



TÍTULO DE PATENTE No. 431079

Titular(es): SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA - TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Domicilio: Avenida Universidad, No. 1200, Int. 5° Piso, Col. Xoco, 03330, Alcaldía Benito Juárez, Ciudad de México, MÉXICO

Denominación: PROCESO PARA LA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA DE ESPECIES VEGETALES MEDIANTE EL SECADO POR ASPERSIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS HASTA OBTENER SU REACTIVACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS.

Clasificación: **CIP:** A01H4/00; A01H6/06; C12N5/04
CPC: A01H4/005; A01H4/006; A01H4/008; A01H6/068; C12N5/04; Y02A40/10

Inventor(es): JOSÉ ALFREDO SÁNTIZ GÓMEZ; JORGE IVÁN RAMÍREZ PÉREZ; FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI; MIGUEL ABUD ARCHILA

SOLICITUD

Número:
MX/a/2022/011223

Fecha de Presentación:
9 de septiembre de 2022

Hora:
10:45

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 9 de septiembre de 2042

Fecha de Expedición: 11 de diciembre de 2025

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1°, 2° fracción I, 5° fracción I, y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 53 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5 fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1°, 3° fracción V, inciso a) sub inciso ii), 4° y 12 fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1°, 3°, 4°, 5° fracción V, inciso a) sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1, 3 y 5 fracción I y antepenúltimo párrafo del Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autoría, se podrá comprobar en www.gob.mx/impi.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1° fracción III; 2° fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena original:

EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000712464370|SERVICIO DE ADMINISTRACION TRIBUTARIA|56||MX/2026/424|MX/a/2022/011223|Título de patente normal|1048|SEF|Pág(s) 1|bJvFuxNpoMbnT0I7zKVuuFWANes=

Sello Digital:

ICILyaqYPPOIGX26ODvPT5nOarLxAYZRsykmO2VRikHtt8aDVGWGGjIBCPIgcKYcJFp4HGaa3FYR8jjSQ5Cewyro G2KG1ly7WY4jUw9AviQ9xEtIlXsambtIveUI8skTzkFkzFjMXw89gPhdolejKpAdRE/5F/1SHkvLi38QWO+KGitLU Awo9Im0nGvN4SvRMhM3t3X67Diy8sVVL2JL02rjNtbCgmcEHKAbUD7gD/3F3dvvZGZBd2yPfrwQmlmuO8UuG0PRVg1 IVz+0fJS+rjGWikAnYKvEbghbghlywqCIMnO76wnkOoKqaGoGuMPo26NfEDuWveCbCZOjclw==



**PROCESO PARA LA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA DE ESPECIES VEGETALES
MEDIANTE EL SECADO POR ASPERSIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS HASTA OBTENER SU
REACTIVACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS**

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se desarrolla dentro del área técnica de la biotecnología, el cultivo de tejidos vegetales y la conservación de material vegetal, comprende un proceso para la encapsulación mediante secado por aspersión de células embriogénicas obtenidas a partir de cultivos callogénicos y células en suspensión hasta la obtención de plántulas de zanahoria. Dicho proceso implica la formulación de los
10 agentes encapsulantes y la configuración de los parámetros del secado por aspersión. Mediante el proceso descrito, se integran las operaciones para la rehidratación, reactivación y regeneración *in vitro* de plántulas a partir de las células secadas por aspersión. Esta invención enriquece los procesos de conservación de material o germoplasma vegetal existentes hasta el momento ya que las células procesadas y almacenadas conservan la capacidad de regenerar una planta completa.

15

OBJETO DE LA INVENCION

La conservación de germoplasma representa una alternativa en el rescate de especies en peligro de extinción o amenazadas, en el almacenamiento de especies de interés agroindustrial y el intercambio de material vegetal. Los principales métodos de conservación de germoplasma son la crioconservación y la
20 liofilización, estos métodos requieren condiciones específicas como la congelación del material vegetal y el uso de sustancias protectoras en ambos procesos, sin embargo, la crioconservación requiere de condiciones de almacenamiento a temperaturas bajo cero empleando nitrógeno líquido, lo que implica el uso obligatorio de un cuarto frío o de refrigeración. Estos métodos tradicionales implican costos tanto en reactivos, mantenimiento, conservación e infraestructura, lo que los hace poco asequibles a diferentes
25 regiones del planeta. Por ello, el secado por aspersión representa una alternativa en la conservación de germoplasma vegetal ya que se pueden emplear diferentes equipos a nivel laboratorio, a nivel de planta piloto o a nivel industrial, además, es posible adaptar las condiciones de operación como la temperatura de entrada y salida del secador, las concentraciones de agentes encapsulantes y el uso de reguladores

de crecimiento y otros aditivos de acuerdo a la especie vegetal a conservar. Del mismo modo, los productos del secado por aspersión pueden conservarse al vacío a temperatura ambiente pero cuando se conservan en refrigeración la viabilidad incrementa, es decir, la vida de anaquel se prolonga, reduciendo los costos de la crioconservación y liofilización y aumentando el número de parámetros empleados en el proceso y en la conservación de germoplasma vegetal.

ANTECEDENTES

El secado por pulverización, también conocido como secado por aspersión, es una operación unitaria mediante la cual un producto líquido conteniendo sólidos se atomiza en una corriente de gas caliente para obtener un polvo al instante. El polvo obtenido puede ser denominado partículas, cápsulas o microcápsulas. En este proceso, las partículas se forman al mismo tiempo que se secan (Barbosa Canovas, et al. (2005). Food Powders: Physical properties, Processing and Functionality. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers). Las enzimas deshidratadas, los detergentes, los extractos de plantas y las proteínas solubles son ejemplos de productos producidos mediante secado por aspersión (Peighambardoust et al., 2011) Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review. Trends Food Sci Tech 22(5):215-224). Así mismo, el secado por aspersión también se ha utilizado con frecuencia para preservar bacterias ácido lácticas (Peralta et al., 2017) Spray-dried adjunct cultures of autochthonous non-starter lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol 255:17–24). La pérdida de agua durante el secado por aspersión en la célula disminuye su actividad de agua, el metabolismo de las células se retrasa y, finalmente, entran en un estado de latencia. Peralta et al. (2017) demostraron que el secado por aspersión no afecta la actividad metabólica de los microorganismos evaluados. Las levaduras también han sido secadas mediante secado por aspersión. Aponte et al. (2016, Impact of different spray-drying conditions on the viability of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. World J Microb Biot 32:13) evaluaron la viabilidad de varias especies de levadura después del secado por aspersión y durante el almacenamiento encontrando que la levadura era viable después del secado y que el rendimiento de fermentación de la levadura encapsulada fue estadísticamente igual en comparación con los cultivos frescos, por lo que se concluye que el secado no afectó el metabolismo de la levadura.

Los estudios sobre el uso del secado por aspersión para la preservación de microorganismos han demostrado que son muchos los factores que influyen en la supervivencia microbiana. Santivarangkna et al. (2008, Santivarangkna, Kulozik U, Foerst P (2008) Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. J Appl Microbiol 105(1):1–13) demostraron que la temperatura del aire de salida influye en la supervivencia microbiana. En células eucariotas, como *Beauveria bassiana* (Liu y Liu (2009) Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA12. J Microencapsul 26(5):377–384), *Saccharomyces cerevisiae* (Aponte et al. 2016) y *Saccharomyces boulardii* (Duongthingoc et al. (2013) Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. Food Chem 141(3):1782–1788), las temperaturas más bajas del aire de entrada y salida utilizadas durante el secado por aspersión promueven mejores resultados. Otros autores informaron que la composición del material utilizado para la encapsulación es muy importante para aumentar la supervivencia microbiana durante el almacenamiento (Jafari et al. (2008) Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. Dry Technol 26(7):816–835). Estos materiales se pueden usar solos o como mezcla, pero se han reportado mezclas complejas de varios materiales como maltodextrinas, gomas, leche descremada, proteína y leche de soya, suero lácteo, entre muchos otros. La interacción entre los agentes encapsulantes y la pared celular (Eckert et al. (2017) Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials. LWT - Food Sci Technol 82:176-183), es principalmente por interacciones por puente de hidrógeno.

En relación con la preservación de células vegetales, la criopreservación se utiliza en la conservación de germoplasma vegetal, sin embargo, es un proceso con alto consumo energético por lo que puede resultar muy costoso, además de que los productos deben de conservarse a muy bajas temperaturas de almacenamiento (-80°C). Por otro lado, el encapsulamiento químico en perlas de alginato para la producción de semillas sintéticas representa un método de propagación vegetal y de conservación de germoplasma y es uno los métodos comúnmente utilizados, sin embargo, dada las características del producto obtenido, se pierde la viabilidad celular en uno o dos meses en almacenamiento. Por lo que, esta invención resuelve el problema del mantenimiento de la viabilidad celular vegetal en el almacenamiento a partir de células encapsuladas y almacenadas al vacío.

Esta invención presenta un proceso no existente en el estado de la técnica, que permite obtener células vegetales microencapsuladas de zanahoria que conservan su viabilidad, así como el proceso para la hidratación, reactivación y rediferenciación del cultivo *in vitro* hasta el desarrollo de plántulas de zanahoria.

5

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura. 1. Se muestra el proceso general para la obtención de microcápsulas conteniendo células de zanahoria para conservar germoplasma.

Figura. 2. Se muestra el diagrama de flujo del proceso para la obtención de plántulas a partir de células microencapsuladas rehidratadas.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención consiste en un proceso para microencapsular y conservar células de zanahoria que mantengan la capacidad de regenerar una plántula completa después del proceso de microencapsulación y durante el almacenamiento.

15

En la figura 1 se muestra el proceso general para la obtención de microcápsulas conteniendo células para la conservación del germoplasma. La materia prima principal son células embriogénicas en suspensión que se obtienen a partir de callos embriogénicos y friables de zanahoria. Los callos provienen de explantes de hoja, tallo o raíz de plántulas de zanahoria obtenidas a nivel *in vitro* después de la desinfección y germinación de semillas.

20

Esta invención consiste en la formulación de agentes encapsulantes como maltodextrina y goma arábica que no se han empleado en células de zanahoria y la configuración de los parámetros de operación del secado por aspersión a 120°C de temperatura de entrada y 50°C de temperatura de salida, parámetros que tampoco se han empleado en paquetes celulares de zanahoria debido a la naturaleza de su pared celular y que permiten obtener microcápsulas con células que se mantienen viables y totipotentes capaces de generar plántulas como en los procesos naturales de germinación.

25

Las suspensiones celulares embriogénicas son tamizadas para obtener un paquete celular homogéneo en tamaño, este paquete celular se mezcla con las soluciones de agentes encapsulantes como

maltodextrina y goma arábica, la mezcla se procesa en un secador por aspersión regulando la temperatura del aire de entrada y de salida. Al final del proceso se obtiene el producto (microcápsulas) que consiste en un polvo donde están contenidas las células vegetales. Al producto se le determina la humedad, actividad de agua y la viabilidad celular, posteriormente el polvo se almacena en refrigeración.

5 El polvo (microcápsulas) almacenado se rehidrata para eliminar el agente encapsulante que protege a la célula y se obtiene el paquete celular que se reactiva en medio de cultivo sólido para que las células se rediferencien y regeneren plántulas completas y enraizadas. Las plántulas se aclimatan en invernadero y se siembran en campo para su crecimiento y desarrollo normal. En la figura 2 se muestra el diagrama de flujo del proceso para la obtención de plántulas a partir de células microencapsuladas rehidratadas.

10 Por lo que, mediante esta invención se plantea un nuevo método de conservación y almacenamiento de material vegetal de zanahoria a partir del cual se pueden obtener plantas que puedan ser cultivadas en campo, pero con la innovación de emplear el secado por aspersión de células protegidas por agentes encapsulantes a determinadas condiciones de operación.

De acuerdo con la presente invención, a continuación, se presentan los pasos que comprende el proceso completo:

15 **a) Desinfectar las semillas:** las semillas se desinfectan en solución etanol-agua entre el 60% y 96% (v/v) durante un periodo de tiempo de 5-20 minutos, posteriormente se realizan 3 lavados de 3 minutos cada uno con agua destilada estéril, luego las semillas se sumergen en hipoclorito de sodio en concentraciones de entre 1% y 100% (p/v) durante 5-20 minutos. Finalmente, se realizan tres lavados de 20 3 minutos cada uno en agua destilada estéril. El porcentaje de desinfección obtenido es entre el 90% y 100%.

b) Obtener plántulas *in vitro*: las semillas desinfectadas se colocan en frascos de vidrio con 20 mL de medio de cultivo estéril MS (Murashige & Skoog) al 50% (p/v) de sales suplementado con 3% (p/v) de sacarosa y 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante. El pH final del medio de cultivo 25 estéril debe estar ajustado a 5.7 ± 0.2 . Los frascos con las semillas y el medio de cultivo estéril se incuban durante 2-3 semanas en cámara bioclimática a temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad hasta la germinación de las semillas, de esta forma se obtiene un

porcentaje de germinación de plántulas sanas *in vitro* entre el 80% y 95% con la finalidad de generar explantes sanos y asépticos.

- c) Inducir callos embriogénicos:** las plántulas germinadas en el paso anterior se utilizan para obtener explantes de hoja, tallo y/o raíz de 1 cm de longitud. Cinco explantes se siembran en frascos de vidrio
5 conteniendo 20 mL medio de cultivo estéril Gamborg suplementado con 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 3% (p/v) de sacarosa y 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante. El pH final del medio de cultivo estéril se debe ajustar a 5.7 ± 0.2 . Los frascos que contienen el explante y el medio de cultivo se incuban en cámara bioclimática a temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 3-4 semanas. Lo anterior permite
10 porcentajes de formación de callo embriogénico friable del 35% para las hojas, del 65% para la raíz y del 90% para el tallo.

- d) Inducir células en suspensión:** los callos embriogénicos friables obtenidos de la fase anterior se utilizan para inducir cultivos de células en suspensión en medio líquido Gamborg suplementado con 1 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 3% (p/v) de sacarosa, el pH final del medio se debe ajustar a
15 5.7 ± 0.2 . Para obtener concentraciones celulares superiores a 1×10^6 células/mL se llevan a cabo subcultivos en periodos de 7-15 días cada uno y se determina la densidad celular cada 7-10 días en cámara de Neubauer. Los cultivos y subcultivos se incuban en cámara bioclimática a temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, en agitación entre 50-150 rpm.

- e) Obtener el paquete celular:** los cultivos de células en suspensión que contienen a las células embriogénicas se tamizan en condiciones de esterilidad, empleando tamices malla 200 con un diámetro de partícula de $0.74 \mu\text{m}$. 40 mL del caldo obtenido después del tamizado se centrifuga entre 4°C y 10°C y entre 3000-5000 rpm durante 5-30 minutos para que las células sean separadas del caldo de cultivo y se obtenga el paquete celular que se secará por aspersión.

- f) Determinar la viabilidad del paquete celular:** La viabilidad de las células del paquete celular es necesaria para asegurarse que las células que van a ser procesadas estén vivas. Esta viabilidad se determina haciendo reaccionar azul de tripán al 0.4%, se mezcla 1:1 (v/v) con la muestra de células. La reacción se deja desarrollar durante 1 minuto y las células se observan en un microscopio óptico a 100x

ampliación con ayuda de una cámara de Neubauer. La viabilidad celular bajo las condiciones en las que se desarrollaron los cultivos es del 100%.

g) Preparar los agentes encapsulantes: para el secado por aspersión del paquete celular se emplean soluciones de agentes encapsulantes de maltodextrina al 30% (p/v), goma arábica al 14% (p/v) y goma xantana al 0.4% (p/v), estos se preparan por separado, se hidratan durante 24 horas en agua destilada, se ajusta el pH a 5.7 ± 0.2 , posteriormente se mezclan en relación 1:1 (v:v) y se homogenizan con ayuda de un agitador orbital entre 80-100 rpm durante 1-3 horas y se esterilizan a 15 lb/pulg² durante 15 minutos. Las mezclas de agentes encapsulantes pudiendo ser maltodextrina-goma arábica o maltodextrina-goma xantana. Otros agentes encapsulantes pueden ser utilizados como polisacáridos, alginatos, suero de leche, leche descremada y/o proteínas vegetales en concentraciones del 1 al 50% (p/v).

h) Resuspender las células: el paquete celular obtenido en el inciso e) se resuspende en la mezcla de agentes encapsulantes estériles obtenidas en el inciso g), la mezcla se somete a agitación orbital de 80-100 rpm durante 30-60 minutos para homogenizar el paquete celular y no dañar las células obtenidas.

i) Secar por aspersión: el secado de células se realiza alimentando la mezcla obtenida en el inciso h) en un secador por aspersión utilizando una temperatura del aire de entrada de entre 80-200°C y una temperatura del aire de salida entre 50-90°C. Este rango amplio de temperaturas se justifica por las diferentes configuraciones de los equipos para el secado por aspersión y por las posibles combinaciones de temperatura del aire de entrada y de salida que permitan obtener un producto en forma polvo cuyo rendimiento sea mayor al 50%, este polvo son las microcápsulas que contienen a las células con viabilidad entre el 60-100%, el tamaño de las microcápsulas es entre 1-40 μm .

j) Conservar el germoplasma: Las microcápsulas se deben mantener a una humedad entre 0 y 15%, una actividad de agua entre 0.1 y 0.5, y se resguardan en bolsas herméticas, selladas al vacío y en refrigeración a temperatura de 4°C a 10°C. Las microcápsulas contienen células deshidratadas con una viabilidad de al menos 90% durante un tiempo de 6 meses.

k) Hidratar las microcápsulas: para disgregar al agente encapsulante que mantiene protegida a la célula, 5 gramos del polvo obtenido como producto con las células microencapsuladas se rehidratan en agua estéril o medio de cultivo MS líquido estéril (ajustado a pH entre 5.7 y 7) suplementado con cefotaxima y etilenbisdiitocarbamato manganoso con sales de zinc en concentraciones entre 100-800

ppm, mantenidos en agitación orbital entre 50-150 rpm durante 1- 24 horas.

5 **l) Obtener el paquete celular:** la suspensión obtenida después de la rehidratación de las microcápsulas se centrifuga entre 3000-5000 rpm, entre 4°C-10°C durante 5-30 minutos para separar los agentes encapsulantes dispersos de las células sin detrimento de la viabilidad celular, para obtener el paquete de células que fueron procesadas mediante secado por aspersión. A este paquete celular se le determina la viabilidad celular según el paso f).

10 **m) Reactivar el paquete celular:** el paquete celular obtenido se reactiva en 20 mL de medio de cultivo estéril, MS sólido con 3% (p/v) de sacarosa y 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante, suplementado con 200 ppm de cefotaxima y 400 ppm de etilenditiotiocarbamato manganoso con sales de zinc para evitar el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras. La reactivación puede incrementar si se emplean reguladores de crecimiento como thidiazuron, bencilaminopurina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido naftalenacético. El cultivo se incuba en cámara bioclimática a 25°C con fotoperiodo de 16 horas durante 4 semanas. Después de este periodo se observa la rediferenciación y formación de estructuras embriogénicas.

15 **n) Obtener plántulas con raíces:** los embriones obtenidos, son transferidos a medio sólido MS con 3% (p/v) de sacarosa y 0.25 % (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante y se incuban a 22±2°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz durante 2 semanas. Después de este periodo, las plántulas se separan en condiciones asépticas y se transfieren a frascos conteniendo 20 mL de medio sólido MS estéril al 50% de sales con 3% (p/v) de sacarosa y 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente
20 gelificante y se incuban durante 14 días a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz. Después de este periodo se logra el enraizamiento del 100% de las plántulas regeneradas, las cuales desarrollan raíces de entre 2-5 cm de longitud y presentan 3-5 hojas con una altura de entre 3-10 cm.

o) Acondicionar las plántulas. Las plántulas obtenidas y enraizadas completamente con 20-30 días de edad se retiran del medio de cultivo y se lavan las raíces con agua estéril. Posteriormente, la plántula se
25 transfiere a maceteras de medio kilo de capacidad de sustrato a la cual se le transfiere de 300-500 gramos de mezcla de sustrato de los cuales 40% es turba y 60% es perlita.

p) **Aclimatar las plántulas.** Las plántulas se aclimatan en un invernadero cubriendo la macetera del paso o) con un recipiente sólido de polipropileno de 500 a 1000g de capacidad al cual se le hacen de tres a cinco agujeros en la base del recipiente de 5 a 10 mm de diámetro, lo cual provee de un microclima alrededor de la plántula a una humedad relativa superior al 75%. El riego de las plántulas se lleva a cabo una vez a la semana. Se logra una aclimatación del 80-95% con plántulas que presentan una longitud de raíz de 5 cm y presentan 3 hojas de 5 cm de altura.

q) **Plantar en campo:** las plántulas aclimatadas en invernadero se transfieren y se siembran en campo directamente en el suelo, pero puede emplearse una mezcla de 30% turba y 70% de perlita. Así mismo, el suelo se puede suplementar con humus de lombriz para que las plantas tengan un desarrollo y crecimiento que permita la elongación y el crecimiento de la raíz principal de la planta. Las plántulas presentan entre 5-8 hojas con altura de entre 10-15 cm.

El secado por aspersión es un proceso que hasta la fecha no se ha utilizado para la estabilización y conservación de células vegetales de zanahoria. Las células deshidratadas con este proceso tienen una viabilidad de al menos 90% durante 6 meses en almacenamiento en refrigeración de 4°C a 10°C y los ingredientes en las concentraciones empleadas, protegen a la célula durante el proceso de secado permitiendo que dichas células mantengan la capacidad de regenerar una planta completa. La sobrevivencia y capacidad metabólica de bacterias, hongos y levaduras después del secado por aspersión están reportadas ampliamente en el estado de la técnica. Sin embargo, las células vegetales son metabólicamente diferentes a las bacterias, hongos y levaduras, por lo que nuestra innovación consiste en desarrollar el proceso para mantener las células viables después del secado por aspersión y que estas células secas mantengan su capacidad de rediferenciación empleando los procesos de rehidratación y reactivación.

Ejemplo. Descripción del proceso de obtención de plántulas de zanahoria a partir de células secadas por aspersión.

a) **Desinfectar las semillas:** 10 gramos de semillas de zanahoria se desinfectan en etanol al 70% (p/v) durante 5 minutos, posteriormente se realizan tres lavados de 3 minutos cada uno con agua destilada

estéril y se sumergen en hipoclorito de sodio al 5% (p/v) durante 15 minutos y se enjuagan 3 veces durante 3 minutos con agua destilada estéril, obteniendo un 100% de desinfección de las semillas.

b) Obtener plántulas *in vitro*: para obtener plántulas asépticas, se colocan 5 semillas desinfectadas en cada frasco de vidrio que contienen 20 mL de medio de cultivo estéril MS (Murashige & Skoog) al 50% (p/v) de sales suplementado con 3% (p/v) de sacarosa y 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante. El pH final del medio debe estar ajustado a 5.7 ± 0.2 . Los frascos con las semillas y el medio de cultivo estéril se incuban durante 21 días en cámara bioclimática a temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Obteniendo 83% de germinación en las semillas.

c) Inducir callos embriogénicos: La inducción de callos embriogénicos se realiza a partir de explantes asépticos de zanahoria, se realizan cortes de 1 cm de longitud aproximadamente de raíces, tallos y hojas, los explantes se siembran en medio de cultivo sólido Gamborg suplementado con 3% (p/v) de sacarosa, 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante y 2 mg/L ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Se colocan 5 explantes en cada frasco de cultivo. Los cultivos se incuban en cámara bioclimática durante 4 semanas a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Después de este periodo se obtiene 35% de callos a partir de los explantes de hojas, 65% de callos a partir de los explantes de raíz y 90% de callos a partir de los explantes de tallo.

d) Inducir células en suspensión: 3 gramos de callos embriogénicos friables obtenidos de los explantes de tallos son transferidos a 100 mL de medio de cultivo líquido Gamborg, suplementado con 3% (p/v) de sacarosa, 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante y 1 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Se llevan a cabo subcultivos en periodos de 15 días y se evalúa la densidad celular cada 7 días por conteo en cámara de Neubauer. Los cultivos y subcultivos se incuban en cámara bioclimática durante 4 semanas a 100 rpm. En este periodo se alcanza una concentración celular de 8.25×10^6 células/mL.

e) Obtener el paquete celular: los cultivos líquidos con células en suspensión se tamizan en condiciones de esterilidad, empleando malla 200 con $0.74 \mu\text{m}$ de diámetro de partícula, para homogenizar el tamaño de las células a procesar. Este paso es con la finalidad de tener células capaces de pasar libremente por

el dispositivo para la aspersión del secador. El caldo obtenido después del tamizado se centrifuga a 4°C y 3,500 rpm durante 20 minutos, se elimina la fase líquida y se obtiene el paquete celular sedimentado.

f) Determinar la viabilidad del paquete celular: La viabilidad celular se determina en el caldo obtenido después del tamizado. Se toma 1 mL de caldo tamizado y se mezcla con el azul de tripano al 0.4% (p/v) en proporción 1:1 y mediante la técnica de exclusión se hace reaccionar durante 1 minuto. Se colocan 20 µL de la mezcla en una cámara de Neubauer y se observa al microscopio. Las células sin teñir son viables. El paquete celular tiene una viabilidad del 100%.

g) Preparar los agentes encapsulantes: los agentes encapsulantes empleados son maltodextrina al 30% (p/v) y goma Arábiga al 14% (p/v). Estos agentes se hidratan durante 24 horas por separado en agua destilada y se ajusta el pH a 5.7, posteriormente se mezclan en relación 1:1 (v:v), se homogenizan con ayuda de un agitador orbital a 80 rpm durante 1 hora y se esterilizan a 15 lb/pulg² durante 15 minutos. Se obtiene una mezcla de agentes encapsulantes, maltodextrina-goma arábiga con 44% sólidos totales.

h) Resuspender las células: El paquete celular con 100% de viabilidad se adiciona a 100 mL de la mezcla de agentes encapsulantes preparado en el paso g) de este ejemplo. La suspensión obtenida se agita a 100 rpm durante 30 minutos para homogenizar el paquete celular.

i) Secar por aspersión: La suspensión obtenida en el paso h) de este ejemplo, que contiene las células, se alimenta a un secador por aspersión con una temperatura del aire de entrada de 120°C y 50°C de temperatura del aire de salida. El producto obtenido es un polvo en el que se encuentran las cápsulas que contienen y protegen a las células. El polvo tiene un rendimiento del 70%.

j) Conservar el germoplasma: El germoplasma contenido en las cápsulas obtenidas después de secado por aspersión presenta humedad de 3.27% y actividad de agua de 0.186. Las células encapsuladas mantienen una viabilidad del 100% inmediatamente después del proceso. El germoplasma se almacena en bolsas herméticas selladas al vacío y se mantienen en refrigeración a 8°C y mantienen una viabilidad del 92% después de 6 meses de almacenamiento.

k) Hidratar las microcápsulas: las células encapsuladas contenidas en el polvo son rehidratadas en condiciones de esterilidad, para ello, 3 gramos de polvo se adicionan a 20 mL de medio de cultivo estéril MS líquido suplementado con 200 ppm de cefotaxima y 400 ppm de etilenbisdiitocarbamato manganoso con sales de zinc para evitar la contaminación. La suspensión se agita a 100 rpm durante 24 horas para

la disgregación de los agentes encapsulantes y la liberación de la célula que se encuentra dentro de la cápsula.

5 **l) Obtener el paquete celular:** para la obtención del paquete celular después del secado por aspersión, se toman 40 mL de la suspensión rehidratada de acuerdo al paso anterior. La suspensión se centrifuga a 4°C y 3,500 rpm durante 20 minutos, se elimina el sobrenadante y se obtiene el paquete celular sedimentado. A este paquete celular se le determina la viabilidad mediante la técnica de exclusión de azul de tripano y las células mantienen el 100% de viabilidad después del secado por aspersión.

10 **m) Reactivar el paquete celular:** el paquete celular recuperado después del secado por aspersión, se reactiva colocándose en 20 mL de medio de cultivo estéril MS sólido suplementado con 3% (p/v) de sacarosa, 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante, 200 ppm de cefotaxima y 400 ppm de etilenbisditiocarbamato manganoso con sales de zinc, se incuba en cámara bioclimática a 25°C con fotoperiodo de 16 horas durante 4 semanas. Después de este periodo se observan embriones en estado globular, corazón, torpedo y cotiledonar.

15 **n) Obtener plántulas con raíces:** los embriones en estado cotiledonar se siembran en medio MS sólido suplementado con 3% (p/v) de sacarosa, 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante y se incuban durante 2 semanas en cámara bioclimática a 25°C con fotoperiodo de 16 horas. Después de este periodo se obtiene el 100% de plántulas completamente enraizadas. Las plántulas se separan en condiciones asépticas y se transfieren a frascos conteniendo medio sólido MS estéril al 50% de sales con 3% (p/v) de sacarosa, 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante y se incuban durante 20 14 días a 25°C con un fotoperiodo preferentemente de 16 horas de luz. Después de este periodo se obtienen plántulas con raíces de 3 cm de longitud y con 3 hojas con altura de 5 cm.

25 **o) Acondicionar las plántulas:** Las plántulas enraizadas completamente después de 20 días, se separan del medio de cultivo y se lavan con agua estéril para eliminar restos del medio de cultivo, se siembra una plántula en una maceta con 300 gramos de sustrato, de los cuales 40% es turba y 60% perlita.

p) Aclimatar las plántulas: Las plántulas acondicionadas se transfieren a un invernadero cubriendo la plántula con un recipiente sólido de polietileno de 600 g de capacidad, el cual tiene cuatro agujeros en su base de 7 mm de diámetro, lo anterior permite mantener un microclima alrededor de la plántula y

mantener una humedad relativa del 85%. Las plántulas se riegan con agua corriente cada 7 días. Se obtiene un 80% de aclimatación. Las plántulas presentan una longitud de raíz de 4 cm y presentan 4 hojas de 5 cm de altura.

- 5 **q) Plantar en campo:** las plántulas aclimatadas después de 14 días en invernadero que tengan una longitud de raíz aproximadamente de 5 cm y una altura aproximada de 10 cm se siembran en campo directamente al suelo. En esta etapa, después de 14 días en campo, se obtienen plántulas con 6 hojas de 10 cm de altura.

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la conservación de germoplasma de zanahoria mediante el secado por aspersión de células hasta obtener su reactivación para la obtención de plántulas, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
 - a) Inducir callos embriogénicos, se utilizan explantes de hoja, tallo y/o raíz de 1 cm de longitud, cinco explantes se siembran en frascos de vidrio conteniendo 20 mL medio de cultivo estéril Gamborg suplementado con 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 3% (p/v) de sacarosa y 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante, el pH final del medio de cultivo estéril se ajusta a 5.7±0.2, los frascos que contienen el explante y el medio de cultivo se incuban en cámara bioclimática a temperatura controlada de 22 ±1°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 3-4 semanas;
 - b) Inducir células en suspensión, se utilizan callos embriogénicos friables para inducir cultivos de células en suspensión en medio líquido Gamborg suplementado con 1 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 3% (p/v) de sacarosa, ajustar el pH final del medio a 5.7±0.2;
 - c) Obtener el paquete celular, los cultivos de células en suspensión que contienen a las células embriogénicas se tamizan en condiciones de esterilidad, empleando tamices malla 200 con un diámetro de partícula de 0.74 µm, se centrifuga entre 4°C y 10°C y entre 3000-5000 rpm durante 5-30 minutos y se obtenga el paquete celular;
 - d) Determinar la viabilidad del paquete celular, se hace reaccionar azul de tripán al 0.4%, se mezcla 1:1 (v/v) con la muestra de células, la reacción se deja desarrollar durante 1 minuto y las células se observan en un microscopio óptico a 100x ampliación con ayuda de una cámara de Neubauer, la viabilidad celular bajo las condiciones en las que se desarrollaron los cultivos es del 100%;
 - e) Preparar los agentes encapsulantes, se emplean soluciones de agentes encapsulantes de maltodextrina al 30% (p/v), goma arábiga al 14% (p/v) y goma xantana al 0.4% (p/v), estos se preparan por separado, se hidratan durante 24 horas en agua destilada, se ajusta el pH a 5.7±0.2, posteriormente se mezclan en relación 1:1 (v:v) y se homogenizan con ayuda de un agitador orbital

- entre 80-100 rpm durante 1-3 horas y se esterilizan a 15 lb/pulg² durante 15 minutos, las mezclas de agentes encapsulantes pueden ser maltodextrina-goma arábica o maltodextrina-goma xantana;
- f) Resuspender las células, el paquete celular se resuspende en la mezcla de agentes encapsulantes estériles, y en donde la mezcla se somete a agitación orbital de 80-100 rpm durante 30-60 minutos;
- 5 g) Secar por aspersión, se realiza alimentando la mezcla de obtenida en un secador por aspersión utilizando una temperatura del aire de entrada de entre 80-200°C y una temperatura del aire de salida entre 50-90°C;
- h) Conservar el germoplasma, las microcápsulas se mantienen a una humedad entre 0 y 15%, y una actividad de agua entre 0.1 y 0.5, se resguardan en bolsas herméticas, selladas al vacío y en refrigeración a temperatura de 4°C a 10°C, las microcápsulas tienen una viabilidad de al menos 90% durante un tiempo de 6 meses;
- 10 i) Rehidratar las microcápsulas, para disgregar al agente encapsulante, 5 gramos del polvo obtenido se rehidratan en agua estéril o medio de cultivo MS líquido estéril suplementado con cefotaxima y etilenbisditiocarbamato manganoso con sales de zinc en concentraciones entre 100-800 ppm, PH entre 5.7 y 7, en agitación orbital entre 50-150 rpm durante 1- 24 horas;
- 15 j) Obtener el paquete celular, la suspensión obtenida después de la rehidratación de las microcápsulas se centrifuga entre 3000-5000 rpm, entre 4°C-10°C durante 5-30 minutos para obtener el paquete de células y se determina su viabilidad;
- k) Reactivar el paquete celular, se reactiva en 20 mL de medio de cultivo estéril, MS sólido con 3% (p/v) de sacarosa y 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante, suplementado con 200 ppm de cefotaxima y 400 ppm de etilenbisditiocarbamato manganoso con sales de zinc, incubando en cámara bioclimática a 25°C con fotoperiodo de 16 horas durante 4 semanas, después de este periodo se observa la rediferenciación y formación de estructuras embriogénicas;
- 20 l) Obtener plántulas con raíces, los embriones obtenidos, son transferidos a medio sólido MS con 3% (p/v) de sacarosa y 0.25 % (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante incubando a 22±2°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz durante 2 semanas, posteriormente las plántulas se
- 25

5 transfieren a frascos conteniendo 20 mL de medio sólido MS estéril al 50% de sales con 3% (p/v) de sacarosa y 0.25% (p/v) de polisacárido aniónico como agente gelificante y se incuban durante 14 días a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y, lograr un enraizamiento del 100% de las plántulas, las cuales desarrollan raíces de entre 2-5 cm de longitud y presentan 3-5 hojas con una altura de entre 3-10 cm;

- m) Acondicionar las plántulas, se lavan las raíces con agua estéril, posteriormente se transfiere a maceteras de medio kilo de capacidad a la cual se le transfiere de 300-500 gramos de mezcla de sustrato de los cuales 40% es turba y 60% es perlita;
 - n) Aclimatar las plántulas, se aclimatan en un invernadero logrando una aclimatación del 80-95% de plántulas que presentan una longitud de raíz de 5 cm y 3 hojas de 5 cm de altura, para posteriormente ser sembradas en campo para su crecimiento y desarrollo.
- 10
2. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en el paso b), para obtener concentraciones celulares superiores a 1×10^6 células/mL se llevan a cabo subcultivos en periodos de 7-15 días cada uno.
- 15
3. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, paso b) y la reivindicación 2, caracterizadas porque los cultivos y subcultivos se incuban en cámara bioclimática a temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, en agitación entre 50-150 rpm.
 4. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en el paso e), también se puede utilizar otros agentes encapsulantes tales como polisacáridos, alginatos, suero de leche, leche descremada y/o proteínas vegetales en concentraciones del 1 al 50% (p/v).
- 20
5. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en el paso g), se obtiene un producto en forma polvo que son las microcápsulas con un tamaño de 1-40 μm , que contienen a las células con viabilidad entre el 60-100%.

RESUMEN

El presente proceso permite obtener células de zanahoria totipotentes con la capacidad de regenerar plántulas como ocurre en los procesos de propagación, micropropagación *in vitro* y semillas sintéticas. Este proceso permite aprovechar al secado por aspersión como una tecnología para la conservación de germoplasma de zanahoria como un nuevo método que no existe en el estado de la técnica. El proceso

5 parte de las células en suspensión y comprende la inducción de callos embriogénicos friables a partir de semillas, hojas, tallos, raíces o cualquier explante capaz de generar células en suspensión, seguido de la obtención del paquete celular. Dicho paquete celular se mezcla con agentes encapsulantes para ser secado por aspersión. Finalmente, las células encapsuladas mediante el secado por aspersión se

10 rehidratan y reactivan para que continúen su desarrollo morfogénico hasta la generación de plántulas capaces de aclimatarse a nivel invernadero y en campo.

Semillas

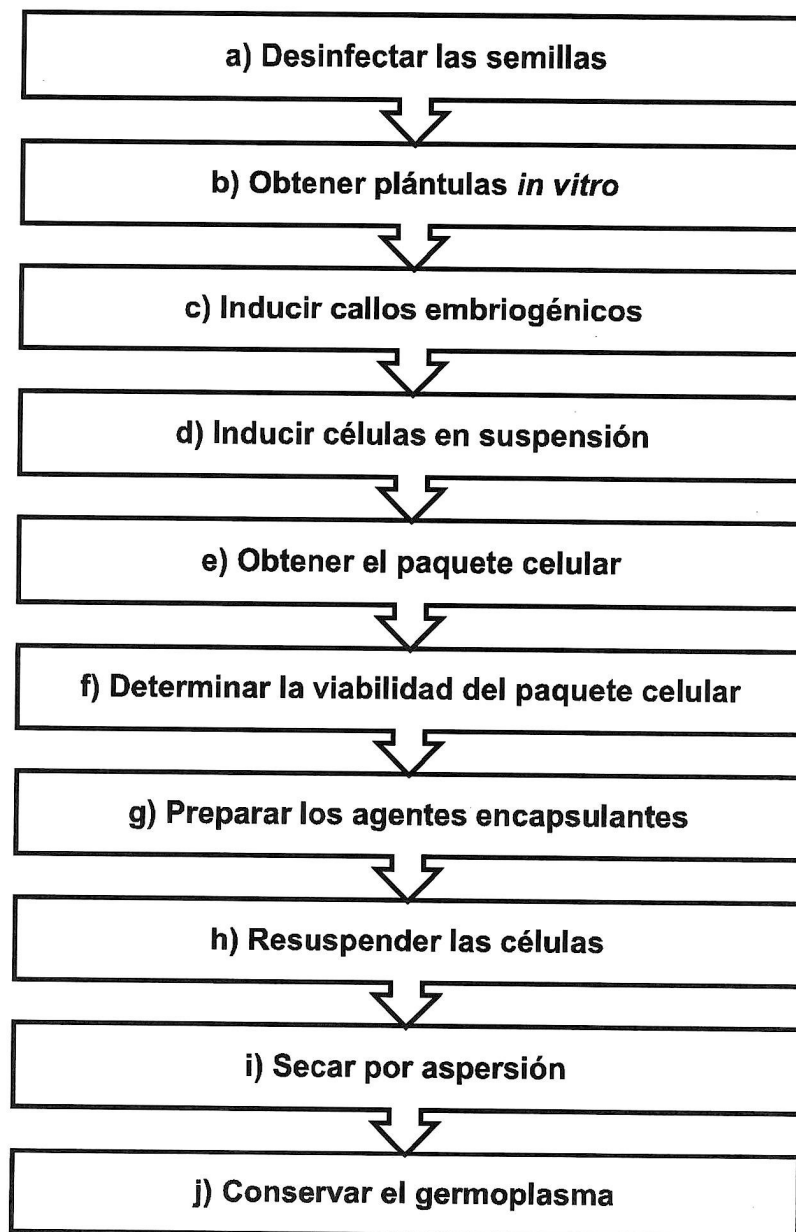


Figura 1

Microcápsulas

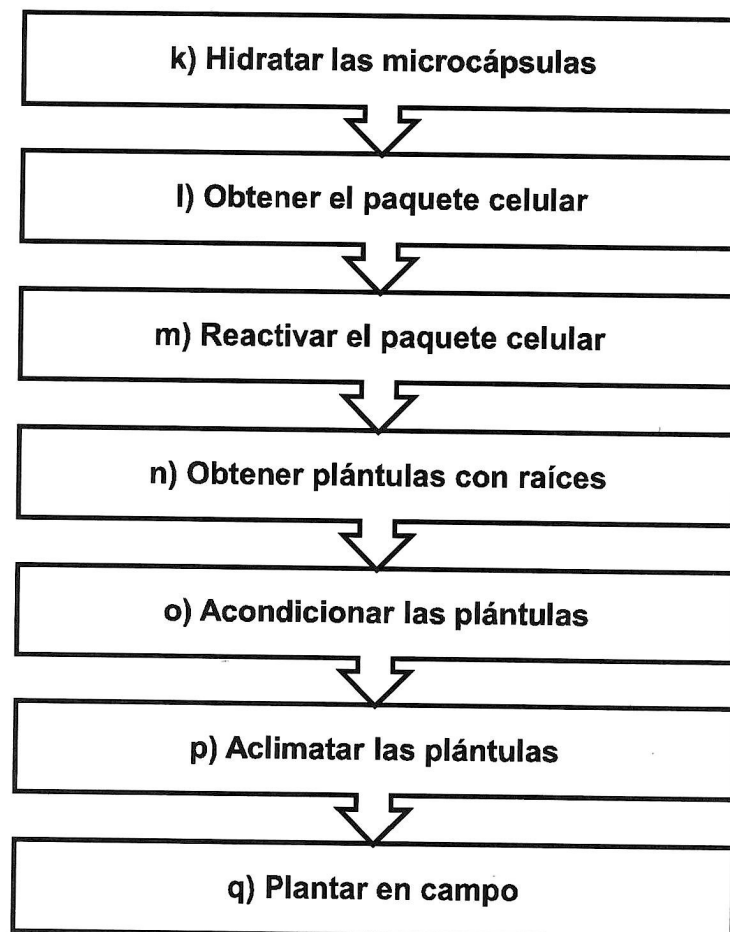


Figura 2