

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ÁCIDO GIBERÉLICO CON AGUA DE COCO Y CASEÍNA HIDROLIZADA COMO FUENTES DE NITRÓGENO EN LA MADURACIÓN DE EMBRIONES DE PALMA COCO CUMBÉ (*Parajubaea cocoides* Burret) OBTENIDOS A PARTIR DE CALLOS, MEDIANTE ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES.

BLANCA ESTHELA ENCALADA ALDAZ ¹

¹ Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, Quito, Ecuador.

RESUMEN: *Parajubaea cocoides* Burret es una palma alto andina propia de los valles y alturas ecuatoriales desde Loja hasta Ibarra, debido a que la germinación es complicada se ha implementado el cultivo *in vitro* como una opción para la producción de esta palma. En el presente trabajo de investigación se estableció un protocolo para la maduración de embriones somáticos mediante el establecimiento de suspensiones celulares, a partir de embriones cigóticos inmaduros. En el establecimiento de las suspensiones los resultados mostraron que las mismas alcanzan el crecimiento exponencial a los 16 y 22 días. Los resultados indicaron que en los tratamientos que contenían 1.5 - 3 mg L⁻¹ de GA₃ y 200 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada, se observó la presencia de embriones en fase cotiledonar, la capacidad embriogénica a las 12 semanas fue del 40.79% al utilizar 1.5 mg L⁻¹ de GA₃, y al utilizar 3 mg L⁻¹ de GA₃, se obtuvo una capacidad embriogénica del 45.36 %. Finalmente, se concluye que el emplear fuentes de nitrógeno orgánico en las suspensiones celulares, genera excelentes resultados en la maduración de embriones.

PALABRAS CLAVES: Embriogénesis somática, Maduración, Ácido giberélico, Caseína hidrolizada, Suspensión celular.

ABSTRACT: *Parajubaea cocoides* Burret is a palm own high Andean valleys and equatorial heights from Loja to Ibarra, because germination is complicated is implemented *in vitro* culture as an option for the production of this palm. In the present research a protocol for maturation of somatic embryos was established by setting cell suspensions from immature zygotic embryos. In suspension establishment, results showed that suspensions reach the highest point on the exponential growth curve between at 16 to 22 days, after this time cellular decay begins. The results showed that contain 1.5 - 3 mg L⁻¹ de GA₃ and 200 mg L⁻¹ casein hydrolyzate shown cotyledonary stage embryos, using 1.5 mg L⁻¹ GA₃, 40.79% of embryogenic capacity was observed at 12 weeks. On the other hand, using 3 mg L⁻¹ GA₃ an embryogenic capacity of 45.36 % was obtained. Finally, we conclude that using of organic nitrogen sources on cell suspensions provides excellent results in maturing embryo.

KEYWORDS: Somatic embryogenesis, Maturation, Gibberellic acid, Hydrolyzed casein, Suspension cell.

INTRODUCCIÓN

El Municipio de Quito, ha identificado 24 especies emblemáticas de la ciudad, entre los que se encuentran *Bactris gasipaes*, *Iriartea deltoidea*, *Phytelephas aequatorialis*, etc. *Parajubaea cocoides* Burret es un icono de la región andina, ya que posee valor cultural, económico y alimenticio, por ende debería formar parte de esta lista, contribuyendo de esta manera a su preservación. Se encuentra amenazada debido a diversas causas, tales como: tala indiscriminada, vandalismo, incendios forestales, crecimiento poblacional urbano y vial, transformaciones agrarias, plagas y agentes atmosféricos (Henderson & Bernal, 1995). Sin embargo no se tiene certeza si la especie está en peligro de extinción dentro de la naturaleza ecuatoriana, pues hasta el momento por los botánicos, no ha sido registrada en estado silvestre en nuestro país (Balslev *et al.*, 2013).

Parajubaea cocoides Burret, es una palma alto andina de los valles y alturas ecuatoriales desde Loja hasta Ibarra, puede llegar a alcanzar veinte metros de altura; son palmeras decorativas e interesantes por su resistencia al frío, ya que se ha constatado que pueden superar temperaturas mínimas de cuatro a cinco grados bajo cero, también favorecen la captación de CO₂, control de erosión y actúan como regulador climático, por tanto sería conveniente que se cultiven en mayor cantidad (Pintaud & Aleano, 2008).

A lo largo del Ecuador, se cultivan estas palmas como árboles que adornan las calles; las encontramos en plazas y jardines, por lo que su mayor uso es de índole ornamental, aunque es importante indicar que su fruto es comestible y se lo conoce como coquito; también se utiliza el endocarpio para tallar y hacer adornos (Henderson & Bernal, 1995).

El cultivo *in vitro*, está fundamentado en el principio de la totipotencia de las células, en donde se debe entender que toda célula vegetal contiene material genético de la planta madre, por esta razón posee la capacidad de regenerar una planta completa, el aporte de esta tecnología ha permitido la propagación masiva de plantas, clonación, obtención de plantas libres de virus, producción de semillas sintéticas,

conservación de germoplasma, obtención de metabolitos secundarios, producción de nuevos híbridos y germinación de semillas (Pérez, 1998).

La embriogénesis somática *in vitro*, es posible ya que los tejidos somáticos vegetales tienen la capacidad de desarrollarse en un embrión, por medio de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento (Reinert, 1958; Steward, Mapes & Mears, 1958).

La embriogénesis somática, es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos, por ello, los embriones somáticos son estructuras bipolares, con un eje radical y apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno. No contienen un nuevo grupo de genes, sino que poseen la misma combinación genética de la planta madre de la cual se toma el explante (Pérez, 1998; Roca, 1993).

Teóricamente esta técnica, es la más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* ya que el embrión posee una naturaleza bipolar, sus altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo y finalmente la posibilidad de encapsular estas estructuras formadas y obtener semillas artificiales. Sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso (Yeung *et al.*, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

Desinfección

En la desinfección de los endospermos, se realizó un enjuague con agua para remover las impurezas, posteriormente se adicionó una solución de detergente por 10 minutos, seguido de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5 % por 10 minutos. Finalmente, los explantes se enjuagaron tres veces con agua estéril, para luego ser sembrados dentro de la cámara de flujo laminar (Sánchez, 2013).

Inducción de callo embriogénico

Según Sánchez (2013), los tratamientos se deben realizar en el Medio Basal de Murashige & Skoog (1962) modificado con

(1 mg L⁻¹) de tiamina, sus macro y micro nutrientes en un reactivo en polvo y sus vitaminas en una solución. Se adicionó al medio 60 mg L⁻¹ 2,4 D, 1 g L⁻¹ carbón activado, 30 g L⁻¹ de azúcar y 7 g L⁻¹ de agar.

Previa la adicción del agar, el pH de los medios de cultivo, se ajustó en un rango de 5.79-5.81, los medios fueron esterilizados a 121°C por 15 minutos en la autoclave, finalmente los embriones inmaduros fueron sembrados en tubos con 15 ml de medio de cultivo en posición horizontal en la cámara de flujo laminar y fueron incubados en la oscuridad por 18 semanas, con subcultivos cada 6 semanas. Inicialmente se sembraron 90 embriones, para verificar los resultados obtenidos por Sánchez (2013), después, se procedió a sembrar 500 embriones. Se evaluó la formación de callo embriogénico y la contaminación.

Suspensiones celulares

Para el establecimiento de las suspensiones celulares, se colocó aproximadamente un gramo de callo friable en un Erlenmeyer estéril de 250 ml con 40 ml de medio de cultivo idóneo, compuesto por Murashige & Skoog (1962) a la mitad de su concentración, se adicionó 0.1 mg L⁻¹ ácido indol acético, 0.8 mg L⁻¹ de benzilaminopurina, 2.5 mg L⁻¹ sulfato de adenina, 40 g L⁻¹ de sacarosa (Muñoz, 2003; Jha *et al.*, 2007; Sujatha *et al.*, 2008).

Se estableció cuatro tratamientos, donde se evaluó dos concentraciones de ácido giberélico de 1.5 y 3 mg L⁻¹, combinados con 35 ml de agua de coco y 200 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada como fuentes de nitrógeno.

El pH de los medios de cultivo, se ajustó en un rango de 5.79-5.81; los medios de cultivo fueron esterilizados a 121 °C por 15 minutos en la autoclave, posteriormente en cámara se agregó GA₃ en dos concentraciones, esterilizado en un filtro de jeringa Minisart de 0.1 - 5 µm, y se dispensó el medio de cultivo. Finalmente, se mantuvo en agitación orbital permanente a 110 rpm incubado a una temperatura de 25°C ± 2°C.

Después de los tres meses de establecida la suspensión, se reemplazó el 30 % de medio antiguo, por medio fresco y se calculó la densidad celular (número de células por mililitro), tomando este cambio como día cero. El conteo celular se realizó por duplicado de cada suspensión, utilizando una cámara de Neubauer de acuerdo al protocolo estandarizado por Lugo (2004), en un microscopio Olympus.

Se tomó 2 ml de la suspensión celular con una jeringa estéril, colocando la muestra en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer, dejando que penetre entre la cámara y el cubreobjetos por capilaridad, tratando que la muestra entre de forma uniforme a la cámara, evitando la formación de burbujas.

Posteriormente se contó las células ubicadas en los cinco cuadrados grandes de la cámara de Neubauer, luego se aplicó la fórmula para el recuento con cuadros grandes en cámara de Neubauer:

$$\text{Concentración (cel/ml)} = \text{Número de células} * 10000 / \text{Número de cuadros}$$

Finalmente, se analizó la cinética de crecimiento de las suspensiones cada dos días hasta llegar a una fase estacionaria (Lugo, 2004). El conteo de las células se realizó por duplicado de cada suspensión. Se dibujó la curva de crecimiento celular, hasta identificar la fase exponencial, para así verificar si existe alguna diferencia entre los cuatro medios utilizados, esto podrá ser evidenciado en los resultados. El eje "x" corresponde al tiempo en días y el eje "y" a la densidad celular expresada en número de células por mililitro. Finalmente se realizó una interpolación con ayuda del programa CurveExpert 2.4.0.

Maduración de embriones somáticos

Realizada la fase de establecimiento de suspensiones celulares, se continuó con la etapa de maduración de los embriones, donde se procedió a sembrar los embriones somáticos en el medio líquido.

Como medio de cultivo base, se utilizó Murashige & Skoog (1962) a la mitad de su concentración, se adicionó 0.1 mg L⁻¹ ácido indol acético, 0.8 mg L⁻¹ de benzilaminopurina, 2.5 mg L⁻¹ sulfato de adenina, 40 g L⁻¹ de sacarosa (Muñoz, 2003; Jha *et al.*, 2007; Sujatha *et al.*, 2008).

Se estableció cinco tratamientos para la maduración embrionaria, donde se evaluó dos concentraciones de ácido giberélico de 1.5 y 3 mg L⁻¹, combinados con 35 ml de agua de coco y 200 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada como fuentes de nitrógeno. Tomando en cuenta que existió un tratamiento testigo sin ácido giberélico y sin fuentes de nitrógeno.

El pH de los medios de cultivo, se ajustó en un rango de 5.79-5.81; los medios de cultivo fueron esterilizados a 121 °C por 15 minutos en la autoclave, posteriormente en cámara se agregó GA₃ en dos concentraciones, esterilizado en un filtro de jeringa Minisart de 0.1 - 5 µm, y se dispensó el medio de cultivo.

Se hizo un análisis de varianza no paramétrico con un nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), posteriormente se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, que permite realizar una comparación de las medias de los datos obtenidos entre los tratamientos aplicados.

Al callo embriogénico, se le realizó varios cortes en la cámara de flujo de laminar con la ayuda del bisturí para disgregarlo, posteriormente fueron sembrados en los medios de cultivo líquidos y fueron incubados en un agitador orbital con un fotoperiodo de 12-12 horas de luz/oscuridad por 12 semanas.

Identificación embrionaria

A las 12 semanas de cultivo, se realizó la caracterización morfológica de los embriones somáticos obtenidos, se colocó un gramo de callo embriogénico de cada tratamiento dentro de una caja Petri procurando disgregarlo, facilitando el conteo de los embriones en sus diferentes estadios. Finalmente se colocó la caja Petri con los embriones sobre un microscopio

estereoscopio para la identificación y conteo; las fotos se tomaron con una cámara digital HD.

Se contabilizó los embriones obtenidos en los cuatro tratamientos, para de esta manera estimar el número de embriones en los diferentes estadios y la cantidad total de embriones.

RESULTADOS

Desinfección

En la validación de la desinfección se procedió a sembrar 15 embriones, tomando en cuenta que se repitió el procedimiento seis veces, es decir en total se obtuvieron 90 embriones sembrados, de los cuales solo uno se contaminó. Logrando un porcentaje de contaminación del 1,11%, por lo tanto la sobrevivencia de los embriones fue de 98,89%.

Inducción de callo embriogénico

Se observó viabilidad, pues permitió la formación de un fragmento de callo friable (coloración blanquecina amarillenta), en los 90 callos que fueron sembrados, validando y obteniendo resultados similares con el protocolo establecido por Sánchez (2013).

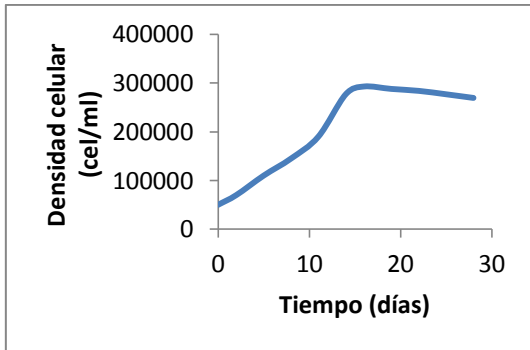
Suspensiones celulares

Al realizar el recuento celular con la cámara de Neubauer, se observó las diferentes etapas identificadas en la curva representativa de la cinética de celular de *Parajubaea cocoides* Burret, donde apreciamos con claridad el proceso de evolución de la biomasa en la suspensión celular.

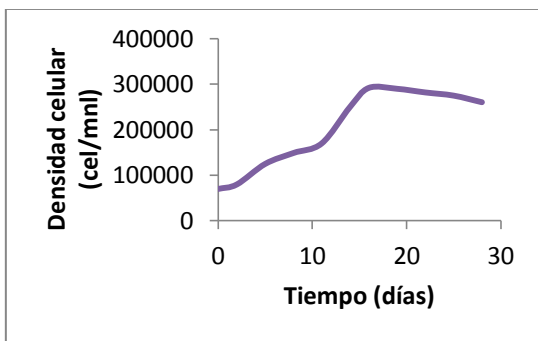
Como se mencionó anteriormente, existen cinco fases de crecimiento celular y son: fase de retraso, fase exponencial, fase lineal, fase de desaceleración progresiva y fase estacionaria.

Con los datos obtenidos del conteo celular, se logró obtener la curva de la cinética celular de las cuatro suspensiones, en las figuras 1, 2, 3 y 4, se representa gráficamente la cinética celular para cada una de las suspensiones.

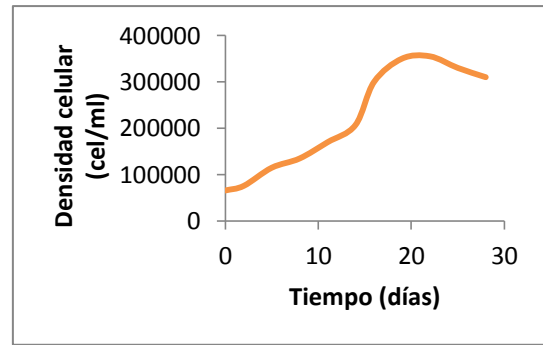
Como apreciamos en la figura 1, la curva cinética de la suspensión celular uno muestra un retraso en su etapa inicial hasta el día cuatro, con un aumento mínimo de la población, posteriormente se observa un aumento celular considerable hasta el día 16, luego el crecimiento es menor hasta el día 22, y a partir del día 25 se nota que empieza a bajar su densidad.



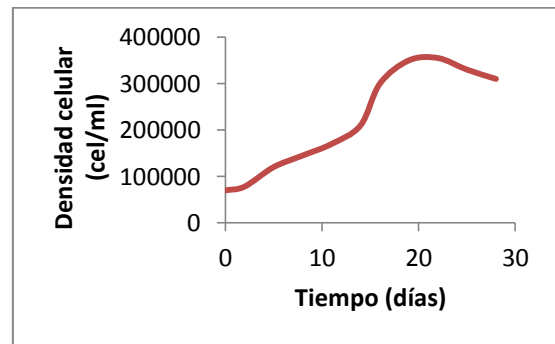
En la figura 2, que representa la suspensión dos, se observa que hay un aumento del número de células desde el primer día con una curva creciente moderada hasta el día 5, luego hay un incremento acelerado de células hasta el día 16. A partir del día 17 hasta el día 25, empieza a desacelerarse el incremento del número de células y para el día 28 se observa una disminución notoria en la densidad celular.



En la figura 3, que representa la suspensión tres, se observa que hay un aumento del número de células con una curva creciente moderada hasta el día 8, luego hay un incremento acelerado de células hasta el día 22. A partir del día 25, empieza a desacelerarse el incremento del número de células y para el día 28, se observa una disminución en la densidad celular.



Finalmente en la figura 4, la curva cinética de la suspensión celular cuatro muestra un crecimiento en la etapa inicial hasta el día 5, posteriormente se observa un aumento celular considerable hasta el día 22, luego el crecimiento decrece hasta el día 25 y a partir del día 28, se nota que empieza a bajar su densidad.



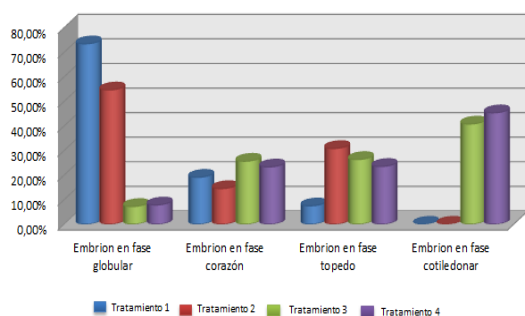
Por lo tanto, según lo observado en las figuras 1 y 2, que corresponden a la suspensión uno (1.5 mg L^{-1} de ácido giberélico y 35 ml de agua de coco), y a la suspensión dos (3 mg L^{-1} de ácido giberélico y 35 ml de agua de coco), se puede establecer que a los 16 días, comienza el decrecimiento celular y por ende se realizó el cambio de medio, mientras que para la suspensión tres (1.5 mg L^{-1} de ácido giberélico y 200 mg L^{-1} de caseína hidrolizada), y la suspensión cuatro (3 mg L^{-1} de ácido giberélico y 200 mg L^{-1} de caseína hidrolizada), se realizó el cambio de medio a los 22 días, como se puede observar en las figuras 3 y 4 respectivamente.

Maduración de embriones somáticos

Se debe especificar y mencionar que los embriones colocados en el tratamiento testigo, sin fuentes de nitrógeno y ácido

giberélico se necrosaron y finalmente murieron.

Se observó mayor presencia de embriones en fase globular en la suspensión uno (1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), seguido de la suspensión dos (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), y porcentajes menores en las suspensiones (1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada). El porcentaje de embriones en fase corazón fue mayor en la suspensión tres (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), seguido de la suspensión cuatro (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), y en menor porcentaje en las suspensiones (1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), mientras que en fase torpedo, el mayor porcentaje de formación se dio en la suspensión dos (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), seguido de las suspensiones (1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), finalmente se obtuvo porcentajes de formación de embriones en fase cotiledonar solo en las suspensiones (1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada) (figura 5).

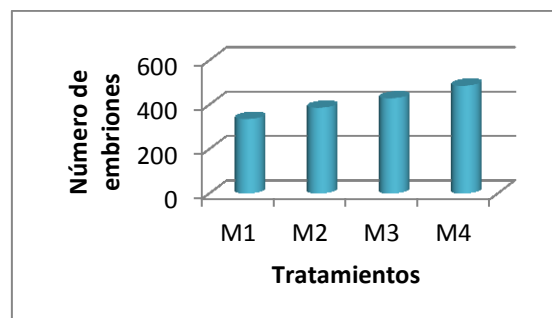


Al referirnos a la capacidad embriogénica, en las suspensiones que contenían (1.5 - 3 mg L⁻¹ de GA₃ y 200 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada), se observó la presencia de embriones en fase cotiledonar.

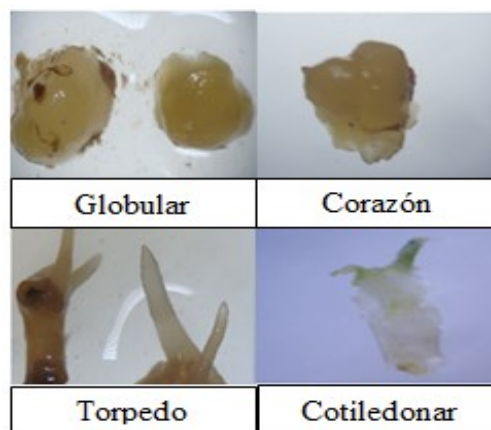
La capacidad embriogénica a las 12 semanas fue del 40.79% al utilizar (1.5 mg L⁻¹ de GA₃), y al utilizar (3 mg L⁻¹ de GA₃), se obtuvo una capacidad embriogénica del 45.36 %.

Finalmente, se obtuvo como resultado total 335 embriones en la suspensión uno (1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), 386 en la suspensión dos (3 mg L⁻¹ de ácido

giberélico con agua de coco), 429 en la suspensión tres (1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), y 485 en la suspensión cuatro (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), es decir el mayor número de embriones se formaron en la suspensión cuatro (figura 6).



Con los resultados obtenidos se puede llegar a afirmar, que la mejor suspensión es la cuatro (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), ya que ahí se observó embriones en las cuatro fases, principalmente cotiledonar, que posteriormente darán origen a nuevas plantas. En la figura 7 se puede observar los embriones de palma coco cumbé en sus diferentes etapas de desarrollo.



DISCUSIÓN

Desinfección

La fase de desinfección conlleva un conjunto de pasos que se realizan para el establecimiento adecuado de un determinado cultivo. Se utilizó el protocolo de desinfección ya establecido por Sánchez (2013), el mismo que es simple, y así no se desperdició recursos. En este procedimiento no fue necesario aplicar un diseño experimental, en razón de que se obtuvo un

alto porcentaje de sobrevivencia de los explantes, pues de los 90 embriones sembrados solo se contaminó el 1.11%, que si lo analizamos es sumamente bajo.

La mayoría de protocolos utilizados para la desinfección de endospermos en otras especies de palmas son similares al utilizado, pues obtienen niveles casi nulos de contaminación (López & Valencia, 2010).

Por otro lado el 1.11 % de contaminación, pudo deberse a un error de manipulación de los explantes dentro de la cámara de flujo laminar al realizar la siembra, este error es experimental, por ende puede ser corregido realizando una optimización en la técnica de siembra y manejo de los explantes, para así lograr niveles nulos de contaminación (Pérez, 1998).

Inducción de callo embriogénico

En este trabajo se pudo evidenciar que para *Parajubaea cocoides* Burret, la concentración tanto de 2,4-D (60 mg L^{-1}) y (1 g L^{-1}) carbón activado, dio buenos resultados para obtener desarrollo y crecimiento de callo embriogénico, y la friabilidad deseada después de 18 semanas de cultivo.

Perera *et al.*, (2007), en su investigación realizada en *Cocos nucifera* L., donde utiliza como explantes ovarios no fecundados, verificó que la concentración de 2,4-D y carbón activado son variables de importancia para la inducción de callos embriogénicos. Logrando establecer que para producir callo embriogénico en explantes de coco, es indispensable encontrar la concentración adecuada de 2,4-D y carbón activado, es importante mencionar que el carbón activado es beneficioso para la adsorción de fenoles y otras sustancias inhibitoras de crecimiento.

Los callos embriogénicos pueden ser compactos, de color blanco amarillento con estructuras nodulares y crecimiento lento, o altamente friable con embriones intercalados entre las masas de células secas poco organizadas (Hussein, 2006). Características que sí presentaron los callos obtenidos, requisitos suficientes para afirmar que obtuvimos callos embriogénicos y que dieron origen a embriones somáticos.

Suspensiones celulares

El establecimiento de una suspensión celular, se logra optimizando diferentes factores que influyen directamente en dicho establecimiento. Pérez (2010), indica que la cantidad de callo a utilizar puede ser desde 1 g a 20 g en 50 ml de medio de cultivo, recalando que mientras mayor cantidad de inóculo inicial se utilice más rápidamente se podrá establecer el cultivo en suspensión. La utilización de frascos de 200 ml con 40 ml de medio de cultivo fresco para las suspensiones celulares de (*Parajubaea cocoides* Burret), generó excelentes resultados reafirmando lo indicado por Roca & Mroginski (1993), en donde se especifica que se debe utilizar el 1/5 de volumen del frasco, con medio fresco para que el resto de volumen sirva para el intercambio gaseoso de las células. Las suspensiones se mantuvieron a una agitación de 110 rpm, ya que según Pérez (2010), a las suspensiones celulares se las puede mantener en un rango de revoluciones de 60 rpm a 150 rpm.

Al emplear agua de coco en las suspensiones celulares, se pudo evidenciar el crecimiento logarítmico a los 16 días, similares resultados obtuvo la Universidad Central de Las Villas, al trabajar con suspensiones celulares de pino gigante, demostrando que el agua de coco es importante para establecer suspensiones en un tiempo de 12 a 16 días (Lorin, 1995).

Según Frenando & Gamage (2000), un factor importante en el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, fue el descubrimiento de los reguladores de crecimiento, ya que se observó el efecto de una sustancia presente en el agua de coco en concentraciones (10-15% v/v), que estimula la división celular (efecto citocinínico).

Por otro lado, en las suspensiones que se adicionó caseína hidrolizada, se obtuvo mayor número de células a los 22 días. La adición de caseína hidrolizada (200 mg L^{-1}), probablemente completa los requerimientos en aminoácidos para la síntesis de proteínas y el metabolismo hormonal, dando como resultado un aumento en la cantidad de

células dentro de una suspensión (Frenando & Gamage, 2000).

Cabe destacar además, que el nitrógeno es un elemento esencial en el cultivo de tejidos, existen varias formas de suministrarlo, se puede completar la dosis de nitrógeno orgánico, con el uso de glutamina y caseína hidrolizada (Jiménez, 1990).

Según Steward *et al.* (1958), el medio MS suplementado con ácido giberélico (2-3 mg L⁻¹), enriquecido con caseína hidrolizada (200-300 mg L⁻¹), promovió un crecimiento rápido e incrementó el número de células, en suspensiones de embriones haploides de (*Theobroma cacao* L.).

La caseína hidrolizada (100-200 mgL⁻¹), ha sido utilizada para estimular el crecimiento, este efecto se debe a un sinergismo entre los aminoácidos que la componen. En (*Vainilla sp.*), este compuesto se ha usado para incrementar el crecimiento celular, encontrando que a medida que se incrementaba la dosis de caseína hidrolizada en un medio MS (1962), se aumentaba el porcentaje de células en la suspensión (Jiménez, 1990).

Maduración de embriones somáticos

Para la maduración de los embriones somáticos es importante adicionar fuentes extras de nitrógeno orgánico y carbono, para un buen desarrollo de las estructuras embrionarias y evitar una germinación precoz. El proceso de maduración en la mayoría de las especies es el paso más limitante para el desarrollo de la embriogénesis somática, pues en esta etapa los embriones deben acumular sustancias de reserva (Kyte & Kleyn, 1996).

Las fuentes de nitrógeno orgánico como aminoácidos y caseína hidrolizada, han sido probadas en (*Azadirachta indica* A. y *Zea Mays* L.), logrando una proliferación sostenida de estructuras embriogénicas *in vitro* y más aún su posterior conversión a planta (Kim & Moon, 2007).

Colunga (1998), empleó caseína hidrolizada (200 mg L⁻¹) como fuente de nitrógeno, en la embriogénesis somática de (*Agave fourcroydes*), obteniendo estructuras

embriogénicas en todas las fases, mientras que Sotiropoulos, Dimassi & Therios (2005), mencionan que estos aditivos en el medio de cultivo, en presencia o ausencia de sales de nitrógeno inorgánica, incrementan la eficiencia del cultivo en la embriogénesis somática, lo cual se manifiesta en mayores tasas de multiplicación de embriones y retención del potencial embriogénico de los tejidos, resultados semejantes se obtuvo en la palma coco cumbé al adicionar (200 mg L⁻¹) de caseína hidrolizada en el medio de maduración.

Por otro lado, se obtuvo resultados positivos al emplear 1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico, pues permitió obtener embriones en todas las fases. Según Dixon & Gonzales (1994), las giberélinas, especialmente el ácido giberélico, favorecen la maduración y aumentan la calidad de los embriones somáticos de (*Azadirachta indica* A.), ya que generalmente las giberélinas inducen a la expresión temprana de genes involucrados en el proceso, en cantidades mayores a (3 mg L⁻¹), aumentando cinco veces la frecuencia de regeneración.

Una de las teorías sostiene que el ácido giberélico, tiene relación con la síntesis del ARN mensajero dirigido por ADN en el núcleo. En la actualidad se cree que el ácido giberélico modifica el ARN producido en los núcleos, y así puede ejercer su control sobre la expansión celular, así como sobre otras actividades de crecimiento y desarrollo vegetal, esto se fundamentó en estudios realizados en (*Azadirachta indica* A. y *Zea Mays* L.). El ácido giberélico puede provocar la expansión celular, mediante la inducción de enzimas que debilitan las paredes celulares. Con frecuencia el ácido giberélico incrementa el contenido de Auxinas, transportándolas a su lugar de acción (Sotiropoulos, Dimassi & Therios, 2005; Dixon & Gonzales, 1994).

Al referirnos a la utilización de 35 ml de agua de coco en la maduración de los embriones, se debe indicar que no se obtuvo embriones en fase cotiledonar, pero sí embriones globulares, torpedos y corazón. Al respecto, Steward *et al.* (1958), considera que en la etapa de maduración de embriones es esencial la presencia de agua de coco; sin

embargo, Claret *et al.*, (2001), realizó estudios posteriores en (*Bixa orellana* L.), demostrando que el agua de coco presentaba beneficios en la formación de embriones en estadios tempranos, pero su utilización no era necesaria para la maduración de los embriones somáticos.

Es complicado establecer cultivos de embriones somáticos que mantengan una uniformidad de sus células en el desarrollo de nuevos clones o individuos, ya que el desarrollo de los embriones se produce independientemente uno del otro, por lo que en un mismo tejido podemos tener embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo (Moncada *et al.*, 1997; Muñoz, 2003).

Según Dixon & Gonzales (1994), para alcanzar un alto grado de sincronización en el crecimiento de los embriones somáticos de (*Azadirachta indica* A.), en un mismo tejido o en suspensión celular, se utiliza ABA (100 mg L⁻¹), además este compuesto tiene la facultad de disminuir anomalías en el cultivo embrionario, como la formación de embriones somáticos secundarios, lo que quiere decir la formación de un embrión a partir de otro embrión somático, fenómeno que se puede presentar en los tejidos, también facilita la acumulación de proteínas de reserva y carbohidratos, y previenen la germinación precoz.

Finalmente, los embriones que se colocaron en la suspensión sin ácido giberélico y fuentes de nitrógeno, se necrosaron y murieron. Según Colunga (1998), es importante suministrar fuentes de nitrógeno en la maduración de embriones de (*Agave fourcroydes*), pues estos componentes permiten obtener estructuras embriogénicas y facilitan la retención del potencial embriogénico de los tejidos.

CONCLUSIONES

El mejor protocolo de desinfección para la inducción de callo, fue utilizando una concentración de NaClO al 2.5%, con un tiempo de inmersión de diez minutos.

Se obtuvo un porcentaje de contaminación en la inducción del callo del 1,11%, por lo tanto la sobrevivencia de los embriones fue de 98,89%.

El mejor tratamiento para la inducción de callo, fue el tratamiento con (60 mg L⁻¹ 2,4 D y 1 g L⁻¹ carbón activado), ya que presentó viabilidad y formación de callos friables.

El mejor tratamiento para el establecimiento de las suspensiones celulares, fue el tratamiento con (1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con 200 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada), ya que presentan la media más alta con respecto a la formación de células en relación al tiempo.

El mejor tratamiento para la maduración de embriones, fue el tratamiento con (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con 200 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada), ya que se observó embriones en todas las fases, y se obtuvo 45.36% de embriones en fase cotiledonar.

El agua de coco como fuente de nitrógeno, no favoreció la obtención de embriones en fase cotiledonar, sin embargo, se obtuvo un 73,43% de embriones en fase globular.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Solis, M. (1944). *La tagua*. Quito: Editorial Ecuador.
- Acosta-Solis, M. (1971). Palmas económicas del noroccidente ecuatoriano. *Naturaleza Ecuatoriana*, 80-163.
- Aguirre, Z., Madsen, J., Cotton, E. (2002). *Botánica Austro Ecuatoriana* (Primera edición ed.). Quito, Ecuador: Editorial Ecuador .
- Balslev, H. M. (2013). *Palmas Ecuatorianas: biología y uso sostenible* (Primera ed.). Quito, Ecuador: Publicaciones del Herbario QCA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Balslev, H., Montúfar, R., Navarrete, H., Valencia, R. (2013). *Palmas Ecuatorianas: biología y uso sostenible*. Quito: Publicaciones del Herbario QCA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Baran, T., Ghosh, J. (2005). *Plant Tissue Culture: Basic and Applied*. *Orion*, 45-50.

- Barranco, I., Gómez, R., Reyes, M., Pérez, L., Freire, M., Herrera, I. (2009). Efecto de la densidad de inóculo en la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar híbrido de banano. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 40-47.
- Barreto. (2003). *Evaluación de tres densidades de siembra y dos frecuencias de inmersión en biorreactor tipo RITA sobre la calidad morfológica de embriones somáticos de café*. Centro Afronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Costa Rica: Editorial Turraiba.
- Berthouly. (1989). Micropropagación de café. *Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera*, 17-22.
- Borchsenius, F., Bernal, R. (1996). *Flora Neotropicana*. Costa Rica: Monographs.
- Borchsenius, F., Pedersen, H., Balslev, H. (1998). *Manual to the palms of Ecuador*. AAU Reports.
- Borchsenius, F., Skov, F. (1999). Conservation status of palms in Ecuador. *Acta Botánica Venezuelica*, 221-236.
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López, D., Torbio, M. (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos*, 345-357.
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López, D., Torbio, M. (2005). *La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal*. Recuperado el 22 de Febrero de 2014, de http://www.inia.es/gcontrec/pub/CEL_ESTINOHERNANDEZCARNEROS_116282779875.pdf
- Colunga, P. (1998). Origen, variación y tendencias evolutivas del (*Agave Fourcroydes*). *Biología*, 62.
- Dixon, R., Gonzales, R. (1994). Plant cell. *USA*, 112.
- Dodds J. & Lorin R. (1995). *Experiments in Plants Tissue Culture*. Estados Unidos : Cambridge University Press.
- Dodds, J., Lorin, R. (1995). Experiments in plants tissue cultura. *Cambridge University Press*.
- Dodds, J., Lorin, R. (1995). Experiments in Plants Tissue Culture. *Cambridge University Press*.
- Fernandez, C., Gramage, C. (2000). Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut. *Plant Science*, 193-198.
- Fernandez, D., Trovant, B., Lopez, J. (2009). *Reintegración ecológica y económica de uan aldera interandina del noreste de Gualaceo*. Azuay: Universidad Internacional Menendez Pelayo y Universidad Central del Ecuador.
- George, E., Klerk, J. (2008). The components of plant tissue. *Tissue Culture*, 501.
- Giron. (1998). Desarrollo y maduración de embrións somáticos de híbridos F1 de Coffea arabica para una producción en el Centro Agronómico Tropical de Investigación. *Master thesis*, 23-30.
- Gonzales, J., Gómez R. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. *Biotecnología de plantas*, I.
- Gonzales, O. M. (2008). *Estudio histológico de la embriogénesis somática*. Recuperado el 12 de Febrero de 2014, de <http://www.ua.es/es/informacion/bio-diversida/cuabiod27.pdf>
- Guerra, T. (1999). Embriogénesis somática. *Cultura de tejidos y transformaciones genéticas de plantas*, 533-568.

- H., C. (2002). Induction to plant biotechnology . *Science Publisher*.
- Hussein, S., Ibrahim, R. (2006). Somatic embryogenesis. *IRIAN Journal of Biotechnology*, 162-165.
- Illán, M., Oraes, L., Oblick, F., Ahn, F. (2008). Las palmeras de América del Sur. *Diversidad e historia evolutiva*, 7-29.
- Ipomoea, L. (2009). *Centro Ibeoamericano de la biodiversida (CIBIO)*. Recuperado el 20 de Marzo de 2014, de <http://www.ua.es/es/informacion/biodiversidad/cuasbio27.pdf>
- Jiménez, F. (1990). Evaluación de las características morfológicas en desarrollo vegetativo de (*Vanilla sp*). Costa Rica : Alajuela.
- Kim, W., Moon, K. (2007). Embriogenesis somática en plantas en Japón . *Plant cell*, 241-245.
- Kyte, L., Kleyn, J. (1996). Plants from test tubes . *Timber press*, 109.
- López, R., Murcia, C., López, P., Valencia, J. (2010). Estandarización del protocolo de desinfección de discos de hojas en la inducción de calogénesis . *Revista de investigaciones de la Universidad de Quindío*, 120-125.
- Lugo, A. (2004). Cámara thoma y neubauer. *GabLaboratory*.
- M, A.-S. (1944). *La tagua* . Quito: Ecuador.
- McKersie, B., Browley, D. (1996). Somatic embryogenesis and artificial seed in forage legumes. *Seed Science Research*, 109-126.
- Moraes, M., Henderson, A. (1990). The genus *Parajubaea*. *Brittonia*, 42-99.
- Moraes, R. (1993). Guía de árboles de Bolivia. *Herbario Nacional de Bolivia-Missouri Botanica Garden* .
- Moraes, R. (1996). Novelties of the *Parajubaea* and *Syangrus* from interandean valleys of Bolivia. *Novon*, 85-92.
- Nabila, A., Tasneem, M., Hassan, A. (1992). Secondary metabolites of chenopodium species. *Journal of the Chemical Society*, 70-82.
- Nakamura. (1997). Análisis numérico y visualización gráfica con MATLAB. *Prentice Hall*, 78.
- Nomura, K., Komamine, A. (1995). Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. *In vitro embryogenesis in plants*, 249-265.
- Parrott, W. (1993). Cell culture the biotechnology applications for banana and plantain improvement. *INBAP*, 183-191.
- Perera, P., Vidhannarachi, V., Gunathilake, T., Yakandawala, D., Hocher, V. (2009). Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut. En *Plant Cell* (págs. 73-81).
- Pérez, J. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Cuba : Ediciones GEO.
- Pérez, J. (2010). Evaluación de la producción e fitoquímicos a partir de cultivo de células en suspensión . *Olander*.
- Pérez, J., Alvarado, Y., Gómez, R., Jimenez, E., Orellana, P. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. En *Instituto de biotecnología de las plantas* (Vol. I). Santa Clara, Cuba .
- Pintaud, J., Aleano, H., Alsley, B., Ernal, R., Orchenius, F. (2008). Las palmera de América del Sur. En *Diversidad e historia evolutiva* (págs. 7-29). Peru: Rev.Peru.
- Quito, D. M. (16 de Agosto de 2002). *Agencia pública de noticias de Quito*. Recuperado el 22 de Enero de 2014, de <http://www.noticiasquito.gob.ec>

- Reinert, J. (1958). Biotecnología de Palmeras. *Botánica*, 15-24.
- Robichard, R., Veronica, I., Merkle, S. (2004). Treatments affecting maturation and germination. *California*, 102.
- Roca, W., Mroginski. (1993). *Cultivo de tejidos en l Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Cali, Colombia : Centro Internacional de la Agricultura Tropical.
- Samson, P., Campa, C., Noirot, M., Thomas, G. (2006). Effect of primary culture medium composition. *Plant cell*, 37-45.
- Sánchez, V. (2013). Establecimiento de un protocolo para la obtención de embriones somáticos tanto en medio sólido como en suspensión celular, a partir de embriones cigóticos inmaduros de Palma coco cumbe (*Parajubaea cocoide*). *Tesis*.
- Sotiropoulos, T., Dimassi, N., Therios, N. (2005). Effects of L-cysteine on growth, and mineral contents of shoots of the apple. *Biologia Platarum*, 443-445.
- Steward, F., Mapes, M., Mears, K. (1958). Growth and organized of cultured cells. *American Journal of Botany*, 705-708.
- Tisserat, B., Esan E., Murashige, T. (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.*, 1-78.
- Torres, K. (1989). Tissue culture techniques. *Horticultural Crops*.
- Trejo, G., Rodriguez, M. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro.
- Yeung, E., Rahman, H., Thorpe, T. (1996). Comparative development of zygotic and microspore derived embryos in brassica napus. *Plant Sci.*, 27-39.