse.

3. JUSTIFICACIÓN

Gomphrena globosa L es considerada una planta de alto valor comercial debido a sus propiedades medicinales y como fuente importante de metabolitos de interés, sin embargo esta planta presenta una gran demanda ornamental y su propagación por semilla se lleva acabo anualmente siendo una limitante para la obtención de material vegetal, por ello es necesario recurrir a nuevas estrategias de micropropagación que garanticen su disponibilidad en todo momento y la conservación de su germoplasma como lo es la tecnología de las semillas sintéticas. Por otro lado, es importante conocer si las plántulas derivadas de semillas sintéticas presentarán características morfológicas y de acumulación de metabolitos secundarios en forma similar a las plántulas *in vitro* de *G. globosa*.

4. HIPÓTESIS

Las semillas sintéticas de *Gomphrena globosa* presentarán un alto porcentaje de germinación y conversión, los cuales presentarán características morfológicas y de acumulación de metabolitos secundarios similares a las plántulas *in vitro*.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer un sistema de micropropagación de *Gomphrena globosa* mediante semillas sintéticas que presenten características morfológicas y de acumulación de metabolitos secundarios en forma similar a las plántulas *in vitro*.

Objetivos específicos

- Micropropagar plántulas *in vitro* de *G. globosa* L.
- Estandarizar el proceso de encapsulación de segmentos nodales de *G. globosa*.
- Evaluar la fuerza de deformación de las semillas sintéticas.
- Evaluar el porcentaje de germinación y la frecuencia de conversión de las semillas sintéticas *in vitro*.
- Conservar el germoplasma a corto plazo.
- Comparar los parámetros morfológicos en plántulas obtenidas mediante cultivo *in vitro* y de semillas sintéticas.
- Cuantificar la producción de fenoles, flavonoides y betalaínas de plántulas obtenidas mediante cultivo *in vitro* y semillas sintéticas
- Evaluar el porcentaje de germinación y la frecuencia de conversión de las semillas sintéticas *ex vitro*.

6. METODOLOGÍA

6.1. Material vegetal.

Las plántulas *in vitro* de *Gomphrena globosa* fueron proporcionadas por el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec localizada en el Circuito Central N° 200, C.P. 68301, San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca.

6.2 Mantenimiento del cultivo *in vitro* de *G. globosa* L

Las plántulas de *G. globosa* de 2 meses de edad fueron sub-cultivadas a partir de segmentos nodales de aproximadamente 1.5 cm de longitud en un medio semisólido compuesto por las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) a un pH de 5.8 seguida de la formulación que se muestra en la Tabla 6 (Méndez, 2017).

Tabla 6. Medio MS para la inducción de brotes.

Componente	Concentración
Medio MS	4.4 g/L
Sacarosa	30 g/L
Fitigel	2.7 g/L

Los frascos con los explantes se incubaron a $25\pm 2^\circ$ C con un fotoperiodo de 18h/6h luz/oscuridad. El subcultivo fue realizado cada 20 días.

6.3 Encapsulamiento de segmentos nodales de *G. globosa* L.

Los segmentos nodales de *G. globosa* de 0.5 cm de longitud fueron tomados de los lotes de plántulas cultivadas en condiciones *in vitro*, posteriormente se suspendieron en la solución de alginato de sodio y con la ayuda de una micro pipeta de 500 μ L se tomaron los segmentos nodales y se goteo de forma individual en una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) contenida en un matraz Erlenmeyer de 500

mL. Para ello, se evaluaron diferentes concentraciones de alginato de sodio y de cloruro de calcio (CaCl_2) disueltos en solución de sales MS al 100%, sacarosa 30g/L (Tabla 7). Una vez que los explantes en alginato fueron suspendidos en el CaCl_2 , el matraz Erlenmeyer se incubó a 150 rpm durante 25 y 30 min para ayudar a dar forma esférica al cotiledón de la semilla sintética. Para la recuperación de las semillas sintéticas se decantó el cloruro de calcio y se efectuaron dos lavados con agua destilada esterilizada. Las semillas sintéticas se almacenaron en frascos de gerber previamente esterilizados y fueron sellados, manteniéndolas en un cuarto de cultivo a 25 ± 1 °C (Standardi y Micheli, 2013) y se evaluó su porcentaje y tiempo de germinación.

Tabla 7. Matriz para el encapsulamiento de segmentos nodales de *G. globosa*

	NaAl	2%	3%	4%
CaCl ₂				
50 mM		T1	T2	T3
75 mM		T4	T5	T6
100 mM		T7	T8	T9

NaAl; Alginato de sodio, CaCl_2 ; Cloruro de calcio

6.4 Medición de la fuerza de deformación

Las semillas sintéticas obtenidas a partir del encapsulamiento se sometieron a pruebas por compresión utilizando un cilindro de acrílico con un diámetro de 4cm con la ayuda de un Texturometro (CT3-25Kg). Para ello, las tres cápsulas de semillas sintéticas fueron colocadas en una base rectangular, la prueba consistió en comprimir las capsulas hasta deformarlas totalmente y como repuesta se midió la fuerza máxima de compresión requerida (Neubauer *et al.*, 2014) como se ilustra en la Figura 6. Se tomaron como control de cada tratamiento tres cápsulas libres de explante. Las pruebas de deformación se realizaron por triplicado.

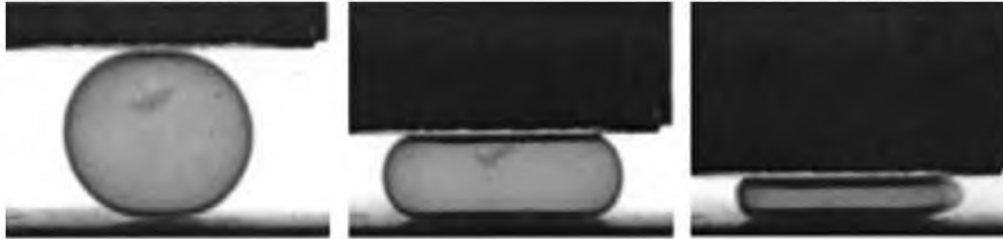


Figura 6. Secuencia de deformación de las cápsulas de alginato de calcio. (Neubauer *et al.*, 2014).

6.5 Medición del porcentaje y tiempo de germinación

Los experimentos para la determinación del porcentaje y tiempo de germinación, se llevó a cabo utilizando frascos de vidrio previamente preparados con papel filtro Whatman N° 1, humedecido con agua destilada esterilizada al momento del establecimiento de las semillas sintéticas, preparados de acuerdo a los diferentes experimentos establecidos; una vez que las semillas sintéticas fueron sembradas, los frascos gerber se sellaron y se colocaron en el cuarto de cultivo a un fotoperiodo de 16 h y flujo fotónico de $33.78 \mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a una temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

El porcentaje de germinación se determinó utilizando la ecuación 1.

$$Pg = \left(\frac{N_g}{N_s} \right) \times 100 \quad (1)$$

Dónde: N_g = número de semillas germinadas y N_s = número de semillas totales.

6.6 Medición del porcentaje de conversión

Con las semillas sintéticas germinadas se prosiguió a realizar una resiembra en medio de cultivo MS suplementado con sacarosa 30 g/L, pH a 5.8 y posteriormente se le adiciono agar 8 g/L como agente gelificante. El porcentaje de conversión se determinó utilizando la ecuación 2.

$$Pc = \left(\frac{N_p}{N_{sb}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Dónde: N_p = número de plantas y N_b = número de brotes totales.

6.7 Almacenamiento

Para realizar la conservación de germoplasma a corto plazo, de las semillas sintéticas obtenidas de los diferentes tratamientos se eligió el tratamiento que presentara el mayor porcentaje de germinación y conversión, se almacenaron 50 semillas (20 por frasco) colocándolas sobre papel filtro estéril dentro de frascos gerber, se sellaron y posteriormente se almacenó a 4°C durante un periodo de 30 días.

Una vez transcurrido el periodo de dormancia las semillas sintéticas fueron llevadas a temperatura ambiente durante 4 h y se les adicionó agua para reactivar el metabolismo del explante, para finalmente medir el porcentaje de germinación y conversión bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro*.

6.8 Aclimatización y establecimiento de semillas sintéticas en suelo

Las semillas sintéticas obtenidas de la conservación de germoplasma a una temperatura de 4°C se les adicionó agua para reactivar el metabolismo del explante para posteriormente aclimatarlas colocándolas en macetas de plástico las cuales contenían una mezcla de vermiculita: suelo estéril (1:1). Las macetas se recubrieron con bolsas de plástico transparentes para mantener una alta humedad y así mantener hidratadas las semillas sintéticas y se incubaron en un cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16 h y flujo fotónico de $33.78 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a una temperatura de 25 ± 1 °C. Las semillas sintéticas se regaron con una solución nutritiva MS siempre que fuese necesario para posteriormente medir el porcentaje de germinación y conversión.

6.9 Extracción y cuantificación de metabolitos secundarios

A las plántulas de *G. globosa* a partir de cultivo *in vitro* convencional y los obtenidos a partir de semillas sintéticas se obtuvieron extractos para la cuantificación de fenoles, flavonoides y betalaínas.

6.9.1 Fenoles totales y Flavonoides

Para la extracción de fenoles totales se realizó una extracción acuosa a partir de 30 mg del material vegetal de *G. globosa* con 1.5 mL de agua, se calentó durante 5 min en agua hirviendo, posteriormente se centrifugo a 10000 rpm/25°C/10min (Silva *et al.*, 2012).

Para la determinación de fenoles se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, el cual aprovecha la capacidad de los fenoles de unirse a radicales libres y de quelación de iones metálicos gracias a la estructura que poseen (anillo aromático con más de un grupo hidroxilo) (Singleton *et al.*, 1974).

La cantidad de fenoles totales se calculó utilizando una curva de calibración de ácido gálico de 0 - 1000 ppm y los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (EAG) por Peso seco (PS). Se utilizó un espectrofotómetro (UV/VIS), para la cuantificación de fenoles totales en los extractos. Primero se agregó 150 µL de agua desionizada, después se adicionó 2.5 µL de una solución de 15 mg/mL de extracto seco (E.S) al cual se le agregó 10 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, la mezcla se dejó reposar durante 10 min y luego se le adicionó un volumen de 30 µL de carbonato de sodio al 20% (p/v). Posteriormente se incubó a 37 °C durante 15 min, finalmente se enfrió en un baño de hielo y se leyó la absorbancia a 750 nm. Todas las muestras se realizaron por triplicado (Chaovanalikit y Wrolstad, 2004).

La cantidad de los flavonoides se calculó utilizando una curva de calibración de quercetina de 0 - 150 ppm y los resultados se expresaron en equivalentes de

Quercetina (EQ) por extracto seco (E.S). La cuantificación de Flavonoides en los extractos se realizó en un espectro (UV/VIS), para lo cual se agregó 300 µL de nuestro extracto de una solución de 15 mg/mL de extracto seco al cual se le agregó 1.5 ml de agua desionizada, luego se adicionó 75 µL de nitrito de sodio al 5% dejando reposar por 6 min a temperatura ambiente, en seguida se adiciono 150 µL de tricloruro de aluminio al 10%, posteriormente se adicionó 400 µL de hidróxido de sodio 1M. Finalmente se adicionó 2.5 mL de agua desionizada dejando reposar por 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 490 nm. Todas las muestras se realizaron por triplicado (Chaovanalikit y Wrolstad, 2004).

6.9.2 Betalaínas

Para la extracción de betalaínas se realizó una extracción acuosa a partir de 30 mg de material vegetal de *G. globosa* con 30 mL de agua durante 30 min a 400 rpm a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm/4°C/10 min. El pellet se re-extrajo con 1.5 mL de agua. El extracto acuoso se filtró y se purificó con cloroformo (3 x 1.5 mL) (Silva *et al.*, 2012).

La cuantificación de betalaínas de los extractos se realizó en un espectro (UV/VIS) de nuestro extracto de una solución de 15 mg/mL de extracto seco y se leyó la absorbancia a 536nm. La cantidad de betalaínas se expresó con base amarantina y se calculó usando la ecuación 3 (Silva *et al.*, 2012).

$$Acd = \frac{A_{536} \cdot PM \cdot V}{\varepsilon \cdot L \cdot P_s} \quad (3)$$

Donde, A_{536} : absorbancia obtenida del extracto, PM: peso molecular (726.6 g/mol), V: volumen de la solución del extracto, ε : coeficiente de absorción molar (5.66×10^4 L/cm mol), L: longitud de trayectoria de la celda y P_s : peso seco del extracto.

6.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico para el porcentaje de germinación, porcentaje de conversión, fuerza de deformación, cuantificación de fenoles y betalaínas se utilizó el programa Minitab 17 versión 1.0.0.1. El análisis de los datos fue por un diseño de dos factores con tres niveles, con un ANOVA de dos vías y se realizó una prueba de Tukey, $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos (Anexo 3).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Características de las cápsulas de alginato calcio y efecto de la matriz encapsulante en la formación de semillas sintéticas.

Un sistema de micropropagación exitoso a través de la encapsulación se basa en una evaluación significativa de los factores que afectan la matriz del gel, el NaAl (alginato de sodio) y CaCl₂ (cloruro de calcio) juegan un papel importante en la complejacion y calidad de la capsula independientemente de la composición de los medios. La encapsulación de los segmentos nodales se vio afectada por la concentración de NaAl y CaCl₂. Las cápsulas de alginato de calcio con segmentos nodales atrapados difirieron morfológicamente con respecto a la textura, forma, transparencia, diámetro y fuerza de deformación con diferentes concentraciones de NaAl y CaCl₂, así como en el diámetro y peso (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de los niveles del agente de encapsulación (alginato de sodio) y de la matriz (CaCl₂) en la encapsulación de segmentos nodales *in vitro* de *G. globosa* L.

Cloruro de calcio (mM)	Alginato de sodio (%)	Forma	Diámetro (mm)	Peso (g)	Fuerza de deformación (N)
50	2	Desordenada sin forma definida	5.1 ± 0.00 ^f	6.2 ± 0.03 ^h	291.35 ± 0.23 ^f
	3	Frágil con cola puntiaguda	5.6 ± 0.26 ^e	6.4 ± 0.01 ^g	296.13 ± 0.22 ^d
	4	Esférica	6 ± 0.05 ^d	6.9 ± 0.03 ^d	299.02 ± 0.54 ^b
75	2	Frágil con cola formada	5.4 ± 0.05 ^e	6.3 ± 0.03 ^g	297.44 ± 0.28 ^c
	3	Frágil con cola formada	6 ± 0.02 ^d	6.6 ± 0.02 ^e	298.15 ± 0.34 ^c
	4	Esférica	6.3 ± 0.06 ^c	7.1 ± 0.01 ^b	300.18 ± 0.19 ^a
100	2	Esférica con cola puntiaguda	6.0 ± 0.00 ^d	6.4 ± 0.01 ^f	294.80 ± 0.32 ^f
	3	Esférica	6.9 ± 0.04 ^b	7 ± 0.01 ^c	297.16 ± 0.45 ^d
	4	Esférica	7.2 ± 0.06 ^a	7.5 ± 0.04 ^a	300.72 ± 0.17 ^a

Tukey p < 0.05 (n=3). Las letras representan la agrupación obtenida por Tukey, siendo la letra "a" el tratamiento con mayor efecto y la desviación estándar.

Se encontró que las cápsulas formadas en presencia de NaAl al 2% y CaCl₂ 50 mM fueron las más frágiles, debido a que se formaron sin una forma definida demasiado blandas para ser manipuladas presentando un peso, transparencia y diámetro inferior a los demás tratamientos, estas cápsulas fueron de las más complicadas en formar debido a que la solución de NaAl presentaba una viscosidad muy baja parecida a la del agua fluyendo con gran facilidad a través del molde.

Por otro lado, la combinación más adecuada para la producción de semillas sintéticas fue NaAl 4% y CaCl₂ 50 mM las cuales presentaron una forma esférica de tamaño uniforme lo cual facilitó su manipulación. Mientras que las cápsulas formadas con NaAl al 3% independiente de la concentración de CaCl₂ presentaron una forma semiesférica con un peso, diámetro y transparencia intermedios.

Finalmente, las cápsulas formadas con NaAl al 4% y CaCl₂ 100 mM fueron las más duras debido a que presentaban un tamaño, diámetro, peso y forma esférica superior a las demás como se muestra en la Figura 7, aunque estas eran las más difíciles de formar debido a que la solución de alginato fue demasiado viscosa para fluir a través del molde.

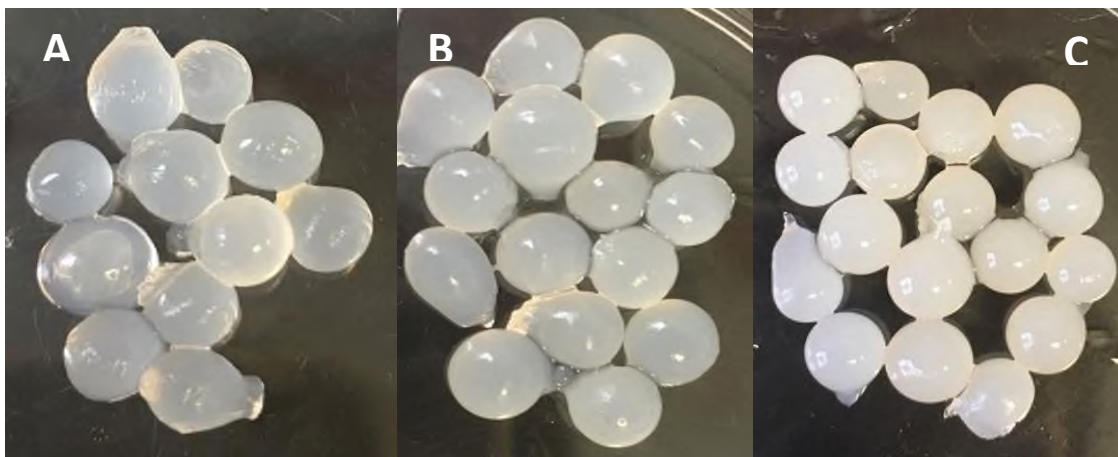


Figura 7. Cápsulas de Alginato de calcio. Con CaCl₂ a 100mM A) Cápsulas de alginato al 2%, B) Cápsulas de alginato al 3%, C) Cápsulas de alginato al 4%.

El diámetro y peso de las cápsulas está dado por un conjunto de parámetros en donde el más decisivo es la viscosidad del homogeneizado, el cual a su vez está determinado por el porcentaje de alginato. Shah y Ravula (2000), determinaron el efecto de la concentración del alginato en el tamaño de las cápsulas, señalando que a medida que se incrementa el porcentaje de alginato, incrementa la viscosidad y se obtienen cápsulas de mayor tamaño.

Por otro lado, se encontró una relación directa entre la concentración de los agentes encapsulantes y la fuerza de deformación. En todos los tratamientos a medida que aumento la concentración de NaAl y CaCl₂ se requirió de una mayor fuerza para poder deformarlas siendo los tratamientos T6 (NaAl 4% y CaCl₂ 75 mM) y T9 (NaAl 4% y CaCl₂ 100 Mm) los que presentaron una mayor resistencia a la deformación presentando una fuerza máxima de deformación de 300N, los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Neubauer *et al.* (2014) quien de igual forma midió la fuerza de deformación en cápsulas de NaAl obtenido fuerzas de deformación de 300N. Las fuerzas requeridas para deformar las semillas sintéticas demuestran la capacidad de las mismas para ser manipuladas mecánicamente al igual que una semilla convencional.

El análisis de las propiedades mecánicas (fuerza de compresión o elasticidad) en sistemas de microencapsulación representan un aspecto importante para garantizar la estabilidad de una microcápsula, con la posibilidad de su aplicación en sistemas biológicos y artificiales. Estas deben proporcionar la suficiente rigidez y artificiales. Estas deben proporcionar la suficiente rigidez y consistencia para evitar la ruptura de la pared debido al desgaste o manipulación. En el caso de las microcápsulas artificiales, la ruptura de la pared puede por el contrario servir como una vía de liberación rápida y eficiente y podría ser deseado para ciertas aplicaciones específicas.

7.3 Efecto de las diferentes concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio sobre el porcentaje de germinación y conversión.

Los segmentos nodales derivados de plántulas micropropagadas *in vitro* se encapsularon para obtener semillas sintéticas. Se observó las etapas de desarrollo de las semillas sintéticas del tratamiento 3 (NaAl 4% y CaCl₂ 50mM) desde la formación de las cápsulas de alginato de calcio hasta la obtención de plántulas (Fig. 8).

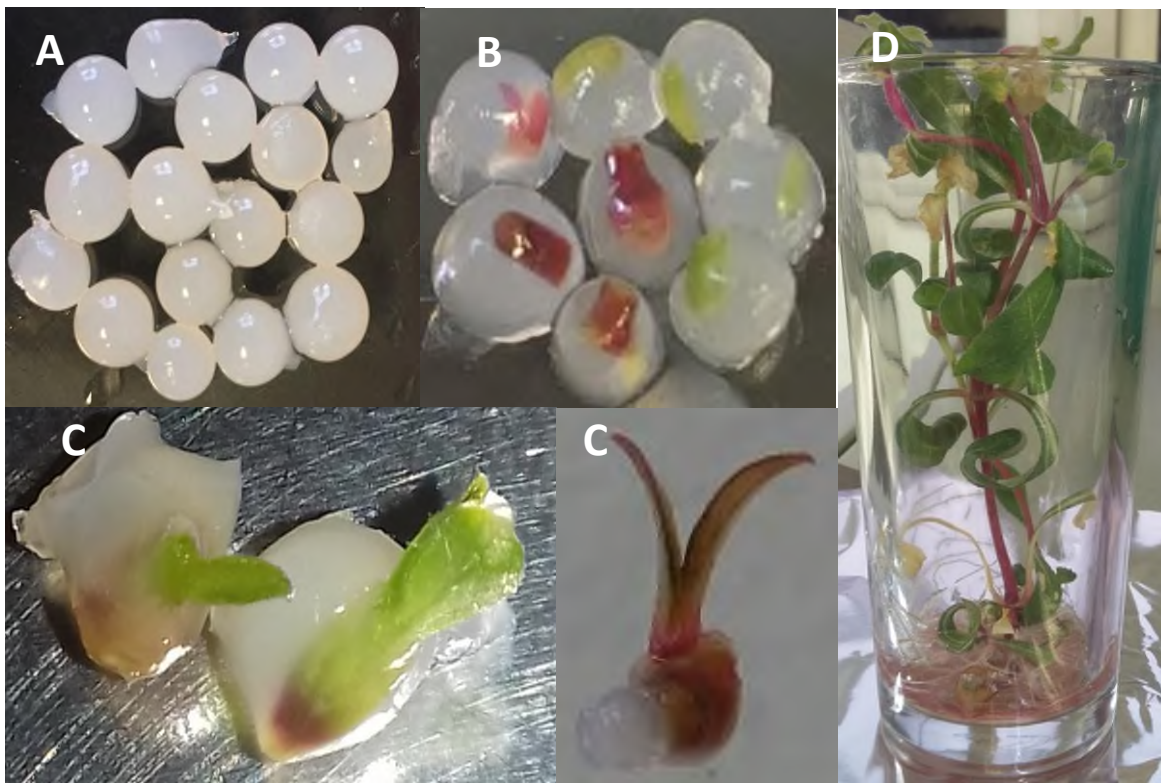


Figura 8. Etapas de desarrollo de las semillas sintéticas de *G. globosa*. (A). cápsulas de alginato de calcio (B). Semillas sintéticas de alginato de calcio (C). Semillas sintéticas germinadas (D). Plántulas obtenidas a partir de semillas sintéticas.

Se encontró una relación directa entre el porcentaje de germinación y la concentración de las soluciones de encapsulación. En la tabla 9 se muestra el porcentaje de germinación (Pg) y porcentaje de conversión (Pc) para cada tratamiento, así como los tiempos que tardaron en germinar las semillas sintéticas hasta convertirse en plantas, observando que a una concentración de NaAl al 4%

en combinación con CaCl₂ a 50 mM fue el tratamiento más adecuado para la formación de perlas de alginato ideales debido a que estas presentaron el mayor porcentaje de germinación y conversión.

Tabla 9. Respuesta de los agentes encapsulantes sobre el Pg y Pc

Tratamientos	Pg (%)	Tg (días)	Pc (%)	Tc (días)
Control	92 ^a	2	94 ^a	6
Tratamiento 1	64 ± 0.038 ^{bcd}	3	65.6 ± 0.37 ^c	8
Tratamiento 2	84 ± 0.41 ^{abc}	4	83.3 ± 0.37 ^{ab}	10
Tratamiento 3	90 ± 0.22 ^a	5	91.1 ± 0.31 ^a	10
Tratamiento 4	64 ± 0.24 ^{bcd}	5	78.1 ± 0.22 ^{bc}	11
Tratamiento 5	68 ± 0.22 ^{abcd}	6	79.4 ± 0.3 ^{bc}	11
Tratamiento 6	88 ± 0.16 ^{ab}	8	84.0 ± 0.15 ^{ab}	12
Tratamiento 7	64 ± 0.24 ^{bcd}	7	87.5 ± 0.24 ^{bc}	12
Tratamiento 8	62 ± 0.23 ^{cd}	9	90.3 ± 0.24 ^{bc}	14
Tratamiento 9	56 ± 0.2 ^d	12	78.5 ± 0.2 ^c	16

Tukey p < 0.05 (n=3). Las letras representan la agrupación obtenida por Tukey, siendo la letra "a" el tratamiento con mayor efecto y la desviación estándar. Tg tiempo de germinación, Pg porcentaje de germinación, Tc tiempo de conversión, Pc porcentaje de conversión.

Los tratamientos con las concentraciones más bajas de NaAl fueron los más rápidos en germinar en un tiempo de 4 a 6 días y dieron como resultado perlas sin una forma definida y eran demasiado suaves para su manipulación, a lo que se le puede atribuir que las cápsulas no se adhirieron correctamente a la superficie de los segmentos nodales debido a que estos tratamientos presentaron un Pg del 64%, mientras que los tratamientos a una concentración del 3% de NaAl presentaron un descenso en la germinación conforme se aumentaba la concentración de CaCl₂, esto se le puede atribuir a un mayor endurecimiento de la capsula, lo cual facilitó la germinación a una concentración de CaCl₂ baja e inhibió la germinación a altas concentraciones. Por otro lado, las concentraciones más altas de NaAl dieron como resultado los porcentajes de germinación más altos a excepción del tratamiento 9, lo cual se le puede atribuir a la concentración de CaCl₂ donde se puede apreciar que conforme aumenta la concentración disminuye el porcentaje de germinación hasta obtener una matriz lo suficientemente dura en el tratamiento 9 como para disminuir el Pg y causar un retraso considerable en el tiempo de germinación.

La razón de estos resultados se le puede atribuir a la protección proporcionada por las cápsulas, así como la presencia de nutrientes en la matriz del gel, que aparentemente sirvió como cama de nutrientes alrededor de los propágulos, lo cual facilitó su supervivencia y crecimiento y se le permitió germinar.

Se encontró que el material de encapsulación y su consistencia influyen sobre el tiempo de germinación y la conservación de las semillas sintéticas, como lo indican Barbotin *et al.*, (1993), quienes han demostrado que la dureza de la cápsula puede variar con la concentración de alginato y la concentración de la solución de CaCl_2 , influyendo de manera importante sobre la germinación. Así, cuando la consistencia de la cápsula es blanda, se facilita la germinación temprana de las semillas sintéticas, sin embargo, cuando se eleva la concentración de alginato se retarda el tiempo de germinación. De acuerdo a nuestros resultados, cuando el porcentaje de NaAl se eleva al 4 %, también aumenta el tiempo de germinación y nos proporciona un mayor porcentaje de germinación y conversión.

Onishi *et al.*, (1994), sugirieron la utilización de NaAl como material de encapsulación, trabajando con embriones somáticos encapsulados de apio y zanahoria. Ellos encontraron que el NaAl es un hidrogel seleccionado como componente de la matriz de encapsulación de semillas sintéticas, debido a sus características, como viscosidad moderada, baja toxicidad y rápida gelificación, esta última muy importante cuando se utiliza el método de endurecimiento por goteo.

A las plántulas obtenidas a partir de semillas sintéticas se le midieron los mismos parámetros fisiológicos que a las plántulas obtenidas en un cultivo *in vitro* convencional (Tabla 10).

Tabla 10. Características morfológicas de plántulas de *G globosa* L obtenidas a partir de semillas sintéticas vs micropropagadas *in vitro*

Parámetros	Semillas sintéticas	Plántulas <i>in vitro</i>
Altura (cm)	16.8 ± 0.95 ^a	16.4 ± 0.77 ^a
Tamaño de hoja (cm)	3.0 ± 0.27 ^a	2.7 ± 0.32 ^a
Tamaño de tallo (cm)	14 ± 0.63 ^a	13.8 ± 0.52 ^a
Tamaño de raíz (cm)	40 ± 1.46 ^a	36.4 ± 1.31 ^a
Grosor de tallo (mm)	2.38 ± 0.17 ^a	2.34 ± 0.15 ^a
No de brotes por explante	2.4 ± 0.21 ^a	2.2 ± 0.33 ^a

Tukey $p < 0.05$ (n=5). Las letras representan la agrupación obtenida por Tukey, siendo la letra “a” el tratamiento con mayor efecto y la desviación estándar.

Realizando la comparación entre las plántulas se obtuvo un mayor desarrollo de las raíces de las plántulas obtenidas mediante semillas sintéticas, en cuanto a los demás parámetros se obtuvieron los mismos resultados. Con respecto a la dinámica de crecimiento de ambas plantas, presentan los mismos sugiriendo que los sustratos poseen nutrientes suficientes que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plántulas al igual que las grandes reservas de nutrientes de las semillas sintéticas la cual tiene la capacidad de retención de humedad y brindarle al explante un gran aporte nutricional, lo cual le ofrece las mejores condiciones para su desarrollo. Estos resultados demuestran que con los sustratos evaluados se presentan una dinámica de crecimiento y desarrollo similar, lo cual les brinda un gran potencial a las semillas sintéticas para la obtención de plantas iguales a los del cultivo *in vitro* convencional lo cual es una gran ventaja debido a las diversas aplicaciones que esta herramienta posee.

7.4 Conservación de germoplasma a corto plazo

Una característica muy deseable del segmento nodal es su capacidad para retener la viabilidad en términos de brotación y potencial de conservación incluso después de un periodo considerable de almacenamiento, que es esencial para su uso en el intercambio de germoplasma o aplicación de campo, por ello en la presente

investigación se analizó la interacción entre el porcentaje de germinación, temperatura y tiempo de almacenamiento. El tratamiento 3 (NaAl 4%, CaCl₂ 50 Mm) el cual presento el mayor Pg se almacenó a una temperatura de 4 °C y 25 °C durante un periodo de almacenamiento de 30 días (Tabla 13). Durante el almacenamiento aséptico las semillas sintéticas se mantuvieron frescas y viables y no presentaron ninguna reducción de tamaño, sin embargo, no se observó germinación de las semillas sintéticas bajo estas condiciones de almacenamiento. Una vez transcurrido el periodo de dormancia se les reactivó el metabolismo adicionándoles agua y estas fueron sembradas en un nuevo medio de cultivo MS.

En el estudio presente la temperatura de almacenamiento fue un factor determinante sobre el porcentaje de germinación y conversión de las semillas sintéticas, las cuales mostraron un mayor porcentaje de germinación ($90.0 \pm 0.2 \%$) y conversión, ($91.0 \pm 0.1 \%$), a una temperatura de 25°C así como en el tiempo de desarrollo de las plantas en comparación con las semillas sintéticas almacenadas a 4°C (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el Pg y Pc

Tratamiento	Ta	Temperatura (°C)	Tg	Pg	Tc	Pc
T3	30	4	6.00 ± 0.31^a	86.00 ± 0.15^a	15.00 ± 0.34^a	95.00 ± 0.31^a
	30	25	5.00 ± 0.32^a	90.00 ± 0.20^a	13.00 ± 0.40^a	91.00 ± 0.1^a

Tukey $p < 0.05$ (n=10). Las letras representan la agrupación obtenida por Tukey, siendo la letra "a" el tratamiento con mayor efecto y la desviación estándar. Ta Tiempo de almacenamiento

En todos los trabajos a medida que se incrementa la temperatura y tiempo de almacenamiento los porcentajes de germinación y conversión disminuyen, un efecto similar se observó en este estudio en donde se logró retrasar el Pg y el tiempo de germinación por 1 día. De forma similar Singh *et al.*, (2010) reportan la encapsulación de segmentos nodales de *Eclipta alba* L., a diferentes tiempos de almacenamiento de 0, 15, 30 45 y 60 días obteniendo un 100% de germinación para

el día 0 y un 51.2 % después de 60 días de almacenamiento. La encapsulación de segmentos nodales en perlas de alginato es una técnica que se puede utilizar para el almacenamiento de germoplasma o para reducir la necesidad de transferir y su cultivar, por ello el almacenamiento en frío tiene el potencial para reducir el costo de mantenimiento de germoplasma debido a la menor necesidad de mano de obra o subcultivos menos frecuentes. Los resultados obtenidos demuestran una importante característica de los segmentos nodales encapsulados en perlas de alginato de calcio el cual es retener la viabilidad de las semillas sintéticas después del almacenamiento, lo que nos permite la conservación de germoplasma a corto plazo.

7.5 Aclimatización y establecimiento de semillas sintéticas en suelo

Las semillas sintéticas fueron transferidas a sustrato, las cuales después de 8 días de ser aclimatadas presentaron un Pg y Pc del 80% y durante este periodo se observó la aparición de la primera hoja. Posteriormente, se observó el desarrollo de las semillas sintéticas hasta plántulas durante un periodo de 30 días. En la Figura 9 se puede apreciar un buen desarrollo de las semillas sintéticas en plantas, las cuales presentaban un mayor brote de raíz y biomasa en comparación con las plántulas obtenidas en condiciones *in vitro*.

Los resultados de nuestra investigación coinciden con diversos estudios (Singh *et al.* 2009; Prasad *et al.*, 2014) sobre la regeneración de plantas a partir de semillas sintéticas bajo condiciones de sustrato en las que después de un periodo de almacenamiento a corto plazo se lleva a cabo un exitoso proceso de regeneración de las plántulas, en la mayoría de los estudios se reporta un Pg y Pc menores a los obtenidos de forma *ex vitro* debido al proceso de adaptación de las semillas sintéticas en condiciones *in vivo*. La tecnología de semillas sintéticas descrita en este trabajo proporciona un método alternativo de propagación de esta importante planta medicinal.

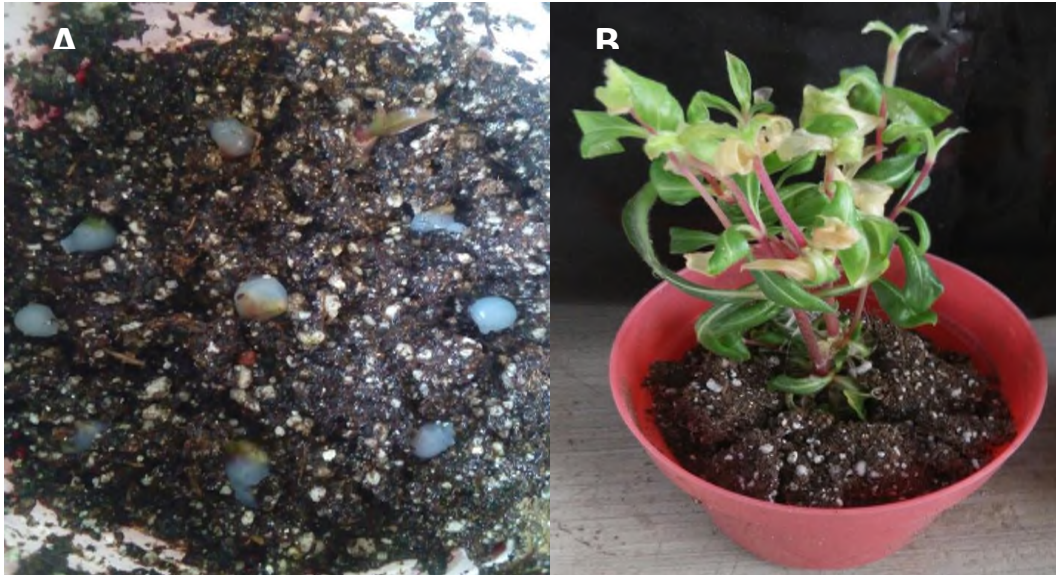


Figura 9. Desarrollo de semillas sintéticas bajo condiciones de sustrato. A) Semillas sintéticas de *G. globosa* transferidas a sustrato estéril B) Plantas de *G. globosa* L. de 3 semanas de edad.

7.6 Determinación del contenido de fenoles totales, flavonoides y betalainas

En la Tabla 12, se muestran las cuantificaciones de fenoles, flavonoides y betalainas de los extractos de raíz, tallo y hoja de las plántulas *in vitro* obtenidas mediante micropropagación y de semillas sintéticas. En los extractos de hojas, se observó mayor contenido de fenoles totales (30.24 ± 0.27 mg EAG/g E.S) y flavonoides (1.00 ± 0.02 mg EQ/g E.S) en plántulas obtenidas a partir de semillas sintéticas en comparación a las plántulas *in vitro*. Mientras que el mayor contenido de betalainas (8.83 ± 0.02 mg EA/g E.S) fue encontrado en tallos de las plántulas de las semillas sintéticas. Por otro lado, los valores obtenidos en este trabajo son mayores a los reportados por Aguilar (2018) quien obtuvo 21.92 mg EA/g E.S y 0.072 mg EQ/g E.S de fenoles y flavonoides, respectivamente en extractos acuosos de parte aérea de plantas silvestres de *G. globosa*.

Los resultados obtenidos muestran una mayor producción de metabolitos secundarios en las plántulas obtenidas mediante semillas sintéticas en comparación al cultivo *in vitro* convencional de *G. globosa* L. Por otro lado, Prasad *et al.* (2014) encontraron uniformidad cuantitativa y cualitativa en la producción de compuestos

bioactivos en extractos de hojas de *Centella asiática* de plántulas obtenidas mediante semillas sintéticas en comparación a la planta madre en la producción de compuestos bioactivos. Estos resultados demuestran que las semillas sintéticas no presentan un impacto negativo en la estabilidad morfológica y química de la planta en términos de contenido de sustancias bioactivas, lo cual les brinda un gran potencial como una tecnología innovadora para un suministro estable de compuestos bioactivos.

Tabla 12. Contenido de Fenoles, Flavonoides y Betalaínas de los extractos de raíz, tallo y hoja de plántulas de *G. globosa* L.

Extracto	Fenoles totales (mg EAG/g E.S)		Flavonoides (mg EQ/g E.S)		Betalaínas (mg EA/g E.S)	
	Plantas <i>in vitro</i>	Plantas de semillas sintéticas	Plantas <i>in vitro</i>	Plantas de semillas sintéticas	Plantas <i>in vitro</i>	Plantas de semillas sintéticas
Raíz	6.18 ± 0.22 ^b	8.29 ± 0.24 ^a	0.14 ± 0.05 ^a	0.17 ± 0.03 ^a	4.21 ± 0.09 ^a	4.86 ± 0.07 ^a
Tallo	11.97 ± 0.20 ^b	16.34 ± 0.21 ^a	0.31 ± 0.03 ^b	0.61 ± 0.04 ^a	7.61 ± 0.02 ^b	8.83 ± 0.02 ^a
Hoja	17.28 ± 0.34 ^b	30.24 ± 0.27 ^a	0.63 ± 0.04 ^b	1.00 ± 0.02 ^a	4.31 ± 0.01 ^a	4.78 ± 0.04 ^a

Tukey $p < 0.05$ (n=3). Las letras representan la agrupación obtenida por Tukey, siendo la letra "a" el tratamiento con mayor efecto y la desviación estándar.

8. CONCLUSIÓN

Se logró establecer un sistema de micropropagación para *G. globosa* L. bajo condiciones *in vitro* encapsulando segmentos nodales en una matriz de alginato de calcio para la obtención de semilla sintética de *G. globosa* L.

En este trabajo se encontró que, mediante la variación en las concentraciones de NaAl en complejo con CaCl₂, es posible la conservación de germoplasma a corto plazo manteniendo su viabilidad.

Las semillas sintéticas presentaron una alta resistencia a la deformación, lo cual permite su manipulación al igual que una semilla convencional.

Las plántulas obtenidas mediante semillas sintéticas presentaron características morfológicas similares a las plántulas micropropagadas *in vitro*. Sin embargo, mostraron mayor acumulación de metabolitos secundarios que las plántulas micropropagadas *in vitro*.

Se logró establecer un sistema de micropropagación para *G. globosa* L. a base de semillas sintética en condiciones *ex vitro*.

9. REFERENCIAS

1. **Aguilar** Ramírez, J.J. (2018). Actividad Citotóxica y Antioxidante de Plantas Utilizadas en la Medicina Tradicional para el Tratamiento de Cáncer en Oaxaca. Licenciatura. Universidad del Papaloapan, 106 p.
2. **Aravamudhan**, A., Ramos, D., Nada, A. y Kumbar, S. (2014). Natural Polymers. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, pp.67-89.
3. **Barbotin** JN., Nava Saucedo EJ., Bazinet C., Kersulec A., Thomasset B y Thomas D. (1993). Immobilization of whole cells and somatic embryos: coating process and cell-matrix interactions. *Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*. Redenbaugh. pp. 65-95
4. **Cai**, Y. Z., Sun, M., y Corke, H. (2005). Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science and Technology*, 16(9), pp. 370–376.
5. **Chang**, C., Kuo, C., Chang, J., y Kuo, Y. (2004). Three New Oleanane-Type Triterpenes from *Ludwigia octovalvis* with Cytotoxic Activity against Two Human Cancer Cell Lines. *Journal of Natural Products*, 67(1), pp. 91-93.
6. **Chaovanalikit**, A., y Wrolstad, R. (2004). Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Food Chemistry and Toxicology*, 69, pp. 67–72
7. **Cheng**, S., Wang, C., Cheng, H., Chen, H., Hsu, Y., Lin, Y., y Chou, C. (2013). Biological Activity of Oleanane Triterpene Derivatives *Chemical Derivatization*. *Molecules*, 18(10), pp. 13003-13019.
8. **Dias** Rufino Arcanjo, D., Virgínia de Oliveira Sena, I., y Carvalho Medeiros de Albuquerque, A. (2011). Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic,

antimicrobial and cardiovascular effects of *Gomphrena globosa* L. (Amaranthaceae). *Journal of Medicinal Plants*, 5(10), pp. 2006-2010.

9. **Flores** Castaños, O. (2010). Determinación de iones Ca^{++} mediante el método de espectroscopía de absorción atómica (EAA) en cápsulas de alginato. Maestría. Universidad veracruzana, pp. 20-35.
10. **Gantait**, S., Kundu, S., Ali, N., y Sahu, N. (2015). Synthetic seed production of medicinal plants: a review on influence of explants, encapsulation agent and matrix. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(5), pp. 2-10.
11. **Gombotz**, W., y Wee, S. (2012). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, pp. 194-205.
12. **H. M. Mahbubur Rahman**, A., y Iffat Ara Gulshana, M. (2014). Taxonomy and Medicinal Uses on Amaranthaceae Family of Rajshahi, Bangladesh. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 2(2), pp. 54-59.
13. Humberto Garcia-Cruz, C., Foggetti, U. y Navarro da Silva, A. (2008). Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção. *Cristóvão Colombo*, 31(7), pp.1801-1805.
14. **Ilyas**, M., Tarnam, A., y Begum, N. (2013). Biological potential and phytopharmacological screening of *Gomphrena* species. *Global Journal of Pharmacology*, 7(4), pp. 457–464.
15. **Iram** Ghaffar, Basharat Ali, y Shahida Hasnain. (2007). Effect of Different Hormonal Combinations on Regeneration of Callus of *Gomphrena globosa* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(20), pp. 3708-3712.

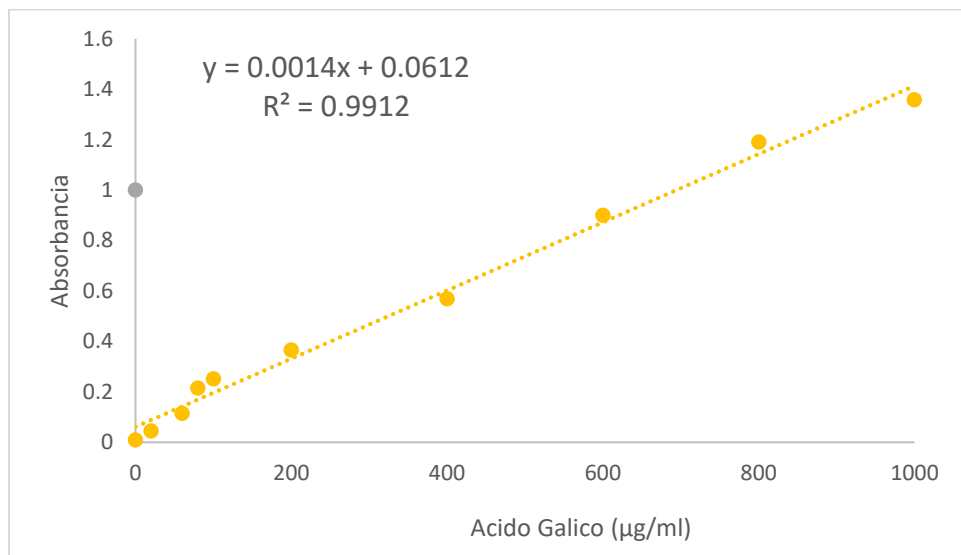
16. **Jain, S.** and Nakhooda, M. (2017). Clonal and Micropropagation. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, pp.428-432.
17. **Kugler, F.,** Stintzing, F., y Carle, R. (2006). Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC–DAD–ESI–MS n. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(2), pp. 637-648.
18. **Kusmiati, K.,** Priadi, D., y Rahayu, R. (2017). Antibacterial Activity Test, Evaluation of Pharmacognosy and Phytochemical Screening of Some Extracts of Globe Amaranth (*Gomphrena globosa*). *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research*, 6(1), pp. 27-33.
19. **Latha, L.,** y Rajendran, N. (2013). Apoptosis Effect Ofisolated Phenolic Secoiridoid Glucoside from Aerial Parts of *Gomphrena Globosa* in A-431 Cell Lines. *Word Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 2(5), pp. 3829-3839.
20. **Manzanilla, M.** (2004). Inducción de embriogénesis somatica de tejido nuclear de *Mangifera indica*. Maestria. Universidad de Colima, febrero de 2014, pp 42-117.
21. **Méndez Sánchez, L.I,** Sanchez-Ocampo, P.M (2016). Germinación *in vitro* de *Gomphrena globosa* en dos medios basales de *cultivo*. 1° Encuentro de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería Delegación Oaxaca. 7-8 Julio 2016, Tuxtepec, Oaxaca, México, pp. 1-4
22. **Méndez Sánchez, L.** (2017). Producción de betalaínas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de *Gomphrena globosa* L. Maestria. Universidad del Papaloapan, pp 1-90.

23. **Minale, L.** (1967). Pigments of centrospermae VII. Betacyanins from *Gomphrena globosa* L. *Phytochemistry*, 6(5), pp. 703-709.
24. **Onishi, N., Sakamoto, Y. and Hirose, T.** (1994). Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39(2), pp.137-145.
25. **Oñate-Sánchez, L., Barrero Sicilia, C., Rueda Romero, P., Vicente Carbajosa, J., y Carbonero Zalduegui, P.** (2008). El gen DOFG4 de *Arabidopsis* participa en la regulación de la germinación de la semilla mediada por ABA. En: XI simposio sobre Metabolismo y modo de acción de fitohormonas, pp. 2-55.
26. **Pinterest.** (2018). *Science* [online] Available at: <https://www.pinterest.com.mx/mccoy87/science/?!p=true> [Accessed 19 Apr. 2018].
27. **Prasad, A., Singh, M., Yadav, N., Mathur, A. y Mathur, A.** (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, pp.205-211.
28. **Roriz, C., Barros, L., Carvalho, A., Santos-Buelga, C., y Ferreira, I.** (2015). Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialised mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation. *Food Chemistry*, 185, pp. 16-24.
29. **Ruiz, A., y Valadez, J.** (1985). Effects of Different Growth Factors on *Gomphrena globosa* Callus Tissue. *Journal of Natural Products*, 48(6), pp. 976-980.

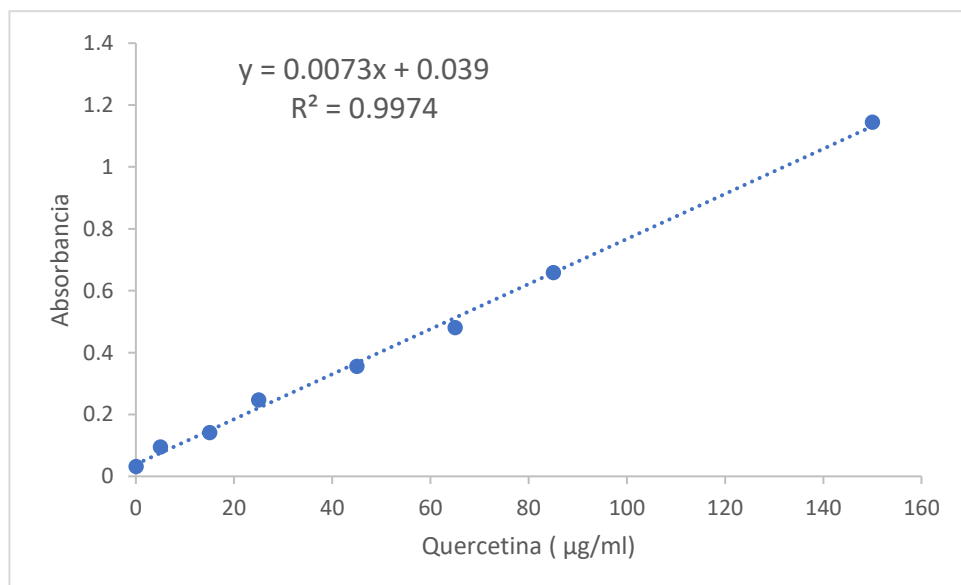
30. **Salvador** MJ, Andrezza NL, Pascoal ACRF, Pereira PS, França SC. (2012). Bioactive Chemical Constituents and Biotechnological Production of Secondary Metabolites in Amaranthaceae Plants, *Gomphreneae* Tribe. Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites, pp. 124-158.
31. **Shah**, n., a y Ravula, R. (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy dessert. *The Australian journal of Dairy Technology*. 55 (3), pp. 139-144.
32. **Silva**, L., Valentão, P., Faria, J., Ferreres, F., Sousa, C., y Gil-Izquierdo, A. (2012). Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. *Food Chemistry*, 135(2), pp. 756-763.
33. **Singleton**, V., Orthofer, R., and Lamuela-Raventós, R. (1974). Analysis of total Phenols and other oxidation substrates and Antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. 14. Polyphenols and flavonoids. *Methods in Enzymology*, 299, pp. 152-178
34. **Singh**, S., Rai, M., Asthana, P. and Sahoo, L. (2010). Alginate-encapsulation of nodal segments for propagation, short-term conservation and germplasm exchange and distribution of *Eclipta alba* (L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(3), pp. 607-610.
35. **Zhiwutong.com**. (2018). *Gomphrena globosa* Linn. [online] Available at: http://www.zhiwutong.com/dan_tu/9/7878.htm [Accessed 19 Apr. 2018].

10. ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración de Acido Gálico para Fenoles totales



Anexo 2. Curva de calibración de Quercetina para Flavonoides



Anexo 3. Análisis de varianza para el diámetro de las semillas sintéticas.

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
NaAl	2	15.7457	15.7457	7.8728	349.00	0.000
CaCl2	2	18.0111	18.0111	9.0055	399.21	0.000
NaAl*CaCl2	4	0.2913	0.2913	0.0728	3.23	0.017
Error	72	1.6242	1.6242	0.0226		
Total	80	35.6723				

Análisis de medias para el diámetro de las semillas sintéticas.

NaAl	CaCl2	N	Media	Agrupación
4	100	9	7.207	A
3	100	9	6.920	B
4	75	9	6.373	C
4	50	9	6.093	D
3	75	9	6.043	D
2	100	9	6.030	D
3	50	9	5.623	E
2	75	9	5.400	E
2	50	9	5.057	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 4. Análisis de varianza para el peso de las semillas sintéticas.

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
NaAl	2	10.1449	10.1449	5.0724	2579.20	0.000
CaCl2	2	3.2373	3.2373	1.6186	823.03	0.000
NaAl*CaCl2	4	0.4851	0.4851	0.1213	61.66	0.000
Error	72	0.1416	0.1416	0.0020		
Total	80	14.0088				

Análisis de medias para el peso de las semillas sintéticas.

NaAl	CaCl2	N	Media	Agrupación
4	100	9	7.523	A
4	75	9	7.190	B
3	100	9	7.053	C
4	50	9	6.947	D
3	75	9	6.603	E
2	100	9	6.477	F
3	50	9	6.410	F G
2	75	9	6.367	G
2	50	9	6.240	H

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 5. Análisis de varianza para la fuerza de deformación de las semillas sintéticas.

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
NaAl1	2	401.997	401.997	200.999	630.03	0.000
CaCl21	2	130.475	130.475	65.238	204.49	0.000
NaAl1*CaCl21	4	71.899	71.899	17.975	56.34	0.000
Error	72	22.970	22.970	0.319		
Total	80	627.341				

Análisis de medias para la fuerza de deformación de las semillas sintéticas.

NaAl1	CaCl21	N	Media	Agrupación
4	100	9	300.7	A
4	75	9	300.2	A
4	50	9	299.0	B
3	75	9	298.1	C
2	75	9	297.4	C
3	100	9	296.5	D
3	50	9	296.1	D
2	100	9	294.8	E
2	50	9	291.3	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 6. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación (Pg) de las semillas sintéticas.

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

ANOVA de dos factores: germinación vs. NaAl, CaCl₂

Fuente	GL	SC	MC	F	P
NaAl	2	7.3556	3.67778	4.95	0.009
CaCl ₂	2	13.6222	6.81111	9.16	0.000
Interacción	4	11.0444	2.76111	3.72	0.008
Error	81	60.2000	0.74321		
Total	89	92.2222			

Análisis de medias para el porcentaje de germinación de las semillas sintéticas.

NaAl	CaCl ₂	N	Media	Agrupación
4	50	10	4.500	A
4	75	10	4.400	A B
3	50	10	4.200	A B C
3	75	10	3.400	A B C D
2	100	10	3.200	B C D
2	75	10	3.200	B C D
2	50	10	3.200	B C D
3	100	10	3.100	C D
4	100	10	2.800	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 7. Análisis de varianza para el porcentaje de conversión (Pc) de las semillas sintéticas.

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
NaAl	2	11.4667	11.4667	5.7333	7.28	0.001
CaCl ₂	2	6.0667	6.0667	3.0333	3.85	0.025
NaAl*CaCl ₂	4	20.2667	20.2667	5.0667	6.43	0.000
Error	81	63.8000	63.8000	0.7877		
Total	89	101.6000				

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

NaAl	CaCl ₂	N	Media	Agrupación
4	50	10	4.100	A
4	75	10	3.700	A B
3	50	10	3.500	A B
3	100	10	2.800	B C
2	100	10	2.800	B C
3	75	10	2.700	B C
2	75	10	2.500	B C
4	100	10	2.200	C
2	50	10	2.100	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 8. Análisis de varianza para la medición de parámetros morfológicos de plántulas obtenidas mediante semillas sintéticas y cultivo *in vitro*.

Altura de la planta

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
x	1	0.40	0.40	0.08	0.779
Error	8	38.00	4.75		
Total	9	38.40			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Raíz	N	Media	Agrupación
1	5	16.800	A
0	5	4.3000	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tamaño de hoja

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
x	1	0.408	0.408	0.67	0.436
Error	8	4.858	0.607		
Total	9	5.266			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Raíz	N	Media	Agrupación
1	5	3.0460	A
0	5	2.6420	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tamaño de tallo

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
x	1	0.10	0.10	0.05	0.833
Error	8	16.80	2.10		
Total	9	16.90			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Raíz	N	Media	Agrupación
1	5	14.800	A
0	5	14.000	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tamaño de raíz

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
x	1	32.4	32.4	2.67	0.141
Error	8	97.2	12.2		
Total	9	129.6			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Raíz	N	Media	Agrupación
1	5	40.000	A
0	5	36.600	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Grosor de tallo

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
x	1	0.004	0.004	0.02	0.885
Error	8	1.440	0.180		
Total	9	1.444			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Raíz	N	Media	Agrupación
1	5	2.3800	A
0	5	2.3400	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Numero de brotes por cultivo

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
x	1	0.100	0.100	0.20	0.667
Error	8	4.000	0.500		
Total	9	4.100			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Raíz	N	Media	Agrupación
1	5	2.4000	A
0	5	2.2000	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 9. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación (Pg) de las semillas sintéticas después de la conservación de germoplasma a corto plazo.

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
temperatura	1	0.200	0.200	0.55	0.470
Error	18	6.600	0.367		
Total	19	6.800			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Raíz	N	Media	Agrupación
25	10	4.5000	A
4	10	4.3000	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 10. Análisis de varianza para el porcentaje de conversión (Pc) de las semillas sintéticas después de la conservación de germoplasma a corto plazo.

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
temperatura	1	0.000	0.000	0.00	1.000
Error	18	17.800	0.989		
Total	19	17.800			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Raíz	N	Media	Agrupación
25	10	4.1000	A
4	10	4.1000	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 11. Análisis de varianza para el contenido de fenoles las plántulas obtenidas *in vitro* vs semillas sintéticas

Raíz

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Raíz	1	6.6852	6.6852	127.26	0.000
Error	4	0.2101	0.0525		
Total	5	6.8953			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Raíz	N	Media	Agrupación
0	3	8.2921	A
15	3	6.1810	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tallo

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tallo	1	28.5809	28.5809	669.25	0.000
Error	4	0.1708	0.0427		
Total	5	28.7517			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Tallo	N	Media	Agrupación
0	3	16.3397	A
15	3	11.9746	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Hoja

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Hoja	1	252.2634	252.2634	2638.29	0.000
Error	4	0.3825	0.0956		
Total	5	252.6459			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Hoja	N	Media	Agrupación
0	3	30.244	A
15	3	17.276	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 12. Análisis de varianza para el contenido de flavonoides las plántulas obtenidas *in vitro* vs semillas sintéticas.

Raíz

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Raíz	1	0.378	0.378	0.93	0.389
Error	4	1.626	0.407		
Total	5	2.005			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Raíz	N	Media	Agrupación
15	3	2.6027	A
1	3	2.1005	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tallo

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tallo	1	0.14180	0.14180	132.48	0.000
Error	4	0.00428	0.00107		
Total	5	0.14608			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Tallo	N	Media	Agrupación
0	3	0.61492	A
15	3	0.30746	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Hoja

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Hoja	1	0.20016	0.20016	192.00	0.000
Error	4	0.00417	0.00104		
Total	5	0.20433			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Hoja	N	Media	Agrupación
0	3	0.99543	A
15	3	0.63014	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 13. Análisis de varianza para el contenido de betalaínas las plántulas obtenidas *in vitro* vs semillas sintéticas.

Raíz

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Raíz	1	0.639	0.639	5.51	0.079
Error	4	0.464	0.116		
Total	5	1.103			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Raíz	N	Media	Agrupación
15	3	4.8683	A
0	3	4.2156	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tallo

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tallo	1	2.2292	2.2292	141.06	0.000
Error	4	0.0632	0.0158		
Total	5	2.2924			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Tallo	N	Media	Agrupación
15	3	8.8376	A
0	3	7.6185	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Hoja

Tabla ANOVA y agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95%.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Hoja	1	0.3308	0.3308	6.83	0.059
Error	4	0.1938	0.0484		
Total	5	0.5246			

Análisis de medias para el porcentaje de conversión de las semillas sintéticas.

Hoja	N	Media	Agrupación
15	3	4.7834	A
0	3	4.3139	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.