



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “OBTENCIÓN Y MADURACIÓN DE EMBRIONES  
SOMÁTICOS DE PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis* Jacq.) A  
PARTIR DE CALLOS MEDIANTE CULTIVO *IN VITRO* PARA SU  
FUTURA GERMINACIÓN”.**

**AUTOR: PILICITA TIPÁN, KARINA ARACELY**

**DIRECTOR: M.Sc. JADÁN GUERRERO, MÓNICA BEATRIZ, Ph.D.**

(c)

**SANGOLQUÍ**

**2017**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “**OBTENCIÓN Y MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis* Jacq.) A PARTIR DE CALLOS MEDIANTE CULTIVO *IN VITRO* PARA SU FUTURA GERMINACIÓN**”, realizado por la señorita **KARINA ARACELY PILICITA TIPÁN**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **KARINA ARACELY PILICITA TIPÁN** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de Marzo del 2017

**M.Sc. Mónica Jadán, Ph.D. (c)**

DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **KARINA ARACELY PILICITA TIPÁN**, con cédula de identidad N° 1721763926, declaro que este trabajo de titulación **“OBTENCIÓN Y MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis* Jacq.) A PARTIR DE CALLOS MEDIANTE CULTIVO *IN VITRO* PARA SU FUTURA GERMINACIÓN”** ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 10 de Marzo del 2017

Karina Aracely Pilicita Tipán

C.C 1721763926



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, **KARINA ARACELY PILICITA TIPÁN**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación **“OBTENCIÓN Y MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis* Jacq.) A PARTIR DE CALLOS MEDIANTE CULTIVO *IN VITRO* PARA SU FUTURA GERMINACIÓN”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 10 de Marzo del 2017

Karina Aracely Pilicita Tipán

C.C 1721763926

## DEDICATORIA

A Dios, por ayudarme en todas las etapas de mi vida, por nunca haberme dejado sola y por darme fuerza en los momentos más difíciles. Por guiarme, por su amor y bendiciones gracias a las cuales he podido terminar con esta y cada una de las etapas en mi vida.

A mi madre Daira, por ser una mujer fuerte, por su esfuerzo y por enseñarme que puedo alcanzar todo lo que me proponga.

A mis abuelitos Jorge y Mayela, por ser como mis padres, por haberme formado como persona, por su apoyo incondicional, por sus consejos y por su amor. Gracias por ayudarme a ser una mejor persona cada día.

A mi hermana Paulina, por ser mi mejor amiga, porque Dios no me podría haber enviado una mejor hermana, por su apoyo y ayuda diaria ya que solo ella entiende el viaje que hemos atravesado hasta llegar aquí.

A mis primos Vladislav y Yamislaydis por ser como mis hermanos. A mis tíos, Magali, Jorge y Danilo por apoyarme.

**Karina Aracely Pilicita Tipán**

## AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia porque me enseñaron a luchar por mis sueños. Porque me apoyaron incondicionalmente en cada momento de mi vida y supieron guiarme para alcanzar mis metas.

A mi directora de Tesis MSc. Mónica Jadán y a la Doctora Claudia Segovia por la confianza que me brindaron para poder culminar mi proyecto de tesis en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, por sus consejos, orientaciones y apoyo que han sido parte muy importante para poder acabar con este proyecto. Además al Doctor Carlos Arroyo por su apoyo en el Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales del Centro de Microscopía Electrónica.

A mi amiga Paulina A, por ser una bendición que Dios puso en mi vida, por ser la persona que me ayudó en los momentos más difíciles, por escucharme y darme consejos, porque desde que la conocí fue como mi hermana y siempre me mostró su apoyo.

A mis amigas de la universidad Jenn, Gaby, Jassi, Danny, Nenis, Jeny y Gaby que me brindaron su cariño, por ser mi familia durante todo este tiempo de vida universitaria.

A la Ingeniera Andrea Vaca que me ayudó en el Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales del Centro de Microscopía Electrónica, por todo el apoyo que me brindó para lograr terminar con este proyecto.

A todas las personas que contribuyeron para que llegara a cumplir esta etapa de mi vida, a todos los que confiaron en mí y me apoyaron.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
LISTA DE CUADROS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABLAS.....	xvi
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMEN.....	xix
ABSTRACT.....	xx
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Formulación del problema.....	1
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. Marco teórico.....	5
1.4.1. Palma Aceitera ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.).....	5
1.4.1.1. Origen y distribución.....	5

1.4.1.2.	Clasificación taxonómica .....	6
1.4.1.3.	Características Morfológicas .....	7
1.4.1.4.	Usos .....	10
1.4.2.	Cultivo <i>in vitro</i> .....	11
1.4.2.1.	Embriogénesis somática .....	13
1.4.2.2.	Etapas de la embriogénesis somática .....	13
1.4.2.3.	Desarrollo de los embriones somáticos en monocotiledóneas .....	14
1.4.3.	Análisis microscópico .....	15
1.4.3.1.	Microscopio electrónico de barrido (SEM) .....	16
1.4.3.2.	Usos y resolución del Microscopio electrónico de barrido .....	16
1.5.	Sistema de hipótesis o pregunta de investigación .....	17
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....		18
2.1.	Localización del ensayo .....	18
2.2.	Fase de cultivo <i>in vitro</i> .....	18
2.2.1.	Proliferación de callos de Palma Aceitera .....	19
2.2.2.	Iniciación de embriones somáticos de Palma Aceitera .....	20
2.2.2.1	Efecto de la influencia del 2,4-D y de kinetina en la iniciación de embriones somáticos .....	20
2.2.3.	Maduración de embriones somáticos de Palma Aceitera .....	23
2.2.3.1	Efecto de la influencia de kinetina y ABA en la maduración de los embriones somáticos de Palma Aceitera .....	23
2.3.	Fase de Análisis celular de callos y embriones somáticos de Palma Aceitera en el Microscopio Electrónico de barrido (SEM) .....	26
2.3.1.	Experimento 1: Efecto del tiempo de postfijación química con tetraóxido de osmio (OsO <sub>4</sub> ) al 1% .....	26

2.3.2. Experimento 2: Efecto del tiempo de inmersión y del buffer (fosfato salino, cacodilato de sodio) utilizado en la fijación de las muestras .....	29
2.3.3. Experimento 3: Efecto del tiempo de inmersión en Hexametildisilazano (HMDS) en el secado de las muestras.....	30
CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....	32
3.1. Fase I: Iniciación de embriones somáticos de Palma Aceitera .....	32
3.2. Fase II: Maduración de embriones somáticos de Palma Aceitera .....	53
3.3. Fase III: Análisis celular de callos y embriones somáticos de Palma Aceitera en el Microscopio Electrónico de barrido (SEM) .....	65
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN .....	83
4.1. Iniciación de embriones somáticos de Palma Aceitera.....	83
4.2. Maduración de embriones somáticos de Palma Aceitera .....	85
4.3. Análisis celular de callos y embriones somáticos de Palma Aceitera en el Microscopio Electrónico de barrido (SEM).....	87
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....	91
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES .....	93
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA .....	94

**LISTA DE CUADROS**

Cuadro 1. Análisis de varianza para los tratamientos evaluados con respecto a la variable de presencia de embriones somáticos .....	36
Cuadro 2. Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con respecto a la variable de presencia de embriones somáticos.....	37
Cuadro 3. Prueba de Shapiro Wilks (modificado) para la variable presencia de embriones somáticos.....	37
Cuadro 4. Prueba de Kruskal Wallis para los tratamientos evaluados para la variable presencia de embriones somáticos.....	39
Cuadro 5. Análisis de varianza para los tratamientos evaluados con respecto a la variable de número de embriones somáticos.....	43
Cuadro 6. Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con respecto a la variable de número de embriones somáticos.....	44
Cuadro 7. Prueba de Shapiro Wilks (modificado) para la variable número de embriones somáticos.....	44
Cuadro 8. Prueba de Kruskal Wallis para los tratamientos evaluados para la variable número de embriones somáticos.....	46
Cuadro 9. Análisis de varianza para los tratamientos evaluados con respecto a la variable del tipo de callo.....	50
Cuadro 10. Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con respecto a la variable de tipo de callo.....	50
Cuadro 11. Prueba de Shapiro Wilks (modificado) para la variable tipo de callo.....	51
Cuadro 12. Prueba de Kruskal Wallis para los tratamientos evaluados para la variable tipo de callo.....	52

Cuadro 13. Análisis de varianza para los tratamientos evaluados con respecto a la variable etapa de maduración del embrión. ....	57
Cuadro 14. Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con respecto a la variable etapa de maduración del embrión. ....	58
Cuadro 15. Prueba de Shapiro Wilks (modificado) para la variable etapa de maduración de los embriones somáticos.....	58
Cuadro 16. Prueba de Kruskal Wallis para los tratamientos evaluados para la variable etapa de maduración de los embriones somáticos. ....	60
Cuadro 17. Análisis de varianza para los tratamientos evaluados con respecto a la variable de oxidación de embriones somáticos.....	64
Cuadro 18. Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con respecto a la variable oxidación de embriones.....	64
Cuadro 19. Análisis de varianza para los tratamientos evaluados con respecto a la variable plasmólisis.....	77
Cuadro 20. Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con respecto a la variable plasmólisis. ....	77
Cuadro 21. Prueba de Shapiro Wilks (modificado) para la variable plasmólisis. ....	78
Cuadro 22. Prueba de Kruskal Wallis para los tratamientos evaluados con respecto a la variable plasmólisis.....	79

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Palma Aceitera.....	7
Figura 2. Inflorescencia masculina de Palma Aceitera. ....	9
Figura 3. Inflorescencia femenina de Palma Aceitera. ....	9
Figura 4. Fruto de Palma Aceitera .....	9
Figura 5. Formación del embrión globular en monocotiledónea. ....	15
Figura 6. Fases del desarrollo de un embrión en monocotiledónea. (a) Vista frontal del proembrión. (b) Vista frontal del embrión en etapa escutelar. (c) Vista frontal del embrión en etapa coleoptilar. (d) Vista esquemática del embrión en estado coleoptilar. ....	15
Figura 7. Fragmento de callo de Palma Aceitera con un peso inicial de 0,281 g. ....	21
Figura 8. Disposición del callo en el medio de cultivo.....	22
Figura 9. Disposición de los embriones somáticos en el medio de cultivo. ....	24
Figura 10. Prefijación con 250 $\mu$ L de 4% de glutaraldehído en tampón fosfato salino 0,1 M (pH 7,2).....	27
Figura 11. Recubrimiento con 20 nm de oro por 2 minutos. ....	28
Figura 12. (A) Ausencia de embriones somáticos en callo del tratamiento I0 (0 mg $L^{-1}$ de 2,4-D y 0 mg $L^{-1}$ de kinetina). (B) Presencia de embriones somáticos en callos de los tratamientos I1 (1 mg $L^{-1}$ de 2,4-D y 0,2 mg $L^{-1}$ de kinetina), (C) I2 (1 mg $L^{-1}$ de 2,4-D y 0,1 mg $L^{-1}$ de kinetina), (D) I3 (1 mg $L^{-1}$ de 2,4-D y 0,05 mg $L^{-1}$ de kinetina), (E) I4 (2 mg $L^{-1}$ de 2,4-D y 0,2 mg $L^{-1}$ de kinetina), (F) I5 (2 mg $L^{-1}$ de 2,4-D y 0,1 mg $L^{-1}$ de kinetina), (G) I6 (2 mg $L^{-1}$ de 2,4-D y 0,05 mg $L^{-1}$ de kinetina). ....	34
Figura 13. Porcentaje de callos con embriones somáticos con respecto a los tratamientos utilizados. ....	35

Figura 14. Gráfico Q-Q plot de la variable presencia de embriones somáticos.....	38
Figura 15. (A) Ausencia de embriones somáticos en tratamiento. (B) Seis embriones somáticos en tratamiento I1. (C) Seis embriones somáticos en tratamiento I2. (D) Seis embriones somáticos en tratamiento I3. (E) Cuatro embriones somáticos en tratamiento I4. (F) Tres embriones somáticos en tratamiento I5, (G) Tres embriones somáticos en tratamiento I6.....	41
Figura 16. Número de embriones somáticos con respecto al tratamiento utilizado en la iniciación de embriones somáticos.....	42
Figura 17. Gráfico Q-Q plot de variable número de embriones somáticos. ....	45
Figura 18. (A) Callo tipo 3 con apariencia globular y beige. (B) Callo tipo 4 de apariencia globular y blanco. ....	48
Figura 19. Porcentaje de callos tipo 3 y tipo 4 con respecto a los tratamientos utilizados.....	49
Figura 20. Gráfico Q-Q plot de la variable tipo de callo. ....	51
Figura 21. (A) Diferentes estados de diferenciación de los embriones somáticos. Embriones vistos en el estereoscopio (1X): (B). Embrión pequeño (0,15 cm). (C). Embrión mediano (0,3 cm). (D). Embrión largo (0,7 cm). (E). Embrión maduro (1 cm).....	55
Figura 22. Porcentaje de embriones somáticos en cada tratamiento de acuerdo a la etapa de maduración.....	56
Figura 23. Gráfico Q-Q plot de la variable etapa de maduración de los embriones somáticos.....	59
Figura 24. Embriones somáticos oxidados (→) y no oxidados (→) en cada tratamiento de maduración observados en el estereoscopio (0,63 X). (A) Tratamiento M0. (B) Tratamiento M1. (C) Tratamiento M2. (D) Tratamiento M3. (E) Tratamiento M4. (F) Tratamiento M5. (G) Tratamiento M6. ....	62

Figura 25. Porcentaje de embriones somáticos oxidados y no oxidados presentes en cada tratamiento de maduración.....	63
Figura 26. (A-H) Microfotografías SEM de callos de Palma Aceitera ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.). (A-B) Callos sin postfijación con OsO <sub>4</sub> 1%. (C-D) Callos postfijados con OsO <sub>4</sub> 1% por 2 horas, (E-F) 4 horas y (G-H) 6 horas.....	66
Figura 27. (A-I) Microfotografías SEM de embriones somáticos de Palma Aceitera ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.). (A-C) Embriones somáticos postfijados con OsO <sub>4</sub> 1% por 2 horas, (D-F) 4 horas y (G-I) 6 horas.....	67
Figura 28. Porcentaje de muestras vegetales con presencia y ausencia de lisis celular de acuerdo a los tratamientos utilizados. ....	68
Figura 29. Microfotografías SEM de callos de Palma Aceitera ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.). (A-B). Callos sin fijación con glutaraldehído. (C-E). Callos fijados con glutaraldehído al 4% en tampón fosfato salino 0,1 M (pH 7,2) a temperatura ambiente durante 2 horas y (F-H) 48 horas. ....	70
Figura 30. (A-F). Microfotografías SEM de callos de Palma Aceitera ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.). (A-C) Callos fijados con glutaraldehído al 4% en tampón cacodilato de sodio 0,1 M (pH 6,8) a temperatura ambiente durante 2 horas y (D-F) 48 horas. ....	71
Figura 31. Porcentaje de muestras vegetales con presencia y ausencia de cristalización de acuerdo a los tratamientos utilizados. ....	72
Figura 32. Microfotografías SEM de callos de Palma Aceitera ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.). (A-B) Callos sin inmersión en HMDS (secados en desecador). (C-D) Callos inmersos por 15 minutos, (E-F) 30 minutos y (G-H) 45 minutos en HMDS. ....	74
Figura 33. (A-I) Microfotografías SEM de embriones somáticos de Palma Aceitera ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.). (A-C) Embriones somáticos	

inmersos por 15 minutos, (D-F) 30 minutos y (G-I) 45 minutos en HMDS.....	75
Figura 34. Porcentaje de muestras vegetales con presencia y ausencia de plasmólisis de acuerdo a los tratamientos utilizados. ....	76
Figura 35. Gráfico Q-Q plot de la variable encogimiento celular. ....	78
Figura 36. (A) Microfotografías de embrión somático emergiendo de callo. (B) Embrión emergiendo del callo observado en estereoscopio (0,63 X). (C, E) Microfotografías de embriones somáticos. (D, F) Embriones somáticos observados en el estereoscopio (0,63 X).....	81
Figura 37. Microfotografías SEM de callo embriogénico de Palma Aceitera con red fibrilar formando puentes finos entre las células y cubriendo la superficie de las células (→).....	82

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del medio de Cultivo Murashige & Skoog (1962).....	19
Tabla 2. Tratamientos de medios de cultivo con fitorreguladores para la etapa de iniciación.....	21
Tabla 3. Tratamientos de medios de cultivo con fitorreguladores para la etapa de maduración de embriones somáticos. ....	24
Tabla 4. Etapas de desarrollo de los embriones somáticos de Palma con su respectivo tamaño y características de acuerdo a Al-Khayri & Al-Bahrany (2012). ....	25
Tabla 5. Tratamientos de postfijación con OsO <sub>4</sub> 1% para la etapa de observación de callos y embriones somáticos en el Microscopio Electrónico de barrido (SEM).....	28
Tabla 6. Tratamientos de fijación de las muestras con dos tiempos de inmersión (2 y 48 horas) y dos buffers (fosfato salino, cacodilato de sodio) para la etapa de observación de callos y embriones somáticos en el Microscopio Electrónico de barrido (SEM).....	30
Tabla 7. Tratamientos de secado de muestras con tres tiempos de inmersión en HMDS (15, 30 y 45 minutos) para la etapa de observación de callos y embriones somáticos en el Microscopio Electrónico de barrido (SEM). ....	31
Tabla 8. Tabla de contingencia con respecto a la presencia de embriones somáticos de acuerdo a los tratamientos utilizados. ....	33
Tabla 9. Tabla de contingencia para la iniciación de embriones somáticos respecto al número de embriones somáticos presentes en cada tratamiento utilizado.....	40
Tabla 10. Tabla de contingencia para la iniciación de embriones somáticos respecto al tipo de callo de acuerdo a los tratamientos utilizados. ....	47

Tabla 11. Tabla de contingencia para la maduración de embriones somáticos respecto a la variable etapa de maduración de los embriones somáticos de acuerdo a los tratamientos utilizados. ....	54
Tabla 12. Tabla de contingencia para la maduración de embriones somáticos respecto a la variable oxidación de los embriones somáticos de acuerdo a los tratamientos utilizados.....	61
Tabla 13. Tabla de contingencia para la variable lisis celular con relación a los tratamientos relacionados al efecto del tiempo de postfijación con OsO4 al 1%. ....	65
Tabla 14. Tabla de contingencia para la variable cristalización con relación a los tratamientos relacionados al efecto del tiempo de inmersión y del buffer (fosfato salino, cacodilato de sodio) utilizado en la fijación de las muestras. ....	69
Tabla 15. Tabla de contingencia para la variable encogimiento celular con relación a los tratamientos relacionados al efecto del tiempo de inmersión en Hexametildisilazano (HMDS) en el secado de las muestras. ....	73

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**2,4-D:** Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ANA:** Ácido Naftalenacético

**ABA:** Ácido Abscísico

**HMDS:** Hexametildisilazano

**OsO<sub>4</sub>:** Tetraóxido de osmio

**PBS:** buffer fosfato salino

**CB:** buffer cacodilato de sodio

**SEM:** Microscopio electrónico de barrido

**Pa:** Pascal

## RESUMEN

La Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) es una planta económicamente importante por su aceite vegetal. Es propagada generalmente por semillas, sin embargo se presentan inconvenientes; por esta razón, se han realizado estudios enfocados en su cultivo *in vitro*, sin embargo, los resultados han tenido poca reproductividad. En el presente estudio, para la iniciación de embriones somáticos se utilizó un medio Murashige & Skoog (1962), suplementado con 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.8 gL<sup>-1</sup> de phytigel y diferentes combinaciones de los fitorreguladores 2,4-D (1 y 2 mgL<sup>-1</sup>) y kinetina (0.2, 0.1 y 0.05 mgL<sup>-1</sup>). El tratamiento con el que se obtuvo el mayor número de callos con embriones somáticos, así como el mayor número de embriones fue: 1 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,2 mgL<sup>-1</sup> de kinetina. Para la etapa de maduración se usó el medio Murashige & Skoog (1962) ajustado a un pH de 5.75 y suplementado con 0,01 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D, 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 2,8 gL<sup>-1</sup> de phytigel y para los tratamientos se utilizaron diferentes combinaciones de los fitorreguladores kinetina (1 y 0,5 mgL<sup>-1</sup>) y ABA (0,4, 0,2 y 0,1 mgL<sup>-1</sup>). Los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento que incluía 0,5 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,2 mgL<sup>-1</sup> de ABA, generándose 28,57% de embriones maduros y 14,29% de oxidación. Para la obtención de microfotografías de callos y embriones somáticos se utilizaron diferentes protocolos, 15 minutos de inmersión en HMDS provocó el menor encogimiento celular y el uso del CB evitó la cristalización en las muestras al ser observadas en SEM.

### Palabras clave:

- **PALMA ACEITERA**
- *Elaeis guineensis* Jacq.
- **EMBRIONES SOMÁTICOS**
- **MADURACIÓN**
- **SEM**

## ABSTRACT

The oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) is an economically important plant mainly for its vegetable oil. It is usually propagated by seeds, however there are drawbacks when this method is used, for this reason, studies have been carried out focused on its *in vitro* culture, however, the results have had little reproductivity. In this study, for the initiation of somatic embryos was used a culture medium Murashige & Skoog (1962), supplemented with 30 gL<sup>-1</sup> of sucrose, 2.8 g L<sup>-1</sup> of phytigel and different combinations of hormones 2,4-D (1 and 2 mgL<sup>-1</sup>) and kinetin (0.2, 0.1 and 0.05 mgL<sup>-1</sup>). The treatment with that obtained the highest number of calluses with somatic embryos, and the greater number of embryos was: 1 mgL<sup>-1</sup> of 2,4 -D and 0.2 mgL<sup>-1</sup> of kinetin. For maturation was used a culture medium Murashige & Skoog (1962) adjusted to pH 5.75 and supplemented with 0.01 mgL<sup>-1</sup> of 2,4 - D, 30 gL<sup>-1</sup> of sucrose, 2.8 gL<sup>-1</sup> of phytigel and for treatments were used different combinations of hormones kinetin (1 and 0.5 mgL<sup>-1</sup>) and ABA (0.4, 0.2 and 0.1 mgL<sup>-1</sup>). The best results were obtained with the treatment that included 0.5 mg L<sup>-1</sup> of kinetin and 0.2 mg L<sup>-1</sup> of ABA, generating 28.57% of mature embryos and 14.29% of oxidation. For the obtaining of microphotographs of callus and somatic embryos different protocols were used, 15 minutes of immersion in HMDS caused the lower cell shrinkage and CB avoided the crystallization in the samples when these were observed in SEM.

### Key words:

- OIL PALM
- *Elaeis guineensis* Jacq.
- SOMATIC EMBRYOS
- MATURATION
- SEM

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Formulación del problema

En el Ecuador, el cultivo de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) es una de los principales fuentes de ingreso en las provincias de Esmeraldas, Los Ríos, Pichincha, Santo Domingo, Sucumbíos y Orellana. De acuerdo con datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) para el año 2006, el área cosechada de fruta de palma en el Ecuador fue de 143 348 hectáreas, con un rendimiento total de 116 715 hectogramo por hectárea y una producción de 1 673 088 toneladas; para el año 2013, estos valores llegaron a 218 833 hectáreas, 105 872 hectogramo por hectárea y 2 316 838 toneladas respectivamente (FAO, 2013).

Según Corley & Tinker (2003) *Elaeis guineensis* Jacq. es una planta monocotiledónea conocida como palma africana o palma de aceite. Esta especie es multiplicada generalmente por semillas de Tenera que es un híbrido proveniente del cruce entre Dura (D) y Pisifera (P). El uso de semillas muestra dificultades debido a que se presentan tasas de germinación relativamente bajas y dificultades en el establecimiento de plántulas. Las variedades Pisifera, Dura y Tenera se distinguen por el espesor de la cáscara de sus frutos. Tenera es preferida para el cultivo comercial debido al alto rendimiento de aceite derivado del tejido de mesocarpio del fruto. Esta planta exhibe dificultades al ser multiplicada por métodos convencionales de propagación vegetativa *in vivo* debido a que presenta un solo punto de crecimiento apical. Tiene un sistema reproductivo de tipo alógamo (polinización cruzada y fecundación entre individuos genéticamente diferentes), por lo cual se obtiene una población genéticamente heterogénea y heterocigota para las características de interés, de esta manera se imposibilita la multiplicación de individuos élite con el uso de semillas (Rey *et al.*, 2004).

Según Rees *et al.*, (2009), existen dos enfermedades principales que amenazan a la palma de aceite. En el 2009 en el sudeste de Asia, aproximadamente el 60% de las plantaciones de Malasia fueron atacadas por la enfermedad de pudrición basal que es causada por los hongos de pudrición blanca del género *Ganoderma* spp. Viñas & Jiménez (2011) han reportado que en Latinoamérica, la pudrición del cogollo es responsable de pérdidas importantes e incluso de la desaparición de plantaciones en países como Panamá, Colombia, Brasil, Surinam y Ecuador. De acuerdo a Rivas & Herrera (2015), la sintomatología de la enfermedad se presenta como clorosis y doblamiento en las hojas jóvenes, además de necrosis de los folíolos. La pudrición llega a alcanzar el punto de crecimiento y de esta manera causa la muerte de la planta. Los principales géneros fúngicos asociados a esta enfermedad son: *Fusarium* spp.; *Trichoderma* sp.; *Diplodia* sp.; *Chalaropsis* sp; *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp.; siendo el primero el que causa más problemas.

Según datos de la Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Africana (ANCUPA), en el 2014 se reportó que la enfermedad de la pudrición del cogollo ha llegado a perjudicar 15 000 hectáreas de plantaciones en el cantón San Lorenzo (Esmeraldas) en los últimos cinco años, afectando a 4000 palmicultores razón por la cual el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) declaró en estado de emergencia al sector palmero de Esmeraldas en ese año (PROEcuador, 2014). Por estas razones es imprescindible la aplicación de otra forma de multiplicación de esta planta; el cultivo *in vitro* es una alternativa para la generación a gran escala de plantas libres de enfermedades, mediante la selección de una planta madre élite. En este contexto, la mejor forma de realizar la micropropagación de esta especie es por medio de embriogénesis somática ya que se ha demostrado que por esta vía se puede llegar a obtener la mayor cantidad de plantas (Smith, 2013).

Esta investigación pretende ampliar el conocimiento sobre el crecimiento de callo así como el desarrollo de embriones somáticos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) hasta la etapa de maduración para luego observarlos en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), con lo cual se podría aportar información referente a la morfología y

posibles características necesarias que inducen a la germinación de embriones somáticos para la generación de plantas, con el fin de ser una base para futuras investigaciones relacionadas a esta especie.

## **1.2. Justificación**

La Palma Aceitera es una de las fuentes de aceite vegetal más importantes a nivel mundial ya que su rendimiento anual por una unidad de área es de hasta 7-10 veces más que la de cualquier otro tipo de cultivo oleaginoso y se estima que alcanzará los 240 millones de toneladas en 2050. El aceite de palma es un aceite comestible con la fuente más rica de carotenoides y tocotrienoles. Por esta razón es usado en varias industrias como alimentos, panadería, jabón, cosméticos, productos farmacéuticos, además de su prometedor uso en la producción de biocombustibles. El Ecuador es el cuarto productor regional de aceite de palma; Costa Rica, Colombia y Brasil ocupan el primer, segundo y tercer lugar respectivamente (Basiron, 2007).

De acuerdo con datos de la Fundación de Fomento de Exportaciones de Aceite de Palma (FEDAPAL), la Palma Aceitera abarca una superficie sembrada que representa el 4,2% de la superficie total de la producción agropecuaria. Es uno de los principales cultivos en Ecuador debido a que ha llegado a ser una actividad social y económica que genera empleos directos e indirectos. ANCUPA afirma que, en el 2014 el Ecuador contaba con 7000 palmicultores, 87% de los cuales formaba parte de los pequeños productores con menos de 50 hectáreas, generándose así 75000 empleos directos y 100000 empleos indirectos (PROECUADOR, 2014).

La inversión agrícola en el cultivo de esta especie ha llegado a superar los \$1260 millones, por parte de las extractoras de aceite ha alcanzado los \$250 millones, mientras que por parte del sector industrial de grasas y aceites se ha obtenido \$320 millones (PROECUADOR, 2014). Con toda esta inversión, en el 2015 se obtuvo una producción

mundial de 206,37 millones de toneladas métricas. La Palma Aceitera habita en regiones tropicales con una precipitación media anual de alrededor de 1780 a 2280 mm y temperatura que varía de 24 a 30 °C. El crecimiento de esta planta es suprimida a temperaturas debajo de 15 °C (Corley & Tinker, 2003).

De acuerdo a datos de ANCUPA en el Ecuador para el año 2001 se sembraron aproximadamente 15 mil hectáreas, en el 2013 se registraron 218 mil hectáreas representando el 1% del área mundial cosechada. En el Ecuador todavía no se generan plantas de palma mediante embriogénesis somática, de manera que es una opción para la generación de nuevas empresas proporcionando así otra fuente de empleos e ingresos (Maldonado, 2015).

La multiplicación *in vitro* de la Palma Aceitera ha sido investigada principalmente en Malasia e Indonesia ya que son los principales productores de su aceite, contribuyendo con cerca del 85% de la producción global. El cultivo *in vitro* es una técnica de reproducción masiva que presenta ventajas frente a los métodos tradicionales, de esta manera no se requiere de la germinación de semillas y además las plantas resultantes tienen las mismas características de una planta madre previamente seleccionada debido a su producción y a la gran resistencia a enfermedades (Viñas & Jiménez, 2011).

Según Hardon *et al.*, (1987), el uso de clones puede aumentar el rendimiento hasta un 30% más que el que se podría obtener con las semillas de los híbridos D x P. De acuerdo a Konan *et al.*, (2016), el método clave para la multiplicación clonal de la palma de aceite es el generado a través de embriogénesis somática a partir de explantes de hoja. Estos explantes son cultivados para la inducción de callo embriogénico en medios con alta concentración de auxinas, los subcultivos posteriores en medios libres de auxinas conduce a la formación de embriones. Suranthran *et al.*, (2012) afirma que para alcanzar el máximo potencial de rendimiento de las palmas y para obtener plantas uniformes de las palmas élite, se debe seguir el método de propagación *in vitro*.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Obtener y madurar embriones somáticos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir de callos mediante cultivo *in vitro* para su futura germinación.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Determinar un medio de cultivo adecuado para la obtención de embriones somáticos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.).
- Establecer un medio de cultivo para la maduración de embriones somáticos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.).
- Observar microfotografías de callos y embriones somáticos en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) para análisis morfológico del desarrollo embriogénico de la Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.).

### **1.4. Marco teórico**

#### **1.4.1. Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.)**

##### **1.4.1.1. Origen y distribución**

Según Hartley (1977), el género *Elaeis* de la familia *Arecaceae* fue introducida en 1763 en la clasificación botánica por Nicholas Joseph Jacquin, quien describió a *Elaeis guineensis* Jacq. La palabra griega -oil "ελαιου", transcrita como "elaion," dio el nombre de género.

De acuerdo con Bakoumé *et al.*, (2015), al analizar la diversidad genética se sugiere que se podría separar a las poblaciones silvestres en tres grupos ubicados al oeste de África, en el África ecuatorial y en la isla de Madagascar. Se encontró la mayor diversidad alélica entre las poblaciones de palma de Nigeria, lo cual indica el posible centro de origen.

#### 1.4.1.2. Clasificación taxonómica

El género *Elaeis* comprende dos especies taxonómicamente diferenciadas, la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) y la palma de aceite americana (*Elaeis oleifera*). Según Barcelos *et al.*, (2015), la palma de aceite se clasifica taxonómicamente como sigue:

- Reino: Plantae
- Subreino: Viridiplantae
- Superdivisión: Embryophyta
- División: Tracheophyta
- Subdivisión: Spermatophytina
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Rosidae
- Superorden: Lillanae
- Orden: Arecales
- Familia: Arecaceae
- Género: *Elaeis*

- Especie: *Elaeis guineensis*.

### 1.4.1.3. Características Morfológicas

Los árboles de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) pueden medir de 15-18 metros de altura, e incluso hasta los 30 metros (Figura 1), para fines comerciales la palma es replantada cuando alcanza los 12-15 metros para la cosecha. Las hojas pueden medir 8 metros de longitud. Para que los primeros primordios foliares se expandan totalmente necesitan 2 años (Corley & Tinker, 2003).



**Figura 1. Palma Aceitera**

**Fuente: (Torres & Morales, 2012).**

El tallo en la parte central tiene la yema apical que produce la hoja compuesta por el peciolo, raquis y foliolos. El peciolo tiene una longitud de 1,3 a 2,5 metros

aproximadamente, es triangular en la sección transversal con bordes espinosos. El raquis mide de 5,5 a 7 metros de longitud teniendo de 300 a 400 foliolos. Tiene un sistema de raíces fibroso con 6000 a 10000 raíces primarias que alcanzan los 20 metros (Janick & Paull, 2008).

La palma de aceite es una especie monoica que produce inflorescencias unisexuales femeninas y masculinas en un ciclo alternativo. La inflorescencia masculina (Figura 2) tiene un pedúnculo o eje central de 40 centímetros que lleva de 100 a 300 espigas de 10 a 30 centímetros de longitud cada una. Las espigas tienen de 400 a 1500 flores masculinas sésiles con seis estambres cada uno de ellos con anteras bilobuladas. Las inflorescencias femeninas (Figura 3) tienen un pedúnculo más corto y más grueso que lleva 150 espigas y tienen de 5 a 30 flores cada una. Las flores femeninas tienen una bráctea espinosa que le protege, además de dos brácteas florales y dos verticilos de tres periantos cada uno. Esta inflorescencia crece en racimos que presentan de 200 a 4000 frutos y madura en 5-6 meses después de la polinización. El fruto (Figura 4) de esta planta es una drupa sésil y ovoide aunque también puede ser alargado y redondeado, según el origen del material genético. La fruta se compone de una pulpa (mesocarpio), un endocarpio (cáscara) y una almendra. La cáscara encierra el embrión y endospermo (Corley & Tinker, 2003; Janick & Paull, 2008).



**Figura 2. Inflorescencia masculina de Palma Aceitera.**

**Fuente: (Infoagro Systems, 2016).**



**Figura 3. Inflorescencia femenina de Palma Aceitera.**

**Fuente: (Infoagro Systems, 2016).**



**Figura 4. Fruto de Palma Aceitera**

**Fuente: (Torres & Morales, 2012).**

#### 1.4.1.4. Usos

De la Palma Aceitera se puede utilizar toda la planta. Como materia prima se usa el tronco y las hojas de la planta para producir muebles y pulpa de papel respectivamente. El fruto de la palma produce aceite de palma y aceite de almendra. El primero se obtiene del mesocarpio de la fruta y el segundo de la almendra. Teóricamente de un racimo de palma se obtiene aproximadamente 20-25% de aceite de palma y de 3-5% de aceite de almendra (aceite de palmiste). Para la producción de alimentos y oleoquímicos se utilizan los aceites de palma y de palmiste que se obtienen del fruto de la palma (Garcés & Cuéllar, 1997).

Por otra parte, los principales subproductos que se obtiene del aceite de palma son la estearina y la oleína que se usan en la industria alimenticia. La estearina es la fracción más sólida y la oleína es una fracción líquida; la primera es una fuente muy útil de componentes de grasas duras, mientras que la segunda se mezcla perfectamente con cualquier aceite. Con un fraccionamiento adicional se obtienen ácidos grasos y alcoholes que son productos intermedios usados en la industria de alimentos y en la industria oleoquímica principalmente detergentes, cosméticos, lubricantes, plásticos, farmacéuticos y de jabones por el contenido de ácido palmítico. El aceite crudo de palma se puede usar como un sustituto del diésel, como lodo de perforación en pozos. Se ha demostrado que el aceite de palma epoxidado puede ser usado como estabilizante y plastificante para el PVC (Garcés & Cuéllar, 1997).

Otro producto de la industria del aceite de palma como lo es el caroteno en el aceite crudo de palma, ha sido procesado en suplemento de vitamina A. La harina de la almendra de palma que se obtiene de la molienda tiene uso en alimentación animal en tanto que la fibra residual del racimo se puede usar directamente como abono orgánico o procesado en compost. La Palma Aceitera tiene 50% de ácido grasos saturados y 50% de ácidos grasos insaturados. El principal componente en ácidos grasos saturados es el ácido palmítico (41,8%) que tiene a su vez componentes monoinsaturados (ácido oleico,

40%) así como polinsaturados (ácido linoleico, 10%). Además presenta antioxidantes como los carotenos y tocoles que le proporcionan propiedades anticancerígenas y contra la arteroesclerosis (Janick & Paull, 2008).

#### **1.4.2. Cultivo *in vitro***

De acuerdo a Cameron (2013), el cultivo de tejidos consiste en tomar un explante (porción de planta), y colocarlo en un medio bajo condiciones estériles, este medio contiene una composición química conocida y se incuba bajo condiciones ambientales definidas. Esta técnica se puede aplicar entre otras cosas en estudios de fisiología, genética y otras ramas de manera básica, además de la bioconversión y producción de compuestos de interés, también en el incremento de la variabilidad genética, así como en la obtención y propagación de plantas libres de patógenos (Roca & Mroginski, 1993).

El éxito del cultivo *in vitro* depende de muchos factores, entre ellos los que se destacan son: la edad de la planta (debido al mayor potencial de regeneración que presentan las más jóvenes), el tipo de explante ya que la elección de este depende del objetivo que se quiera lograr y de la especie que será utilizada, además es importante considerar el tamaño del explante, el genotipo y las condiciones ambientales, otro factor importante es el sistema de regeneración que se emplee debido a que este básicamente depende de los objetivos que se pretendan alcanzar con la técnica de cultivo *in vitro* (Roca & Mroginski, 1993).

La propagación vegetativa de plantas es la aplicación del cultivo *in vitro* más usada. Hay 3 formas por las cuales se puede realizar la micropropagación: por brotación axilar, produciendo brotes adventicios directa o indirectamente vía callo y por medio de embriogénesis somática directa o indirecta. La primera forma produce el menor número de plantas pero estas son iguales a la original mientras que la embriogénesis somática puede producir la mayor cantidad de plantas pero esta no es inducida en todas las especies (Smith, 2013).

Cuando ya se ha determinado los objetivos que se pretenden alcanzar con el cultivo *in vitro*, se debe tener en cuenta los componentes del medio de cultivo, dentro de los cuales además del agua, se tiene los siguientes (Roca & Mroginski, 1993):

**Fuente de carbono.-** Las células vegetales en un cultivo *in vitro* generalmente no son activadas fotosintéticamente por lo que requieren carbohidratos como fuente de carbono, entre los más comunes están la sacarosa o la glucosa, sin embargo, la fructosa y el almidón también pueden ser usados pero en menor cantidad. Por otra parte se ha encontrado que el mioinositol genera un mayor crecimiento de callos y suspensiones celulares (Smith, 2013).

**Nutrientes minerales.-** En este grupo se incluyen los macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), los cuales son considerados esenciales para el crecimiento de plantas enteras, estos elementos se suministran en distintas formas pero de forma cualitativa. Los medios de cultivo aportan los mismos macro y microelementos (Roca & Mroginski, 1993).

**Vitaminas.-** Las vitaminas tiene funciones catalíticas en reacciones enzimáticas y pueden mejorar la respuesta celular, la vitamina que se considera más importante para la planta es la tiamina (Vitamina B1), además del ácido nicotínico (Vitamina B3) y la piridoxina (Vitamina B6) (Smith, 2013).

**Reguladores de crecimiento.-** Las hormonas vegetales más usadas son: ácido abscísico (ABA), ácido 3 indol acético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 3-indolbutírico (AIB), 6-furfurilaminopurina (kinetina), 6- bencilaminopurina (6-BAP), ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (Smith, 2013).

**Agente gelificante.-** Permite al medio de cultivo tomar una consistencia semisólida que funciona como soporte del explante; se adiciona agar desde un 0,6% hasta un 1%. El tipo de agar utilizado para gelificar el medio debe ser purificado para minimizar los problemas de impurezas. La marca comercial y concentraciones usadas en la preparación del medio de cultivo pueden alterar la respuesta de los explantes. Los

medios de cultivo pueden solidificarse con agarosa, agar, gelrite, phytigel, (Roca & Mroginski, 1993).

#### **1.4.2.1. Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática es un método de propagación *in vitro* con el cual se logra producir plantas a partir de células diploides sin fusión de gametos. En este proceso, las células somáticas sufren una reprogramación y empiezan a diferenciarse en un embrión. Para que esto ocurra se debe producir un cambio en el patrón de expresión génica, es muy probable que esto se deba a factores epigenéticos como metilación del ADN o por compactaciones o descompactaciones en la disposición de la cromatina (Viñas & Jiménez, 2011).

La embriogénesis somática puede ocurrir *in vitro* de dos maneras: indirectamente, donde se necesita de células desdiferenciadas obtenidas a partir de un explante con una fase intermedia caracterizada por la formación de callo; y, de forma directa, a partir del tejido madre sin que este sufra una etapa de callogénesis (Pádua *et al.*, 2013).

#### **1.4.2.2. Etapas de la embriogénesis somática**

Según Viñas & Jiménez (2011), el proceso de embriogénesis somática indirecta se divide en 4 etapas de forma general (callo proembriogénico, desarrollo proembriogénico, maduración de proembriones y desarrollo de embriones), en cada una de las cuales es necesario una variación en los fitorreguladores, las condiciones de cultivo o incluso el medio de cultivo. El detalle de las etapas se indica a continuación:

**Callo proembriogénico:** se produce una división celular asimétrica, debido a la presencia de auxinas; también se produce una acidificación del citoplasma y de la pared celular en las células con capacidad embriogénica.

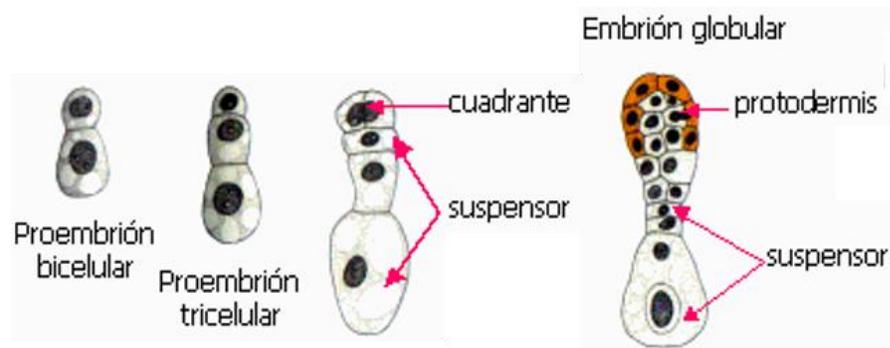
**Desarrollo proembriogénico:** en esta etapa, los reguladores de crecimiento estimulan el crecimiento del callo proembriogénico generado en la etapa anterior.

**Maduración de proembriones:** Los embriones somáticos comienzan a acumular productos de reserva. En esta etapa se fomenta la conversión de proembriones a embriones somáticos.

**Desarrollo de embriones:** Se estimula el crecimiento de los embriones que pasan por las etapas: globular, escutelar y coleoptilar, para finalmente generar plantas.

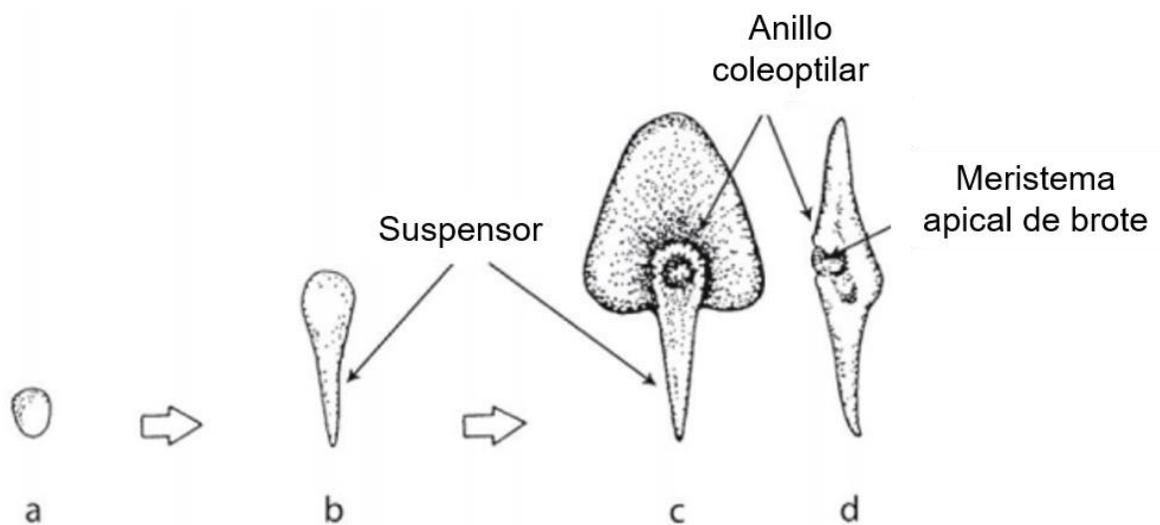
### **1.4.2.3. Desarrollo de los embriones somáticos en monocotiledóneas**

Según García *et al.*, (2016), la embriogénesis somática en monocotiledóneas abarca las etapas: globular, escutelar y coleoptilar; en estas plantas, el embrión no pasa por las fases de corazón y torpedo como ocurre en las dicotiledóneas. De acuerdo con Raven *et al.*, (2013) el desarrollo comienza con el proembrión que se divide en dos células, la célula basal que se divide para formar el suspensor (participa en la nutrición del embrión) y la célula terminal que se divide para formar lo que se conoce como el cuadrante (4 células) y posteriormente el octante (8 células), divisiones posteriores forman el embrión globular que tiene un total de 64 células (ver figura 5). García *et al.*, (2016), afirman que en la fase escutelar se forma el cotiledón (escutelum) que se desarrolla apicalmente. En la fase coleoptilar se encuentra el ápice caulinar ubicado a un lado del cotiledón en el anillo coleoptilar. En la figura 6 se pueden ver la representación esquemática de las etapas del desarrollo del embrión en una monocotiledónea.



**Figura 5. Formación del embrión globular en monocotiledónea.**

**Fuente: (Modificado de Raven, 2013).**



**Figura 6. Fases del desarrollo de un embrión en monocotiledónea. (a) Vista frontal del proembrión. (b) Vista frontal del embrión en etapa escutelar. (c) Vista frontal del embrión en etapa coleoptilar. (d) Vista esquemática del embrión en estado coleoptilar.**

**Fuente: (Modificado de Raghavan, 2006).**

### 1.4.3. Análisis microscópico

### **1.4.3.1. Microscopio electrónico de barrido (SEM)**

Según Lešer *et al.*, (2009), la primera evidencia de la observación de muestras biológicas en el SEM se remonta a 1993, en donde se observó la morfología de artrópodos. Existen muchos métodos de preparación de las muestras, la fijación química sigue siendo el método más usado para la conservación de los especímenes. El primer paso en la preparación de las muestras es la fijación, en donde el glutaraldehído es el fijador más usado aunque también se usa una combinación de glutaraldehído y formaldehído. De acuerdo con Zhou & Wang (2007), el glutaraldehído reacciona con el nitrógeno de los aminoácidos en proteínas adyacentes liberando dos moléculas de agua y uniendo las cadenas de péptidos. Sin embargo en algunos casos es necesario un proceso de postfijación, en donde el tetraóxido de osmio es generalmente usado ya que conserva muchos lípidos y además puede estabilizar proteínas transformándolas en geles transparentes. El siguiente paso en el proceso de preparación de las muestras es la deshidratación; aquí se usa series gradientes de etanol o acetona hasta el etanol o acetona absoluto. Luego se realiza el secado de las muestras en donde se destacan los procedimientos como el secado de punto crítico, el secado por congelación, el uso de hexametildisilazano (HMDS) o la liofilización. El tiempo de inmersión en cada sustancia y su selección varía dependiendo del tipo de muestra. Finalmente las muestras son recubiertas con una capa conductora generalmente de oro de aproximadamente 20 nm y son observadas al microscopio (Lešer *et al.*, 2009).

### **1.4.3.2. Usos y resolución del Microscopio electrónico de barrido**

El SEM es un instrumento que permite la examinación y análisis de las características microestructurales, morfológicas y composición química de una muestra sólida. Permite el análisis de muestras relacionadas con la ciencia de materiales y ciencias biológicas. Este tipo de microscopio electrónico permite la observación de

muestras en tres dimensiones a diferencia del microscopio electrónico de transmisión (TEM) en el cual no se puede observar el espesor de la muestra (Zhou & Wang, 2007).

El límite de resolución se define como la distancia mínima requerida para que dos estructuras puedan ser separadas y todavía aparecer como dos estructuras distintas. Ernst Abbe determinó que este límite depende de la longitud de onda de la fuente de iluminación. El SEM utiliza un haz de electrones enfocados, el cual le permite escanear la superficie de la muestra generando de esta manera un gran número de señales las cuales son convertidas a una señal visual que aparecen en un tubo de rayos catódicos (Zhou & Wang, 2007).

### **1.5. Sistema de hipótesis o pregunta de investigación**

Se puede inducir a la formación y maduración de embriones somáticos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) mediante una combinación adecuada de reguladores de crecimiento.

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Localización del ensayo**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología y en el Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, localizados en Sangolquí, Av. General Rumiñahui, s/n, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, 0° 18,81 S; 78° 26,64 O; a una altitud de 2516 msnm.

### **2.2. Fase de cultivo *in vitro***

Se utilizó 25 frascos con un total de 5 g de callos de *Elaeis guineensis* Jacq. proporcionados por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, localizada en Sangolquí, Av. General Rumiñahui, s/n, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, 0° 18,81 S; 78° 26,64 O; a una altitud de 2516 msnm. Los callos proporcionados se obtuvieron de explantes de hojas de la plantación Palmar del Rio, ubicada en la provincia de Orellana, 0° 19 S; 77° 04 W, a una altitud de 280 msnm.

### 2.2.1. Proliferación de callos de Palma Aceitera

Se utilizó el protocolo de Maldonado (2015), en el que se colocó porciones de los callos en un medio Murashige & Skoog (1962) ajustado a un pH de 5.75 y suplementado con 5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0.1 mg L<sup>-1</sup> de kinetina, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.8 g L<sup>-1</sup> de phytigel. En la tabla 1 se muestran los componentes del medio Murashige & Skoog (1962).

**Tabla 1.**  
**Componentes del medio de Cultivo Murashige & Skoog (1962).**

<b>Componente</b>	<b>Concentración en el medio de cultivo</b>
<b>Micro Elementos</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
FeNaEDTA	36.7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
KI	0.83
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> °	0.25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
<b>Macro Elementos</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
CaCl <sub>2</sub>	332,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub>	180,54
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
<b>Vitaminas</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
Glicina	2
Mio-Inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
HCl piridoxina	0.5
Tiamina HCl	0.1

Se utilizó 25 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio de 200 mL los cuales fueron esterilizados a 121°C durante 30 minutos. La siembra de los callos se realizó dentro de la cabina de flujo laminar marca ESCO modelo SHC-4A2, en condiciones totalmente asépticas, con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación. Debido a que el 2,4-D es fotosensible, los callos subcultivados se incubaron en oscuridad a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C y una humedad relativa  $50\% \pm 2$ . Se realizó un cambio de medio cada mes y se multiplicó las porciones de callos durante cuatro meses.

### **2.2.2. Iniciación de embriones somáticos de Palma Aceitera**

Se utilizó callos propagados en la fase de proliferación. En el proceso de iniciación de embriones somáticos se siguió el protocolo descrito por Maldonado (2015), empleando un medio Murashigue y Skoog (1962), modificando las concentraciones de 2,4-D y de kinetina. El objetivo de esta fase fue determinar la mejor combinación de auxina: citoquinina para la obtención del mayor número de callos con embriones somáticos.

#### **2.2.2.1 Efecto de la influencia del 2,4-D y de kinetina en la iniciación de embriones somáticos**

El material vegetal fue sembrado en un medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) utilizado por Maldonado (2015), ajustado a un pH de 5.75 y suplementado con  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa como fuente de carbono,  $2.8 \text{ g L}^{-1}$  de phytigel como agente gelificante y para los tratamientos se utilizaron diferentes concentraciones de los fitorreguladores 2,4-D y kinetina, los cuales se observan en la tabla 2. Se dispuso 25 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio de 200 mL los cuales fueron esterilizados a 121°C durante 30 minutos.

**Tabla 2.**  
**Tratamientos de medios de cultivo con fitorreguladores para la etapa de iniciación**

Tratamiento	Concentración de 2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	Concentración de kinetina (mgL <sup>-1</sup> )
I0	0	0
I1	1	0,2
I2	1	0,1
I3	1	0,05
I4	2	0,2
I5	2	0,1
I6	2	0,05

La siembra de los callos se realizó dentro de la cabina de flujo laminar en condiciones totalmente asépticas, con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación. Para cada tratamiento se cultivó 1 fragmento de callo con un peso entre 0,2 y 0,3 g (Figura 7) y se colocó en el centro del medio de cultivo (Figura 8). Para pesar el callo se utilizó una balanza de marca Precisa, modelo XT 320M. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento, y se consideró a un frasco con 1 callo como unidad experimental.



**Figura 7. Fragmento de callo de Palma Aceitera con un peso inicial de 0,281 g.**



**Figura 8. Disposición del callo en el medio de cultivo.**

Una vez que los callos fueron sembrados, se incubaron los frascos a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C en condiciones de oscuridad y humedad relativa  $50\% \pm 2$ . Se realizó un cambio de medio cada mes y se evaluaron las siguientes variables a los dos meses de iniciada la siembra:

- **Presencia de embriones somáticos:** se evaluaron cada uno de los frascos mediante observación en el estereoscopio de marca Leica, modelo S4E y se asignó el valor de 1 al callo que presentaba embrión somático y con el valor de 0 si no lo presentaba.
- **Número de embriones somáticos:** Se observó en el estereoscopio cada uno de los frascos y se registró el número de embriones somáticos formados en cada frasco.
- **Tipo de callo:** según Pádua *et al.*, (2013), el callo que tiene potencial embriogénico es el callo tipo 3. Donde el callo tipo 1 está formado por células alargadas y translúcidas; en tanto que el tipo 2, tiene células desiguales y translúcidas; el tipo 3 en cambio es globular y beige, mientras que el tipo 4 es globular y blanco. Por lo cual se evaluó por observación en el estereoscopio si un callo presentaba las características

del callo tipo 3 y se le asignó el valor de 1 mientras que si el callo no las presentaba se le asignó el valor de 0.

Los tratamientos que se usaron en esta fase fueron evaluados mediante análisis estadístico y exploratorio de datos. Se evaluó además si los datos siguen una distribución paramétrica, para lo cual se utilizó un análisis inferencial mediante el análisis de varianza (ANOVA) con sus supuestos: gráfica de Q-Q plot y la prueba de Shapiro-Wilks modificado; si al utilizar las pruebas se comprueba que los datos no siguen una distribución paramétrica se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Para el desarrollo del análisis estadístico se utilizó el software InfoStat.

### **2.2.3. Maduración de embriones somáticos de Palma Aceitera**

Se utilizó el medio de cultivo Murashige & Skoog (1962), para la maduración de los embriones somáticos usado por Sumaryono *et al.*, (2008), modificando las concentraciones de kinetina y ABA.

#### **2.2.3.1 Efecto de la influencia de kinetina y ABA en la maduración de los embriones somáticos de Palma Aceitera**

El protocolo que se realizó se basó en el medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) ajustado a un pH de 5.75 y suplementado con 0,01 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa como fuente de carbono, 2.8 g L<sup>-1</sup> de phytigel como agente gelificante y para los tratamientos se utilizaron diferentes concentraciones de los fitorreguladores kinetina y ABA dando un total de seis tratamientos, los cuales se observan en la tabla 3. Se dispensó 25 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio de 200 mL los cuales fueron esterilizados a 121°C durante 30 minutos.

**Tabla 3.**  
**Tratamientos de medios de cultivo con fitorreguladores para la etapa de maduración de embriones somáticos.**

Tratamiento	Concentración de kinetina ( $\text{mgL}^{-1}$ )	Concentración de ABA ( $\text{mgL}^{-1}$ )
M0	0	0
M1	1	0,4
M2	1	0,2
M3	1	0,1
M4	0,5	0,4
M5	0,5	0,2
M6	0,5	0,1

Los embriones somáticos obtenidos en la etapa anterior fueron sembrados dentro de la cabina de flujo laminar en condiciones totalmente asépticas, con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación. Para cada tratamiento se colocaron 3 embriones somáticos en el centro del medio de cultivo (Figura 9) y se realizaron 7 repeticiones por tratamiento considerando a un frasco con 3 embriones somáticos como unidad experimental.



**Figura 9. Disposición de los embriones somáticos en el medio de cultivo.**

Una vez que los embriones somáticos fueron sembrados, se incubaron los frascos a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C y un fotoperíodo de 16/8 (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), humedad relativa  $50\% \pm 2$ . Se realizó un cambio de medio cada mes y se evaluaron las siguientes variables al finalizar el segundo mes de iniciados los tratamientos:

- **Fase de desarrollo del embrión:** se evaluaron cada uno de los frascos mediante observación en el estereoscopio y se midió los embriones somáticos con ayuda de una regla. Se caracterizó la madurez del embrión asignando el valor de 1 a los embriones pequeños, 2 a los medianos, 3 a los largos y 4 a los muy largos (maduros), de acuerdo a la clasificación propuesta por Al-Khayri & Al-Bahrany (2012) como se observa en la tabla 4.

**Tabla 4.**  
**Etapas de desarrollo de los embriones somáticos de Palma con su respectivo tamaño y características de acuerdo a Al-Khayri & Al-Bahrany (2012).**

<b>Fase de desarrollo del embrión</b>	<b>Características</b>	<b>Longitud del embrión (cm)</b>
Pequeños	Embriones globulares	< 0,3
Medianos	Embriones bipolares	0,3 - 0,59
Largos	Embriones bipolares elongados con los polos definidos	0,6- 0,8
Muy largos (Maduros)	Embriones con el polo de la raíz elongada bipolares elongados	> 0,8

- **Oxidación:** Se evaluó por observación si un embrión somático presentaba oxidación y se asignó el valor de 1 mientras que si no presentaba oxidación se le asignó el valor de 0.

Los tratamientos que se usaron en esta fase fueron evaluados mediante análisis estadístico y exploratorio de datos. Se evaluó además si los datos siguen una distribución paramétrica, para lo cual se utilizó un análisis inferencial mediante el análisis de varianza (ANOVA) con sus supuestos: gráfica de Q-Q plot y la prueba de Shapiro-Wilks modificado; si al utilizar las pruebas se comprueba que los datos no siguen una distribución paramétrica se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Para el desarrollo del análisis estadístico se utilizó el software InfoStat.

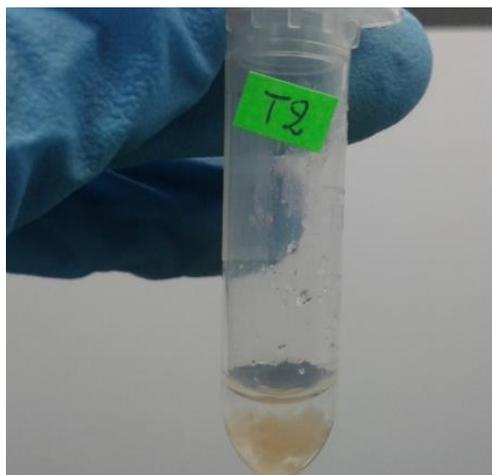
### **2.3. Fase de Análisis celular de callos y embriones somáticos de Palma Aceitera en el Microscopio Electrónico de barrido (SEM)**

Se utilizó 15 frascos de callos y 10 frascos de embriones somáticos de *Elaeis guineensis* Jacq. y se realizó los procedimientos de preparación y observación de las muestras en el Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

#### **2.3.1. Experimento 1: Efecto del tiempo de postfijación química con tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 1%**

La preparación del material vegetal fue realizado en base al protocolo utilizado por Palanyandy *et al.*, (2013), el mismo que fue modificado como sigue: se colocaron las muestras en tubos eppendorf y se prefijaron con 250 µL de 4% de glutaraldehído en tampón fosfato salino 0,1 M (pH 7,2) a temperatura ambiente durante 2 horas (Figura 10). Se retiró el glutaraldehído de cada tubo eppendorf y las muestras fueron postfijadas con 250 µL de OsO<sub>4</sub> 1% durante 2, 4 y 6 horas (tabla 5), generando 3 tratamientos.

Después se retiró el  $\text{OsO}_4$  y se enjuagaron con tampón fosfato salino 0,1 M (pH 7,2) tres veces durante 30 minutos cada vez. Se realizó una deshidratación gradual con una serie creciente de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 99%) por 30 minutos y fueron liofilizadas a  $-62^\circ\text{C}$  y vacío de 1,2 Pa por 24 horas en Freeze Dryer iLShin BioBase. Al finalizar el proceso se colocaron sobre una base con cinta doble adherente, para realizar el recubrimiento iónico metálico con 20 nm de oro por dos minutos (Figura 11) utilizando el Sputtering System Q150R ES, finalmente se observó en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) marca TESCAN, modelo MIRA3.



**Figura 10. Prefijación con 250  $\mu\text{L}$  de 4% de glutaraldehído en tampón fosfato salino 0,1 M (pH 7,2).**



**Figura 11. Recubrimiento con 20 nm de oro por 2 minutos.**

Se realizaron seis repeticiones para cada tratamiento y se estudió el efecto del tiempo de postfijación con  $\text{OsO}_4$  1% en muestras de callos y embriones somáticos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) utilizando 3 tiempos de inmersión en el postfijador como se puede ver en la tabla 5.

**Tabla 5.**  
**Tratamientos de postfijación con  $\text{OsO}_4$  1% para la etapa de observación de callos y embriones somáticos en el Microscopio Electrónico de barrido (SEM).**

Tratamiento	Tiempo de Post-fijación con $\text{OsO}_4$ (h)
S0	0
S1	2
S2	4
S3	6

La variable que se evaluó fue:

**Lisis celular.**- se realizó la observación de las muestras en el SEM y se asignó el valor de 1 a la muestra que presentó lisis celular y el valor de 0 a la muestra que no la presentó.

### **2.3.2. Experimento 2: Efecto del tiempo de inmersión y del buffer (fosfato salino, cacodilato de sodio) utilizado en la fijación de las muestras**

Para la preparación del material vegetal se empleó el protocolo utilizado por Palanyandy *et al.*, (2013), el mismo que fue modificado como sigue: se colocaron las muestras en tubos eppendorf y se prefijaron con 250  $\mu$ L de glutaraldehído al 4% ya sea en tampón cacodilato de sodio 0,1 M (pH 6,8) o en tampón fosfato salino 0,1 M (pH 7,2) a temperatura ambiente durante 2 horas y 48 horas. Después las muestras se enjuagaron con el respectivo tampón que se usó en la fijación por tres veces durante 30 minutos cada vez. Se realizó una deshidratación gradual con una serie creciente de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 99%) por 30 minutos. Luego las muestras fueron liofilizadas por 24 horas. Al final del proceso de liofilización se las colocó sobre una base con cinta doble adherente, para realizar el recubrimiento iónico metálico con 20 nm de oro por dos minutos, finalmente se observó en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).

Se realizaron seis repeticiones para cada tratamiento y se estudió el efecto del tiempo de fijación y el buffer utilizado para lo que se usaron 2 tiempos inmersión (2 horas y 48 horas) con el buffer fosfato salino (PBS) y con el buffer cacodilato de sodio (CB), dando un total de 4 tratamientos como se observa en la tabla 6.

**Tabla 6.**  
**Tratamientos de fijación de las muestras con dos tiempos de inmersión (2 y 48 horas) y dos buffers (fosfato salino, cacodilato de sodio).**

Tratamiento	Tiempo de inmersión (h)	Buffer de fijación (PBS o CB)
E0	0	0
E1	2	PBS
E2	48	PBS
E3	2	CB
E4	48	CB

La variable que se evaluó fue:

**Cristalización.**- se realizó la observación de las muestras en el SEM y se asignó el valor de 1 a la muestra que presentó cristalización y el valor de 0 a la muestra que no presentó cristalización.

### 2.3.3. Experimento 3: Efecto del tiempo de inmersión en Hexametildisilazano (HMDS) en el secado de las muestras

El protocolo que se usó para la preparación del material vegetal fue el indicado por Palanyandy *et al.*, (2013), el mismo que fue modificado como sigue: se colocaron las muestras en tubos eppendorf y se prefijaron con 250  $\mu$ L de 4% de glutaraldehído en tampón cacodilato de sodio 0,1 M (pH 6,8) a temperatura ambiente durante 2h. Después se retiró el fijador de cada tubo y se enjuagaron las muestras con tampón cacodilato de sodio 0,1 M (pH 6,8) tres veces durante 30 minutos cada vez. Se realizó una deshidratación gradual con una serie creciente de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 99%) por 30 minutos. Para el secado de la muestra se siguió el protocolo descrito por Lee & Chow (2012), para lo cual las muestras se colocaron en tubos eppendorf con 250  $\mu$ L de HMDS por 15, 30 y 45 minutos dando un total de 3 tratamientos como se observa

en la tabla 7. Las muestras se dejaron secar por una noche en un desecador colocado dentro de una cabina extractora de gases. Las muestras fueron entonces colocadas sobre una base con cinta doble adherente, para realizar el recubrimiento iónico metálico con 20 nm de oro por dos minutos, finalmente se observó en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). Se realizaron seis repeticiones para cada tratamiento y se estudió el efecto del tiempo de inmersión en HMDS.

**Tabla 7. Tratamientos de secado de muestras con tres tiempos de inmersión en HMDS (15, 30 y 45 minutos) para la etapa de observación de callos y embriones somáticos en el Microscopio Electrónico de barrido (SEM).**

Tratamiento	Tiempo de inmersión en HMDS (min)
H0	0
H1	15
H2	30
H3	45

La variable que se evaluó fue:

**Plasmólisis.-** Se evaluó el encogimiento celular mediante la observación de las muestras en el SEM y se asignó el valor de 0 a la muestra que presentó encogimiento celular y con el valor de 1 a la muestra que no lo presentó.

Los tratamientos que se usaron en esta última fase fueron evaluados mediante análisis estadístico y exploratorio de datos. Se evaluó además si los datos siguen una distribución paramétrica, para lo cual se utilizó un análisis inferencial mediante el análisis de varianza (ANOVA) con sus supuestos: gráfica de Q-Q plot y la prueba de Shapiro- Wilks modificado; si al utilizar las pruebas se comprueba que los datos no siguen una distribución paramétrica se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Para el desarrollo del análisis estadístico se utilizó el software InfoStat.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1. Fase I: Iniciación de embriones somáticos de Palma Aceitera

Terminado el tiempo de cultivo en el medio de proliferación de callos; estos fueron transferidos a los medios de cultivo de iniciación de embriones somáticos. Durante la etapa de iniciación de embriones somáticos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) se evaluó presencia de embriones somáticos, número de embriones somáticos y tipo de callo a los dos meses de iniciados los tratamientos. Para estos ensayos se usaron 6 tratamientos compuestos por el medio Murashige & Skoog (1962), suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.8 g L<sup>-1</sup> de phytigel y diferentes concentraciones de los fitorreguladores 2,4-D y kinetina.

#### 3.1.1. Presencia de embriones somáticos

##### *Análisis exploratorio*

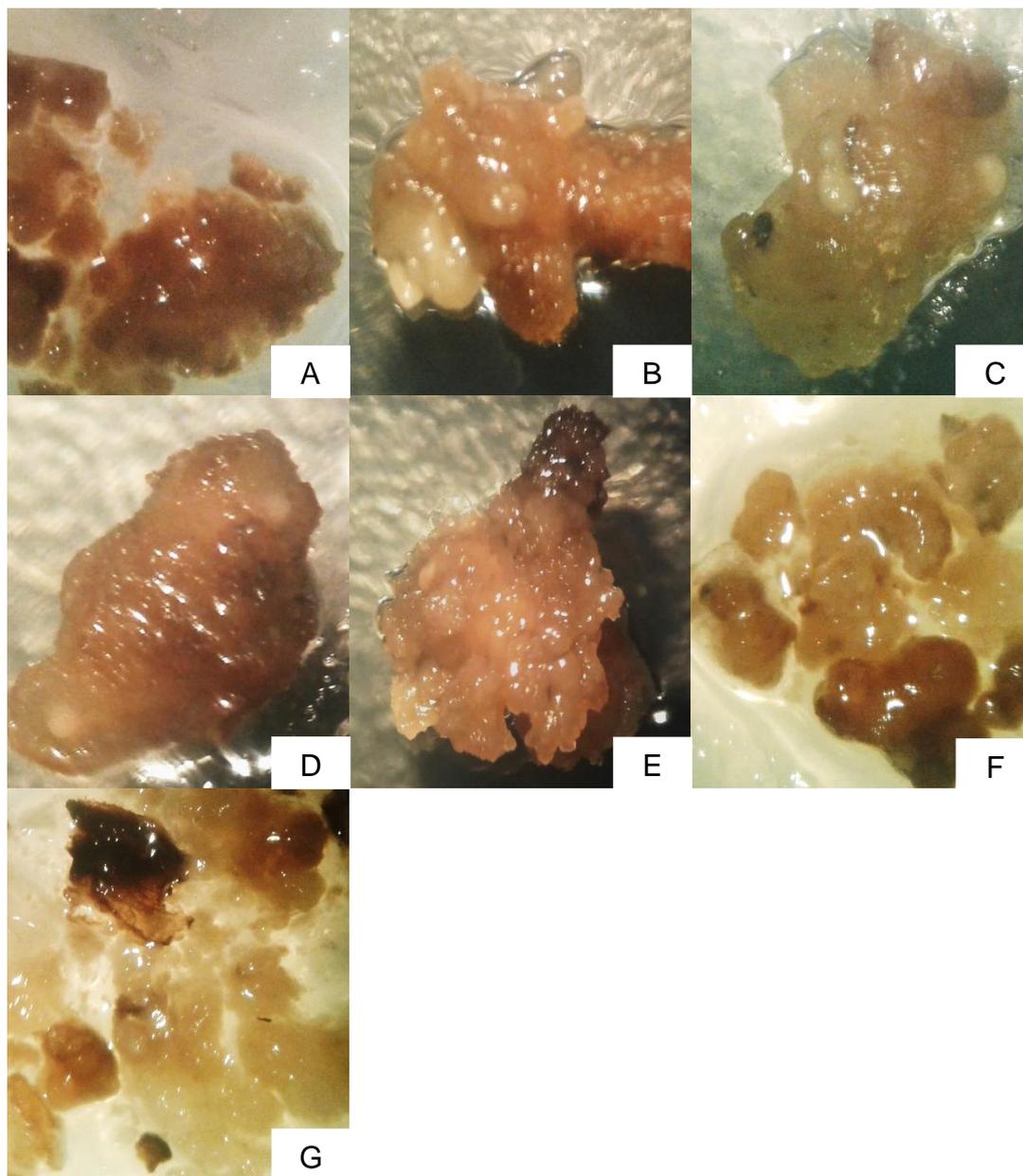
Se observaron cambios morfológicos en los callos a los dos meses de iniciados los tratamientos. La presencia de embriones somáticos se observó en todos los tratamientos lo cual se evidenció por la formación de estructuras globulares o nodulares de coloración blanca o amarillenta (Figura 12).

La tabla 8 muestra el análisis de contingencia de los diferentes tratamientos utilizados en la iniciación de embriones somáticos, con respecto a la presencia de embriones somáticos. El tratamiento sin las fitohormonas 2,4-D y kinetina (Tratamiento I0) no presentó formación de embriones. Se pudo observar que el tratamiento que

presentó el mayor número de callos con embriones somáticos fue el tratamiento compuesto por 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,2 mg L<sup>-1</sup> de kinetina (Tratamiento I1). Los tratamientos que tenían 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 0,1 mg L<sup>-1</sup> de kinetina y 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 0,05 mg L<sup>-1</sup> (Tratamiento I2 e I3 respectivamente) presentaron igual número de callos con embriones somáticos. El tratamiento compuesto por 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y las mismas concentraciones de kinetina antes mencionadas presentaron el menor número de callos con embriones somáticos.

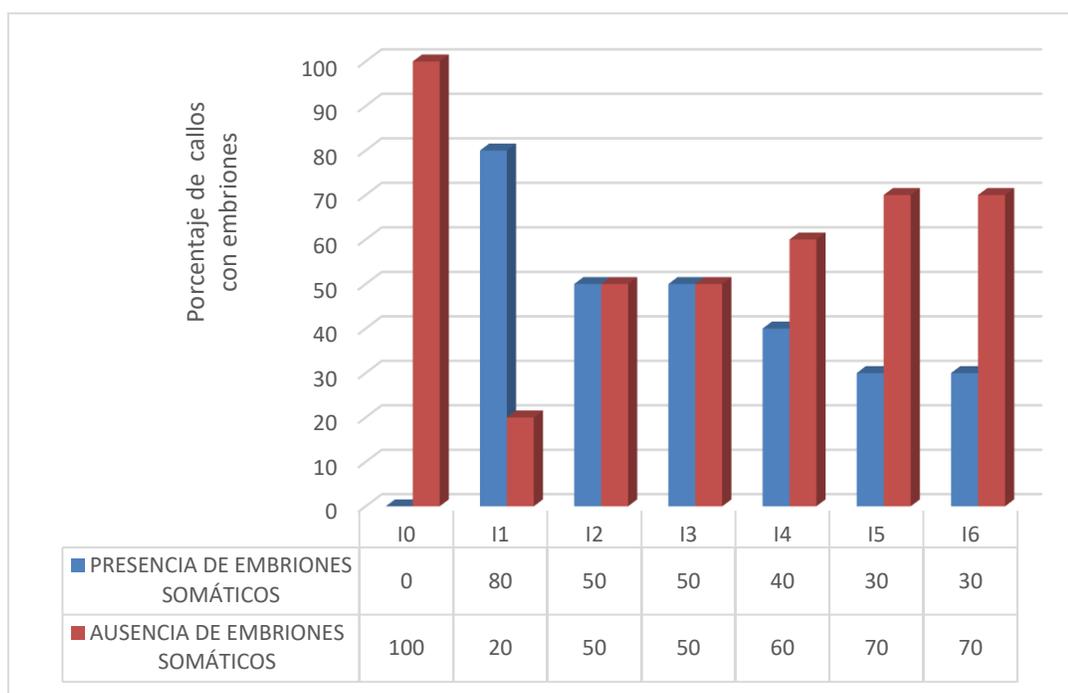
**Tabla 8.**  
**Tabla de contingencia con respecto a la presencia de embriones somáticos de acuerdo a los tratamientos utilizados.**

Tratamiento	Callos con embriones somáticos	
	Presencia	Ausencia
I0	0	10
I1	8	2
I2	5	5
I3	5	5
I4	4	6
I5	3	7
I6	3	7



**Figura 12. (A) Ausencia de embriones somáticos en callo del tratamiento I0 (0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0 mg L<sup>-1</sup> de kinetina). (B) Presencia de embriones somáticos en callos de los tratamientos I1 (1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,2 mg L<sup>-1</sup> de kinetina), (C) I2 (1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,1 mg L<sup>-1</sup> de kinetina), (D) I3 (1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,05 mg L<sup>-1</sup> de kinetina), (E) I4 (2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,2 mg L<sup>-1</sup> de kinetina), (F) I5 (2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,1 mg L<sup>-1</sup> de kinetina), (G) I6 (2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,05 mg L<sup>-1</sup> de kinetina).**

En la figura 13 se puede apreciar que el tratamiento I1 (compuesto por un medio Murashige & Skoog (1962), suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.8 g L<sup>-1</sup> de phytigel, 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,2 mg L<sup>-1</sup> de kinetina), presenta un total de 80% de callos con embriones somáticos, siendo el tratamiento más exitoso con respecto a la variable presencia de embriones somáticos, mientras que el menor porcentaje de callos con embriones somáticos se obtuvo del tratamiento I6 (compuesto por el mismo medio Murashige & Skoog (1962) pero con 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,05 mg L<sup>-1</sup> de kinetina), obteniéndose un 30% de callos con embriones somáticos, convirtiéndose en el tratamiento menos efectivo con respecto a la variable de estudio.



**Figura 13. Porcentaje de callos con embriones somáticos con respecto a los tratamientos utilizados.**

### *Análisis inferencial*

En el cuadro 1 se observa el análisis de varianza (ANOVA) que permite determinar si existe diferencias significativas entre los tratamientos de iniciación de embriones somáticos con respecto a la variable presencia de embriones somáticos. El valor de  $p=0,0157$  ( $p=1,57\%$ ) obtenido es menor al nivel de significancia nominal ( $\alpha=5\%$ ), rechazando de esta manera la hipótesis de igualdad de las medias, lo cual demuestra la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

### Cuadro 1.

#### Análisis de varianza para los tratamientos evaluados con respecto a la variable de presencia de embriones somáticos

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Presencia de Embriones Som..	70	0,21	0,14	114,43	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,60	6	0,60	2,86	0,0157
Tratamiento	3,60	6	0,60	2,86	0,0157
Error	13,20	63	0,21		
Total	16,80	69			

Se aplicó la prueba de Duncan para encontrar subgrupos entre los tratamientos. En el cuadro 2 se puede ver que se agrupó a los tratamientos I1, I2, I3 e I4 en el subgrupo A, sin embargo donde se encontró la mayor cantidad de callos con presencia de embriones somáticos fue en el tratamiento I1, en el cual se obtuvo la mayor media.

**Cuadro 2.**

**Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con respecto a la variable de presencia de embriones somáticos.**

Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 0,2095 gl: 63					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
I1	0,80	10	0,14	A	
I2	0,50	10	0,14	A	B
I3	0,50	10	0,14	A	B
I4	0,40	10	0,14	A	B C
I5	0,30	10	0,14	B	C
I6	0,30	10	0,14	B	C
I0	0,00	10	0,14		C

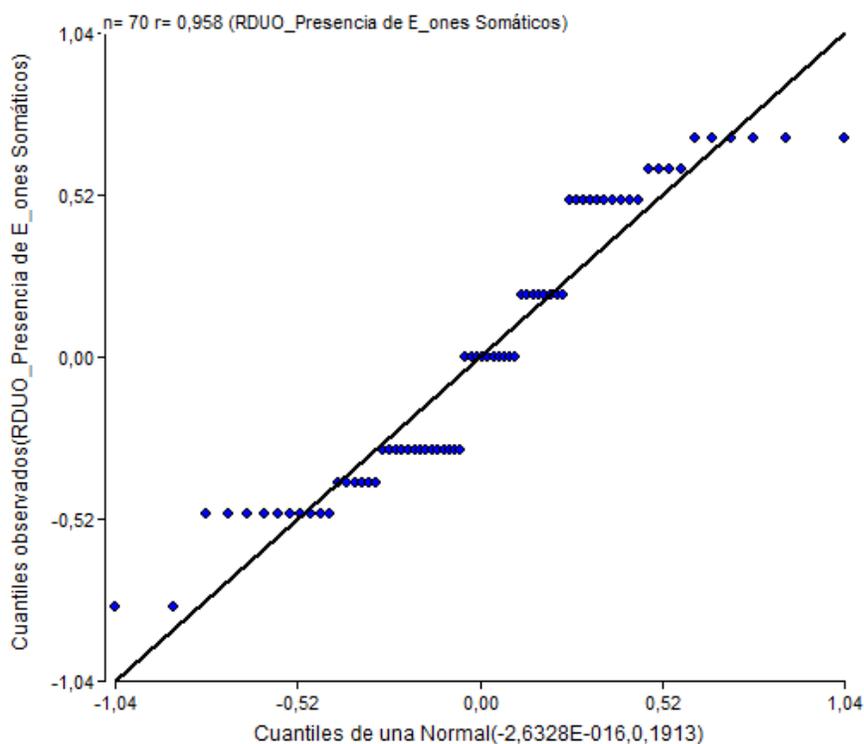
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Para determinar si los datos siguen una distribución normal se procedió a realizar la prueba de Shapiro Wilks (modificado) y la gráfica de Q-Q plot. En el cuadro 3 se puede observar la prueba de Shapiro Wills (modificado) donde se obtuvo un valor de  $p < 0,0001$  ( $p = 0,01\%$ ), valor que es menor al nivel de significancia de la prueba ( $\alpha = 5\%$ ), lo cual permite rechazar la hipótesis de que los datos siguen una distribución normal. La gráfica Q-Q plot (Figura 14) evidencia que los datos no siguen una distribución normal.

**Cuadro 3.**

**Prueba de Shapiro Wilks (modificado) para la variable presencia de embriones somáticos.**

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Presencia de Embriones Som..	70	0,40	0,49	0,59	<0,0001



**Figura 14. Gráfico Q-Q plot de la variable presencia de embriones somáticos.**

Al haber confirmado que los datos correspondientes a la variable presencia de embriones somáticos no cumplen con la normalidad, se realizó un análisis de varianza no paramétrico aplicando la prueba de Kruskal Wallis (Cuadro 4), en donde se obtuvo un valor de  $p=0,0220$  ( $p=2,2\%$ ) que es menor al nivel de significancia de la prueba, lo cual indica la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.

En el cuadro 4 se puede ver que el tratamiento I1 ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D y  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de kinetina) posee la mayor media con un valor de 0,80 y con una desviación estándar de 0,42, con lo que se puede deducir que este es el mejor tratamiento para obtener mayor presencia de callos con embriones somáticos.

Además se puede comprobar este resultado al analizar los valores de los rangos en el cuadro 4, en donde se puede ver que el tratamiento I1 presenta el valor más alto de

rango (49,90) ubicándose en el subconjunto B, diferente al resto de tratamientos pertenecientes a los subgrupos AB (I2-I6) y al A (I0), indicando que existe una diferencia significativa entre este y los demás tratamientos. Razón por la que se puede decir que este es el mejor tratamiento para obtener una mayor presencia de callos con embriones somáticos.

**Cuadro 4.**  
**Prueba de Kruskal Wallis para los tratamientos evaluados para la variable presencia de embriones somáticos.**

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Presencia de Embriones Som..	I0	10	0,00	0,00	0,00	10,65	0,0220
Presencia de Embriones Som..	I1	10	0,80	0,42	1,00		
Presencia de Embriones Som..	I2	10	0,50	0,53	0,50		
Presencia de Embriones Som..	I3	10	0,50	0,53	0,50		
Presencia de Embriones Som..	I4	10	0,40	0,52	0,00		
Presencia de Embriones Som..	I5	10	0,30	0,48	0,00		
Presencia de Embriones Som..	I6	10	0,30	0,48	0,00		

Trat.	Ranks
I0	21,50 A
I5	32,00 A B
I6	32,00 A B
I4	35,50 A B
I2	39,00 A B
I3	39,00 A B
I1	49,50 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 3.1.2. Número de embriones somáticos

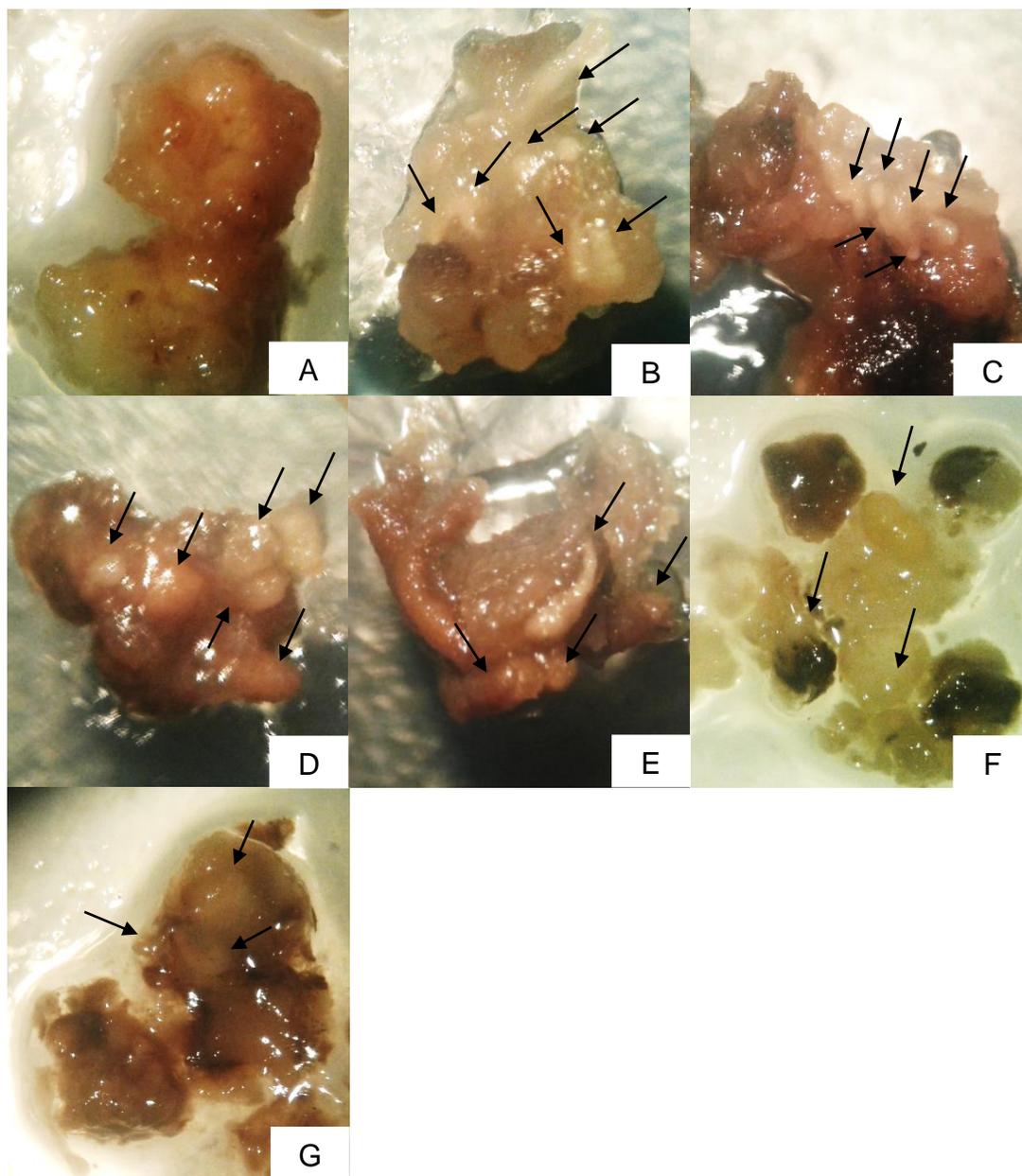
#### *Análisis exploratorio*

Terminado el tiempo de cultivo (2 meses) en los tratamientos de iniciación de embriones somáticos, se contaron estas estructuras de apariencia globular o nodular de coloración blanca o amarillenta en cada uno de los tratamientos como se puede observar en la Figura 15.

La tabla 9 muestra el análisis de contingencia de los diferentes tratamientos utilizados en la iniciación de embriones somáticos, indicando el número de embriones somáticos obtenidos en cada tratamiento. El tratamiento I0 (sin las fitohormonas 2,4-D y kinetina) no presentó embriones somáticos. En la tabla 9 se puede ver que el tratamiento que presentó el mayor número de embriones somáticos fue el tratamiento I1 (1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,2 mg L<sup>-1</sup> de kinetina) con un total de 35 embriones. Mientras que el tratamiento que estaba compuesto por 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,05 mg L<sup>-1</sup> de kinetina (Tratamiento I6) solo presentó 7 embriones somáticos obteniéndose aquí el menor número de embriones somáticos.

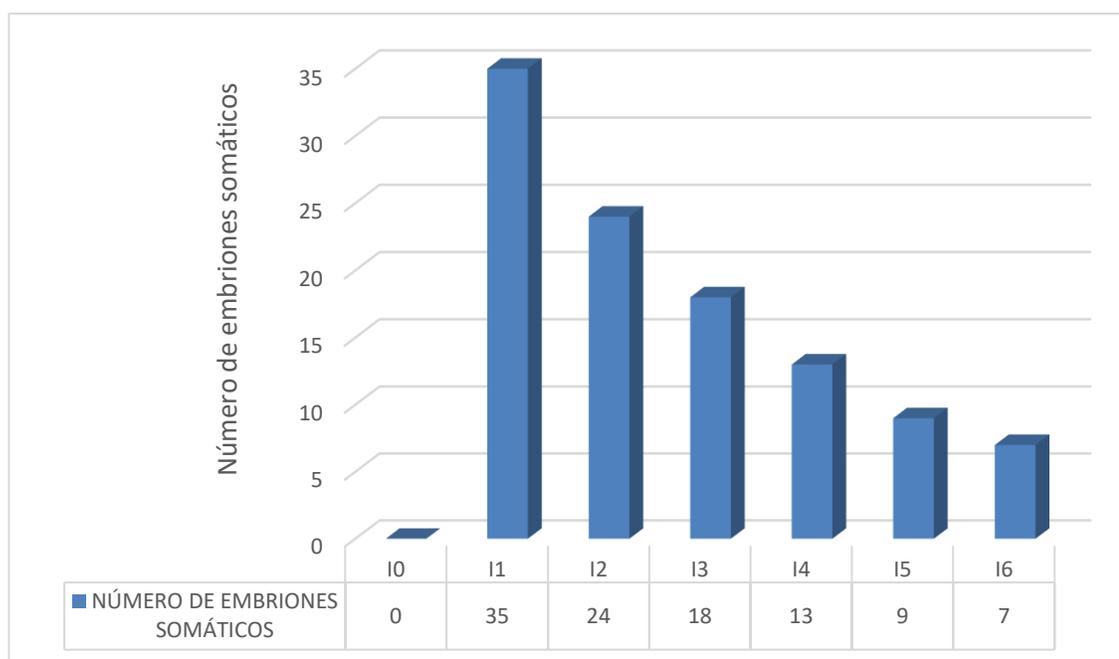
**Tabla 9.**  
**Tabla de contingencia para la iniciación de embriones somáticos respecto al número de embriones somáticos presentes en cada tratamiento utilizado.**

Tratamiento	Número de embriones somáticos
I0	0
I1	35
I2	24
I3	18
I4	13
I5	9
I6	7



**Figura 15. (A) Ausencia de embriones somáticos en tratamiento. (B) Seis embriones somáticos en tratamiento I1. (C) Seis embriones somáticos en tratamiento I2. (D) Seis embriones somáticos en tratamiento I3. (E) Cuatro embriones somáticos en tratamiento I4. (F) Tres embriones somáticos en tratamiento I5, (G) Tres embriones somáticos en tratamiento I6.**

En la figura 16 se puede apreciar que el tratamiento I1 (compuesto por un medio Murashige & Skoog (1962), suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.8 g L<sup>-1</sup> de phytigel, 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,2 mg L<sup>-1</sup> de kinetina), presenta el mayor número de embriones somáticos, siendo el tratamiento más exitoso; conforme aumenta la concentración de 2,4-D, se obtiene menor número de embriones, como se puede ver en el tratamiento I6 (2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,05 mg L<sup>-1</sup> de kinetina); siendo de esta manera el menos efectivo con relación a la variable en estudio.



**Figura 16. Número de embriones somáticos con respecto al tratamiento utilizado en la iniciación de embriones somáticos.**

### *Análisis inferencial*

Una vez completado el análisis exploratorio se procedió a realizar el análisis inferencial para lo cual se realizó un análisis de varianza (ANOVA) como se observa en

el cuadro 5, el mismo que permite determinar si existe diferencias significativas entre los tratamientos de iniciación de embriones somáticos con respecto a la variable de número de embriones somáticos. El valor de  $p= 0,0017$  ( $p=0,17\%$ ) obtenido en el ANOVA es menor al nivel de significancia nominal ( $\alpha= 5\%$ ), indicando la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, rechazando así la hipótesis de igualdad de las medias.

### Cuadro 5.

**Análisis de varianza para los tratamientos evaluados con respecto a la variable de número de embriones somáticos.**

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Número de Embriones Somáti..	70	0,28	0,21	121,03	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	81,89	6	13,65	4,06	0,0017
Tratamiento	81,89	6	13,65	4,06	0,0017
Error	211,60	63	3,36		
Total	293,49	69			

Para encontrar subgrupos entre los tratamientos, se aplicó la prueba de Duncan. En el cuadro 6 se puede ver que se agrupó a los tratamientos I1, I2, I3 en el subgrupo A, mientras que los tratamientos I2 e I3 se agruparon en el subgrupo AB; sin embargo donde se encontró la mayor cantidad de embriones somáticos fue en el tratamiento I1, en el cual se obtuvo la mayor media con un valor de 3,5.

**Cuadro 6.**

**Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con respecto a la variable de número de embriones somáticos.**

Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 3,3587 gl: 63					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
I1	3,50	10	0,58	A	
I2	2,40	10	0,58	A	B
I3	1,80	10	0,58	A	B C
I4	1,30	10	0,58	B	C
I5	0,90	10	0,58	B	C
I6	0,70	10	0,58	B	C
I0	0,00	10	0,58		C

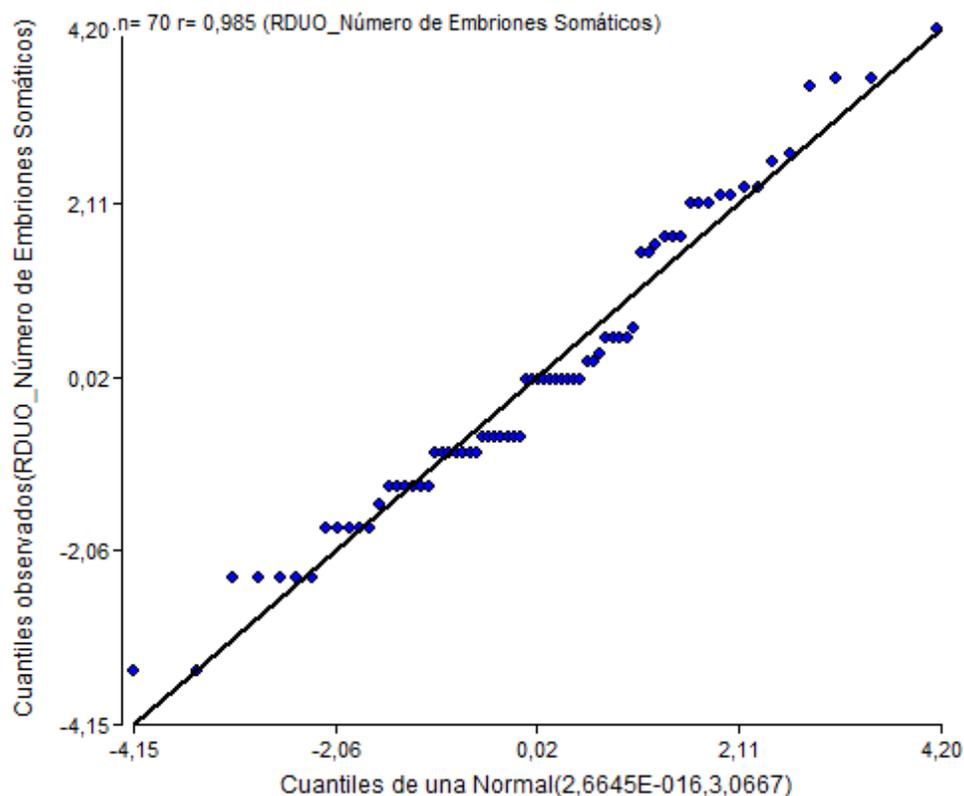
*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

Se realizó la prueba de Shapiro Wilks (modificado) y la gráfica de Q-Q plot para determinar si los datos siguen una distribución normal. Se obtuvo un valor de  $p < 0,0001$  ( $p=0,01\%$ ) en el cuadro 7, valor que es menor al nivel de significancia de la prueba ( $\alpha=5\%$ ), esto permite rechazar la hipótesis de que los datos siguen una distribución normal. En la figura 17 se evidencia que los datos no siguen una distribución normal.

**Cuadro 7.**

**Prueba de Shapiro Wilks (modificado) para la variable número de embriones somáticos.**

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Número de Embriones Somáti..	70	1,51	2,06	0,72	<0,0001



**Figura 17. Gráfico Q-Q plot de variable número de embriones somáticos.**

Debido a que se confirmó que los datos correspondientes a la variable número de embriones somáticos no cumplen con la normalidad, se realizó un análisis de varianza no paramétrico aplicando la prueba de Kruskal Wallis (Cuadro 8), en donde se obtuvo un valor de  $p=0,0049$  ( $p=0,49\%$ ), valor que es menor al nivel de significancia de la prueba, indicando así la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.

En el cuadro 8 se puede ver que el tratamiento II ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D y  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de kinetina) posee la mayor media con un valor de 3,50 y con una desviación estándar de 2,22. Por lo cual se puede decir que este es el mejor tratamiento para obtener el mayor número de embriones somáticos.

También se puede comprobar este resultado al analizar los valores de los rangos en el cuadro 8, en donde se puede ver que el tratamiento I1 presenta el rango más alto con un valor de 52,60 ubicándose en el subconjunto C, diferente al resto de tratamientos pertenecientes a los subgrupos BC (I2), ABC (I3), AB (I4-I6) y al A (I0), indicando que existe una diferencia significativa entre el tratamiento I1 y los demás tratamientos. Razón por la que se puede decir que este es el mejor tratamiento para la obtención del mayor número de embriones somáticos.

**Cuadro 8.**  
**Prueba de Kruskal Wallis para los tratamientos evaluados para la variable número de embriones somáticos.**

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Número de Embriones Somáti..	I0	10	0,00	0,00	0,00	14,53	0,0049
Número de Embriones Somáti..	I1	10	3,50	2,22	4,00		
Número de Embriones Somáti..	I2	10	2,40	2,67	1,50		
Número de Embriones Somáti..	I3	10	1,80	2,20	1,00		
Número de Embriones Somáti..	I4	10	1,30	1,70	0,00		
Número de Embriones Somáti..	I5	10	0,90	1,45	0,00		
Número de Embriones Somáti..	I6	10	0,70	1,25	0,00		

Trat. Ranks		
I0	21,50	A
I6	29,55	A B
I5	30,35	A B
I4	34,15	A B
I3	38,45	A B C
I2	41,90	B C
I1	52,60	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 3.1.3. Tipo de callo

#### *Análisis exploratorio*

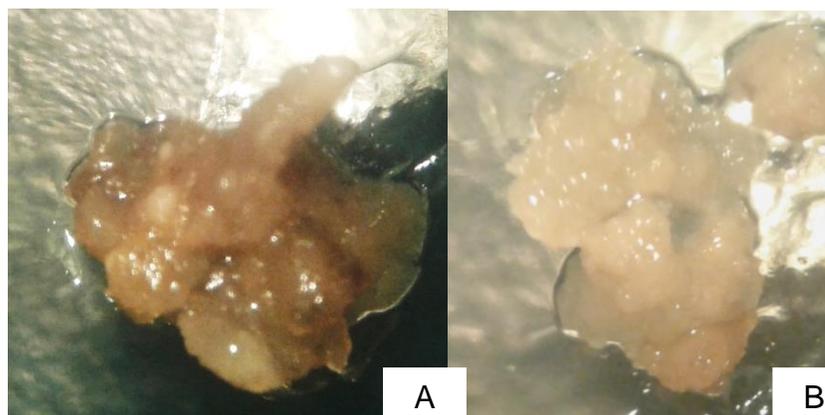
Se observaron los callos a los dos meses de iniciados los tratamientos. La presencia de callo con potencial embriogénico como lo es el de tipo 3, se evidenció por la formación de un callo globular y beige mientras que el de tipo 4 se presentó como un callo globular y blanco (Figura 18).

En la tabla 10 se puede ver el análisis de contingencia de los diferentes tratamientos que se utilizaron en la iniciación de embriones somáticos, indicando el número de callos tipo 3 y tipo 4. El tratamiento sin las fitohormonas 2,4-D y kinetina (Tratamiento I0) solo presentó callos tipo 4. Se pudo observar que el tratamiento que presentó el mayor número de callos tipo 3 fue el tratamiento compuesto por 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,2 mg L<sup>-1</sup> de kinetina (Tratamiento I1), con un total de 10 frascos. Se presentaron 9 frascos con callos tipo 3 en los tratamientos I2, I3 e I4. Los tratamientos I5 e I6 obtuvieron el menor número de callos tipo 3 con solo 7 frascos de este tipo de callo en cada uno.

**Tabla 10.**

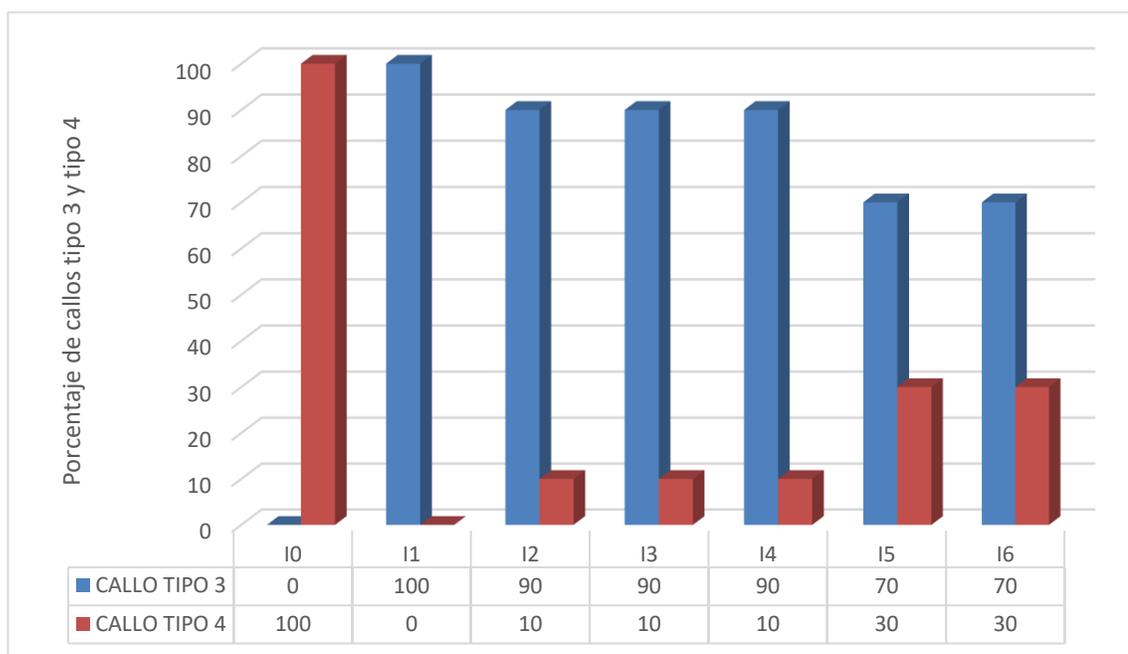
**Tabla de contingencia para la iniciación de embriones somáticos respecto al tipo de callo de acuerdo a los tratamientos utilizados.**

Tratamiento	Tipo de callo	
	Callo tipo 3	Callo tipo 4
I0	0	10
I1	10	0
I2	9	1
I3	9	1
I4	9	1
I5	7	3
I6	7	3



**Figura 18. (A) Callo tipo 3 con apariencia globular y beige.  
(B) Callo tipo 4 de apariencia globular y blanco.**

El tratamiento I1 (compuesto por un medio Murashige & Skoog (1962), suplementado con  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa,  $2.8 \text{ g L}^{-1}$  de phytigel,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D y  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  de kinetina), presenta un 100% de callos tipo 3 como se puede observar en la figura 19, siendo el tratamiento más exitoso con respecto a la variable tipo de callo. Los tratamientos que obtuvieron un 90% de callos tipo 3 fueron los tratamientos I2, I3 e I4. Los tratamientos que obtuvieron el menor porcentaje de callos tipo 3 fueron los tratamientos I5 e I6, obteniéndose un 70% de callos tipo 3 en cada tratamiento, convirtiéndose en los tratamientos menos efectivos con respecto a la variable de estudio.



**Figura 19. Porcentaje de callos tipo 3 y tipo 4 con respecto a los tratamientos utilizados.**

### *Análisis inferencial*

Luego de realizar el análisis exploratorio se realizó el análisis inferencial. Para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos de iniciación de embriones somáticos con respecto a la variable del tipo de callo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) como se observa en el cuadro 9. Se obtuvo un valor  $p < 0,0001$  ( $p < 0,01\%$ ), el cual es menor al nivel de significancia nominal ( $\alpha = 5\%$ ), de manera que se rechaza la hipótesis de igualdad de las medias, evidenciando la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

**Cuadro 9.**

**Análisis de varianza para los tratamientos evaluados con respecto a la variable del tipo de callo.**

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Tipo de callo	70	0,52	0,48	42,91	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,97	6	1,16	11,44	<0,0001
Tratamiento	6,97	6	1,16	11,44	<0,0001
Error	6,40	63	0,10		
Total	13,37	69			

Se aplicó la prueba de Duncan para encontrar subgrupos entre los tratamientos. En el cuadro 10 se puede ver que se agrupó a todos los tratamientos en el subgrupo A, con excepción del tratamiento control (sin los fitorreguladores 2,4-D y kinetina) que se agrupó en el subgrupo B. Sin embargo donde se encontró la mayor cantidad de callos tipo 3 fue en el tratamiento I1, en el cual se obtuvo la mayor media con un valor de 1.

**Cuadro 10.**

**Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con respecto a la variable de tipo de callo.**

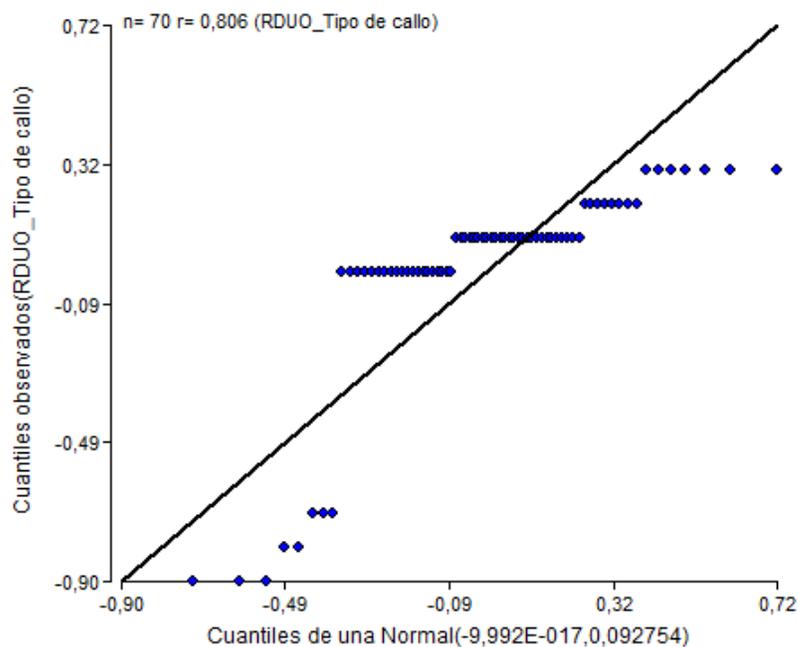
Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 0,1016 gl: 63					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
I1	1,00	10	0,10	A	
I4	0,90	10	0,10	A	
I3	0,90	10	0,10	A	
I2	0,90	10	0,10	A	
I5	0,80	10	0,10	A	
I6	0,70	10	0,10	A	
I0	0,00	10	0,10		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Se realizó la prueba de Shapiro Wilks (modificado) y la gráfica de Q-Q plot para determinar si los datos siguen una distribución normal. Se obtuvo un valor de  $p < 0,0001$  ( $p = 0,01\%$ ) en el cuadro 11, el cual es menor al nivel de significancia ( $\alpha = 5\%$ ), con lo que se puede rechazar la hipótesis de que los datos siguen una distribución normal. Además esto se puede evidenciar en la gráfica Q-Q plot de la Figura 20.

**Cuadro 11.**  
**Prueba de Shapiro Wilks (modificado) para la variable tipo de callo.**

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Tipo de callo	70	0,74	0,44	0,52	<0,0001



**Figura 20.** Gráfico Q-Q plot de la variable tipo de callo.

Se confirmó de esta manera que los datos correspondientes a la variable tipo de callo no cumplen con la normalidad, por lo cual se realizó un análisis de varianza no paramétrico aplicando la prueba de Kruskal Wallis (Cuadro 12), en donde se obtuvo un valor de  $p < 0,0001$  ( $p < 0,01\%$ ), el mismo que es menor al nivel de significancia de la prueba, indicando así la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.

**Cuadro 12.**  
**Prueba de Kruskal Wallis para los tratamientos evaluados para la variable tipo de callo.**

Prueba de Kruskal Wallis						
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H
Tipo de callo I0		10	0,00	0,00	0,00	20,62 <0,0001
Tipo de callo I1		10	1,00	0,00	1,00	
Tipo de callo I2		10	0,90	0,32	1,00	
Tipo de callo I3		10	0,90	0,32	1,00	
Tipo de callo I4		10	0,90	0,32	1,00	
Tipo de callo I5		10	0,80	0,42	1,00	
Tipo de callo I6		10	0,70	0,48	1,00	

Trat. Ranks	
I0	9,50 A
I6	34,00 B
I5	37,50 B
I4	41,00 B
I2	41,00 B
I3	41,00 B
I1	44,50 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

En el cuadro anterior se puede ver que el tratamiento I1 (1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,2 mg L<sup>-1</sup> de kinetina) posee una media de 1 la cual es la mayor y con un valor de 0 en la desviación estándar. Pero estos valores no son representativos y esto se comprueba al observar los rangos con los cuales se encierra a todos los tratamientos en un solo grupo

(grupo A) a excepción del tratamiento control (grupo B), lo cual indica que entre los tratamientos I1-I6 no hay diferencias significativas con relación a la variable estudiada.

### **3.2. Fase II: Maduración de embriones somáticos de Palma Aceitera**

Terminado el tiempo de cultivo en los tratamientos de iniciación de embriones somáticos; estos fueron transferidos a los medios de cultivo de maduración. Durante la etapa de maduración de embriones somáticos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) se evaluó la longitud (cm) de los embriones somáticos, la fase de desarrollo del embrión y la oxidación que presentaba a los dos meses de iniciados los tratamientos. Para estos ensayos se usaron 6 tratamientos compuestos por el medio Murashige & Skoog (1962), suplementado con 0,01 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.8 g L<sup>-1</sup> de phytigel y diferentes concentraciones de los fitorreguladores de kinetina y ABA.

#### **3.2.1. Etapa de maduración del embrión**

##### ***Análisis exploratorio***

Se midieron los embriones somáticos a los dos meses de iniciados los tratamientos. Se observó la presencia simultánea de embriones somáticos en distintos estados de diferenciación en un mismo tratamiento, presentándose así diferentes longitudes como se puede ver en la Figura 21.

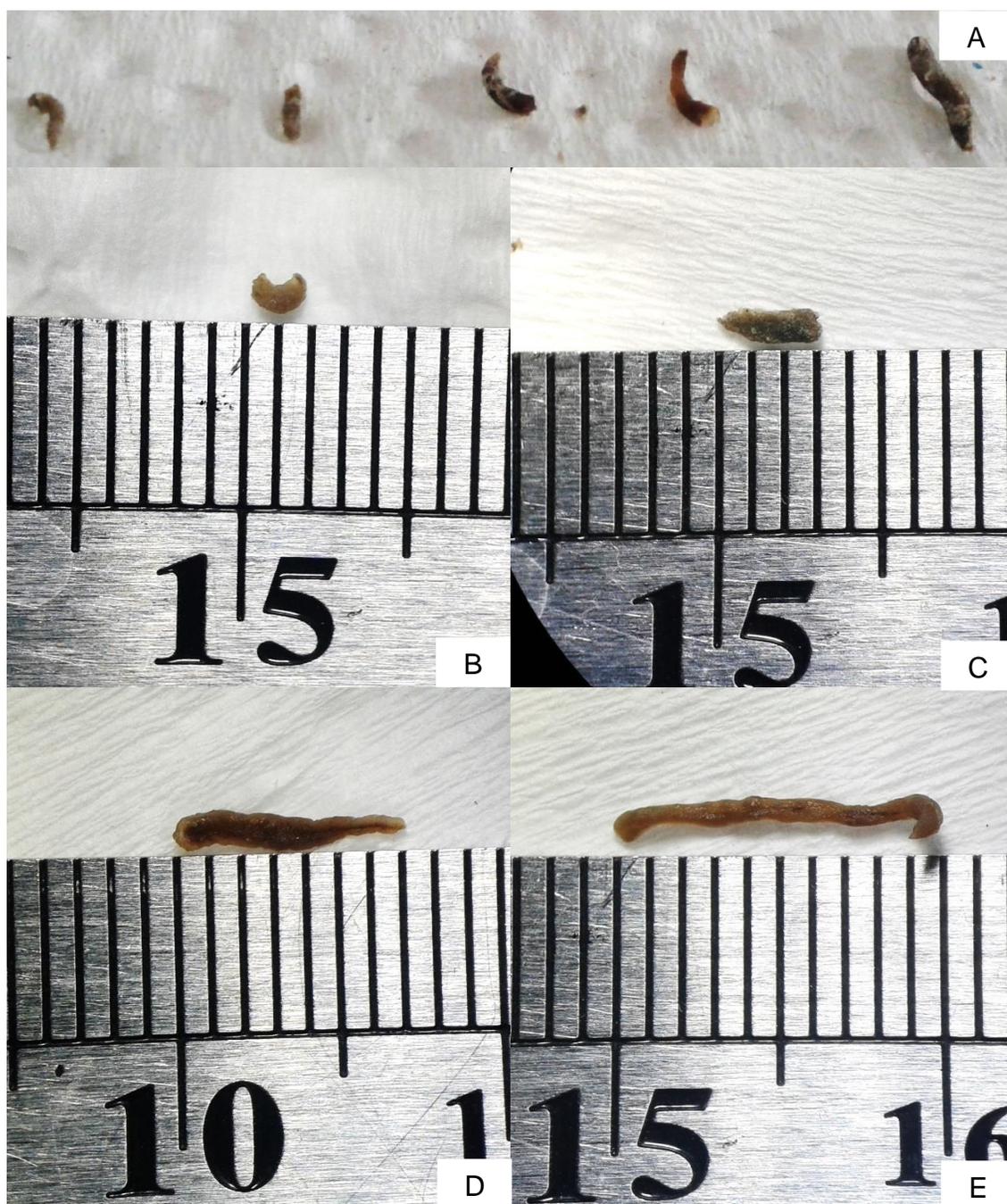
La tabla 11 muestra el análisis de contingencia de los diferentes tratamientos empleados en la maduración de los embriones somáticos, indicando el número de embriones presentes de acuerdo a su estado de diferenciación; para lo cual se agrupó a los embriones en pequeños, medianos, largos y muy largos y se contó el número

presente en cada clasificación. Estos datos se pueden observar en el anexo B donde se especifica la longitud (cm) de cada embrión somático obtenido en cada tratamiento.

El tratamiento sin las fitohormonas kinetina y ABA (Tratamiento M0) presentó el mayor número de embriones pequeños (18), mientras que el tratamiento que presentó el mayor número de embriones medianos fue el tratamiento M6 (0,5 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,1 mgL<sup>-1</sup> de ABA) con un total de 21 embriones. Los tratamientos M3 (1 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,1 mgL<sup>-1</sup> de ABA) y M4 (0,5 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,4 mgL<sup>-1</sup> de ABA) presentaron igual número de embriones largos con un total de 3 embriones cada uno. Mientras que los tratamientos M2 (1 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,2 mgL<sup>-1</sup> de ABA), M3 (1 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,1 mgL<sup>-1</sup> de ABA) y M5 (0,5 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,2 mgL<sup>-1</sup> de ABA) fueron los únicos que presentaron embriones maduros, con 6, 3 y 6 embriones respectivamente.

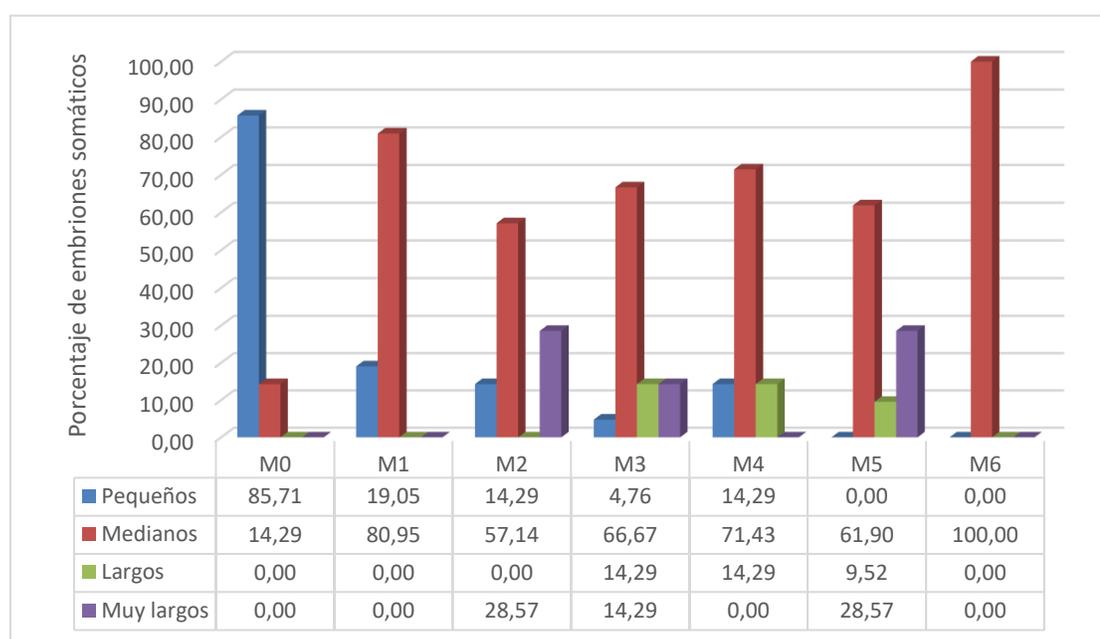
**Tabla 11.**  
**Tabla de contingencia para la maduración de embriones somáticos respecto a la variable etapa de maduración de los embriones somáticos de acuerdo a los tratamientos utilizados.**

Tratamiento	Etapa de maduración del embrión somático			
	Pequeños	Medianos	Largos	Muy largos
M0	18	3	0	0
M1	4	17	0	0
M2	3	12	0	6
M3	1	14	3	3
M4	3	15	3	0
M5	0	13	2	6
M6	0	21	0	0



**Figura 21. (A) Diferentes estados de diferenciación de los embriones somáticos. Embriones vistos en el estereoscopio (1X): (B). Embrión pequeño (0,15 cm). (C). Embrión mediano (0,3 cm). (D). Embrión largo (0,7 cm). (E). Embrión maduro (1 cm).**

En la figura 22 se puede apreciar que el tratamiento sin las fitohormonas kinetina y ABA (Tratamiento M0) presentó un 85,71% de embriones pequeños y 14,29% de medianos. El tratamiento M6 presentó un 100% de embriones medianos, seguido del tratamiento M1 que generó un 80,95%. Los tratamientos M3, M4 y M5 fueron los únicos que generaron embriones largos con un 14,29%; 14,29% y 9,52% respectivamente. Los tratamientos con los que se obtuvieron el mayor porcentaje de embriones muy largos fueron los tratamientos M2 y M5 con un total de 28,57% cada uno, mientras que el tratamiento M3 presentó un 14,29%; convirtiéndose de esta manera en los únicos tratamientos que produjeron embriones maduros.



**Figura 22. Porcentaje de embriones somáticos en cada tratamiento de acuerdo a la etapa de maduración.**

### *Análisis inferencial*

Para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos de maduración de embriones somáticos con respecto a la variable etapa de maduración del embrión, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) como se observa en el cuadro 13. El valor de  $p < 0,0001$  ( $p < 0,01\%$ ) obtenido en el ANOVA, es menor al nivel de significancia nominal ( $\alpha = 5\%$ ), indicando la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, rechazando así la hipótesis de igualdad de las medias.

### Cuadro 13.

**Análisis de varianza para los tratamientos evaluados con respecto a la variable etapa de maduración del embrión.**

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Etapa de maduración del ES..	147	0,33	0,30	32,95	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31,88	6	5,31	11,52	<0,0001
Tratamiento	31,88	6	5,31	11,52	<0,0001
Error	64,57	140	0,46		
Total	96,45	146			

Se aplicó la prueba de Duncan para encontrar subgrupos entre los tratamientos. En el cuadro 14 se puede ver que se agrupó a los tratamientos M5, M2 y M3 en el subgrupo A, en el subgrupo AB se agrupó a los tratamientos M2 y M3, sin embargo donde se encontró la mayor media fue en el tratamiento M5, en el cual se obtuvo la mayor media con un valor de 2,67. El tratamiento control (M0) presentó la menor media con un valor de 1,14 y se agrupó en el subgrupo D.

**Cuadro 14.**

**Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con respecto a la variable etapa de maduración del embrión.**

Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 0,4612 gl: 140					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
M5	2,67	21	0,15	A	
M2	2,43	21	0,15	A	B
M3	2,38	21	0,15	A	B
M6	2,00	21	0,15		B C
M4	2,00	21	0,15		B C
M1	1,81	21	0,15		C
M0	1,14	21	0,15		D

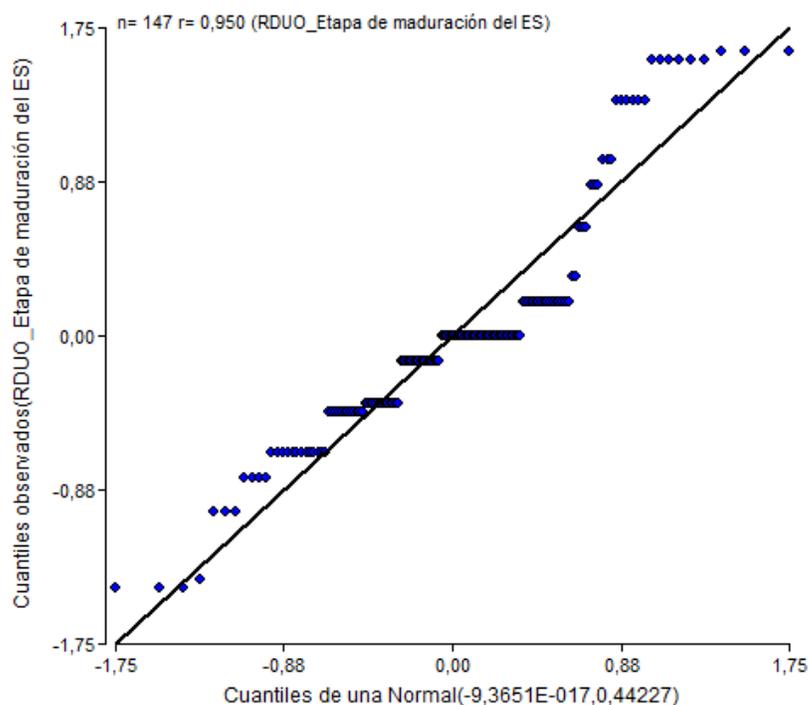
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal se procedió a realizar la prueba de Shapiro Wilks (modificado) y la gráfica de Q-Q plot. En el cuadro 15 se puede observar la prueba de Shapiro Wills (modificado) donde se obtuvo un valor de  $p < 0,0001$  ( $p = 0,01\%$ ), valor que es menor al nivel de significancia de la prueba ( $\alpha = 5\%$ ), lo cual permite rechazar la hipótesis de que los datos siguen una distribución normal. En la figura 23 se puede comprobar que los datos no siguen una distribución normal.

**Cuadro 15.**

**Prueba de Shapiro Wilks (modificado) para la variable etapa de maduración de los embriones somáticos.**

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Etapa de maduración del ES..	147	2,06	0,81	0,72	<0,0001



**Figura 23. Gráfico Q-Q plot de la variable etapa de maduración de los embriones somáticos.**

Debido a que se confirmó que los datos correspondientes a la variable etapa de maduración del embrión somático no cumplen con la normalidad, se realizó un análisis de varianza no paramétrico aplicando la prueba de Kruskal Wallis como se observa en el cuadro 16, en donde se obtuvo un valor de  $p < 0,0001$  ( $p = 0,01\%$ ) que es menor al nivel de significancia de la prueba, lo cual indica la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.

En el cuadro 16 se puede ver que el tratamiento M5 (1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,2 mg L<sup>-1</sup> de kinetina) posee la mayor media con un valor de 2,67 y con una desviación estándar de 0,91, con lo que se puede deducir que este es el mejor tratamiento para la maduración de los embriones somáticos.

Además se puede comprobar este resultado al analizar los valores de los rangos en el cuadro 16, en donde se puede ver que el tratamiento M5 presenta el valor más alto

de rango (99,90) ubicándose en el subgrupo C, los tratamientos que le siguen de acuerdo al valor del rango son el M3 y M2 con un rango de 90,40 y 86,14 respectivamente, los mismos que están en el subgrupo BC. Por esta razón se puede decir que el tratamiento M5 es el mejor tratamiento para obtener un mayor número de embriones maduros.

### Cuadro 16.

#### Prueba de Kruskal Wallis para los tratamientos evaluados para la variable etapa de maduración de los embriones somáticos.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Etapa de maduración del ES..	M0	21	1,14	0,36	1,00	42,75	<0,0001
Etapa de maduración del ES..	M1	21	1,81	0,40	2,00		
Etapa de maduración del ES..	M2	21	2,43	1,08	2,00		
Etapa de maduración del ES..	M3	21	2,38	0,80	2,00		
Etapa de maduración del ES..	M4	21	2,00	0,55	2,00		
Etapa de maduración del ES..	M5	21	2,67	0,91	2,00		
Etapa de maduración del ES..	M6	21	2,00	0,00	2,00		

Trat.	Ranks	
M0	23,86	A
M1	65,19	B
M4	75,50	B C
M6	77,00	B C
M2	86,14	B C
M3	90,40	B C
M5	99,90	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 3.2.2. Oxidación

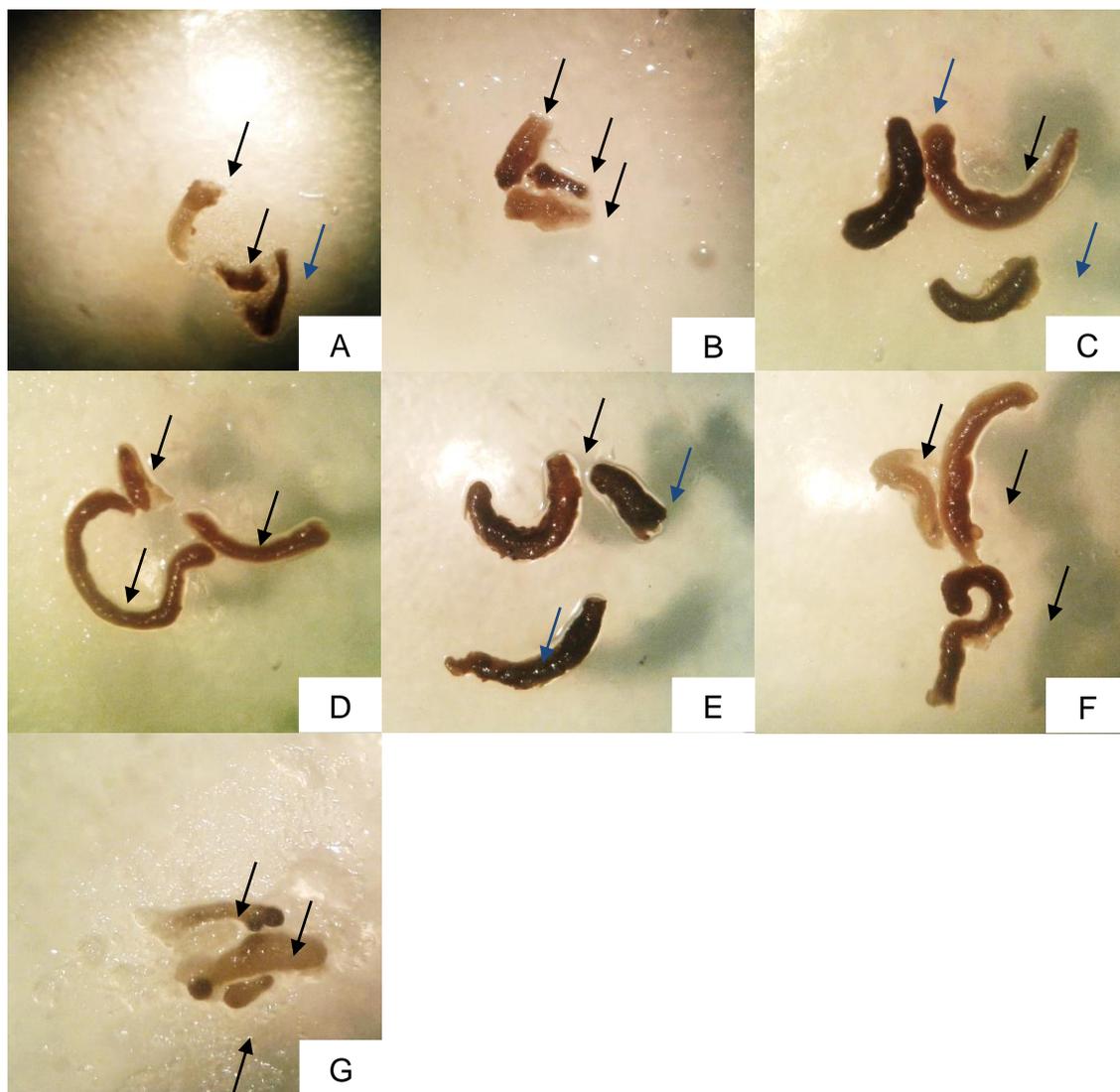
#### *Análisis exploratorio*

Se observó que la mayoría de embriones no se oxidaron al finalizar la etapa de cultivo. Se observó la presencia simultánea de embriones somáticos oxidados y no oxidados en un mismo tratamiento como se puede ver en la Figura 24.

La tabla 12 muestra el análisis de contingencia de los diferentes tratamientos empleados en etapa de maduración de los embriones somáticos, indicando el número de embriones oxidados y no oxidados. El tratamiento sin las fitohormonas kinetina y ABA (Tratamiento M0) y el tratamiento M1 (1 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,4 mgL<sup>-1</sup> de ABA) presentaron el mayor número de embriones oxidados con un total de 8 en cada tratamiento. El tratamiento M2 (1 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,2 mgL<sup>-1</sup> de ABA) mostró 6 embriones oxidados, en tanto que los tratamientos M4 (0,5 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,4 mgL<sup>-1</sup> de ABA) y M6 (0,5 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,1 mgL<sup>-1</sup> de ABA) mostraron 5 embriones oxidados cada uno. El tratamiento M5 (0,5 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,2 mgL<sup>-1</sup> de ABA) fue el que generó menos embriones oxidados con tan solo 3.

**Tabla 12.**  
**Tabla de contingencia para la maduración de embriones somáticos respecto a la variable oxidación de los embriones somáticos de acuerdo a los tratamientos utilizados.**

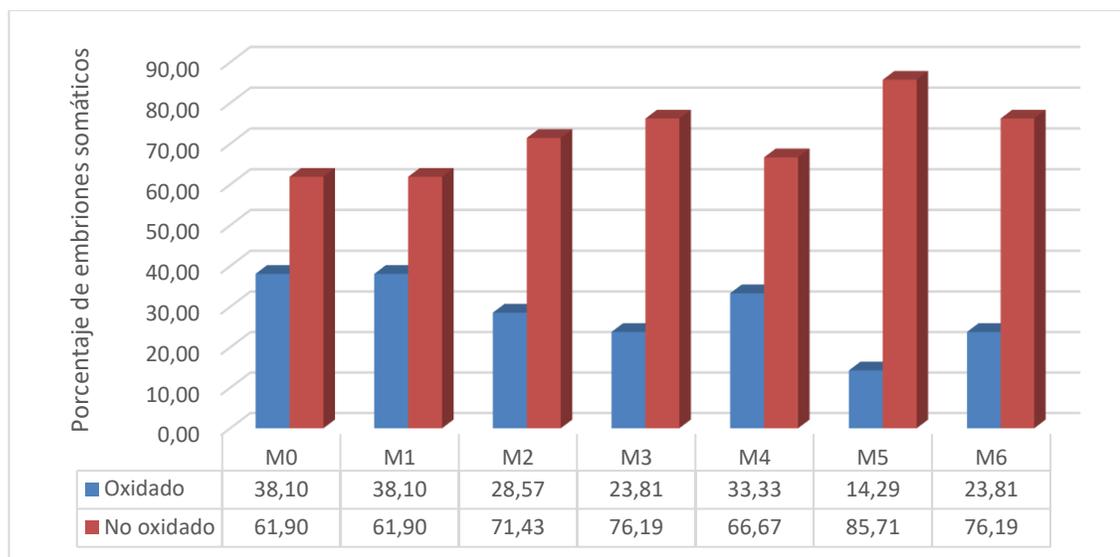
Tratamiento	Oxidación	
	Oxidado	No oxidado
M0	8	13
M1	8	13
M2	6	15
M3	5	16
M4	5	16
M5	3	18
M6	5	16



**Figura 24. Embriones somáticos oxidados (→) y no oxidados (→) en cada tratamiento de maduración observados en el estereoscopio (0,63 X). (A) Tratamiento M0. (B) Tratamiento M1. (C) Tratamiento M2. (D) Tratamiento M3. (E) Tratamiento M4. (F) Tratamiento M5. (G) Tratamiento M6.**

En la figura 25 se puede observar que el tratamiento M0 y el tratamiento M1 presentaron igual porcentaje de embriones oxidados con un total de 38,10%, mientras que el tratamiento M2 generó un 28,57% de embriones oxidados. Los tratamientos M3 y

M6 produjeron un 23,81% respectivamente y el tratamiento M5 fue el que generó la menor cantidad de embriones oxidados, presentando solo un 14,29%.



**Figura 25. Porcentaje de embriones somáticos oxidados y no oxidados presentes en cada tratamiento de maduración.**

### *Análisis inferencial*

En el cuadro 17 se observa el análisis de varianza (ANOVA) que permite determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos de maduración de embriones somáticos con respecto a la variable oxidación. El valor de  $p=0,5986$  ( $p=59,86\%$ ) obtenido es mayor al nivel de significancia nominal ( $\alpha=5\%$ ), aceptando la hipótesis de igualdad de las medias, lo cual indica que no existencia diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

**Cuadro 17.**

**Análisis de varianza para los tratamientos evaluados con respecto a la variable de oxidación de embriones somáticos**

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Oxidación	147	0,03	0,00	159,43	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,95	6	0,16	0,77	0,5986
Tratamiento	0,95	6	0,16	0,77	0,5986
Error	29,05	140	0,21		
Total	30,00	146			

Además la prueba de Duncan (Cuadro 18), indica que no hay subgrupos en los tratamientos empleados para la maduración de los embriones con respecto a la oxidación. El ANOVA nos indica que al no haber diferencias significativas con los tratamientos empleados, la variable oxidación no permite determinar el mejor tratamiento de esta etapa.

**Cuadro 18.**

**Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con respecto a la variable oxidación de embriones.**

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,2075 gl: 140				
Tratamiento	Medias	n	E.E.	
M1	0,38	21	0,10	A
M0	0,38	21	0,10	A
M4	0,33	21	0,10	A
M2	0,29	21	0,10	A
M6	0,24	21	0,10	A
M3	0,24	21	0,10	A
M5	0,14	21	0,10	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

### 3.3. Fase III: Análisis celular de callos y embriones somáticos de Palma Aceitera en el Microscopio Electrónico de barrido (SEM)

#### 3.3.1. Experimento 1: Efecto del tiempo de postfijación química con tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 1%

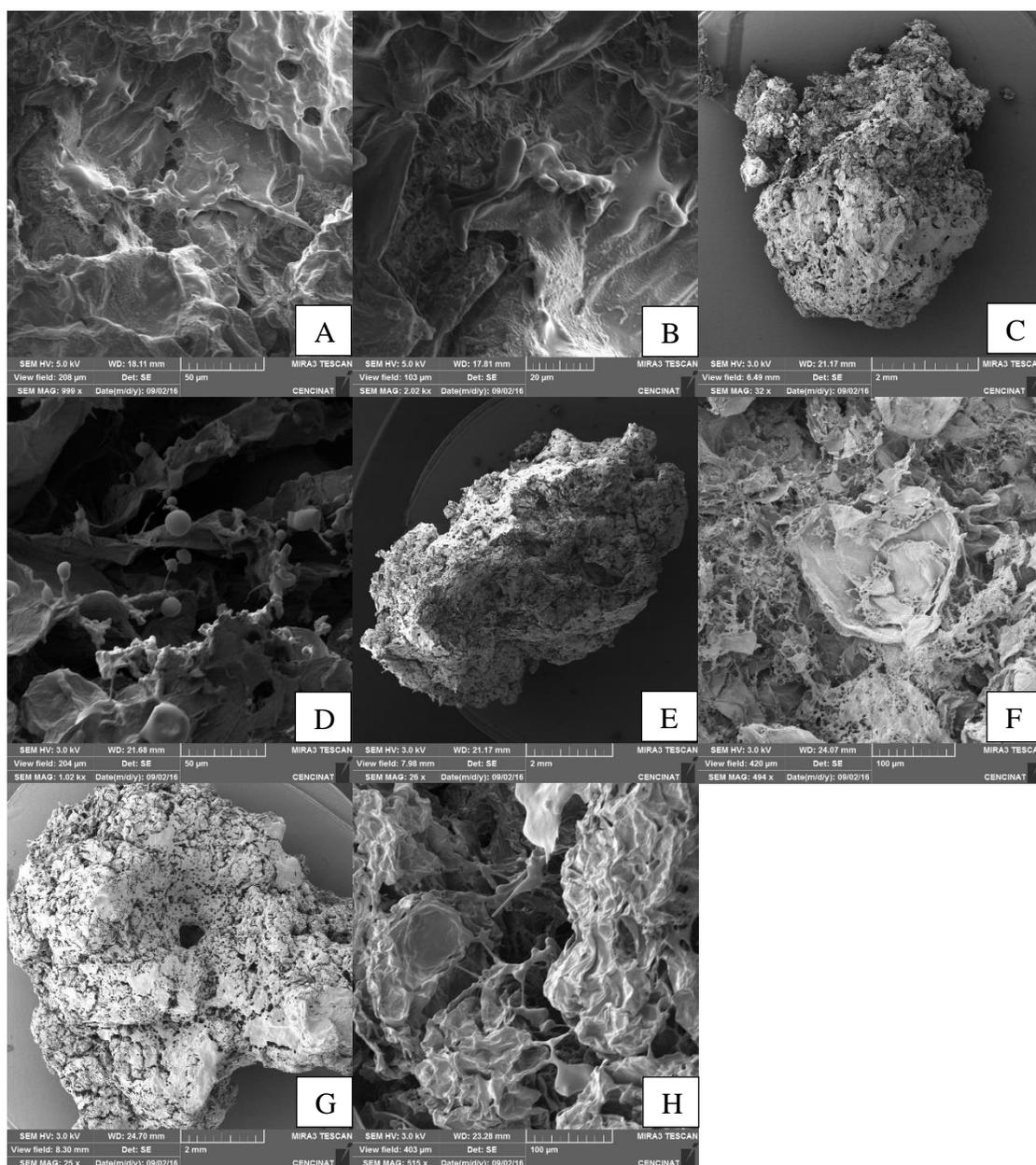
##### *Análisis exploratorio*

Se observaron las muestras vegetales de callos y embriones somáticos de Palma Aceitera en el SEM. Se evidenció la presencia de ruptura celular o encogimiento de las células en las muestras de todos los tratamientos como se observa en la Figura 26 y 27.

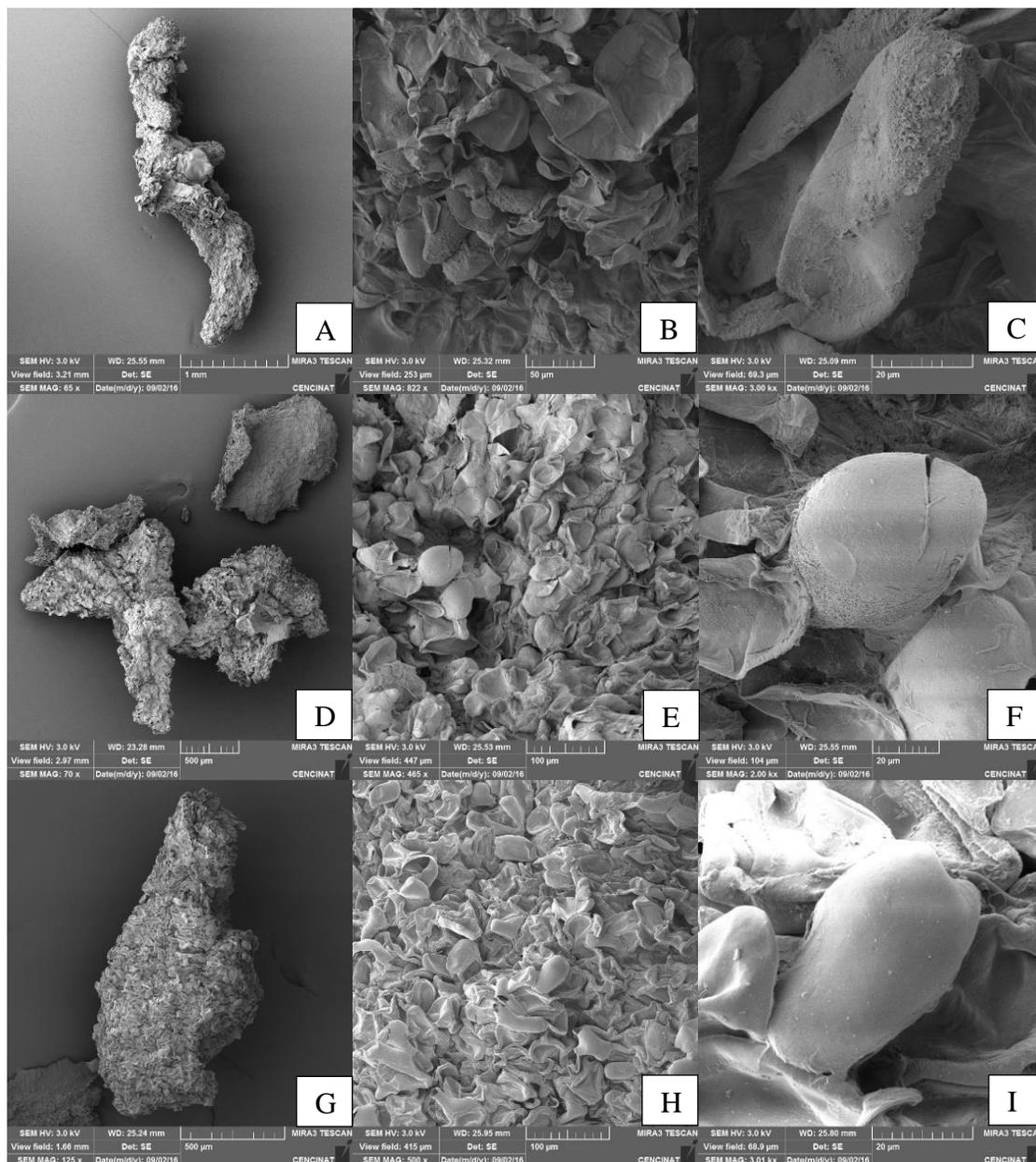
La tabla 13 muestra el análisis de contingencia de los diferentes tratamientos empleados en este primer experimento, indicando el número de muestras vegetales con presencia y ausencia de lisis celular de acuerdo al tratamiento empleado. Se puede observar que todos los tratamientos generan lisis celular en las 6 muestras empleadas.

**Tabla 13.**  
**Tabla de contingencia para la variable lisis celular con relación a los tratamientos relacionados al efecto del tiempo de postfijación con OsO<sub>4</sub> al 1%.**

Tratamiento	Lisis celular	
	Presencia	Ausencia.
S0	6	0
S1	6	0
S2	6	0
S3	6	0



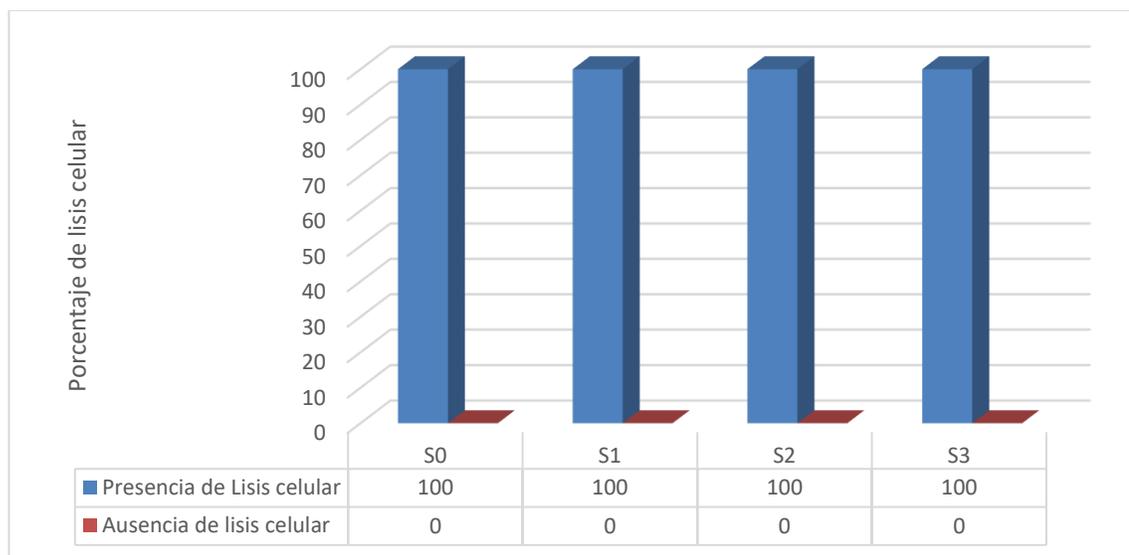
**Figura 26. (A-H) Microfotografías SEM de callos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.). (A-B) Callos sin postfijación con OsO<sub>4</sub> 1%. (C-D) Callos postfijados con OsO<sub>4</sub> 1% por 2 horas, (E-F) 4 horas y (G-H) 6 horas.**



**Figura 27. (A-I) Microfotografías SEM de embriones somáticos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.). (A-C) Embriones somáticos postfijados con OsO<sub>4</sub> 1% por 2 horas, (D-F) 4 horas y (G-I) 6 horas.**

En la figura 28 se puede apreciar que todos los tratamientos generan un 100% de lisis celular, de manera que todos los tratamientos son ineficaces para la observación de

las muestras de callos y embriones somáticos de Palma Aceitera en el SEM. Razón por la cual no se realizó el análisis inferencial.



**Figura 28. Porcentaje de muestras vegetales con presencia y ausencia de lisis celular de acuerdo a los tratamientos utilizados.**

### 3.3.2. Experimento 2: Efecto del tiempo de inmersión y del buffer (fosfato salino, cacodilato de sodio) utilizado en la fijación de las muestras

#### *Análisis exploratorio*

Se evidenció la formación de cristales en las muestras pertenecientes a los tratamientos donde se empleó el tampón fosfato salino 0,1 M (pH 7,2) como se observa en la Figura 29 y 30.

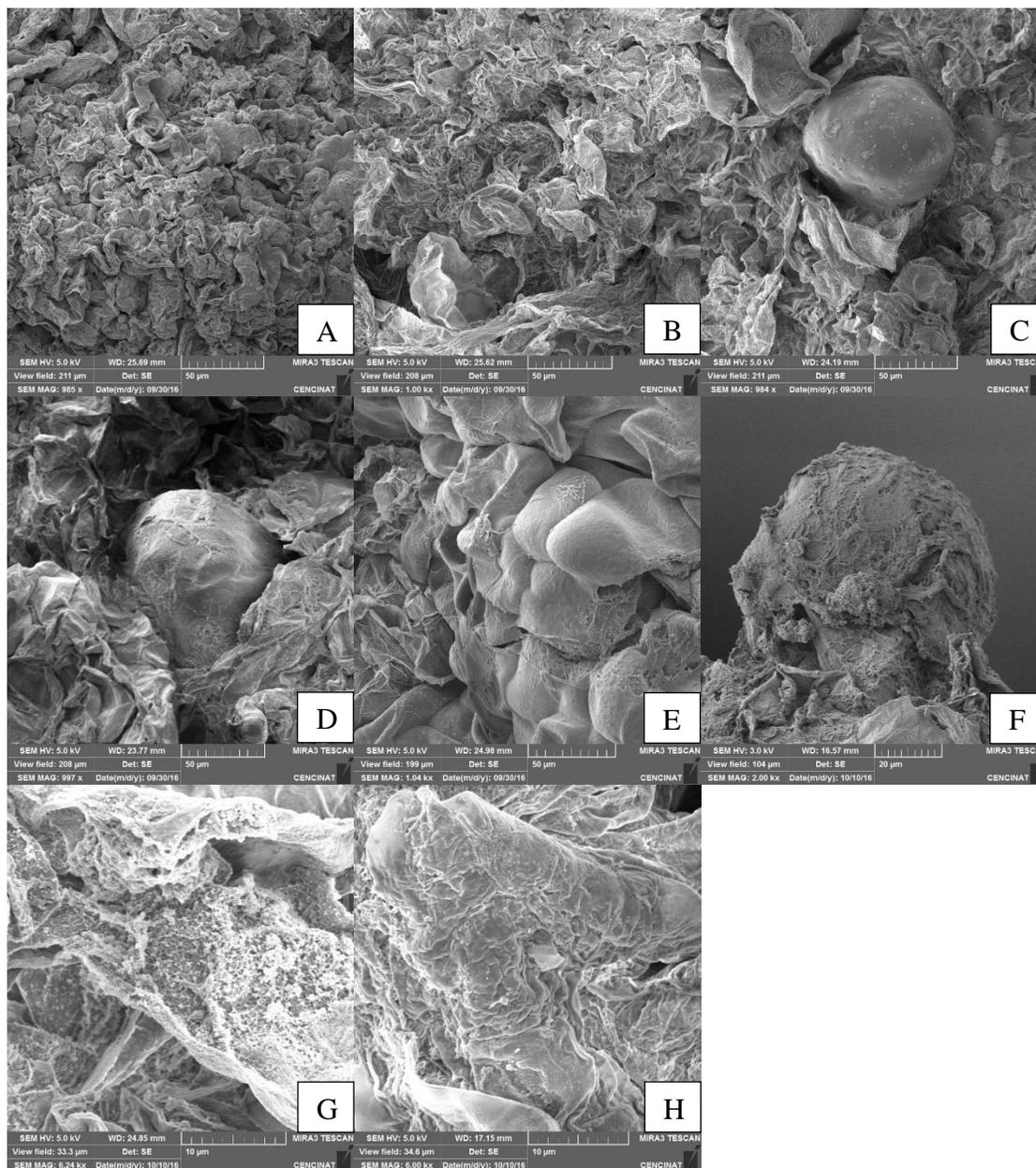
La tabla 14 muestra el análisis de contingencia de los diferentes tratamientos empleados en este segundo experimento, indicando el número de muestras vegetales que presentaron la formación de cristales de acuerdo a los tratamientos empleados. Se puede

observar que los tratamientos E3 y E4 fueron los únicos que no presentaron la formación de cristales, además del tratamiento control (E0).

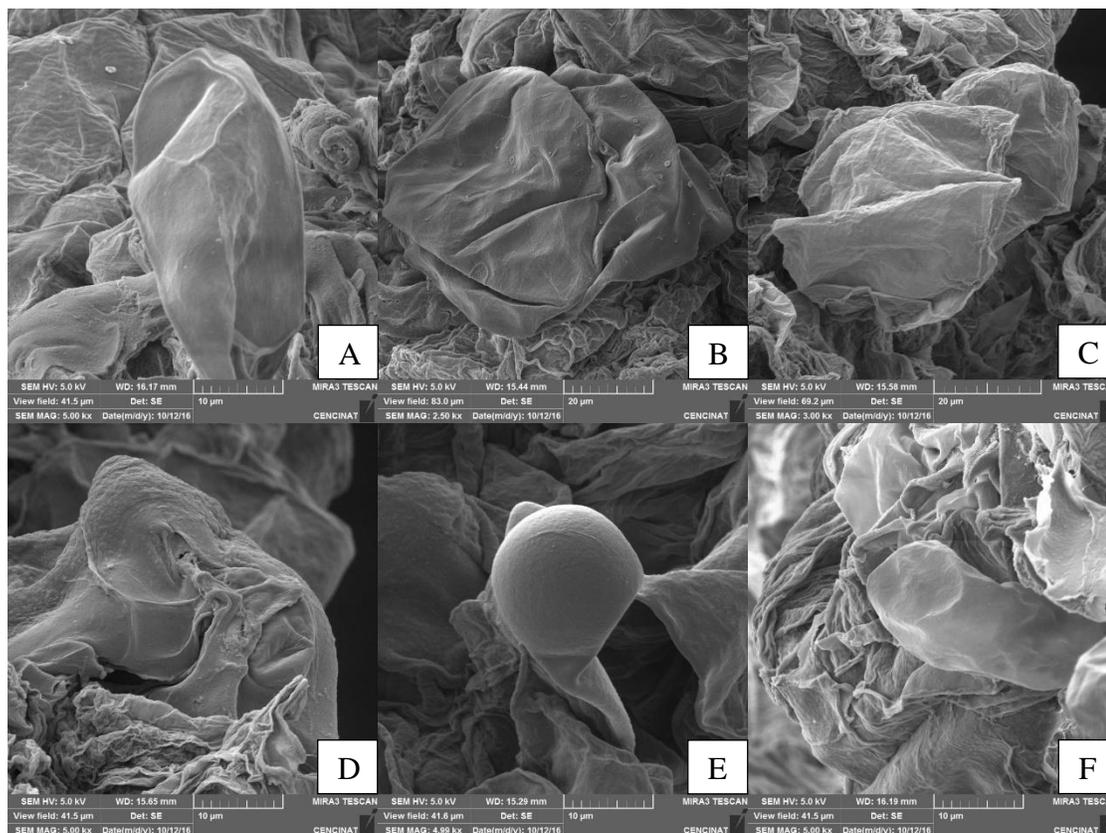
**Tabla 14.**

**Tabla de contingencia para la variable cristalización con relación a los tratamientos relacionados al efecto del tiempo de inmersión y del buffer (fosfato salino, cacodilato de sodio) utilizado en la fijación de las muestras.**

Tratamiento	Cristalización	
	Presencia	Ausencia.
E0	0	6
E1	6	0
E2	6	0
E3	0	6
E4	0	6

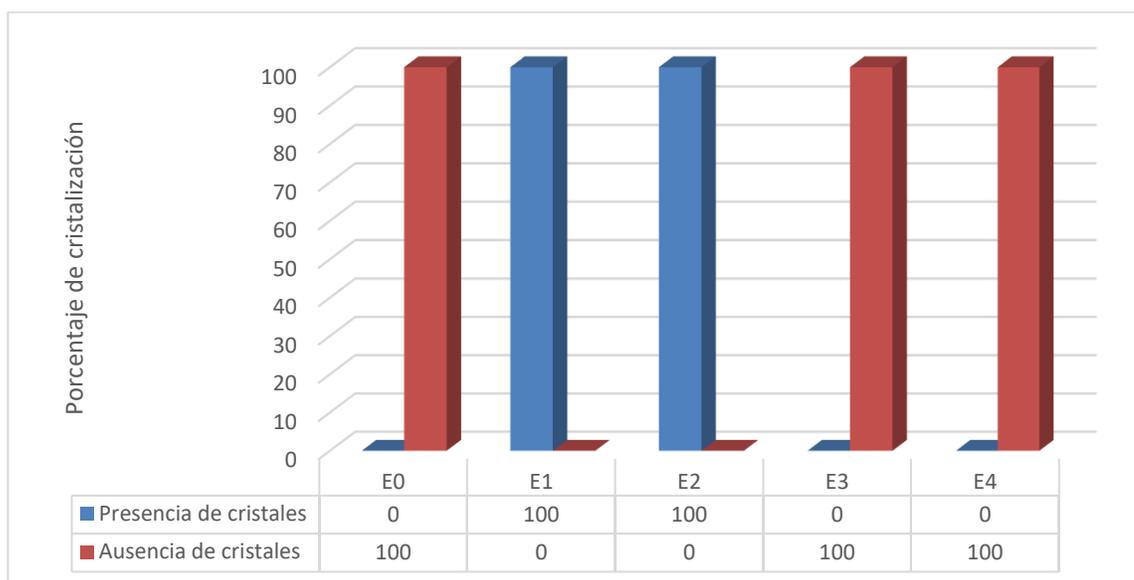


**Figura 29. Microfotografías SEM de callos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.). (A-B). Callos sin fijación con glutaraldehído. (C-E). Callos fijados con glutaraldehído al 4% en tampón fosfato salino 0,1 M (pH 7,2) a temperatura ambiente durante 2 horas y (F-H) 48 horas.**



**Figura 30. (A-F). Microfotografías SEM de callos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.). (A-C) Callos fijados con glutaraldehído al 4% en tampón cacodilato de sodio 0,1 M (pH 6,8) a temperatura ambiente durante 2 horas y (D-F) 48 horas.**

En la figura 31 se puede apreciar que los tratamientos que produjeron un 100% de cristalización fueron los tratamientos E1 y E2, en los cuales se usó el tampón fosfato salino 0,1 M (pH 7,2), independientemente de si el tiempo de inmersión fue 2 horas o 24 horas. Los tratamientos E3 y E4 no produjeron cristalización en las muestras. Sin embargo todos los tratamientos generaron lisis celular por lo cual ningún tratamiento aplicado en este experimento es eficaz para la observación de callos y embriones somáticos en el SEM.



**Figura 31. Porcentaje de muestras vegetales con presencia y ausencia de cristalización de acuerdo a los tratamientos utilizados.**

### 3.3.3. Experimento 3: Efecto del tiempo de inmersión en Hexametildisilazano (HMDS) en el secado de las muestras

#### *Análisis exploratorio*

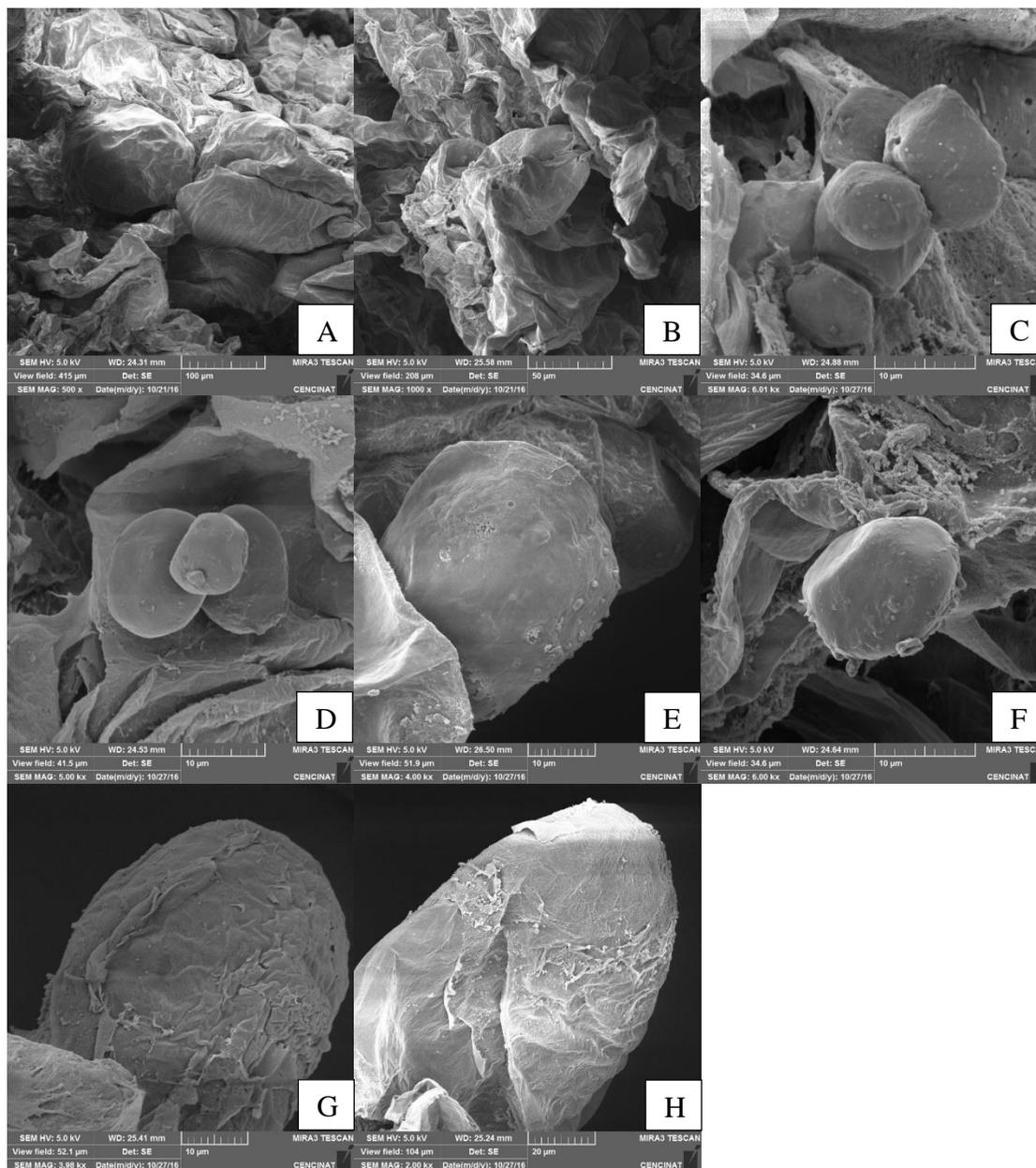
Las muestras de callos y embriones somáticos de Palma Aceitera mostraron plasmólisis (visto por la con presencia de encogimiento celular) conforme aumentaba el tiempo de inmersión en HMDS como se observa en la Figura 32 y 33.

La tabla 15 muestra el análisis de contingencia de los diferentes tratamientos empleados, indicando el número de muestras vegetales con presencia y ausencia de plasmólisis de acuerdo al tratamiento empleado. Se puede observar que el tratamiento control (H0); en el cual las muestras no fueron inmersas en HMDS, presentó el mayor número de muestras con plasmólisis, con un total 6. El tratamiento que consistió en la inmersión de las muestras por 15 minutos en HMDS (H1) no presentó ninguna muestra con plasmólisis.

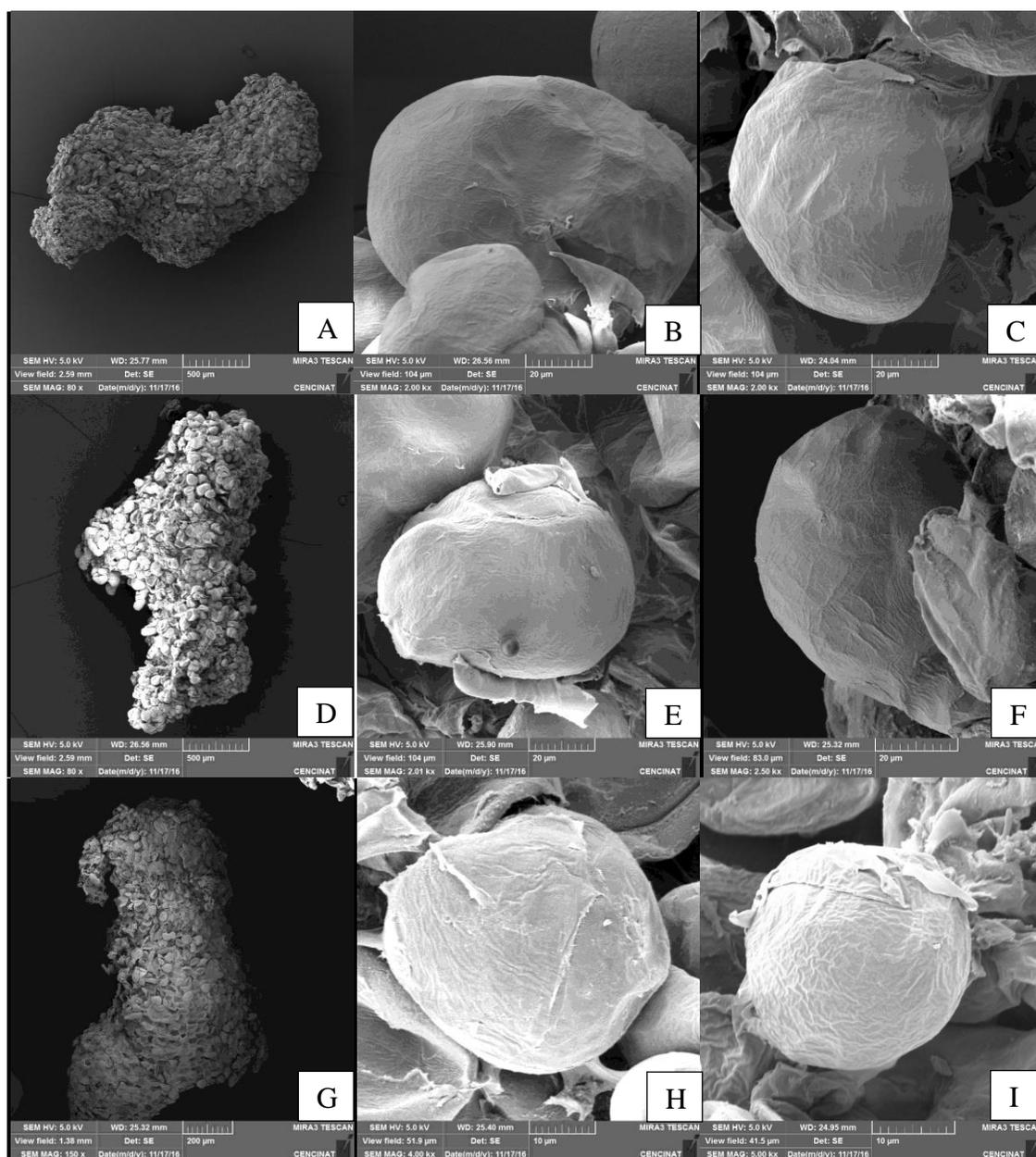
**Tabla 15.**

**Tabla de contingencia para la variable encogimiento celular con relación a los tratamientos relacionados al efecto del tiempo de inmersión en Hexametildisilazano (HMDS) en el secado de las muestras.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Plasmólisis</b>	
	<b>Presencia</b>	<b>Ausencia</b>
H0	6	0
H1	0	6
H2	2	4
H3	4	2



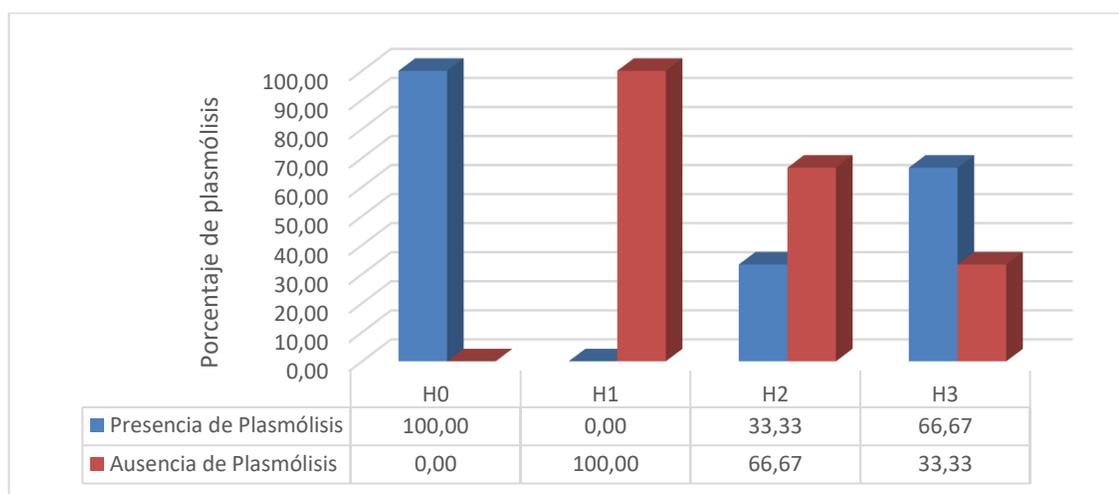
**Figura 32. Microfotografías SEM de callos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.). (A-B) Callos sin inmersión en HMDS (secados en desecador). (C-D) Callos inmersos por 15 minutos, (E-F) 30 minutos y (G-H) 45 minutos en HMDS.**



**Figura 33. (A-I) Microfotografías SEM de embriones somáticos de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.). (A-C) Embriones somáticos inmersos por 15 minutos, (D-F) 30 minutos y (G-I) 45 minutos en HMDS.**

En la figura 34 se puede apreciar que el tratamiento H1 (15 minutos de inmersión en HMDS) presenta un 100% de muestras sin plasmólisis. El tratamiento H2 (30 minutos de inmersión en HMDS) presenta un 33,33% de las muestras con plasmólisis,

mientras que con el tratamiento H3 (45 minutos de inmersión en HMDS) se obtuvo un 66,67%, sin embargo con el tratamiento H0 (0 minutos de inmersión en HMDS) se generó un 100%, convirtiéndose en el tratamiento menos efectivo con respecto a la variable de estudio.



**Figura 34. Porcentaje de muestras vegetales con presencia y ausencia de plasmólisis de acuerdo a los tratamientos utilizados.**

### *Análisis inferencial*

Para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) como se observa en el cuadro 19. El valor de  $p=0,0009$  ( $p= 0,09\%$ ) obtenido en el ANOVA, es menor al nivel de significancia nominal ( $\alpha= 5\%$ ), indicando la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, rechazando así la hipótesis de igualdad de las medias.

**Cuadro 19.**  
**Análisis de varianza para los tratamientos evaluados con respecto a la variable plasmólisis.**

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Plasmólisis	24	0,56	0,49	73,03	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,33	3	1,11	8,33	0,0009
Tratamiento	3,33	3	1,11	8,33	0,0009
Error	2,67	20	0,13		
Total	6,00	23			

Se aplicó la prueba de Duncan para encontrar subgrupos entre los tratamientos. En el cuadro 20 se puede ver que se agrupó a los tratamientos H1 en el subgrupo A, al H2 al subgrupo AB, al H3 al subgrupo BC. Sin embargo donde se encontró la mayor media fue en el tratamiento H1, en el cual se obtuvo la mayor media con un valor de 1. El tratamiento control (H0) presentó una media de 0 y se agrupó en el subgrupo C.

**Cuadro 20.**  
**Prueba de Duncan para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con respecto a la variable plasmólisis.**

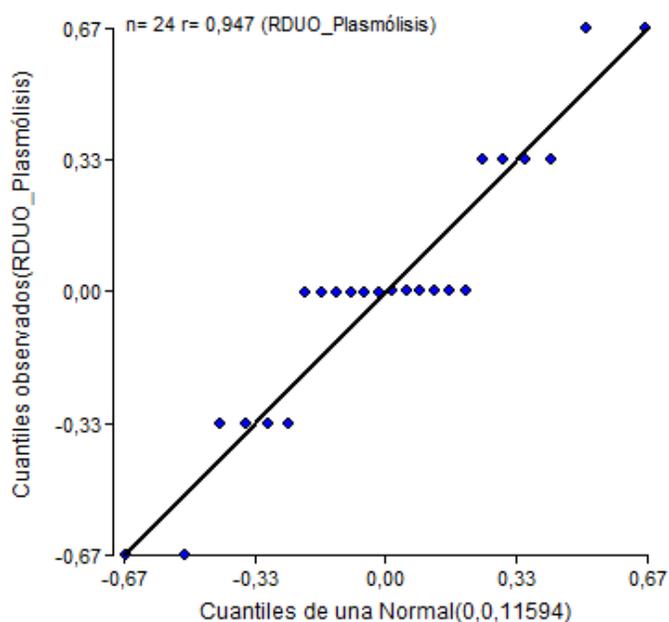
Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 0,1333 gl: 20					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
H1	1,00	6	0,15	A	
H2	0,67	6	0,15	A	B
H3	0,33	6	0,15	B	C
H0	0,00	6	0,15		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal se procedió a realizar la prueba de Shapiro Wilks (modificado) y la gráfica de Q-Q plot. En el cuadro 21 se puede observar la prueba de Shapiro Wills (modificado) donde se obtuvo un valor de  $p < 0,0001$  ( $p = 0,01\%$ ), valor que es menor al nivel de significancia de la prueba ( $\alpha = 5\%$ ), lo cual permite rechazar la hipótesis de que los datos siguen una distribución normal. En la figura 35 se comprueba que los datos no siguen una distribución normal.

**Cuadro 21.**  
**Prueba de Shapiro Wilks (modificado) para la variable plasmólisis.**

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Plasmólisis	24	0,50	0,51	0,60	<0,0001



**Figura 35. Gráfico Q-Q plot de la variable encogimiento celular.**

Como ya se confirmó que los datos correspondientes a la variable plasmólisis no cumplen con la normalidad, se realizó un análisis de varianza no paramétrico aplicando la prueba de Kruskal Wallis como se observa en el cuadro 22, en donde se obtuvo un valor de  $p=0,00051$  ( $p=0,051\%$ ) que es menor al nivel de significancia de la prueba, lo cual indica la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.

**Cuadro 22.**  
**Prueba de Kruskal Wallis para los tratamientos evaluados con respecto a la variable plasmólisis.**

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Plasmólisis	H0	6	0,00	0,00	0,00	9,60	0,0051
Plasmólisis	H1	6	1,00	0,00	1,00		
Plasmólisis	H2	6	0,67	0,52	1,00		
Plasmólisis	H3	6	0,33	0,52	0,00		

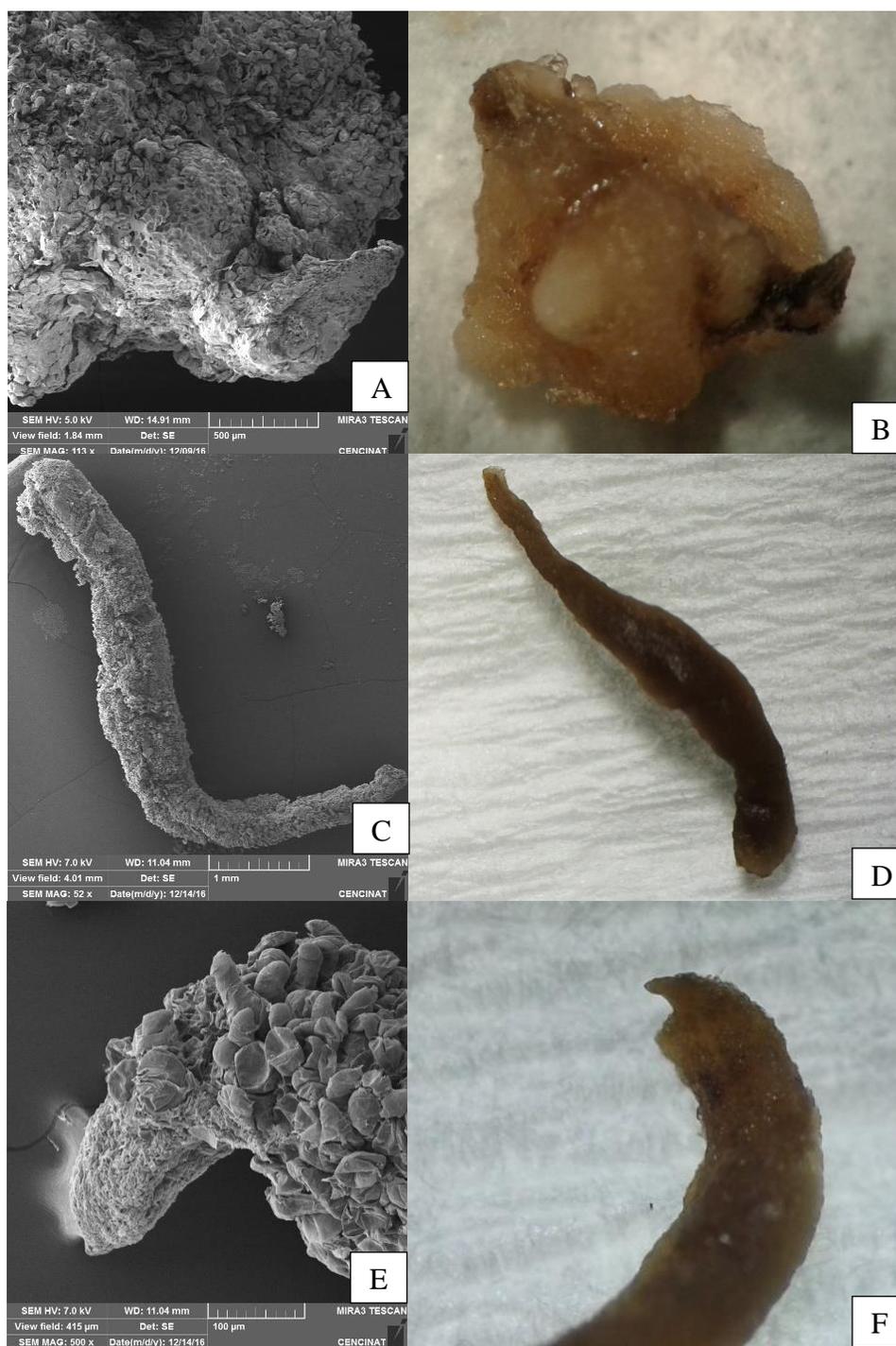
Trat. Ranks	
H0	6,50 A
H3	10,50 A B
H2	14,50 A B
H1	18,50 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

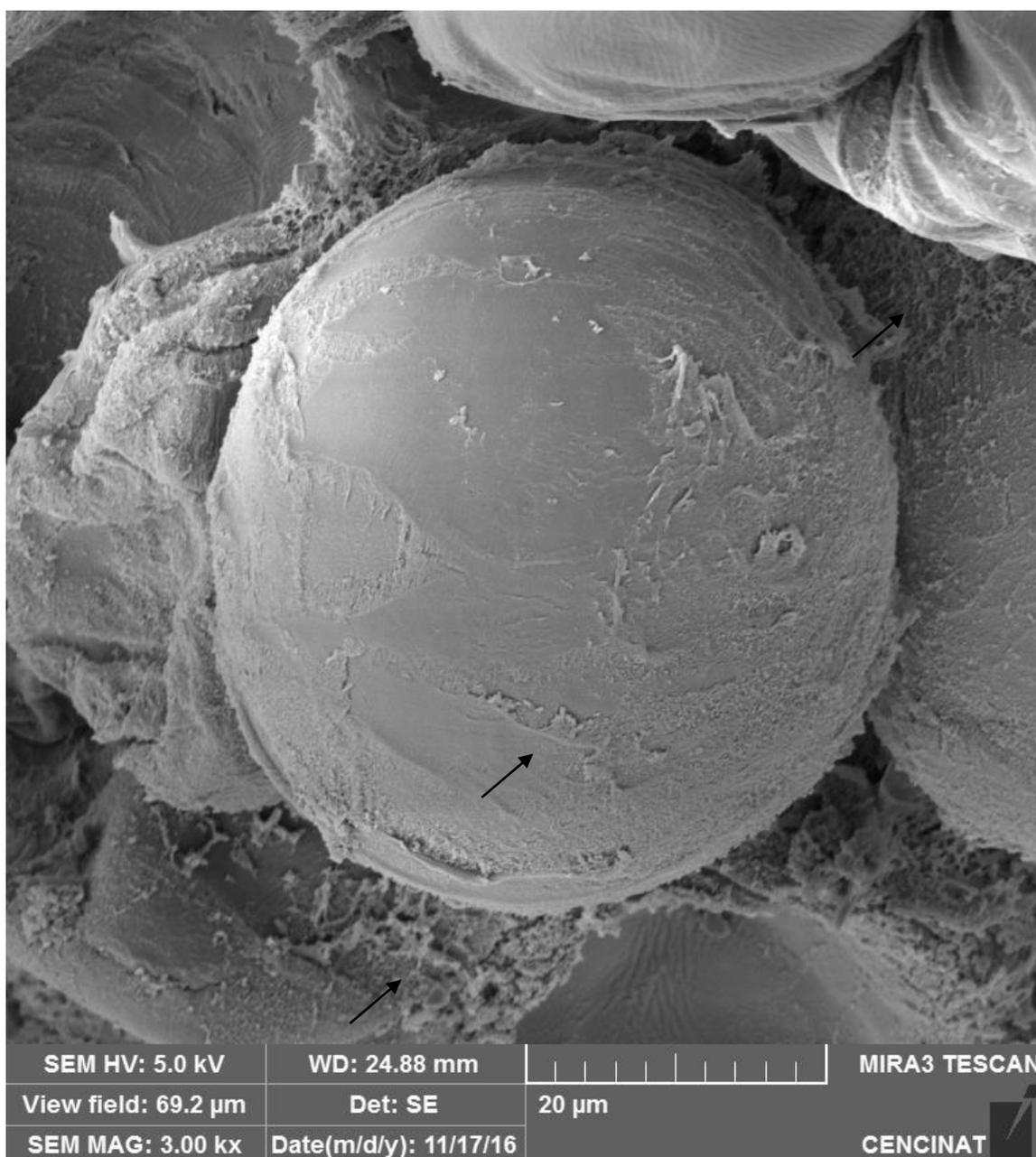
En el cuadro 22 se puede ver que el tratamiento H1 (15 minutos de inmersión en HMDS) posee la mayor media con un valor de 1 y con una desviación estándar de 0, con lo que se puede deducir que este es el mejor tratamiento para la observación de callos y embriones somáticos en el SEM.

Además, se puede comprobar este resultado al analizar los valores de los rangos en el mismo cuadro, en donde se puede ver que el tratamiento H1 presenta el valor más alto de rango (18,50) ubicándose en el subgrupo B, los tratamientos que le siguen de acuerdo al valor del rango son el H2 y H3 con un rango de 14,50 y 10,50 respectivamente, los mismos que están en el subgrupo AB. Por esta razón se puede decir

que el tratamiento H1 es el mejor tratamiento para esta fase. En la figura 36 se puede ver microfotografías SEM de callos y embriones somáticos, mientras que en la figura 37 se puede apreciar la identificación de la matriz extracelular en callos embriogénicos de Palma Aceitera, ambas figuras se obtuvieron con el protocolo descrito H1.



**Figura 36. (A) Microfotografías de embrión somático emergiendo de callo. (B) Embrión emergiendo del callo observado en estereoscopio (0,63 X). (C, E) Microfotografías de embriones somáticos. (D, F) Embriones somáticos observados en el estereoscopio (0,63 X).**



**Figura 37. Microfotografías SEM de callo embriogénico de Palma Aceitera con red fibrilar formando puentes finos entre las células y cubriendo la superficie de las células (→).**

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

La Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) es una de las especies económicas más importantes a nivel mundial. La micropropagación de esta monocotiledónea perenne propagada habitualmente por semillas ha sido estudiada durante más de 20 años. La regeneración de esta especie por medio de embriogénesis somática involucra cuatro etapas: inducción, embriogénesis, desarrollo de brotes y enraizamiento. Según Rival & Parveez (2005), el cultivo *in vitro* de esta planta abarca un tiempo prolongado, tardándose hasta 2 años desde la selección del explante primario hasta la aclimatización de las plantas regeneradas. Esto lo confirman Soh *et al.*, (2011), quienes encontraron que la inducción y velocidad de crecimiento del callo de Palma Aceitera fue bajo comparado con otras especies, además se determinó que la respuesta que presentan los genotipos de palma difiere incluso bajo condiciones similares; sin embargo por esta vía se halló que se puede incrementar el rendimiento de esta especie.

El presente trabajo de investigación además de suministrar datos relacionados con la obtención y maduración de embriones somáticos, proporciona información referente a la morfología detallada de callos y embriones somáticos observados en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), lo que podría servir de sustento a futuras investigaciones para la germinación de embriones hasta la obtención de plantas, además de la estandarización de un protocolo eficiente para disminuir el tiempo de la micropropagación de esta especie.

### **4.1. Iniciación de embriones somáticos de Palma Aceitera**

Según Jiménez (2001), la expresión de la embriogénesis somática puede ser iniciada por diferentes factores, dependiendo de la especie, del genotipo, de las condiciones fisiológicas de la planta donadora, entre otros aspectos. En las angiospermas monocotiledóneas como lo es la Palma Aceitera, la embriogénesis somática ha sido inducida en medios suplementados con auxinas. De acuerdo a Raemakers *et al.*, (1995),

se ha llegado a inducir embriogénesis somática en medios suplementados con 2,4-D, ANA, AIA, AIB y 4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-ácido carboxílico (Picloram); sin embargo también se han logrado resultados con medios libres de auxinas. En el caso de las citoquinas, se ha usado principalmente 6- bencil aminopurina (6-BAP) en un 57%, seguido de kinetina (37%), además de zeatina (ZEA) y tidiazuron (TDZ) en un 3% cada una. Las auxinas son consideradas las hormonas más efectivas en la regulación de la embriogénesis somática, el 2,4-D es el inductor clásico que incrementa los niveles de auxinas endógenas en los explantes. Por esta razón en esta investigación se usó 2,4-D y kinetina en diferentes concentraciones para la iniciación de embriones somáticos.

Se logró obtener la mayor presencia de callos con embriones somáticos, así como el mayor número de embriones somáticos en el medio Murashige & Skoog (1962) con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.8 g L<sup>-1</sup> de phytigel y suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,2 mg L<sup>-1</sup> de kinetina. Aunque los tratamientos para la obtención de la mayor presencia de callos con embriones somáticos no fueron estadísticamente significativos (cuadro 4), si lo fueron para la variable número de embriones somáticos (cuadro 8). De acuerdo a Fki *et al.*, (2003), el subcultivo de suspensiones celulares de callos de palma datilera, en medio líquido enriquecido con bajas concentraciones de 2,4-D (1 mg L<sup>-1</sup>) y de carbón activado (300 mg L<sup>-1</sup>) produjo la diferenciación de los embriones somáticos, en cuya investigación se incrementó la producción de embriones somáticos, de 10 a 200 embriones por mes por cada 100 mg de peso fresco de callo embriogénico. Concentración de 2,4-D que corrobora los resultados obtenidos en esta investigación para la variable presencia de callos con embriones somáticos. No obstante, difiere del número de embriones somáticos obtenidos, debido al uso de suspensiones celulares en lugar de medio sólido, además de no ser la Palma Aceitera. Para el caso de la Palma Aceitera, en el trabajo realizado por De Touchet *et al.*, (1991), se utilizó suspensiones celulares con 100 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1 g L<sup>-1</sup> de carbón activado para la producción de proembriones, además en la investigación se indica que el uso de carbón activado se debería suministrar con el uso de altas concentraciones de auxinas, ya que estas fitohormonas también son absorbidas por el carbón activado. De acuerdo a Thuzar *et al.*,

(2011), el uso de 100-140 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D en presencia de carbón activado solo proporciona 2 a 2,8 mg L<sup>-1</sup> de esta auxina de forma eficiente. Debido a la baja concentración de 2,4-D (1 mg L<sup>-1</sup>) usada en la presente investigación, no se usó carbón activado y no hubo un porcentaje de oxidación alto.

Con respecto al tipo de callo, no se obtuvo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados (cuadro 12). Según Pádua *et al.*, (2013), el callo tipo 3 presenta apariencia globular y beige y se logra obtener con mayor frecuencia con la adición de 1,6 y 9 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, en tanto que el tipo 4 es globular y blanco y se forma generalmente con 3 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D o con 1 mg L<sup>-1</sup> y 9 mg L<sup>-1</sup> de picloram; lo cual difiere a lo encontrado en esta investigación ya que tanto los medios compuestos por 1 o por 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D generaron los dos tipos de callos descritos.

#### **4.2. Maduración de embriones somáticos de Palma Aceitera**

Se usó el medio Murashige & Skoog (1962) con 0,01 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.8 g L<sup>-1</sup> de phytigel y suplementado con kinetina y ABA en diferentes concentraciones. Se obtuvo el mayor número de embriones medianos al utilizar 0,5 mg L<sup>-1</sup> de kinetina y 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ABA. Al emplear 0,5 y 1 mg L<sup>-1</sup> de kinetina con 0,4 y 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ABA respectivamente, se formaron embriones largos. Los tratamientos en donde se usó 0,5 y 1 mg L<sup>-1</sup> de kinetina con 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ABA, y el de 1 mg L<sup>-1</sup> de kinetina con 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ABA fueron los únicos que presentaron embriones maduros. Esto se confirma con los resultados obtenidos por Al-Khayri & Al-Bahrany (2012) en la palma datilera, en donde se encontró que la reducción del crecimiento de los embriones somáticos era función de la concentración de ABA. Se probó diferentes concentraciones de ABA y así se encontró que mientras la concentración de ABA incrementaba a 2,6432 mg L<sup>-1</sup> se produjo inhibición del crecimiento de los embriones somáticos. Mientras que más allá de esa concentración el crecimiento se hizo invariable. Por esta razón, se

sugiere que la concentración mínima de ABA que produce una respuesta en la maduración es  $0,26432 \text{ mg L}^{-1}$ .

Según Konan *et al.*, (2016), el cultivo *in vitro* de la Palma de Aceite ha reportado la producción de embriones asincrónicos de diferente tamaño, color y estado de desarrollo en un mismo cultivo lo cual indica que el desarrollo de los embriones es altamente heterogéneo. Esta heterogeneidad impacta la productividad de las plántulas, con lo cual la producción en gran escala de plantas clonales mediante embriogénesis somática todavía sigue siendo difícil. Al-Khayri & Al-Bahrany (2012), confirman este hecho indicando que una limitación presente en el cultivo *in vitro* de la Palma datilera es la falta de sincronización en el desarrollo de los embriones somáticos. Pero afirman que se puede optimizar la sincronización de los embriones al variar las concentraciones de ABA. En su investigación probaron el efecto combinado de ABA y polietilenglicol en la sincronización de los embriones somáticos. El ABA es una hormona de estrés de la planta que se ha sugerido que ejerce regulación de ciertos genes involucrados en la desecación y maduración de los embriones somáticos (Hatzopoulos *et al.*, 1990). Mientras que el polietilenglicol es un compuesto inductor de estrés osmótico que se incluye en el medio de cultivo para estimular la desecación *in vitro* y de esta manera estimular la síntesis de ABA en el embrión (Viji *et al.*, 2012). También se han observado resultados similares en la investigación realizada por Samosir *et al.*, (1999), donde trabajaron con diferentes concentraciones de ABA y polietilenglicol con el objetivo de obtener una maduración sincronizada de los embriones somáticos del cocotero (*Cocos nucifera*). Estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente investigación donde se produjeron embriones pequeños, medianos, largos y muy largos (maduros), que se pudieron ver en un mismo tratamiento, sin embargo se obtuvo el mayor porcentaje de embriones maduros en el tratamiento M5 ( $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de kinetina y  $0,2 \text{ mgL}^{-1}$  de ABA) y el M2 ( $1 \text{ mgL}^{-1}$  de kinetina y  $0,2 \text{ mgL}^{-1}$  de ABA) con un 28,57% cada uno.

Zouine *et al.*, (2005), encontraron que la adición de ABA al medio de cultivo mejora la maduración de embriones somáticos de palma datilera, además de incrementar

la acumulación de azúcares y proteínas de almacenamiento. Sumaryono *et al.*, (2008), obtuvieron de 10-16 embriones somáticos maduros de Palma Aceitera en cada frasco de sistema de inmersión temporal, al administrar  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de kinetina con  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de ABA al medio de cultivo líquido utilizado, lo cual difiere de los resultados obtenidos en la presente investigación donde solo se obtuvo embriones maduros en los tratamientos en donde se usó  $0,5$  y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de kinetina con  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de ABA, y el de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de kinetina con  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ABA. La mayoría de la embriogénesis somática en la Palma Aceitera se lleva a cabo en un medio sólido, sin embargo, según De Touchet *et al.*, (1991) y Sumaryono *et al.*, (2008), la tasa de crecimiento de callos y embriones somáticos en un medio sólido se considera menor que la de un medio líquido, debido a que con un medio líquido se presenta un contacto total del explante con el medio, sin embargo, todavía se presentan inconvenientes al utilizar un medio líquido como son la vitrificación, el daño celular por la rotación y la falta de oxígeno.

De Touchet *et al.*, (1991), indican la importancia de los reguladores de crecimiento en la maduración de los embriones somáticos. En su investigación usaron un medio líquido sin reguladores de crecimiento, pero obtuvieron embriones con meristemo apical y radicular a una frecuencia muy baja, estos embriones no llegaron a germinar y se necrosaron cuando fueron transferidos a un medio sólido de germinación. Como afirman los autores una oxidación intensa puede causar necrosis. En la presente investigación se obtuvo el menor porcentaje (14,29%) de oxidación de los embriones somáticos usando el medio M5 ( $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de kinetina y  $0,2 \text{ mgL}^{-1}$  de ABA) y el mayor porcentaje de oxidación (38,10%) con el medio M1 ( $1 \text{ mgL}^{-1}$  de kinetina y  $0,4 \text{ mgL}^{-1}$  de ABA), lo cual indica que los embriones obtenidos presentan un potencial para no necrosarse al ser transferidos al medio de germinación.

#### **4.3. Análisis celular de callos y embriones somáticos de Palma Aceitera en el Microscopio Electrónico de barrido (SEM)**

La capacidad para identificar la etapa de madurez adecuada entre las diversas etapas de crecimiento heterogéneas para la conversión directa de los embriones en plántulas permitirá una mejor explotación de su potencial de regeneración. Además, la selección de los embriones en la etapa precisa permitiría su almacenamiento a través de la producción de semillas sintéticas o la crioconservación (Ma *et al.*, 2012). Por esta razón es importante la obtención de microfotografías SEM para un análisis más detallado.

No hay una regla universal para decidir cuándo se debe realizar una postfijación química, por lo cual es necesaria una experimentación para cada tipo de muestra. Cuanto más gruesa sea la célula, se necesita más tiempo para que el fijador o postfijador penetren. Así se ha comprobado que 2% de glutaraldehído penetra en tejidos animales a una profundidad de 0,7 mm en 3 horas a temperatura ambiente (Hayat, 1974). En la presente investigación no se observó diferencias al utilizar el postfijador tetraóxido de osmio.

De acuerdo a Lee & Chow (2012), los tampones son usados en la fijación química para proporcionar un pH adecuado y un ambiente osmótico para que las células puedan ser mantenidas en su forma normal. Para diferentes estudios se han usado los tampones fosfato salino (PBS) y cacodilato de sodio (CB), mientras que en otros no se especifica el tampón usado. De acuerdo a los autores, el cacodilato de sodio tiene la ventaja de evitar la precipitación a bajas concentraciones y de minimizar las concentraciones de microorganismos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo donde se obtuvo cristalización en las muestras en donde se usó PBS pero no en las que se usó CB. Además, según Lee & Chow (2012), la precipitación durante el proceso de fijación es afectada por la cinética, la concentración de los iones y el tipo de tampón utilizado. El tiempo de fijación varía de algunos minutos a 3 días. En este trabajo se empleó 2 y 48 horas; sin embargo no se encontró diferencias en los tiempos empleados.

El protocolo que dio la mejor preservación de la superficie celular fue en el cual se empleó HMDS para el secado de las muestras. Protocolo probado por primera vez en Ecuador. Según Katsen-Globa *et al.*, (2016), el tiempo de inmersión de las muestras en HMDS es proporcional a la plasmólisis o encogimiento celular producido, de manera que mientras mayor sea el tiempo de inmersión, mayor es la plasmólisis o encogimiento celular generado. En su investigación encontraron que el menor encogimiento celular de las células madre mesenquimales humanas se obtuvo con un tiempo de inmersión de 3 minutos en HMDS, mientras que en esta investigación se obtuvo la menor presencia de plasmólisis de las células de callos y de los embriones somáticos con 15 minutos de inmersión. Además estos resultados son corroborados por Katsen-Globa *et al.*, (2016), donde se obtuvo una excelente preservación de la superficie de los fibroblastos del ratón luego del secado de punto crítico (método más usado para muestras biológicas) y del secado por inmersión en HMDS, prácticamente sin diferencias entre los dos métodos utilizados. Estos resultados concuerdan con los estudios que comparan el secado mediante punto crítico y el secado con HMDS de muestras de biofilms encontrados por Fratesi *et al.*, (2004). Por otra parte, el secado por HMDS es un método más rápido, simple y barato, además de no requerir ningún equipo especial, a parte de la cabina extractora de gases. Con la liofilización se pueden formar cristales de hielo, agujeros en las membranas celulares o encogimiento celular, por lo cual el secado con HMDS produce una excelente preservación de la superficie celular y es una alternativa cuando no se dispone del secado de punto crítico (Katsen-Globa *et al.*, 2016).

Por otra parte se observó la presencia de la matriz extracelular en la superficie de células embriogénicas y entre las células embriogénicas. Algunos autores coinciden en que la aparición de la matriz extracelular es una característica asociada con la embriogénesis somática, así se ha descrito en gimnospermas (Šamaj *et al.*, 2008) y angiospermas (Chapman *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2011). Esto también lo ha reportado Steinmacher *et al.*, (2012), afirmando que la presencia de la matriz extracelular está asociada con un grupo de células específicas que son las que desarrollan los embriones somáticos. Esto se determinó ya que se encontró que la matriz extracelular cubre células

del callo y posteriormente se rompe para dar lugar al desarrollo de embriones somáticos. Además se encontró que la matriz extracelular tiene una estructura granular y fibrilar. Se postula que esta estructura podría servir como un marcador estructural temprano de la competencia embriogénica en un callo (Palanyandy *et al.*, 2013).

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

La Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) es de gran importancia económica para diferentes sectores, no solo por el aceite vegetal que produce si no por sus demás aplicaciones, también tiene una importancia social. La embriogénesis somática es una técnica que permite la propagación clonal de la planta, por lo cual es de gran importancia el desarrollo de medios de cultivo óptimos para la obtención y maduración de embriones somáticos.

El medio de cultivo Murashige & Skoog (1962), suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.8 g L<sup>-1</sup> de phytigel, 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,2 mg L<sup>-1</sup> de kinetina (Tratamiento II) generó la mayor cantidad de callos con embriones somáticos y el mayor número de embriones somáticos, con un total del 80% de callos con embriones somáticos mientras que con este tratamiento se obtuvieron 35 embriones somáticos.

En cuanto al tipo de callo, no se observaron diferencias significativas con los tratamientos empleados. Se obtuvieron callos con apariencia globular y beige (tipo 3) y también callos de apariencia globular y blanco (tipo 4). Sin embargo se obtuvo un 100% de callos tipo 3 con el tratamiento II. Sumando lo anteriormente descrito se puede concluir que el mejor medio para la etapa de iniciación de embriones somáticos fue el medio II.

El medio de cultivo Murashige & Skoog (1962), suplementado con 0,01 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.8 g L<sup>-1</sup> de phytigel y 1 mgL<sup>-1</sup> de kinetina con 0,2 mgL<sup>-1</sup> de ABA (M2), además del medio con 0,5 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,2 mgL<sup>-1</sup> de ABA (M5) generaron un 28,57% de embriones maduros, mientras que el medio con 1 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,1 mgL<sup>-1</sup> de ABA (M3) generó un 14,29% de embriones maduros. De manera que fueron los únicos tratamientos que produjeron embriones maduros.

En los tratamientos de maduración, se generó un porcentaje de oxidación bajo, desde 14,29%, obtenido con el tratamiento M5, hasta 38,10% obtenido con el tratamiento M1 (1 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0,4 mgL<sup>-1</sup> de ABA), con esto y lo anteriormente

expuesto, se pudo determinar que el medio M5 fue el mejor medio para la etapa de maduración de embriones somáticos.

El presente estudio generó resultados aceptables en la obtención y maduración de embriones somáticos, los embriones maduros obtenidos en este proyecto pueden ser sometidos a medios de germinación para lograr producir por primera vez plantas de Palma Aceitera por medio de embriogénesis somática en el Ecuador.

El protocolo que dio mejor resultado para evitar el encogimiento celular, así como la cristalización del material vegetal destinado a la observación en el Microscopio electrónico de barrido (SEM), fue en el cual se prefijaron las muestras con 4% de glutaraldehído en tampón cacodilato de sodio 0,1 M (pH 6,8) a temperatura ambiente durante 2h. Luego se enjuagaron con el tampón tres veces durante 30 minutos cada vez. Posteriormente se realizó una deshidratación gradual con una serie creciente de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 99%) por 30 minutos. Y para el secado, las muestras se colocaron en HMDS por 15 minutos y se dejaron en la cámara extractora de gases toda la noche.

Además por primera vez en el Ecuador se generó un procedimiento que disminuye el encogimiento celular y evita la cristalización de las muestras vegetales, lo cual se podría utilizar para la observación de otras muestras biológicas en el microscopio electrónico de Barrido (SEM). Debido al bajo costo del HMDS, comparado con otros procedimientos donde se necesita de equipos especiales como es el caso del secado de punto crítico que es el método más usado en el caso de muestras biológicas; el procedimiento obtenido en esta investigación tiene un gran potencial para su utilización en otras muestras.

## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Es necesario que se termine el proyecto con la fase de germinación de embriones somáticos para lograr obtener plantas completas de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) por medio de embriogénesis somática.

De acuerdo a los medios de cultivo que dieron mejores resultados al terminar el proyecto, sería importante realizar pruebas con suspensiones celulares o con sistemas de inmersión temporal para evaluar la viabilidad de obtener mayor cantidad de embriones somáticos maduros, así como de disminuir el tiempo en el que se obtuvieron en el presente estudio.

Se debería estudiar la embriogénesis somática secundaria en esta especie para evitar la maduración embriogénica asincrónica que se obtuvo en el presente proyecto, además de aumentar el número de embriones maduros obtenidos para generar una producción masiva y de calidad de planta completas.

Se debería realizar pruebas moleculares para determinar si existe variación somaclonal, al comparar la planta madre utilizada con los embriones somáticos obtenidos.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, C. (2012). *Inducción de callos embriogénicos en explantes INIAP de palma africana (Elaeis guineensis) y palma americana (Elaeis oleífera) con resistencia y/o tolerancia a la pudrición de cogollo* (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí.

Al-Khayri, J. M., & Al-Bahrany, A. M. (2012). *Effect of abscisic acid and polyethylene glycol on the synchronization of somatic embryo development in date palm (Phoenix dactylifera L.)*. *Biotechnology*, 11(6), 318.

Bakoumé, C., Wickneswari, R., Siju, S., Rajanaidu, N., Kushairi, A., & Billotte, N. (2015). *Genetic diversity of the world's largest oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) field genebank accessions using microsatellite markers*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62(3), 349-360.

Barcelos, E., Rios, S. D. A., Cunha, R. N., Lopes, R., Motoike, S. Y., Babiychuk, E., ... & Kushnir, S. (2015). *Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement*. *Frontiers in plant science*, 6, 190.

Basiron, Y. (2007). *The palm-oil advantage in biofuel*. New Straits Times. Recuperado de <http://www.mpoc.org.my>.

Chapman, A., Blervacq, A. S., Tissier, J. P., Delbreil, B., Vasseur, J., & Hilbert, J. L. (2000). *Cell wall differentiation during early somatic embryogenesis in plants. I. Scanning and transmission electron microscopy study on embryos originating from direct, indirect, and adventitious pathways*. *Canadian Journal of Botany*, 78(6), 816-823.

Corley R. H. V., Tinker P. B. (2003). *The Oil Palm*. Oxford: John Wiley & Sons; 10.1002/9780470750971

De Touchet, B., Duval, Y., & Pannetier, C. (1991). *Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.)*. *Plant Cell Reports*, 10(10), 529-532.

FAOSTAT. (2013). *FAOSTAT Agriculture Data*. FAO, Rome, Italy. Recuperado de: <http://faostat.fao.org>

Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N., & Rival, A. (2003). *An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, Phoenix dactylifera L., cv. Deglet Nour*. *Plant Cell Reports*, 21(6), 517-524.

Fratesi, S. E., Lynch, F. L., Kirkland, B. L., & Brown, L. R. (2004). *Effects of SEM preparation techniques on the appearance of bacteria and biofilms in the Carter Sandstone*. *Journal of Sedimentary Research*, 74(6), 858-867.

Garcés, I. C., & Cuéllar, M. C. (1997). *Productos derivados de la industria de la palma de aceite: usos*. *Revista Palmas*, 18(1), 33-48.

García, S. A., Oramas, G. G., & Barredo, F. (2016). *Estudio histológico de la embriogénesis somática en Agave fourcroydes Lem*. *Biotecnología Vegetal*, 2(1).

Hartley, C. W. S. (1977). *The oil palm (Elaeis guineensis Jacq.)*. London: Longman

Hatzopoulos, P., Fong, F., & Sung, Z. R. (1990). *Absciscic acid regulation of DC8, a carrot embryonic gene*. *Plant physiology*, 94(2), 690-695.

Hayat, M. A. (1974). *Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological applications. Volume 1*. Van Nostrand Reinhold Company.

Infoagro Systems, S.L. (2016). *El cultivo de la palma africana*. Recuperado de: [http://www.infoagro.com/documentos/el\\_cultivo\\_palma\\_africana.asp](http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_palma_africana.asp)

Janick, J., Paull, R. (2008). *The Encyclopedia of Fruit and Nuts*. London: CABI.

Jayanthi, M., Susanthi, B., Mohan, N. M., & Mandal, P. K. (2015). *In vitro somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of Elaeis guineensis* (Jacq.). *SpringerPlus*, 4(1), 1-7.

Jiménez, V. M. (2001). *Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(2), 196-223.

Katsen-Globa, A., Puetz, N., Gepp, M. M., Neubauer, J. C., & Zimmermann, H. (2016). *Study of SEM preparation artefacts with correlative microscopy: Cell shrinkage of adherent cells by HMDS-drying*. *Scanning*.

Konan, K. E., Durand-Gasselin, T., Kouadio, Y. J., Flori, A., Rival, A., Duval, Y., & Pannetier, C. (2010). *In vitro conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms*. *Plant cell reports*, 29(1), 1-13.

Lee, J. T. Y., & Chow, K. L. (2012). *SEM sample preparation for cells on 3D scaffolds by freeze-drying and HMDS*. *Scanning*, 34(1), 12-25.

Lešer, V., Drobne, D., Pipan, Ž., Milani, M., & Tatti, F. (2009). *Comparison of different preparation methods of biological samples for FIB milling and SEM investigation*. *Journal of microscopy*, 233(2), 309-319.

Ma, X., Bucalo, K., Determann, R. O., Cruse-Sanders, J. M., & Pullman, G. S. (2012). *Somatic embryogenesis, plant regeneration, and cryopreservation for Torreya taxifolia, a highly endangered coniferous species*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(3), 324-334.

Maldonado, K. (2015). *Inducción de callo y obtención de embriones somáticos en Palma Aceitera (Elaeis guineensis)* (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí.

Mariani, T. S., Latif, S., Ginting, G., & Miyake, H. (2008). *Somatic embryogenesis of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) for synthetic seed production*.

Muniran, F., Bhore, S. J., & Shah, F. H. (2008). *Micropropagation of Elaeis guineensis Jacq.'Dura': Comparison of three basal media for efficient regeneration. Indian journal of experimental biology, 46(1), 79.*

Murashige T., & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum, 15, 473-497.*

Palanyandy, S. R., Suranthran, P., Gantait, S., Sinniah, U. R., Subramaniam, S., Aziz, M. A., ... & Roowi, S. H. (2013). *In vitro developmental study of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) polyembryoids from cell suspension using scanning electron microscopy. Acta physiologiae plantarum, 35(5), 1727-1733.*

Pádua, M. S., Paiva, L. V., Labory, C. R., Alves, E., & Stein, V. C. (2013). *Induction and characterization of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) pro-embryogenic masses. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 85(4), 1545-1556.*

Pan, X., Yang, X., Lin, G., Zou, R., Chen, H., Šamaj, J., & Xu, C. (2011). *Ultrastructural changes and the distribution of arabinogalactan proteins during somatic embryogenesis of banana (Musa spp. AAA cv.'Yueyoukang 1'). Physiologia plantarum, 142(4), 372-389.*

PROECUADOR. (2014). Análisis Sectorial- Aceite de palma y elaborados 2014. Recuperado de: [http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/05/PROEC\\_AS2016\\_ACEITEPALMA.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/05/PROEC_AS2016_ACEITEPALMA.pdf).

Raemakers, C. J. J. M., Jacobsen, E., & Visser, R. G. F. (1995). *Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. Euphytica, 81(1), 93-107.*

Raghavan, V. (2006). *Double fertilization: embryo and endosperm development in flowering plants.* Springer Science & Business Media.

Raven, P.H, Evert, R.F, & Eichhorn, S.E. (2013). *Biology of Plants.* (8th ed). New York-United States of America: W.H.Freeman.

Rees, R. W., Flood, J., Hasan, Y., Potter, U., & Cooper, R. M. (2009). *Basal stem rot of oil palm (Elaeis guineensis); mode of root infection and lower stem invasion by Ganoderma boninense*. *Plant Pathology*, 58(5), 982-989.

Rey, L., Gómez, P., Ayala, I., Delgado, W., Rocha, P. (2004). *Colecciones genéticas de palma de aceite Elaeis guineensis (Jacq.) y Elaeis oleifera (H.B.K) de Cenipalma: Características de importancia para el sector palmicultor*. Palmas (Colombia) 25 (especial): 39 – 48.

Rival, A., & Parveez, G. K. (2005). 4.2 *Elaeis guineensis Oil Palm*. General Editor: Gabrielle J. Persley, The Doyle Foundation, Glasgow, Scotland., 113.

Rivas Figueroa, F., & Herrera Isla, L. (2015). *Organismos asociados a la pudrición del cogollo de la Palma Aceitera (Elaeis guineensis Jacq) en San Lorenzo, Ecuador*. *Revista de Protección Vegetal*, 30(3), 193-203.

Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de tejidos vegetales en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura tropical (CIAT). Cali, Colombia.

Šamaj, J., Salaj, T., Matúšová, R., Salaj, J., Takáč, T., & Volkmann, D. (2008). *Arabinogalactan-protein epitope Gal4 is differentially regulated and localized in cell lines of hybrid fir (Abies alba × Abies cephalonica) with different embryogenic and regeneration potential*. *Plant cell reports*, 27(2), 221-229.

Samosir, Y. M. S., Godwin, I. D., & Adkins, S. W. (1999). *The use of osmotically active agents and abscisic acid can optimise the maturation of coconut somatic embryos*. In *Current Advances in Coconut Biotechnology* (pp. 341-354). Springer Netherlands.

Smith, R. H. (2013). *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Academic Press.

Soh, A. C., Wong, G., Tan, C. C., Chew, P. S., Chong, S. P., Ho, Y. W., ... & Kumar, K. (2011). *Commercial-scale propagation and planting of elite oil palm clones:*

research and development towards realization. *Journal of Oil Palm Research*, 23(1), 935-952.

Steinmacher, D. A., Saare-Surminski, K., & Lieberei, R. (2012). *Arabinogalactan proteins and the extracellular matrix surface network during peach palm somatic embryogenesis. Physiologia plantarum*, 146(3), 336-349.

Sumaryono, I. R., Kasi, P. D., & Ginting, G. (2008). *Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryos of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) in temporary immersion system. J. Agric*, 1(2), 109-114.

Suranthran, P., Gantait, S., Sinniah, U. R., Subramaniam, S., Alwee, S. S. R. S., & Roowi, S. H. (2012). *Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids. Plant Growth Regulation*, 66(2), 101-109.

Torres, K., & Morales, M. (2012). *Palmas oleaginosas de Colombia*. Recuperado de: [http://palmasoleaginosasdecolombia.blogspot.com/2012\\_03\\_01\\_archive.html](http://palmasoleaginosasdecolombia.blogspot.com/2012_03_01_archive.html).

Thuzar, M., Vanavichit, A., Tragoonrung, S., & Jantasuriyarat, C. (2011). *Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. Acta physiologiae plantarum*, 33(1), 123-128.

Viji, M., Maheswari, P., Karuppanapandian, T., & Manoharan, K. (2012). *Effect of polyethylene glycol and mannitol on somatic embryogenesis of pigeonpea, Cajanus cajan (L.) Millsp. African Journal of Biotechnology*, 11(45), 10340-10349.

Viñas, M., & Jiménez, V. M. (2011). *Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 229-242.

Zhou, W., & Wang, Z. L. (Eds.). (2007). *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*. Springer science & business media

Zouine, J., El Bellaj, M., Meddich, A., Verdeil, J. L., & El Hadrami, I. (2005). *Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in Phoenix dactylifera. Plant cell, tissue and organ culture*, 82(1), 83-92.