

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**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 CUMBÉ (*Parajubaea cocoides* Burret)**

**Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**VERÓNICA MARITZA SÁNCHEZ HINOJOSA**

**SANGOLQUÍ, 9 de abril de 2013**

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

Verónica Maritza Sánchez Hinojosa

**DIRECTORA DE LA CARRERA**

---

Ing. Grace Tatiana Páez

Sangolquí, 9 de abril de 2013

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. VERÓNICA MARITZA SÁNCHEZ HINOJOSA como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

Sangolquí, 9 de abril de 2013

---

Ing. Norman Soria, M.Sc.

**DIRECTOR**

---

Quim. Jaime Gía, M.Sc.

**CODIRECTOR**

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Verónica Maritza Sánchez Hinojosa

### Declaro que:

El proyecto de grado denominado **“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 cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret)”**, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 9 abril de 2013

---

**Verónica Maritza Sánchez Hinojosa**

## AUTORIZACIÓN

Yo, Verónica Maritza Sánchez Hinojosa

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **“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 cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret)”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 9 abril de 2013

---

**Verónica Maritza Sánchez Hinojosa**

## **DEDICATORIA**

A mi familia, mi padre, mi madre y mi hermana por ser una guía y mi ejemplo a seguir en la vida, y por enseñarme además que el esfuerzo siempre será bien recompensado con el éxito.

**Verónica Maritza Sánchez Hinojosa**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios mi padre celestial en primer lugar, por ayudarme a salir adelante y estar conmigo en todo momento bendiciéndome, guiándome, dándome salud y fuerza para seguir alcanzado mis metas.

A mis padres Fernando y Fanny, por inculcarme todos los valores y principios, enseñarme siempre a levantarme y seguir adelante y gracias a ellos soy una mejor persona cada día.

A mi hermana Sandra, por ayudarme en todo instante, compartirme sus experiencias, aconsejándome para triunfar en la vida.

A toda mi familia, por contar siempre con ellos y apoyarme en todo momento.

A mi enamorado Edison, por tenerme paciencia, estar junto a mí en las buenas y malas y por demostrarme todo su cariño y afecto.

A mi mejor amiga Mireya, por su amistad incondicional, por haber compartido conmigo todas mis alegrías y tristezas durante todo este tiempo.

A todos mis amiga/os y compañera/os de mi vida universitaria, especialmente a aquellos que estuvieron a mi lado en este arduo camino. A los que aportaron en el desarrollo del presente trabajo, como son mis amigos tesisistas del Laboratorio de Micropropagación de la EPMMOP-Q y de la Universidad San Francisco de Quito, ofreciendo su ayuda y apoyo en todo lo que estaba a su alcance.

A todo el personal del Laboratorio de Micropropagación de la EPMMOP-Q y al equipo del servicio de Patología del HCAM, por su contribución en esta investigación.

A mi profesora y amiga Fernanda Loayza, por estar siempre ahí cuando se le necesita y ayudarme enormemente con una parte muy importante de este trabajo.

A mi director Ing. Norman Soria y a mi codirector Quim. Jaime Gía, por el tiempo y dedicación que me brindaron durante todo el desarrollo de esta investigación, impartiendo sus conocimientos para el éxito de este trabajo.

A todos y cada uno de ustedes, porque sin su aporte este logro no hubiese sido posible.

**Verónica Maritza Sánchez Hinojosa**



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS .....	II
CERTIFICACIÓN .....	III
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	IV
AUTORIZACIÓN .....	V
DEDICATORIA .....	VI
AGRADECIMIENTO .....	VII
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	IX
LISTADO DE TABLAS .....	XIII
LISTADO DE FIGURAS .....	XVI
LISTADO DE ANEXOS .....	XX
NOMENCLATURA .....	XXII
RESUMEN .....	XXIV
ABSTRACT.....	XXV
<b>CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1    Formulación del problema .....	1
1.2    Justificación del problema.....	3
1.3    Objetivos .....	5
1.3.1    Objetivo general.....	5
1.3.2    Objetivos específicos .....	5
1.4    Marco Teórico .....	6
1.4.1    Generalidades.....	6
1.4.2    Palma coco cumbé ( <i>Parajubaea cocoides</i> Burret) .....	7

1.4.3	Cultivo <i>in vitro</i> .....	10
1.5	Hipótesis.....	25
<b>CAPÍTULO 2 : MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>		<b>26</b>
2.1	Participantes .....	26
2.1.1	Instituciones .....	26
2.1.2	Personal interno .....	26
2.1.3	Personal externo.....	26
2.2	Zona de Estudio.....	27
2.2.1	Fase de campo.....	27
2.2.2	Fase de laboratorio.....	28
2.3	Período de tiempo de investigación .....	29
2.4	Procedimientos y diseño .....	29
2.4.1	Plantas madre .....	29
2.4.2	Material vegetal .....	30
2.4.3	Fase I: Desinfección de los explantes .....	32
2.4.4	Fase II: Establecimiento e inducción de callos embriogénicos .....	33
2.4.5	Fase III: Inducción de embriones somáticos.....	37
2.4.6	Fase IV: Análisis histológico .....	41
2.4.7	Fase V: Establecimiento de suspensiones celulares .....	46
2.5	Análisis de Datos.....	49
<b>CAPÍTULO 3 : RESULTADOS .....</b>		<b>51</b>
3.1	Fase I: Desinfección de los explantes .....	51
3.1.1	Contaminación .....	51
3.2	Fase II: Establecimiento e inducción de callos embriogénicos.....	52

3.2.1	Viabilidad, formación de callo y friabilidad.....	52
3.2.2	Coloración.....	54
3.2.3	Morfología .....	56
3.2.4	Peso y dimensión del callo.....	58
3.3	Fase III: Inducción de embriones somáticos.....	64
3.3.1	Número de embriones somáticos.....	65
3.3.2	Dimensión del callo .....	67
3.3.3	Correlación entre las variables número de embriones somáticos y dimensión del callo.....	70
3.4	Fase IV: Análisis histológico .....	71
3.5	Fase V: Establecimiento de suspensiones celulares.....	75
3.5.1	Número de embriones somáticos.....	76
3.5.2	Peso de la masa celular .....	77
3.5.3	Correlación entre las variables número de embriones somáticos y peso de la masa celular .....	79
3.6	Comparación de la variable número de embriones somáticos en medio sólido (fase III) y en suspensión celular (fase V).....	80
3.7	Difusión del trabajo de investigación.....	82
<b>CAPÍTULO 4 : DISCUSIÓN.....</b>		<b>83</b>
4.1	Fase I: Desinfección de los explantes .....	83
4.2	Fase II: Establecimiento e inducción de callos embriogénicos.....	84
4.3	Fase III: Inducción de embriones somáticos.....	88
4.4	Fase IV: Análisis histológico .....	90
4.5	Fase V: Establecimiento de suspensiones celulares.....	94
<b>CAPÍTULO 5 : CONCLUSIONES.....</b>		<b>97</b>

<b>CAPÍTULO 6 : RECOMENDACIONES .....</b>	<b>99</b>
<b>CAPÍTULO 7 : BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.1:</b> Taxonomía de la palma coco cumbé ( <i>Parajubaea cocoides</i> Burret). .....	10
<b>Tabla 2.1:</b> Tratamientos de la fase II: establecimiento e inducción de callos embriogénicos.....	33
<b>Tabla 2.2:</b> Tratamientos de la fase III: inducción de embriones somáticos.....	38
<b>Tabla 2.3:</b> Protocolo de procesamiento de muestras de tejido.....	42
<b>Tabla 2.4:</b> Procedimiento para la desparafinización, hidratación y tinción del tejido. ....	44
<b>Tabla 2.5:</b> Tratamientos de la fase V: establecimiento de suspensiones celulares .....	46
<b>Tabla 3.1:</b> Frecuencia y porcentaje de la variable contaminación de la fase I. ....	51
<b>Tabla 3.2:</b> Frecuencias y porcentajes de las variables: viabilidad, formación de callo (F. callo) y friabilidad de los 9 tratamientos en la fase II. ....	53
<b>Tabla 3.3:</b> Frecuencias y porcentajes de la variable coloración de los explantes, según la escala arbitraria establecida para los 9 tratamientos en la fase II. ....	55
<b>Tabla 3.4:</b> Frecuencias y porcentajes de la variable morfología de los explantes, según la escala arbitraria establecida para los 9 tratamientos en la fase II. ....	57
<b>Tabla 3.5:</b> Medidas de ajuste del modelo según la variable peso del callo de la fase II. ....	59
<b>Tabla 3.6:</b> Análisis de varianza mostrando las pruebas de hipótesis secuenciales según la variable peso del callo de la fase II.....	59
<b>Tabla 3.7:</b> Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para el Factor 1 según la variable peso del callo de la fase II.....	60
<b>Tabla 3.8:</b> Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para el Factor 2 según la variable peso del callo de la fase II.....	60

<b>Tabla 3.9:</b> Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para cada tratamiento (Factor 1*Factor 2) según la variable peso del callo de la fase II. ....	61
<b>Tabla 3.10:</b> Medidas de ajuste del modelo según la variable dimensión del callo de la fase II. ....	61
<b>Tabla 3.11:</b> Análisis de varianza mostrando las pruebas de hipótesis secuenciales según la variable dimensión del callo de la fase II. ....	62
<b>Tabla 3.12:</b> Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para el Factor 1 según la variable dimensión del callo de la fase II. ....	62
<b>Tabla 3.13:</b> Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para el Factor 2 según la variable dimensión del callo de la fase II. ....	62
<b>Tabla 3.14:</b> Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para cada tratamiento (Factor 1*Factor 2) según la variable dimensión del callo de la fase II. ....	63
<b>Tabla 3.15:</b> Prueba de Kruskal-Wallis ( $\alpha= 0.05$ ) para la variable número de embriones somáticos de la fase III. ....	66
<b>Tabla 3.16:</b> Comparaciones de a pares entre las medias de los rangos de tratamientos para la variable número de embriones somáticos de la fase III. ....	66
<b>Tabla 3.17:</b> Análisis de varianza (ANOVA) para la variable dimensión del callo de la fase III. ....	68
<b>Tabla 3.18:</b> Prueba de LSD de Fisher con $\alpha= 0.05$ y DMS= 0.64342 (Error: 0.5162, gl: 30) para los bloques según la variable dimensión del callo de la fase III. ....	68
<b>Tabla 3.19:</b> Prueba de LSD de Fisher con $\alpha= 0.05$ y DMS= 0.94722 (Error: 0.5346, gl: 28) para todos los tratamientos según la variable dimensión del callo de la fase III. ....	69
<b>Tabla 3.20:</b> Análisis de correlación de Pearson entre las variables número de embriones somáticos y dimensión del callo de la fase III. ....	70
<b>Tabla 3.21:</b> Prueba de Kruskal-Wallis ( $\alpha= 0.05$ ) para la variable número de embriones somáticos de la fase V. ....	76

<b>Tabla 3.22:</b> Análisis de varianza (ANOVA) para la variable peso de la masa celular de la fase V.....	78
<b>Tabla 3.23:</b> Prueba de LSD de Fisher con $\alpha= 0.05$ y DMS= 1,10145 (Error: 0.6749, gl: 16) para la variable peso de la masa celular de la fase V. ....	78
<b>Tabla 3.24:</b> Análisis de correlación de Pearson entre las variables número de embriones somáticos y peso de la masa celular de la fase V.....	79
<b>Tabla 3.25:</b> Análisis de varianza mostrando las pruebas de hipótesis secuenciales según la variable número de embriones somáticos para el factor medio. ....	80
<b>Tabla 3.26:</b> Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para cada medio según la variable número de embriones somáticos. ....	81

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Palma coco cumbé ( <i>Parajubaea cocoides</i> Burret) ubicada en la hacienda “Las Magnolias” (Sangolquí-Ecuador). .....	8
<b>Figura 1.2:</b> Estambres (G), ovario (H), fruto (I), corte transversal del fruto (J), endocarpo (K) de <i>Parajubaea cocoides</i> Burret (Moraes & Henderson, 1990). .....	9
<b>Figura 1.3:</b> Corte trasversal de un ápice de henequén en fase de inducción CM (centro meristemático) (Alemán <i>et al.</i> , 2002). .....	16
<b>Figura 1.4:</b> Células embriogénicas polarizadas y en división. Formación de S (suspensor) y E (embrión) (Alemán <i>et al.</i> , 2002). .....	17
<b>Figura 1.5:</b> Formación de agregados celulares. C Mm (células mamilares) (Alemán <i>et al.</i> , 2002). .....	17
<b>Figura 1.6:</b> Varios embriones de henequén en estado globular. G (embriones globulares) (Alemán <i>et al.</i> , 2002). .....	18
<b>Figura 2.1:</b> Ubicación geográfica de la Hacienda “Las Magnolias”, sitio donde se realizó la fase de campo de este proyecto de investigación. ....	27
<b>Figura 2.2:</b> Ubicación geográfica del Laboratorio de Micropropagación de la Unidad de Espacio Público (UEP) del Municipio de Quito. ....	28
<b>Figura 2.3:</b> Plantas madre adultas de la palma coco cumbé (a y b), racimos con sus frutos (c). .....	30
<b>Figura 2.4:</b> Semillas de la palma coco cumbé recolectadas de plantas adultas de la hacienda “Las Magnolias”. Semilla seleccionada (a). ....	31
<b>Figura 2.5:</b> Endospermo de semilla seleccionada (inmadura) (a), embriones cigóticos inmaduros extraídos de los endospermos (explante empleado) (b). ....	32
<b>Figura 2.6:</b> Medición del peso del callo formado (a), medida de la dimensión del callo formado (b). .....	37
<b>Figura 2.7:</b> Callo embriogénico con embriones somáticos no distinguibles a simple vista (a), callo embriogénico colocado en el estereoscopio para determinar el número de embriones somáticos (b). .....	40



<b>Figura 2.8:</b> Medición de la dimensión del callo embriogénico en el proceso de inducción de embriones. ....	41
<b>Figura 2.9:</b> Cortes de las porciones de callo con sus embriones. ....	42
<b>Figura 2.10:</b> Muestra cortada y colocada en una canastilla (a), muestras sumergidas en la solución de fijador (b), muestras colocadas en el procesador de tejidos (c).....	43
<b>Figura 2.11:</b> Dispensador de parafina (a), bloques de parafina enfriándose (b), bloques de parafina con tejido embrionario (c). ....	43
<b>Figura 2.12:</b> Cortes de las muestras en el micrótopo (a), microcorte colocado en agua tibia (b), microcorte recogido y extendido en un portaobjetos adherente (c). ....	44
<b>Figura 2.13:</b> Equipo coloreador donde se realizó la desparafinización, hidratación y tinción del tejido (a), placas con las muestras teñidas (b). ....	45
<b>Figura 2.14:</b> Observación de las placas con sus muestras en el microscopio óptico de fluorescencia. ....	45
<b>Figura 2.15:</b> Conteo del número de embriones somáticos con la ayuda del estereoscopio.....	48
<b>Figura 2.16:</b> Filtrado de la suspensión de células (a y b); medición del peso de la suspensión filtrada (c). ....	49
<b>Figura 3.1:</b> Explante contaminado (a), explante sano (b).....	51
<b>Figura 3.2:</b> Explantes no viables. Formación de planta (a), planta normal por germinación (a1), planta y callo (a2); formación de raíz (b), raíz de planta germinada (b1), raíz de planta con callo (b2); oxidación (c); necrosis (d). ....	52
<b>Figura 3.3:</b> Formación de callo. Callo no friable de color amarillento (a y b), callo friable de color blanquecino amarillento (c). ....	53
<b>Figura 3.4:</b> Representación gráfica de los valores porcentuales de la viabilidad, formación de callo y friabilidad de los 9 tratamientos en la fase II.....	54
<b>Figura 3.5:</b> Escala de color. 1: Blanquecino (a), 2: Blanquecino amarillento (b), 3: Blanquecino marrón (c), 4: Amarillento (d), 5: Amarillento marrón (e). ....	54

<b>Figura 3.6:</b> Representación gráfica de la coloración de los explantes según la escala arbitraria establecida, de los 9 tratamientos en la fase II. ....	56
<b>Figura 3.7:</b> Escala de morfología. 1: Normal (a), 2: Normal e hinchado (b), 3: Curvo (c), 4: Curvo e hinchado (d), 5: Amorfo (e).....	56
<b>Figura 3.8:</b> Representación gráfica de la morfología de los explantes según la escala arbitraria establecida, de los 9 tratamientos en la fase II. ....	58
<b>Figura 3.9:</b> Representación gráfica de las variables peso y dimensión del callo de la fase II, según el tratamiento (Factor 1*Factor 2). ....	64
<b>Figura 3.10:</b> Embriones globulares vistos al estereoscopio. Separación de los embriones de su callo de origen 0.67X (a y b), embriones separados de su tejido materno 1X (c). ....	65
<b>Figura 3.11:</b> Representación gráfica de la variable número de embriones somáticos de la fase III, según el bloque*tratamiento. ....	67
<b>Figura 3.12:</b> Representación gráfica de la variable dimensión del callo de la fase III, según el bloque*tratamiento.....	69
<b>Figura 3.13:</b> Representación gráfica de la correlación ( $R^2=0.76$ ) entre la dimensión del callo (Y) y el número de embriones somáticos (X) en la fase III. ....	70
<b>Figura 3.14:</b> Tejido meristemático y células conductoras de las porciones de callo 10x (a), actividad mitótica en el callo embriogénico, células en división con núcleos claramente visibles 40x (b). CM= células meristemáticas, CC= células conductoras. ....	71
<b>Figura 3.15:</b> Células conductoras cercanas a las meristemáticas 40x (a y b), células conductoras en fluorescencia 40x (c), células conductoras próximas a las meristemáticas en fluorescencia 40x (d). CM= células meristemáticas, CC= células conductoras. ....	72
<b>Figura 3.16:</b> Corte histológico de un callo embriogénico. Zonas de células en fluorescencia que se encuentran en constante división celular 40x (a), zonas de células en división celular 10x (b). ....	73
<b>Figura 3.17:</b> Células con gránulos de almidón en fluorescencia, cercanas a células meristemáticas 40x (a), grupo de células no embriogénicas que	

contienen gránulos de almidón próximas a células meristemáticas 40x (b). CM= células meristemáticas, CG= células con gránulos de almidón. ....	73
<b>Figura 3.18:</b> Corte histológico de un embrión en estado globular. Parte de un embrión con células meristemáticas organizadas claramente visibles 40x (a), embrión en fluorescencia con células meristemáticas y protoderma 40x (b), división celular en el protoderma, núcleos de color rojo y células meristemáticas adyacentes 100x (c). CM= células meristemáticas, PT= protoderma. ....	74
<b>Figura 3.19:</b> Suspensión celular con embriones somáticos (a), suspensión celular con embriones somáticos vista al estereoscopio 0.67X (b), embriones somáticos globulares y maduros 0.67X (c), embrión somático maduro 1X (d). EM= Embriones somáticos maduros, EG= Embriones somáticos globulares. ....	75
<b>Figura 3.20:</b> Representación gráfica de la variable número de embriones somáticos de la fase V, según el tratamiento. ....	77
<b>Figura 3.21:</b> Representación gráfica de la variable peso de la masa celular de la fase V, según el tratamiento. ....	79
<b>Figura 3.22:</b> Representación gráfica de la correlación ( $R^2=0.84$ ) entre el peso de la masa celular (Y) y el número de embriones somáticos (X) en la fase V. ....	80
<b>Figura 3.23:</b> Representación gráfica de la variable número de embriones somáticos según el Medio*Tratamiento. ....	81

## LISTADO DE ANEXOS

**Anexo A.** Recolección del material vegetal de las plantas madre de *Parajubaea coccoides* Burret en la hacienda “Las Magnolias”. Planta madre adulta (a), Racimos de cocos (b), Fruto o semilla (c), escisión de los racimos con la ayuda de una tijera de podar (d), recolección de los racimos de cocos (e). **¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo B.** Hacienda “Las Magnolias”, lugar de recolección del material vegetal. **¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo C.** Laboratorio de Micropropagación de la Unidad de Espacio Público (UEP) del Municipio de Quito. Sala de preparación de medios de cultivo y material (a), Área de medios de cultivo preparados previos a su uso (b), Sala de siembra (c), Sala de incubación (d), Área de aclimatización de plántulas (e), Plántulas aclimatadas listas para su transferencia a campo (f). **¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo D.** Endospermos de semillas de varias edades. Endospermo de semilla seleccionada (inmadura) (a). **¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo E.** Desinfección de los explantes (endospermos conteniendo los embriones cigóticos inmaduros). Explantes con detergente en el agitador orbital (a y b), Explantes previamente con cloro enjuagados con agua destilada estéril (c). **¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo F.** Proceso de escisión de los endospermos (a, b, c y d); siembra de los embriones cigóticos inmaduros (e, f, g); incubación en la oscuridad (h). **¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo G.** Composición del medio basal de Murashige & Skoog *MS* (1962) modificado. **¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo H.** Proceso de siembra e incubación de los callos del mejor tratamiento de la fase II en los medios de inducción de embriones. Escisión de las porciones de tejido no callogénico (c), incubación a un fotoperiodo de 12-12 horas luz/oscuridad (e). **¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo I.** Proceso de siembra de los callos del mejor tratamiento de la fase II para el establecimiento de las suspensiones celulares. Escisión de las porciones de tejido no callogénico (c y d), fracciones de tejido callogénico cortadas y disgregadas (e y f), inoculación de las porciones de callo en el medio líquido (g)

y h), incubación de las suspensiones celulares en un agitador orbital a un fotoperiodo de 12-12 horas luz/oscuridad (j y k).....**¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo J.** Procedimiento para el subcultivo de las suspensiones celulares a las 3 semanas de incubación.....**¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo K.** Callos obtenidos en el proceso de callogénesis. Callos embriogénicos friables (a), callos no embriogénicos no friables (b).**¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo L.** Cambios morfológicos del embrión cigótico inmaduro desde su inoculación en el medio de cultivo con el mejor tratamiento de la fase II, hasta la formación de callo después de 18 semanas de incubación.**¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo M.** Embriones globulares (fase III) vistos al estereoscopio 0.67X (a y b), 1X (c).....**¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo N.** Formación de raíces adventicias en los callos, después del proceso de inducción de embriones en medio sólido.....**¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo O.** Embriones globulares y maduros (fase V). Suspensión celular con embriones (a), suspensión celular con embriones vista al estereoscopio 0.67X (b), embrión en estado globular 1X (c), embriones globulares y maduros 0.67X (d), embriones maduros 1X (e), 0.67X (f). EM= Embriones somáticos maduros, EG= Embriones somáticos globulares. ....**¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo P.** Fenómeno de oxidación en las suspensiones celulares. Suspensión sin oxidación (a), suspensión con oxidación (b), suspensiones con y sin oxidación (c). ....**¡Error! Marcador no definido.**

**Anexo Q.** Artículo científico para la publicación en la revista Biogénesis.....**¡Error! Marcador no definido.**

## NOMENCLATURA

**EPMMOP-Q:** Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas de Quito

**UEP:** Unidad de espacio público

**DMQ:** Distrito Metropolitano de Quito

**HCAM:** Hospital Carlos Andrade Marín

**m:** Metros

**cm:** Centímetros

**mm:** Milímetros

**µm:** Micrómetros

**m.s.n.m.:** Metros sobre el nivel del mar

**°C:** Grados centígrados

**mL:** Mililitros

**g:** Gramos

**g.L<sup>-1</sup>:** Gramo por litro

**mg.L<sup>-1</sup>:** Miligramo por litro

**kg.cm<sup>-2</sup>:** Kilogramo por centímetro cuadrado

**M:** Molaridad (mol por litro, mol.L<sup>-1</sup>)

**N:** Normalidad (equivalente gramo por litro, eq-g.L<sup>-1</sup>)

**pH:** Potencial hidrógeno

**min:** Minutos

**rpm:** Revoluciones por minuto

**H<sub>2</sub>O:** Agua

**HCl:** Ácido clorhídrico

**NaOH:** Hidróxido de Sodio

**NaClO:** Hipoclorito de Sodio

<b>MS:</b>	Formulación de Murashige & Skoog (1962)
<b>2,4-D:</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>ANA:</b>	Ácido Naftalenacético
<b>BAP:</b>	6-bencilaminopurina
<b>Kin:</b>	Kinetina
<b>CA:</b>	Carbón Activado
<b>DBCA:</b>	Diseño experimental en bloques completos al azar
<b>DCA:</b>	Diseño experimental completamente al azar
<b>ANOVA:</b>	Análisis de varianza del inglés Analysis Of Variance
<b>LSD:</b>	Mínima diferencia significativa del inglés Least Significant Difference
<b>T:</b>	Tratamiento
<b>CV:</b>	Coefficiente de variación
<b>CM:</b>	Células meristemáticas
<b>CC:</b>	Células conductoras
<b>CG:</b>	Células con gránulos de almidón
<b>PT:</b>	Protoderma
<b>EM:</b>	Embriones somáticos maduros
<b>EG:</b>	Embriones somáticos globulares

## RESUMEN

El Distrito Metropolitano de Quito debido a su ubicación geográfica posee una diversidad de ecosistemas, sin embargo sus componentes vegetales se han visto afectados por cambios de orden institucional, social y económico en los últimos años. Esto sugiere la implementación de nuevos sistemas de conservación de la biodiversidad, como son los planes de reforestación y arborización urbana. Un ejemplar usado para estos fines es la palma coco cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret), especie ornamental endémica del Ecuador, considerada bajo amenaza de extinción. Se la encuentra en calles y avenidas y sus frutos son comestibles. Su propagación natural se consigue mediante las semillas, pero no es eficaz. La mejor alternativa es el cultivo de tejidos y dentro de este el proceso de embriogénesis somática, como el más eficiente. En el presente trabajo de investigación se estableció un protocolo para la obtención de embriones somáticos tanto en medio sólido como en suspensión celular, a partir de embriones cigóticos inmaduros de esta especie. Para esto, los explantes mencionados se tomaron de frutos de plantas adultas, estos se evaluaron según su capacidad de formar callos embriogénicos y a su vez embriones somáticos a través de distintas concentraciones de reguladores de crecimiento y cofactores según la fase. Los resultados mostraron que la más alta frecuencia de formación de callos embriogénicos friables (100 %) se alcanzó con  $60 \text{ mg.L}^{-1}$  2,4-D +  $1 \text{ g.L}^{-1}$  CA. El promedio más alto de embriones somáticos (23) por callo en medio sólido se logró con el tratamiento control ( $0 \text{ mg. L}^{-1}$  BAP/Kin). Los aspectos morfológicos y características embriogénicas de los callos y sus embriones, fueron verificados mediante un análisis histológico. La concentración óptima de BAP para el mayor número de embriones somáticos (266) por suspensión celular fue de  $0.4 \text{ mg. L}^{-1}$ . Finalmente, se concluye que la suspensión celular es más eficiente en la formación de embriones somáticos ya que la productividad aumenta en 12 veces comparada con el medio sólido.



## ABSTRACT

Metropolitan District of Quito due to its geographic location has a variety of ecosystems. However, the plants inside these have been affected because of institutional, social and economic changes in recent years. Therefore, the implementation of new systems for biodiversity conservation such as reforestation and urban forestry plans has been suggested. The coco cumbé palm (*Parajubaea cocoides* Burret) is a specimen used for these purposes. It is an ornamental plant endemic from Ecuador which is under threat. This plant could be found in streets and avenues and has edible fruits. The natural propagation of this palm is achieved through the seeds which is not effective. The best alternative is the tissue culture and specifically the process of somatic embryogenesis is considered the most efficient. The aim of the present research was to establish a protocol in order to obtain somatic embryos of this species from immature zygotic embryos in both solid medium and suspension culture. For this purpose, the explants were taken from fruits of adult plants; these were evaluated in order to form embryogenic calli and somatic embryos through different concentrations of growth regulators and cofactors according to the stage. The results showed that the highest frequency of friable embryogenic calli (100 %) was achieved with  $60 \text{ mg.L}^{-1}$  2,4-D +  $1 \text{ g.L}^{-1}$  CA. The highest average of somatic embryos (23) per callus in solid medium was reached with control treatment ( $0 \text{ mg. L}^{-1}$  BAP/Kin). The morphological aspects and embryogenics characteristics of calli and embryos were verified through a histological analysis. The optimal concentration of BAP for the highest number of somatic embryos (266) per suspension culture was  $0.4 \text{ mg. L}^{-1}$ . In conclusion, the suspension culture is more efficient in the formation of somatic embryos, because the productivity increased by 12 times compared with the solid medium.

# CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del problema

El Distrito Metropolitano de Quito (DMQ), debido a su ubicación geográfica posee una variedad de climas y microclimas, esto hace que exista una diversidad de ecosistemas alrededor de todo el territorio. Dentro de este, el 62.2 % de su superficie lo conforman 17 ecosistemas vegetales boscosos, arbustivos y herbáceos, y dentro de estos ecosistemas se encuentran 21490 registros de plantas. Varias de estas especies se encuentran amenazadas y tienen un alto riesgo de extinción (Secretaria de Ambiente del Ecuador, 2012).

La conservación de los ecosistemas y la biodiversidad como patrimonio natural son claves para la integridad del DMQ. Este patrimonio se encuentra sometido a varias presiones de orden institucional, social y económico; esto se debe a varios cambios que se han dado en los últimos años, como por ejemplo, el cambio en el uso del suelo debido a la demanda habitacional, la construcción de nueva infraestructura en ecosistemas frágiles, la deforestación de bosques nativos, la fragmentación de hábitats naturales, la contaminación industrial y domiciliaria y el cambio climático, entre otros. Esto sugiere la necesidad de implementar nuevos sistemas de conservación de la biodiversidad que permitan un manejo sostenible del territorio, un ejemplo de esto, son los planes de reforestación y arborización urbana con especies nativas, que se están llevando a cabo en varias zonas del DMQ (Secretaria de Ambiente del Ecuador, 2012).

Dentro de las especies nativas del Ecuador, usadas para fines de arborización urbana y reforestación, se encuentran: chilca (*Baccharis* spp.), sacha capulí (*Vallea stipularis*), pumamaqui (*Oreopanax avicenniifolius*), alisos (*Alnus acuminata*), tocte (*Juglans neotropica*), guaba (*Inga* spp.), cucharillo (*Oreocallis grandiflora*), palma coco cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret), entre otras (Fernández *et al.*, 2009).

La palma coco cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret) pertenece a las palmas solitarias monoicas. Es una palma ornamental, la cual se encuentra en calles y avenidas

de algunas ciudades de Ecuador y del sur de Colombia, no se conoce esta especie en estado silvestre. Entre sus características principales, se sabe que posee un tallo alto, liso, de color café grisáceo, tiene una corona globosa de hojas pinnadas y una inflorescencia pedunculada con frutos comestibles (Ulloa & Moller, 1995; Aguirre *et al.*, 2002; Squire, 2008).

En cuanto al estado de conservación de estas plantas, existen 23 especies que son endémicas de Ecuador; la mayoría de especies amenazadas y vulnerables son andinas y solo una pequeña cantidad de estas se encuentra distribuida en áreas dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas, como son los parques nacionales y reservas forestales. En el Ecuador el número de especies de palmas según exploraciones y algunos reportes se cree que es de aproximadamente 130, número que puede ir disminuyendo debido al impacto socio-ambiental sobre las comunidades de palmas (Aguirre *et al.*, 2002).

Esta palma se encuentra en peligro de extinción en estado amenazado, forma parte de las especies andinas amenazadas, puesto que en la actualidad no se la cultiva normalmente, además que su crecimiento es lento y requiere un largo periodo de tiempo. Esta especie no ha sido plantada durante varios años y los individuos remanentes son plantas adultas de muchos años de edad (Peña *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2009).

Para cultivar este tipo de palmas se utiliza principalmente sus semillas, aunque en algunas ocasiones se las cultiva a partir de bulbos, sin embargo, este último no es el caso específico de esta palma, ya que no produce estos brotes. Las semillas de la mayoría de estas plantas y de esta especie de palma particularmente, tardan mucho en germinar, en condiciones específicas de temperatura y humedad este tiempo puede ser menor, pero no deja de ser extenso, generalmente toma más de un año (Squire, 2008).

Por todo lo descrito anteriormente es necesario la realización de un protocolo para la obtención de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros de

palma coco cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret), como parte fundamental del proceso de embriogénesis somática, necesario para su conservación.

## 1.2 Justificación del problema

Ecuador es un país con una gran biodiversidad, rico en vegetación y específicamente en especies de palmas, alberga casi 1/4 de las especies americanas. En varias provincias del Ecuador se encuentran 54 especies nativas de palmas que representan el 1/10 de todas las especies de palmas americanas, sin embargo, algunas de estas especies se encuentran amenazadas, vulnerables o están en peligro de extinción (Aguirre *et al.*, 2002).

Las palmas se caracterizan por algunos de sus usos, estos son: como fuente de alimento, para obtener materiales de construcción, fibras, medicinas, como plantas decorativas u ornamentales, entre otros. Las palmas usadas como ornamentales se encuentran en calles, avenidas, parques y jardines del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) y otras ciudades del Ecuador; este es el caso de la palma coco cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret) (Aguirre *et al.*, 2002).

Esta planta tiene una gran importancia social, debido a su poder paisajístico y su belleza emblemática le han convertido en un árbol patrimonial; considerándola así, una especie nativa arbórea del Ecuador, resultando importante su estudio y preservación (Josse *et al.*, 2000).

El Municipio de Quito por su parte, a través de la Secretaría de Ambiente del Ecuador y las administraciones zonales, pretende impulsar a nivel urbano, la construcción de una red de corredores verdes, empleando varias especies nativas, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los ciudadanos y contribuir en la conservación de la biodiversidad. Esto permitirá conectar remanentes de ecosistemas naturales, como quebradas, con extensiones de bosques, como parques metropolitanos y zonales; además de parques lineales y barriales y áreas arborizadas a lo largo del trazado vial, como son veredas, parterres y redondeles. Por lo tanto, la palma coco cumbé, como especie ornamental, puede usarse para este fin (Distrito Metropolitano de Quito, 2012).

Su uso como planta ornamental, cultivada en las aceras, redondeles, parques, jardines y espacios públicos en general, además de sus posibles usos, tales como, su endosperma comestible y la elaboración de botones a base de su endocarpo duro, genera una gran importancia a nivel económico (Aguirre *et al.*, 2002; Borchsenius & Moraes, 2006).

Su importancia a nivel ambiental, es clara pues esta especie de palma se encuentra amenazada, ya que en la actualidad no se la cultiva, es por esta razón que se hace necesario su estudio e investigación, como herramienta fundamental para la preservación de la biodiversidad del DMQ y del Ecuador en general (Peña *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2009).

Adicionalmente, como ya se mencionó, la palma coco cumbé se cultiva a través de sus semillas, y la germinación de estas necesita largos periodos de tiempo, es por esta razón que la mejor alternativa es el cultivo de tejidos o cultivo *in vitro*, y dentro de este el proceso de embriogénesis somática, como el más eficiente (Squire, 2008).

La multiplicación de palmas a través del proceso de embriogénesis somática resulta ser de gran importancia, debido a que muchas de estas plantas monocotiledóneas perennes producen poca cantidad de hijos basales, los cuales son además difíciles de enraizar, o en muchos casos no producen estos brotes, como es el caso de esta palma. Al ser estas palmas plantas que presentan cierto grado de recalcitrancia al cultivo *in vitro*, se hace más importante su estudio (Viñas & Jiménez, 2011).

La embriogénesis somática es considerada como el método más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, ya que permite incrementar los porcentajes de multiplicación en cortos periodos de tiempo y además ayuda a disminuir los costos de producción (Pérez, 1998; Freire, 2003; Celestino *et al.*, 2005).

La mayoría de estudios realizados sobre varias especies de palmas, como por ejemplo, la palma dátíl (*Phoenix dactylifera*), palma aceitera (*Elaeis guineensis*), palma

de betel (*Areca catechu*) y palma cocotera (*Cocos nucifera*), sugieren el proceso de embriogénesis somática indirecta como una alternativa eficiente de preservación de estas especies, puesto que permite una producción mayor de este tipo de plantas (Viñas & Jiménez, 2011).

Con estos argumentos, el desarrollo de este proyecto resulta pertinente y relevante dada la posibilidad de obtener embriones somáticos de *Parajubaea cocoides* Burret como parte esencial del proceso de embriogénesis somática, necesario para su producción masiva, lo cual a su vez es útil en el desarrollo de proyectos actuales y futuros en el ámbito de reforestación y arborización urbana del DMQ, además de contribuir en gran medida a la preservación de la biodiversidad.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Establecer 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 cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret).

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Determinar el mejor medio de cultivo y las mejores condiciones para el establecimiento de la especie *in vitro*.
- Promover la formación de callos primarios y embriogénicos en un medio de inducción de callos embriogénicos previamente establecido.
- Inducir la formación de embriones somáticos en medio sólido, a partir de los callos embriogénicos obtenidos en el proceso de callogénesis.
- Realizar un estudio histológico de los embriones somáticos obtenidos y sus callos, para verificar su viabilidad.
- Establecer las suspensiones celulares con los callos embriogénicos, para su proliferación y formación de embriones somáticos.

- Comparar los medios sólido y líquido en la eficiencia de formación de embriones somáticos.
- Realizar una publicación científica sobre este trabajo de investigación.

## **1.4 Marco Teórico**

### **1.4.1 Generalidades**

Las palmas constituyen una familia fácilmente reconocible dentro de las monocotiledóneas, estas poseen las características distintivas de este grupo de plantas, tales como, un solo cotiledón, haces vasculares dispersos en la sección transversal del tallo y flores trímeras. Tienen un hábito leñoso, debido al gran desarrollo del tallo a través de un meristemo apical muy grande (Aguirre *et al.*, 2002).

Las palmas son principalmente plantas tropicales y subtropicales, sin embargo, algunas son muy resistentes y crecen en temperaturas templadas e incluso en zonas donde se producen heladas (Squire, 2008).

La familia de las palmas, *Arecaceae*, incluye 200 géneros y 2450 especies de palmas distribuidas en la región tropical a nivel mundial, con algunas especies que se extienden en áreas subtropicales en ambos hemisferios. Además de ser un grupo muy diverso y ecológicamente importante, los miembros de la familia son de gran utilidad para las comunidades humanas, ya que están siendo explotados de muchas formas a nivel mundial (Borchsenius & Moraes, 2006).

En el Ecuador, se encuentran 34 géneros y 130 especies nativas y varias introducidas y cultivadas, algunas de estas son consideradas árboles patrimoniales. Las palmas que pertenecen a esta familia son de gran importancia ya que varias especies nativas son útiles para la alimentación, artesanía, construcción, tejidos, extracción de aceite, ornamentación, entre otras; de ahí su gran importancia a nivel socio-económico (Ulloa & Moller, 1995).

Existen 23 especies que son endémicas de Ecuador, la mayoría de estas especies son andinas y se encuentran amenazadas; un gran número de estas no se encuentran en reservas naturales, esta es su importancia a nivel ambiental (Aguirre *et al.*, 2002).

#### **1.4.2 Palma coco cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret)**

*Parajubaea cocoides* Burret es una palma ornamental que se encuentra en calles y avenidas de las ciudades antiguas de los Andes en el Ecuador y en el sur de Colombia, al ser considerado como un árbol patrimonial del Ecuador, su atractivo paisajístico es emblemático ya que realza la belleza arquitectónica de muchas edificaciones históricas de la época colonial (figura 1.1) (Aguirre *et al.*, 2002; Pintaud & Ludeña, 2008). Por tanto, al ser una planta decorativa u ornamental y al considerarse un árbol patrimonial su importancia socio-económica es clara (Borchsenius & Moraes, 2006).

En cuanto al estado de preservación de esta especie, se encuentra en peligro de extinción en estado amenazado, puesto que en la actualidad no existen cultivos y la mayoría de sus individuos son remanentes de muchos años (Peña *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2009).

El género *Parajubaea*, consta de tres especies *Parajubaea torallyi* y *Parajubaea sunkha* endémicas de Bolivia y *Parajubaea cocoides* Burret distribuida en los andes del Ecuador y en el sur de Colombia, donde esta palma crece entre los 2500 y 3000 m.s.n.m, por tanto no es adecuada para los trópicos; no se conoce esta especie en estado silvestre (Borchsenius & Moraes, 2006).

No se sabe con certeza si es una planta endémica del Ecuador, debido a la ausencia de formaciones naturales o una forma cultivada (cultígeno) de las especies de Bolivia (Moraes & Henderson, 1990), sin embargo muchos autores así lo afirman (Ulloa & Moller, 1995; Pintaud & Ludeña, 2008; Fernández *et al.*, 2009; Germplasm Resources Information Network , 2012). Anteriormente se pensaba que esta especie de



palma se encontraba en estado silvestre en Papallacta, pero posteriormente se desmintió este hecho (Moraes & Henderson, 1990).

Esta palma crece generalmente mediante semillas; para cultivarla se necesitan semillas frescas, el tiempo de germinación es largo, por lo que se debe humedecer las semillas en agua o fraccionar y lacerar la cáscara de la misma. Se la debe colocar en un lugar cálido durante 6-8 semanas, o incluso hasta seis meses, antes de sembrarla para acelerar el proceso de germinación. Pero incluso con todas estas condiciones, la germinación es tardía (Squire, 2008).

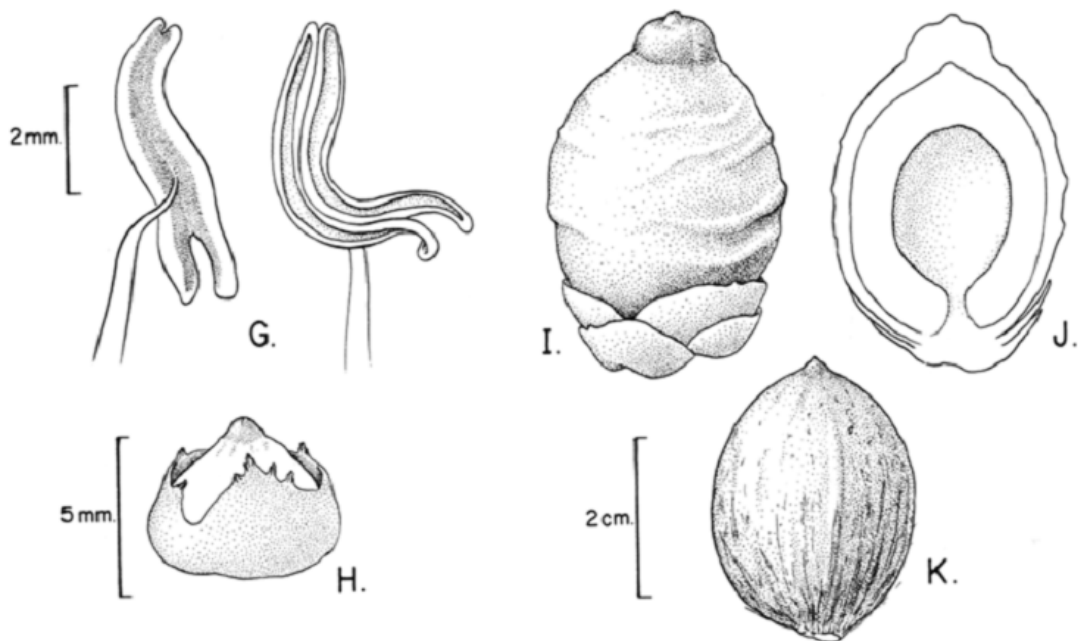


**Figura 1.1:** Palma coco cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret) ubicada en la hacienda “Las Magnolias” (Sangolquí-Ecuador).

#### 1.4.2.1 Características

Dentro de sus características principales, esta planta perenne pertenece a las palmas solitarias monoicas, llega a medir de 12-16 m de altura, posee un tallo alto, café grisáceo y liso, que alcanza los 45 cm de diámetro; su corona es globosa con hojas pinnadas, arqueadas de 3-3.6 m con peciolos de 90 cm, en las palmas maduras esta

corona llega a medir de 4.5-6 m de ancho. Posee una inflorescencia interfoliar pedunculada de color anaranjado con 15-17 estambres, sus frutos son comestibles de 4-5 cm de largo, ovoides, lisos, café-verdosos; su endocarpo es rígido de color negro y de 6-7 mm de espesor; este consta de 1-2 semillas de 1.4 cm de diámetro (figura 1.2) (Moraes & Henderson, 1990; Ulloa & Moller, 1995; Aguirre *et al.*, 2002; Squire, 2008).



**Figura 1.2:** Estambres (G), ovario (H), fruto (I), corte transversal del fruto (J), endocarpo (K) de *Parajubaea cocoides* Burret (Moraes & Henderson, 1990).

#### 1.4.2.2 Taxonomía

La taxonomía de esta especie vegetal se indica a continuación (tabla 1.1):

- **Nombre científico:** *Parajubaea cocoides* Burret
- **Nombres comunes:** Coco cumbé, coco, palma de coquito, coco de tierra fría, palma de Quito.

**Tabla 1.1:** Taxonomía de la palma coco cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret).

<i>Parajubaea cocoides</i> Burret	
<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Liliopsida
<b>Orden:</b>	Arecales
<b>Familia:</b>	Arecaceae
<b>Subfamilia:</b>	Arecoideae
<b>Tribu:</b>	Cocoseae
<b>Subtribu:</b>	Butiinae
<b>Género:</b>	<i>Parajubaea</i>
<b>Especie:</b>	<i>P. cocoides</i>

**Fuente:** Moraes & Henderson (1990); Catalogue of Life (2012); Germplasm Resources Information Network (2012).

### 1.4.3 Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos o cultivo *in vitro* se fundamenta en el principio de totipotencia celular, el cual indica que toda célula vegetal contiene el material genético de la planta madre, por ende tiene la capacidad de regenerar una planta completa (Pérez, 1998).

Esta tecnología abarca muchas herramientas que permiten el cultivo de células, protoplastos, tejidos, y órganos, bajo condiciones asépticas y controladas, a través de la utilización de medios nutritivos con distintos tipos de reguladores de crecimiento (Roca & Mroginski, 1993; Pérez, 1998).

El establecimiento del cultivo de tejidos, depende en primera instancia del tipo de explante, la especie de planta utilizada y su genotipo, el método de regeneración que se emplee, además del objetivo que se pretende alcanzar (Roca & Mroginski, 1993).

El aporte de esta tecnología ha sido de gran importancia, y su alcance va desde estudios básicos de fisiología, bioquímica y genética, obtención de plantas sanas libres de patógenos y enfermedades, hasta la propagación masiva, la conservación del germoplasma, la producción de metabolitos secundarios y el mejoramiento genético (Roca & Mroginski, 1993; Pérez, 1998).

Dentro del cultivo de tejidos existen dos eventos morfogénicos para la regeneración de plantas, estos son: organogénesis y embriogénesis somática (Pérez, 1998).

La morfogénesis es un fenómeno, que se refiere al origen y a los cambios en la forma específica, es decir, en la estructura y la organización, que se dan lugar en el desarrollo de un organismo, esto se puede presentar tanto en la organogénesis como en la embriogénesis somática y dependen tanto de la naturaleza del explante como del genotipo de la especie (Marinucci *et al.*, 2004).

#### **1.4.3.1 Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática es un proceso que implica la formación de embriones somáticos a partir de células somáticas vegetales, es decir, sin la fusión de gametos, estos embriones son estructuras bipolares que tienen un eje apical-radical y son capaces de formar plantas normales y completas. Entre las principales características que tienen los embriones somáticos son además: independencia frente al tejido generador, es decir, no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de este; presentan bandas procambiales entre los ápices. (Pérez, 1998; Freire, 2003; Viñas & Jiménez, 2011).

Esta vía de regeneración se fundamenta, por tanto, en la obtención de embriones somáticos, que tienen su origen en células somáticas de la planta donante, las cuales se reprograman y siguen un patrón de desarrollo idéntico al del embrión de origen cigótico. De esta manera, al no ser la célula inicial producto de un proceso de recombinación y fusión de gametos, se conserva íntegramente el genotipo de la planta donante. Algunos autores indican que estos embriones somáticos tienen un origen unicelular, mientras que otros piensan que el origen puede ser tanto unicelular como multicelular (Celestino *et al.*, 2005; Viñas & Jiménez, 2011).

La embriogénesis somática es considerada como el método más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, ya que permite incrementar los coeficientes de multiplicación en cortos periodos de tiempo, disminuir los costos de producción, brinda

la posibilidad en primer lugar de automatizar el proceso productivo con el uso de biorreactores, además de la aplicación de técnicas de encapsulación para obtener semillas artificiales y por último la posibilidad de utilizar los cultivos embriogénicos como dianas adecuadas para la transformación genética. Por otro lado, existen desventajas como son la falta de conocimiento de los parámetros que regulan este proceso y el aún limitado número de especies en las cuales se describe un proceso de embriogénesis somática eficiente (Pérez, 1998; Freire, 2003; Celestino *et al.*, 2005).

Este proceso es afectado notablemente por una serie de factores que en algunos casos favorecen o por otro lado dificultan los procedimientos *in vitro*, estos son algunos de ellos: el genotipo de la planta, las condiciones de cultivo, los reguladores del crecimiento y demás componentes del medio de cultivo, además del tipo y estado fisiológico del explante (Roca & Mroginski, 1993; Pérez, 1998; Freire, 2003).

Se ha estudiado también el efecto de las fuentes de explantes en la producción de embriones somáticos. Estos pueden ser obtenidos de varias fuentes, tales como: hojas jóvenes, inflorescencias, peciolos, entre otros. La reacción que presente el explante ante la embriogénesis está determinada por la edad de este, así como también por la concentración de la auxina empleada (Pérez, 1998).

Se ha determinado morfológicamente que la embriogénesis somática posee cuatro fases, estas son: 0, 1, 2 y 3. Durante la primera fase o fase 0, las células aisladas sufren continuas divisiones debido a la presencia de auxinas en el medio de cultivo, hasta formar agregados celulares embriogénicos. En la fase 1, estos agregados adquieren la habilidad para el desarrollo de embriones cuando la auxina es eliminada del medio de cultivo, durante esta fase la proliferación de los agregados es relativamente lenta y aparentemente sin diferenciación durante los tres días después de transferido al medio de cultivo libre de auxina. Después de esto, en la fase 2 ocurre una rápida división en ciertas partes del agregado celular, a los tres o cuatro días del cultivo, dando lugar a la formación del embrión en etapa globular. En la fase final o fase 3, las plantas dicotiledóneas continúan el desarrollo del embrión en las etapas de corazón y torpedo (Roca & Mroginski, 1993; Pérez, 1998; Freire, 2003).

En el caso de las especies monocotiledóneas, estas poseen las tres primeras fases, fase 0, 1 y 2, la última fase no, pues en estas no se diferencian las etapas de corazón y torpedo, ya que el embrión globular sufre un proceso de transición, pasando por las etapas de escutelar y coleoptilar, este se alarga hasta llegar a formarse el embrión maduro (Freire, 2003).

Adicionalmente, este proceso de regeneración de plantas, consta de las siguientes etapas: 1. inducción de los embriones somáticos, 2. desarrollo de los embriones somáticos, 3. proliferación, 4. maduración, 5. germinación y conversión en plantas (Freire, 2003).

En cuanto a la inducción de embriones somáticos, todas las células somáticas dentro de la planta contienen la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional. La inducción de la embriogénesis somática consiste en una reprogramación del patrón de expresión de los genes presentes en la célula somática. Es posible que esta regulación génica se deba a factores epigenéticos como la metilación del ADN y compactaciones o descompactaciones en la disposición de la cromatina. Se han utilizado diferentes técnicas para estimular el proceso de embriogénesis somática como son: estrés con calor, anaerobiosis, temperaturas bajas (4.0 °C) y también la exposición a auxinas. Los reguladores de crecimiento, principalmente las auxinas, juegan un papel muy importante en la transducción de señales para desencadenar un patrón de expresión génica determinado. De todas las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), es el que promueve la hipermetilación del ADN con mayor facilidad (Pérez, 1998; Freire, 2003; Viñas & Jiménez, 2011).

Durante la inducción de la embriogénesis somática pueden ocurrir dos sucesos diferentes. En el primer suceso, solo basta un estímulo de la división celular para la formación de un embrión somático a partir del tejido de un explante. A este proceso se le conoce como *embriogénesis somática directa*, es decir, la formación de embriones somáticos directamente desde una estructura organizada. Este desarrollo directo es debido a la acción realizada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante (Pérez, 1998; Viñas & Jiménez, 2011).

El segundo suceso, se trata de un proceso de desdiferenciación, las células del tejido deben sufrir varias divisiones mitóticas en presencia de una auxina. Estas divisiones mitóticas dan lugar a un callo previo a la formación de embriones somáticos, aunque también se pueden obtener a partir de suspensiones celulares y protoplastos. Este proceso es llamado *embriogénesis somática indirecta* (Roca & Mroginski, 1993; Pérez, 1998; Freire, 2003).

En cuanto al desarrollo de los embriones somáticos, es necesario en primer lugar adicionar al medio de cultivo bajas concentraciones de auxina (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético *2,4-D*, Ácido indolacético *AIA*) o auxinas menos potentes (Ácido naftalenacético *ANA*) e incluso no adicionar auxinas, especialmente cuando se trata de especies monocotiledóneas. En algunas especies es necesario adicionar una citoquinina (Freire, 2003).

El comportamiento asincrónico de los embriones somáticos es un punto de mucha relevancia, algunos aspectos que influyen en la asincronía son: la cantidad de nutrientes que un embrión somático puede tomar del medio de cultivo, la posible interacción entre los embriones y la concentración en que se encuentren los elementos de acondicionamiento liberados por los propios embriones somáticos al medio de cultivo (Freire, 2003).

La proliferación es uno de los aspectos más importantes cuando se trata de lograr una propagación masiva, a estos procesos se les conoce también como embriogénesis secundaria, recurrente o repetitiva. La proliferación de células embriogénicas es fuertemente afectada por el nivel de auxina, ya que si este es bastante alto, se inicia un nuevo ciclo de producción de embriones somáticos (Pérez, 1998).

La maduración, es la fase de desarrollo del embrión en que ocurre la expansión de la célula, la acumulación de sustancias de reserva y este adquiere además tolerancia a la desecación. En este punto, es muy importante tener en cuenta suplementos como son: las auxinas, los carbohidratos, el nitrógeno y el AAB (Ácido abcísico). La correcta acumulación de reservas conlleva a un incremento en la masa seca de los embriones

somáticos e influye positivamente en su posterior germinación (Pérez, 1998; Freire, 2003).

En cuanto a la germinación y conversión en plantas, las reservas de proteínas y lípidos en el embrión somático disminuyen sustancialmente, esta degradación rápida de estas sustancias, se debe probablemente a la falta del tejido nutritivo que rodea a la semilla, es por esta razón que las plantas obtenidas de embriones somáticos son más pequeñas que las obtenidas a partir de semillas. También juegan un papel importante en la germinación, las citoquininas añadidas al medio de cultivo, ya que estas contrarrestan el efecto de las auxinas durante la inducción y la proliferación (Roca & Mroginski, 1993; Pérez, 1998; Freire, 2003).

Se le denomina conversión, al proceso de desarrollo de plantas completas en condiciones *ex vitro* a partir de embriones somáticos. Esta conversión puede diferir entre los distintos genotipos, las especies y los sistemas de cultivo. La manipulación de los embriones cigóticos *in vitro* simulando los procesos que tienen lugar en las plantas de forma natural, es la mejor opción para optimizar la maduración y conversión en plantas de los embriones somáticos (Roca & Mroginski, 1993; Freire, 2003).

Para saber si un proceso de embriogénesis somática es eficiente o no, se debe tomar en cuenta el porcentaje de embriones somáticos que se convierten en plantas y no limitar este valor solamente a los embriones somáticos que germinan (Freire, 2003).

#### **1.4.3.2 Histología vegetal**

Un estudio histológico es de gran importancia en el cultivo *in vitro* y especialmente en la embriogénesis somática para comprender los procesos morfogénicos que ocurren durante cada una de sus etapas, como son los cambios estructurales (Lara *et al.*, 2003; González *et al.*, 2005).

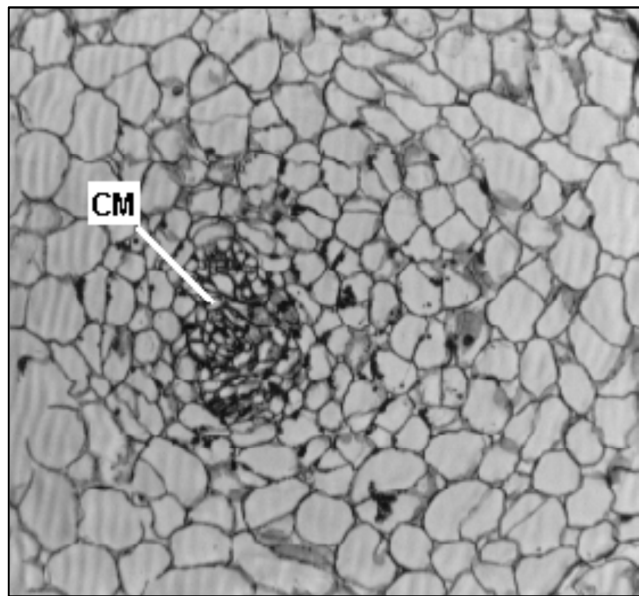
Realizando un estudio histológico, se puede determinar las zonas de respuesta del explante, es decir, donde existe división celular, y de esta manera emplear



únicamente estas zonas que responden al tratamiento con auxinas para lograr una mejor inducción de callo embriogénico (Viñas & Jiménez, 2011).

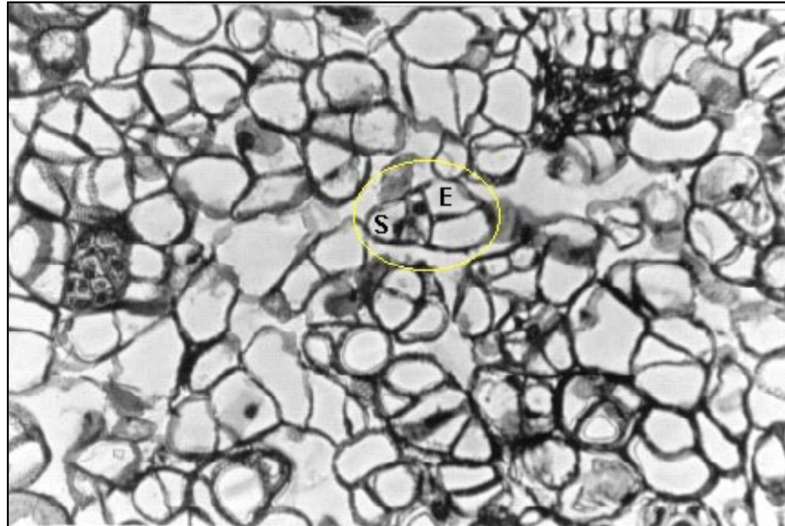
La histogénesis de los callos, es importante ya que permite establecer relaciones entre la influencia de los reguladores del crecimiento sobre la desorganización del tejido de los callos, comparándola con el tejido celular de una estructura organizada normal (González *et al.*, 2005).

Mediante cortes histológicos, se puede observar que durante la inducción del proceso embriogénico las células derivadas de los centros meristemáticos presentan un alto porcentaje de polaridad y división asimétrica (figura 1.3), similar a los patrones que se dan en la embriogénesis cigótica (Alemán *et al.*, 2002).



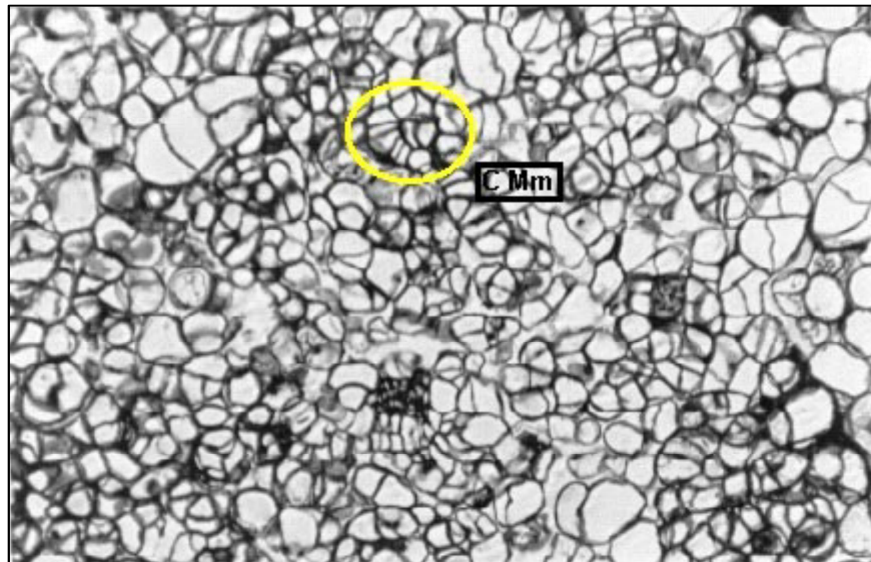
**Figura 1.3:** Corte transversal de un ápice de henequén en fase de inducción CM (centro meristemático) (Alemán *et al.*, 2002).

Estas células con un extremo agudo y el otro redondeado, de tamaño pequeño, paredes celulares finas, con núcleos prominentes, nucléolos grandes y vacuolas pequeñas, comienzan a dividirse longitudinalmente y transversalmente para dar origen al suspensor y al embrión (figura 1.4) (Alemán *et al.*, 2002). La función principal de este suspensor es mantener en contacto al embrión con el tejido materno (Scherwinski *et al.*, 2012).



**Figura 1.4:** Células embriónicas polarizadas y en división. Formación de S (suspensor) y E (embrión) (Alemán *et al.*, 2002).

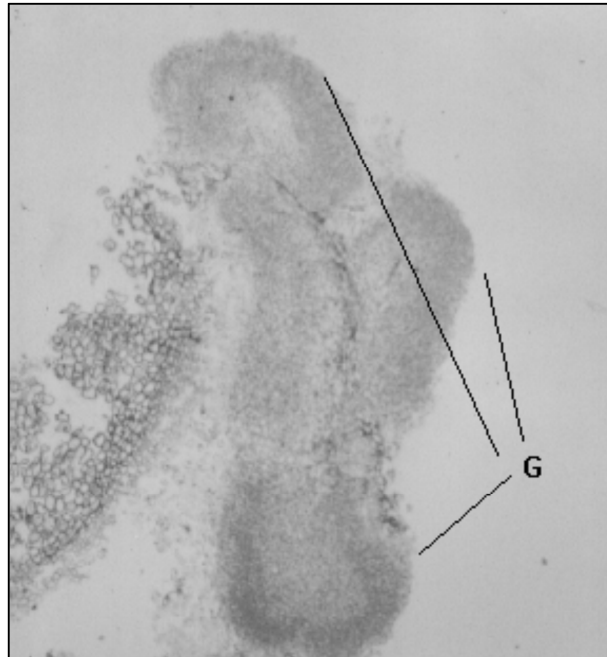
Las divisiones celulares subsiguientes dentro del embrión, conllevan a la formación de una masa de células mamilares (figura 1.5), donde las células periféricas dan origen a la epidermis del embrión (Alemán *et al.*, 2002).



**Figura 1.5:** Formación de agregados celulares. C Mm (células mamilares) (Alemán *et al.*, 2002).

Posteriormente una serie de divisiones sucesivas dan lugar al primer estadio del embrión (fase globular) (figura 1.6), en el caso de la plantas monocotiledóneas esta fase

globular pasa por varias etapas de transición hasta llegar al embrión maduro (Alemán et al., 2002).



**Figura 1.6:** Varios embriones de henequén en estado globular. G (embriones globulares) (Alemán *et al.*, 2002).

#### 1.4.3.3 Variación somaclonal

La variación somaclonal, es un punto de mucha relevancia en los procesos de cultivo *in vitro*, y específicamente en la embriogénesis somática, aunque se piensa que este proceso tiene una menor variación somaclonal en comparación a otras vías de regeneración, sin embargo no se ha comprobado del todo (Pérez, 1998).

Algunas de las plantas cultivadas *in vitro*, muestran variaciones tales como incremento en el número de tallos o ramas, retardo en la floración y otras características, las cuales influyen en el rendimiento en el campo. Sin embargo, estas plantas han mostrado una menor incidencia de enfermedades sistémicas (Roca & Mroginski, 1993).

La aparición o no en mayor o menor medida de posibles variantes somaclonales está determinada por los protocolos de trabajo que se llevan a cabo, mas

no por los propios acontecimientos que tienen lugar durante los diferentes procesos de regeneración (Roca & Mroginski, 1993; Pérez, 1998; Freire, 2003).

Los mecanismos de esta variación se pueden deber a cambios en los cromosomas, amplificación y metilación del ADN, deleciones, transposomas o incluso a los cambios epigenéticos, que son también recurrentes. Esta variación somaclonal, está condicionada por la ocurrencia simultánea de varios factores en el cultivo *in vitro* (Freire, 2003).

El genotipo de la especie con la que se trabaja, también influye fuertemente en esta variación, por lo que se recomienda el estudio más detallado de todos los genotipos existentes por cada especie (Pérez, 1998; Freire, 2003; Viñas & Jiménez, 2011).

#### **1.4.3.4 Suspensiones celulares**

Las suspensiones celulares o el cultivo en suspensión, constituye una vía para mantener y propagar células vegetales. Estas suspensiones celulares consisten en células libres o aisladas así como en agregados celulares distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento (Roca & Mroginski, 1993; Freire, 2003).

Los cultivos en suspensiones celulares, son otra forma de llevar a cabo el proceso de embriogénesis somática indirecta. Estos son establecidos generalmente por la transferencia de fracciones de callos indiferenciados o embriones somáticos en etapas iniciales a un medio de cultivo en fase líquida, estos a su vez son colocados en agitación durante todo el período de cultivo. Este tipo de cultivo es un sistema modelo que representa la base para el escalado del cultivo en los biorreactores (Roca & Mroginski, 1993; Freire, 2003).

El cultivo en suspensión es muy importante, debido a que a través de este se pueden realizar estudios sobre: embriogénesis somática, crecimiento y diferenciación, organogénesis, ciclo celular, genética, nutrición, bioquímica y metabolismo, así como

también la obtención de diversos productos secundarios tales como: fenoles, antiquinonas, antocianina, nicotina, etc (Freire, 2003).

Para iniciar y establecer un cultivo en suspensión, generalmente se utilizan porciones de callos friables, pero también se pueden establecer a partir de explantes tales como: mesófilo de hojas, fragmentos de cotiledones o embriones inmaduros; estos explantes deben estar expuestos a una alta concentración de auxina, ya que esto induce la división celular y como resultado se tiene una desorganizada suspensión consistente en células embriogénicas y no embriogénicas (Roca & Mroginski, 1993; Pérez, 1998; Freire, 2003).

Las células embriogénicas se encuentran en pequeños grupos conocidos como masas embriogénicas, en la mayoría de cultivos en suspensión estas células se encuentran en la menor proporción (1-2 %); por tanto, un cultivo en suspensión está formado por una poca cantidad de células que han pasado de somáticas a embriogénicas (Pérez, 1998).

El medio más utilizado para estos cultivos ha sido el de Murashige & Skoog *MS* (1962), sin embargo, el propuesto por Gamborg *et al.* *B5* (1968), se ha utilizado en el cultivo de muchas especies de gran importancia agrícola (Roca & Mroginski, 1993; Freire, 2003).

El efecto rotatorio de las suspensiones celulares, ayuda a la dispersión de las células y al intercambio de gases, esto hace que las células vegetales se mantengan vivas. La velocidad de agitación más apropiada para la mayoría de cultivos ha sido 60-150 rpm, esta velocidad puede variar en cuanto al volumen del cultivo y a la capacidad del recipiente en el que se encuentra; generalmente se ocupan volúmenes de medio de cultivo de 15-20 mL en recipientes de 100 mL, o volúmenes de 30-50 mL en recipientes de 250 mL (Freire, 2003).

Una vez establecidas las suspensiones celulares, se debe tomar en cuenta su mantenimiento, esto implica la realización de subcultivos para continuar con los procesos fisiológicos normales. El momento de realizar un subcultivo, está relacionado con la curva de crecimiento de la suspensión. Esta curva está formada por las siguientes fases: fase inicial o de latencia, que es cuando no existe división celular; fase exponencial, que es cuando las células alcanzan su máxima división; fase lineal, en esta fase la tasa de división celular va declinando y la fase estacionaria, que es donde las células empiezan a morir por la falta de nutrientes, el pH del medio cambia y su crecimiento es inhibido por la gran cantidad de las mismas. Por tanto, el subcultivo debe realizarse antes de esta última fase (Roca & Mroginski, 1993; Freire, 2003).

#### **1.4.3.5 Tipos de explante**

El tipo de explante es un factor importante, ya que unos tejidos responden mejor al proceso de embriogénesis somática que otros. Un aspecto que se debe tomar en cuenta es la selección de explantes que contengan regiones meristemáticas. Por esta razón, en palmas comúnmente se ha utilizado tejido inmaduro como son, las inflorescencias, los ápices, los segmentos basales de hojas y los embriones cigóticos. La respuesta a este proceso puede variar incluso en la misma especie de palma con el tipo de explante utilizado (Goh *et al.*, 2001; Al-Khayri, 2011; Viñas & Jiménez, 2011; Scherwinski *et al.*, 2012).

En varios trabajos realizados por algunos autores han utilizado embriones cigóticos inmaduros con resultados favorables, en las especies: *Cocos nucifera L.*, *Euterpe oleracea*, *Bactris gasipaes* Kunth, *Calamus merrillii* y *Calamus subinerm* (Fernando & Gamage, 2000; Goh *et al.*, 2001; Alencar *et al.*, 2010; Scherwinski *et al.*, 2012).

#### **1.4.3.6 Medios de cultivo**

El medio de cultivo utilizado mayormente ha sido el medio sólido, durante todas las etapas de la embriogénesis somática, sin embargo, el uso de suspensiones celulares durante la etapa del desarrollo de embriones ha promovido la obtención de embriones somáticos. Se ha recomendado el uso de un mismo medio de cultivo basal

para todas las etapas del proceso, o en algunos casos con algunas modificaciones; sin embargo, contrariamente se cree que el cambio del medio de cultivo a lo largo del proceso embriogénico puede ser favorable (Fki *et al.*, 2003; Sané *et al.*, 2006; Al-Khayri, 2011).

En trabajos realizados anteriormente han utilizado varios medios basales como son: medio basal 72 *BM* 72 (1989), medio basal de Murashige & Skoog *MS* (1962), medio basal Y3 descrito por Eeuwens (1976), medio basal *SH* descrito por Schenk & Hildebrandt (1972), medio basal White *W* (1963), medio Woody Plant *WPM* descrito por Lloyd & McCown (1981), medio *NN* descrito por Nitsch & Nitsch (1969) y medio basal *CHU N6* (1975) (Fernando & Gamage, 2000, Ferreira *et al.*, 2008, Muniran *et al.*, 2008; Alencar *et al.*, 2010, Al-Khayri, 2011; Scherwinski *et al.*, 2012).

Sin embargo, varios autores coinciden que la utilización del medio basal de Murashige & Skoog *MS* (1962), ha dado buenos resultados en el proceso de embriogénesis somática en varias especies (Goh *et al.*, 2001; Alencar *et al.*, 2010; Scherwinski *et al.*, 2012).

En el caso de las suspensiones celulares, algunos autores indican que el medio basal Murashige & Skoog *MS* (1962) a la mitad de su concentración contribuye favorablemente a la formación de embriones somáticos en dichas suspensiones (Fki *et al.*, 2003; Abohatem *et al.*, 2011).

#### **1.4.3.7 Reguladores de crecimiento**

- ***Auxinas***

La inducción de callo con potencial embriogénico en el proceso de embriogénesis somática se ha logrado principalmente con el uso de un tipo de reguladores del crecimiento vegetal, denominados auxinas; siendo la más utilizada el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), aunque en algunos casos se ha empleado también picloram, con resultados favorables (Verdeil *et al.*, 1994; Steinmacher *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008; Alencar *et al.*, 2010; Scherwinski *et al.*, 2012).

Sin embargo, varios autores coinciden que el uso de 2,4-D da buenos resultados para la inducción de la calogénesis, y las concentraciones empleadas han sido: 5.5 mg.L<sup>-1</sup>, 10 mg.L<sup>-1</sup>, 22 mg.L<sup>-1</sup>, 25 mg.L<sup>-1</sup>, 75 mg.L<sup>-1</sup> y 100 mg.L<sup>-1</sup> (Fernando & Gamage, 2000; Al-Khayri & Al-Bahrany, 2001; Da Silva *et al.*, 2002; Rajesh *et al.*, 2003; Perera *et al.*, 2007; Al' Utbi & AL- Husaibi, 2008; Othmani *et al.*, 2009; Alencar *et al.*, 2010).

En la siguiente etapa de este proceso, la inducción de embriones somáticos tanto en medio sólido como en suspensión, los reguladores de crecimiento no han sido necesarios en muchos casos, generalmente se ha eliminado por completo del medio de cultivo la auxina utilizada en la fase anterior, en otros casos se ha reducido su concentración o se ha empleado auxinas menos potentes (Verdeil *et al.*, 1994; Fki *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2008; Othmani *et al.*, 2009).

Este es el caso del *ácido naftalenacético (ANA)*, su acción es menos potente que la del 2,4-D, es por esta razón que se ha utilizado en esta etapa en bajas concentraciones, diferentes autores han empleado las siguientes concentraciones de este regulador con buenos resultados: 0.01 mg.L<sup>-1</sup>, 1 mg.L<sup>-1</sup>, 1.5 mg.L<sup>-1</sup> y 2 mg.L<sup>-1</sup> (Da Silva *et al.*, 2002; Al' Utbi & AL- Husaibi, 2008; Muniran *et al.*, 2008; Aslam *et al.*, 2011; Scherwinski *et al.*, 2012).

#### ▪ **Citoquininas**

Complementariamente, en la etapa de inducción de embriones, algunos autores afirman que el tipo de reguladores de crecimiento más utilizados son las citoquininas, y dentro de estas la *isopenteniladenina (2-iP)*, la *6-bencilaminopurina (BAP)* y la *kinetina (Kin)*. Varios autores coinciden que las concentraciones de BAP que dan mejores resultados en la inducción de embriones en medio sólido son: 1.13 mg.L<sup>-1</sup>, 2.25 mg.L<sup>-1</sup>, 22.5 mg.L<sup>-1</sup> y 67.58 mg.L<sup>-1</sup> (Verdeil *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 2006; Perera *et al.*, 2007, Montero *et al.*, 2011). En el caso de las suspensiones no existen muchos reportes de la utilización de esta citoquinina, sin embargo, Abohatem *et al.* (2011) en su estudio reportan buenos resultados en cuanto a la inducción de embriones con: 0.3 mg.L<sup>-1</sup> BAP.



En cuanto a la Kin las concentraciones utilizadas en ciertos trabajos en medios sólidos han sido: 1 mg.L<sup>-1</sup> y 3 mg.L<sup>-1</sup> (Fisher & Tsai, 1978; Al' Utbi & AL- Husaibi, 2008).

#### **1.4.3.8 Cofactores**

Dentro de los cofactores, el uso de antioxidantes en el medio de cultivo se ha llevado a cabo en varias especies de estas plantas, debido a que la oxidación de sus explantes ha sido un fenómeno recurrente. Dentro de los componentes más utilizados para contrarrestar este problema, se encuentra el *carbón activado (CA)*, sin embargo, este compuesto puede adsorber ciertos componentes fundamentales del medio de cultivo, como son los reguladores de crecimiento, lo cual afecta en gran medida a la respuesta embriogénica. Por el contrario, se conoce que en algunas especies de palmas la presencia de este compuesto ayuda a promover el proceso de embriogénesis somática en algunas etapas (Roca & Mroginski, 1993; Viñas & Jiménez, 2011; Scherwinski *et al.*, 2012).

Varios autores en sus trabajos utilizaron diferentes concentraciones de carbón activado con buenos resultados, estas fueron: 0.3 g.L<sup>-1</sup>, 1.5 g.L<sup>-1</sup>, 2 g.L<sup>-1</sup>, 2.5 g.L<sup>-1</sup> y 3 g.L<sup>-1</sup> (Fernando & Gamage, 2000; Da Silva *et al.*, 2002; Steinmacher *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008; Badawy *et al.*, 2009; Othmani *et al.*, 2009; Scherwinski *et al.*, 2012).

## **1.5 Hipótesis**

Existe 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 cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret).

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

### **2.1 Participantes**

Para la puesta en marcha y el desarrollo de este proyecto de investigación se contó con la participación de las siguientes partes.

#### **2.1.1 Instituciones**

- Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas de Quito EPMMOP-Q, Unidad de Espacio Público UEP.
- Escuela Politécnica del Ejército ESPE.
- Hospital Carlos Andrade Marín HCAM.

#### **2.1.2 Personal interno**

- Ing. Norman Soria M.Sc., director del proyecto.
- Quim. Jaime Gía M.Sc., codirector del proyecto.

#### **2.1.3 Personal externo**

- Ing. Cristian Reyes, jefe del Laboratorio de Micropropagación de la UEP.
- Ing. Lorena Oña, asistente del Laboratorio de Micropropagación de la UEP.
- Andrea González, técnica del Laboratorio de Micropropagación de la UEP.
- Ing. Segundo Aguilar, jefe del banco de semillas del vivero municipal de Cununyacu.
- Ing. Jaime Hidrobo Luna Ph.D., coordinador externo.
- Dr. Nicolás Vivar, jefe del Servicio de Patología del HCAM.
- Rafael Proaño, técnico del Servicio de Patología del HCAM.

## 2.2 Zona de Estudio

### 2.2.1 Fase de campo

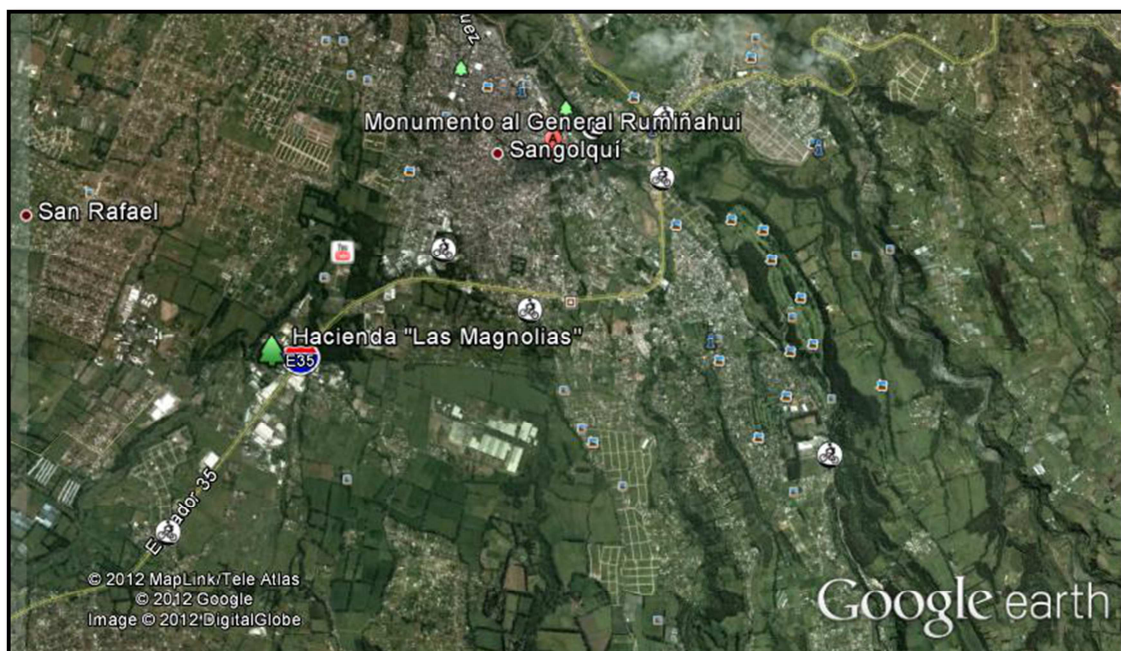
La fase de campo de este proyecto de investigación, que consistió en la recolección del material vegetal de plantas adultas de la palma coco cumbé (Ver Anexo A), se llevó a cabo en la Hacienda “Las Magnolias” (Ver Anexo B), ubicada en la Provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, ciudad de Sangolquí, vía Amaguaña km 3 ½.

Las coordenadas del sitio, son las siguientes:

*Latitud:* 0°21'8.51"S

*Longitud:* 78°27'58.68"O

*Altitud:* 2 532 m.s.n.m.



**Figura 2.1:** Ubicación geográfica de la Hacienda “Las Magnolias”, sitio donde se realizó la fase de campo de este proyecto de investigación.

Fuente: Google Earth (2012)

### 2.2.2 Fase de laboratorio

Este proyecto de investigación se lo realizó en su mayoría en el Laboratorio de Micropropagación de la Unidad de Espacio Público (UEP) del Municipio de Quito localizado en el Vivero Municipal de Cununyacu (Ver Anexo C), ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia de Cumbayá, sector de Cununyacu, vía Intervalles km 2 ½.

Las coordenadas del sector, son las siguientes:

*Latitud:* 0°13'25.90"S

*Longitud:* 78°25'50.34"O

*Altitud:* 2 303 m.s.n.m.



**Figura 2.2:** Ubicación geográfica del Laboratorio de Micropropagación de la Unidad de Espacio Público (UEP) del Municipio de Quito.

**Fuente:** Google Earth (2012)

El estudio histológico se realizó en el Servicio de Patología del Hospital Carlos Andrade Marín HCAM, ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia San Juan, sector de Miraflores Bajo, en la Portoviejo y Ayacucho (Google Earth, 2012).

Las coordenadas del lugar, son las siguientes:

*Latitud:* 0°12'19.14"S

*Longitud:* 78°30'16.80"O

*Altitud:* 2825 m.s.n.m.

### **2.3 Período de tiempo de investigación**

Este proyecto de investigación tuvo un período de duración de 10 meses desde Marzo del 2012 hasta Enero del 2013.

### **2.4 Procedimientos y diseño**

#### **2.4.1 Plantas madre**

Las plantas madre utilizadas en esta investigación son plantas adultas que tienen una edad aproximada de 15 años, su altura es de 15 m y el ancho de su corona es de 4.5 m aproximadamente (figura 2.3).

Estas palmas no presentaban ningún tipo de problemas ni enfermedades; esto fue verificado previamente por los trabajadores del banco de semillas del Vivero Municipal de Cununyacu, puesto que sus semillas fueron estudiadas detalladamente y con estas se realizaron varias pruebas como por ejemplo, las pruebas de germinación en campo con y sin pretratamiento, las plantas obtenidas fueron sanas y viables.

De igual forma, estas semillas fueron utilizadas para su germinación y regeneración de plantas completas *in vitro* dentro del laboratorio de micropropagación en trabajos anteriores, de estos se obtuvieron plántulas sanas libres de virus y de patógenos en general.

El acondicionamiento de estas plantas a condiciones de invernadero no fue posible, debido a su gran tamaño y al hecho de que el explante requerido eran los frutos, los cuáles no se obtienen en plantas de corta edad. El laboratorio de micropropagación consta de plántulas de coco cumbé aclimatadas, las cuales no pueden ser aún utilizadas por lo mencionado anteriormente, sin embargo, estas plantas servirán como fuente de explante en investigaciones futuras sobre esta especie vegetal.



**Figura 2.3:** Plantas madre adultas de la palma coco cumbé (a y b), racimos con sus frutos (c).

#### **2.4.2 Material vegetal**

La fuente de explante para este estudio fueron los frutos de la palma coco cumbé, que presentaron un color verde oscuro, con aproximadamente 4 cm de diámetro, los cuáles fueron recolectados en forma aleatoria (figura 2.4). Se procedió a clasificar la semilla, según estos parámetros, para la obtención de los explantes con los que se

trabajó, que fueron los embriones cigóticos inmaduros (Steinmacher *et al.*, 2007; Scherwinski *et al.*, 2012).

Para la recolección de este material vegetal, se necesitó una canastilla y una tijera de podar, puesto que se cortaron los racimos de cocos directamente de la planta, cada uno de estos racimos contenía aproximadamente de 150 a 200 frutos (Ver Anexo A, parte b, c, d y e).



**Figura 2.4:** Semillas de la palma coco cumbé recolectadas de plantas adultas de la hacienda “Las Magnolias”. Semilla seleccionada (a).

Los racimos con sus frutos fueron transportados en bolsas plásticas a temperatura ambiente, para ser procesados posteriormente en el Laboratorio de Micropropagación de la UEP.

El procesamiento consistió en separar el mesocarpo del endocarpo, y dentro de este el endospermo conteniendo el embrión cigótico inmaduro (figura 2.5), este endospermo se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su posterior desinfección y escisión en las siguientes 24 horas (Steinmacher *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008; Scherwinski *et al.*, 2012).





**Figura 2.5:** Endospermo de semilla seleccionada (inmadura) (a), embriones cigóticos inmaduros extraídos de los endospermos (explante empleado) (b).

### 2.4.3 Fase I: Desinfección de los explantes

La desinfección que se utilizó para los explantes, los endospermos (ver Anexo D, parte a), fue en primer lugar un enjuague con agua corriente para remover impurezas, se adicionó a continuación una solución de detergente por 10 min a 160 rpm en un agitador orbital (innova 2100), seguido de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2,5 % por 10 min a 160 rpm (Ver Anexo E, parte a y b) (Steinmacher *et al.*, 2007).

Posteriormente, los explantes se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril dentro de una cámara de flujo laminar (Streamline Laboratory products) con la ayuda de gazas estériles (Ver Anexo E, parte c), seguidamente fueron seccionados longitudinalmente por la mitad, con la ayuda de un bisturí estéril para obtener los embriones cigóticos inmaduros (Ver Anexo F, parte a, b, c y d) (Ferreira *et al.*, 2008).

No existieron factores de estudio en esta primera fase, puesto que el proceso mencionado logró porcentajes muy bajos y casi nulos de contaminación. Sin embargo, se evaluó el porcentaje de contaminación con 90 repeticiones, que corresponden a los tratamientos de la fase II; mediante la variable de respuesta contaminación (1= contaminado, 0= sano) a las 6 semanas de incubación, con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ contaminación} = \frac{\# \text{ contaminados}}{\# \text{ total}} * 100\%$$

## 2.4.4 Fase II: Establecimiento e inducción de callos embriogénicos

Una vez realizada la desinfección de los explantes, se procedió a la siembra de los embriones cigóticos inmaduros en el medio de establecimiento e inducción de callos embriogénicos, comprendiendo la siguiente fase (Ver Anexo F, parte e y g).

### 2.4.4.1 Factores de estudio

El primer factor de estudio en esta fase fue la concentración de 2,4-D, para esto se evaluaron las siguientes concentraciones:

- **C<sub>1</sub>**: 20 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D
- **C<sub>2</sub>**: 60 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D
- **C<sub>3</sub>**: 100 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D

El siguiente factor de estudio fue la concentración de CA, para esto se adicionaron las concentraciones que se detallan a continuación:

- **CA<sub>1</sub>**: 0 g.L<sup>-1</sup> CA
- **CA<sub>2</sub>**: 0.5 g.L<sup>-1</sup> CA
- **CA<sub>3</sub>**: 1 g.L<sup>-1</sup> CA

De la interacción de estos dos factores se desprendieron los siguientes tratamientos:

**Tabla 2.1:** Tratamientos de la fase II: establecimiento e inducción de callos embriogénicos.

Tratamientos		Factor 2 CA		
		CA <sub>1</sub>	CA <sub>2</sub>	CA <sub>3</sub>
Factor 1 2,4-D	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub> x CA <sub>1</sub>	C <sub>1</sub> x CA <sub>2</sub>	C <sub>1</sub> x CA <sub>3</sub>
		20 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D + 0 g.L <sup>-1</sup> CA	20 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 g.L <sup>-1</sup> CA	20 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L <sup>-1</sup> CA
	C <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> x CA <sub>1</sub>	C <sub>2</sub> x CA <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> x CA <sub>3</sub>
		60 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D + 0 g.L <sup>-1</sup> CA	60 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 g.L <sup>-1</sup> CA	60 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L <sup>-1</sup> CA
	C <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> x CA <sub>1</sub>	C <sub>3</sub> x CA <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> x CA <sub>3</sub>
		100 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D + 0 g.L <sup>-1</sup> CA	100 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 g.L <sup>-1</sup> CA	100 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L <sup>-1</sup> CA

#### 2.4.4.2 Métodos específicos de manejo del experimento

- Para todos los experimentos, los siguientes reactivos: sales, vitaminas y carbón activado fueron *PhytoTechnology Laboratories*, mientras que para los reguladores (2,4-D, BAP, Kin, ANA) y el agar se utilizó Sigma-Aldrich.
- Todos los tratamientos se realizaron en el medio basal de Murashige & Skoog *MS* (1962) modificado (Da Silva *et al.*, 2002; Scherwinski *et al.*, 2012), sus macro y micronutrientes, en un reactivo en polvo y sus vitaminas en una solución con extra tiamina ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Ver Anexo G).
- Para las diferentes concentraciones de 2,4-D que fueron evaluadas, se utilizó una solución 1:1 de este reactivo; mientras que para las concentraciones de CA, se empleó este reactivo en polvo.
- La concentración de sacarosa y de agar fue de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  y  $7 \text{ g.L}^{-1}$  respectivamente (Steinmacher *et al.*, 2007).
- Previo a la adición del agar, el pH de los medios de cultivo fue ajustado con la ayuda de un potenciómetro (JENWAY 3505) a un rango de 5.79-5.81, utilizando soluciones básicas y ácidas, de hidróxido de sodio (NaOH) y de ácido clorhídrico (HCl), en las concentraciones de 0.1 N y 0.1 M respectivamente (Steinmacher *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008).
- Los medios de cultivo fueron esterilizados en un autoclave horizontal (Tuttnaver 2540M) a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 minutos a  $1.53 \text{ kg.cm}^{-2}$  de presión (Ferreira *et al.*, 2008).
- Los embriones cigóticos inmaduros fueron inoculados en estos medios de cultivo en posición horizontal, en tubos de 25 x 150 mm conteniendo 10 mL del medio (Ver Anexo F, parte f) (Fernando & Gamage, 2000; Ferreira *et al.*, 2008).
- Todos los tratamientos se mantuvieron en un cuarto de incubación en la oscuridad a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 18 semanas, con subcultivos en el mismo medio cada 6 semanas (Ver Anexo F, parte h). En la siembra de los subcultivos los embriones se colocaron verticalmente con la parte basal sumergida en el medio de cultivo (Scherwinski *et al.*, 2012).

### 2.4.4.3 Diseño estadístico

Esta fase II se basó en un *diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 3x3*, este constó de 2 factores con 3 niveles cada uno, que correspondían a las concentraciones de 2,4-D y de CA en el medio de cultivo (2,4-D: 20 mg.L<sup>-1</sup>, 60 mg.L<sup>-1</sup> y 100 mg.L<sup>-1</sup>; CA: 0 g.L<sup>-1</sup>, 0.5 g.L<sup>-1</sup> y 1 g.L<sup>-1</sup>), la interacción de estos dio un total de 9 tratamientos con 10 repeticiones. La unidad experimental consistió en un tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo para inducción de callos, donde se sembró un embrión cigótico inmaduro, procedente de frutos de palmas coco cumbé, recolectados en la hacienda “Las Magnolias”.

Los resultados obtenidos en las evaluaciones de las variables de respuesta; determinaron el mejor tratamiento y con estas muestras se procedió a la siguiente etapa.

El modelo estadístico para este diseño está dado por (Gutiérrez *et al.*, 2008):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde,

$Y_{ijk}$  : medición correspondiente al tratamiento concentración de 2,4-D y CA.

$\mu$ : variación promedio del peso y la dimensión del callo formado.

$\alpha$ : concentración de 2,4-D.

$i$ : 20 mg.L<sup>-1</sup>, 60 mg.L<sup>-1</sup>, 100 mg.L<sup>-1</sup>.

$\beta$ : concentración de CA.

$j$ : 0 g.L<sup>-1</sup>, 0.5 g.L<sup>-1</sup>, 1 g.L<sup>-1</sup>.

$(\alpha\beta)_{ij}$  : efecto de la interacción de las concentraciones de 2,4-D y CA con sus niveles.

$k$ : 10 repeticiones.

$\varepsilon_{ijk}$  : error aleatorio con distribución normal, variables independientes  $N(0, \sigma^2)$ .

#### 2.4.4.4 Variables de respuesta

Las variables de respuesta que se evaluaron al final de este ensayo fueron:

- **Formación de callo:** Masa de células indiferenciadas formada en la etapa de establecimiento e inducción. Esta variable fue dicotómica, asignándose 1 en el caso de que se haya dado la formación de callo y 0 en caso contrario.
- **Friabilidad:** consistencia que presenta un callo, disgregable o no disgregable. De igual forma, la variable fue dicotómica, es decir, se asignó 1 en el caso de que era friable y 0 en el caso contrario.
- **Coloración:** tonalidad de color que adquiere un explante en el proceso del cultivo *in vitro*. La evaluación se la realizó mediante una escala arbitraria con cinco categorías:
  - **1:** Blanquecino
  - **2:** Blanquecino amarillento
  - **3:** Blanquecino marrón
  - **4:** Amarillento
  - **5:** Amarillento marrón
- **Morfología:** forma que adquiere un explante en el proceso del cultivo *in vitro*. De igual manera se realizó una escala arbitraria con cinco categorías:
  - **1:** Normal
  - **2:** Normal e hinchado
  - **3:** Curvo
  - **4:** Curvo e hinchado
  - **5:** Amorfo

- **Peso del callo:** masa del callo formado durante la etapa de establecimiento. El peso se tomó en gramos (g), con la ayuda de una balanza analítica de precisión (ACCULAB ALC) (figura 2.6a).
- **Dimensión del callo:** tamaño del callo formado durante la etapa de establecimiento. Esta variable se tomó en centímetros (cm), con la ayuda de una regla (figura 2.6b).



**Figura 2.6:** Medición del peso del callo formado (a), medida de la dimensión del callo formado (b).

### 2.4.5 Fase III: Inducción de embriones somáticos

Con los callos obtenidos del mejor tratamiento de la fase II, se procedió a la siembra de estos en un medio sólido de inducción de embriones somáticos, constituyendo la fase III (Ver Anexo H).

#### 2.4.5.1 Factores de estudio

El primer factor de estudio en esta fase fue la concentración de BAP y el segundo la concentración de Kin, se evaluaron las mismas concentraciones para ambos factores en forma separada; estas se detallan a continuación:

- **C<sub>1</sub>:** 0 mg.L<sup>-1</sup> BAP/Kin
- **C<sub>2</sub>:** 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP/Kin

- C<sub>3</sub>: 2 mg.L<sup>-1</sup> BAP/Kin
- C<sub>4</sub>: 3 mg.L<sup>-1</sup> BAP/Kin

De estas concentraciones se desprenden los tratamientos mostrados en la tabla 2.2 para cada factor.

**Tabla 2.2:** Tratamientos de la fase III: inducción de embriones somáticos.

<b>Factor 1 BAP</b>		<b>Factor 2 Kin</b>	
<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>
C <sub>1</sub> <sup>a</sup>	0 mg.L <sup>-1</sup>	C <sub>1</sub> <sup>a</sup>	0 mg.L <sup>-1</sup>
C <sub>2</sub>	1 mg.L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub>	1 mg.L <sup>-1</sup>
C <sub>3</sub>	2 mg.L <sup>-1</sup>	C <sub>3</sub>	2 mg.L <sup>-1</sup>
C <sub>4</sub>	3 mg.L <sup>-1</sup>	C <sub>4</sub>	3 mg.L <sup>-1</sup>

<sup>a</sup> indica mismo tratamiento

#### 2.4.5.2 Métodos específicos de manejo del experimento

- Todos los tratamientos se realizaron en el medio basal de Murashige & Skoog *MS* (1962) modificado (Alencar *et al.*, 2010; Scherwinski *et al.*, 2012), sus macro y micronutrientes, en un reactivo en polvo y sus vitaminas en una solución con extra tiamina (1 mg.L<sup>-1</sup>).
- Para las diferentes concentraciones de Kin y de BAP que fueron evaluadas, se utilizó una solución 1:1 de estos reactivos.
- También se tuvo una concentración fija de ANA (0.01 mg.L<sup>-1</sup>) (Da Silva *et al.*, 2002; Scherwinski *et al.*, 2012). Este reactivo de igual forma se lo utilizó en una solución 1:1.
- La concentración de sacarosa y de agar fue de 30 g.L<sup>-1</sup> y 6 g.L<sup>-1</sup> respectivamente (Da Silva *et al.*, 2002; Scherwinski *et al.*, 2012).
- Previo a la adición del agar, el pH de los medios de cultivo fue ajustado con la ayuda de un potenciómetro (JENWAY 3505) a un rango de 5.79-5.81, utilizando soluciones básicas y ácidas, de hidróxido de sodio (NaOH) y de ácido clorhídrico (HCl), en las concentraciones de 0.1 N y 0.1 M respectivamente (Steinmacher *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008).

- Los medios de cultivo fueron esterilizados en un autoclave horizontal (Tuttnaver 2540M) a 121 °C por 20 minutos a 1.53 kg.cm<sup>-2</sup> de presión (Ferreira *et al.*, 2008).
- De los explantes secundarios obtenidos se retiró las porciones de tejido que no formaron callo, para tener únicamente tejido callogénico (Ver Anexo H, parte c), estos callos fueron inoculados en estos medios de cultivo, en frascos conteniendo 50 mL del medio (Ver Anexo H, parte d) (Fernando & Gamage, 2000).
- Todos los tratamientos se mantuvieron incubados a 25 ± 2 °C a un fotoperiodo de 12-12 horas luz/oscuridad por 6 semanas (Ver Anexo H, parte e), con un subcultivo en el mismo medio a las 4 semanas (Ferreira *et al.*, 2008; Scherwinski *et al.*, 2012).

### 2.4.5.3 Diseño estadístico

Para esta fase III se aplicó un *diseño experimental en bloques completos al azar (DBCA)*, cada bloque constó de un factor (factor bloque 1: BAP y factor bloque 2: Kin), con 3 tratamientos o niveles cada uno (1 mg.L<sup>-1</sup>, 2 mg.L<sup>-1</sup>, 3 mg.L<sup>-1</sup>) más un tratamiento control (0 mg.L<sup>-1</sup>), todos estos con 5 repeticiones.

La unidad experimental consistió en un frasco conteniendo medio de cultivo sólido para la inducción de embriones somáticos, donde se sembró un callo resultado de la fase II.

De igual forma se realizaron evaluaciones de las variables de respuesta para determinar el mejor tratamiento. Con estas muestras se procedió al análisis histológico.

El modelo estadístico para este diseño está dado por (Gutiérrez *et al.*, 2008):

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde,

$Y_{ij}$ : medición correspondiente al tratamiento y al bloque (concentración de BAP/Kin).

$\mu$ : variación de la dimensión y el número esperado de embriones somáticos por callo.



$\tau_i$  : efecto debido al tratamiento (0 mg.L<sup>-1</sup>, 1 mg.L<sup>-1</sup>, 2 mg.L<sup>-1</sup>, 3 mg.L<sup>-1</sup>).

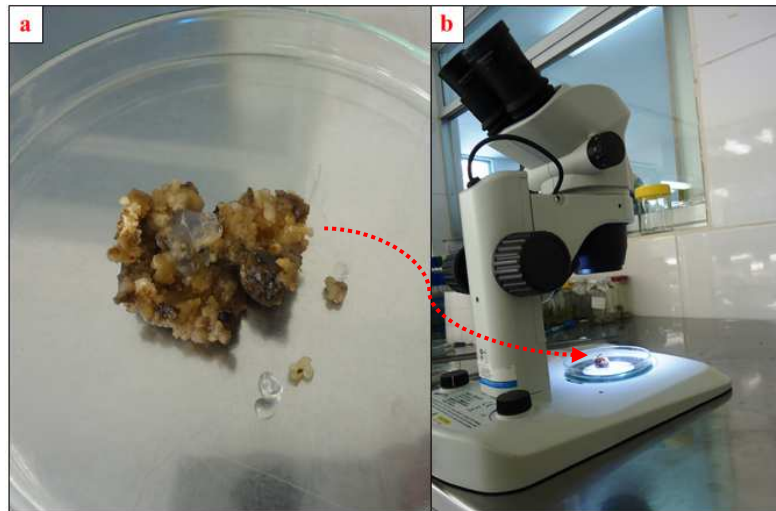
$\gamma_j$  : efecto debido al bloque (BAP/Kin).

$\varepsilon_{ijk}$  : error aleatorio atribuible a la medición  $Y_{ij}$ .

#### 2.4.5.4 Variables de respuesta

Las variables de respuesta evaluadas al término de este ensayo fueron:

- **Número de embriones somáticos:** estructuras bipolares con eje apical-radical, independientes del tejido materno. El número de embriones somáticos se lo determinó mediante la ayuda de un estereoscopio (Olympus SZ) (figura 2.7).



**Figura 2.7:** Callo embriogénico con embriones somáticos no distinguibles a simple vista (a), callo embriogénico colocado en el estereoscopio para determinar el número de embriones somáticos (b).

- **Dimensión del callo:** tamaño del diámetro mayor alcanzado por el callo en el proceso de inducción de embriones. Esta variable se determinó en centímetros (cm) con la ayuda de una regla (figura 2.8).



**Figura 2.8:** Medición de la dimensión del callo embriogénico en el proceso de inducción de embriones.

#### **2.4.6 Fase IV: Análisis histológico**

Una vez inducidos los embriones somáticos del mejor tratamiento se tomó una muestra representativa para realizar un análisis histológico con el fin de observar el tejido embriogénico y verificar los aspectos morfológicos. De la siguiente manera, en primer lugar se seleccionó el tejido vegetal con el que se trabajó, es decir, se tomó las porciones donde se observaban los embriones somáticos y callo embriogénico.

Para este estudio histológico, se procedió según el protocolo establecido en el manual de procedimiento de análisis histotecnológico del Servicio de Patología del HCAM.

Primeramente, se cortó pequeñas porciones de los callos, donde se encontraban los embriones, en muestras de 1.5 x 1.5 cm y 3 mm de espesor, tal como se observa en la figura 2.9.

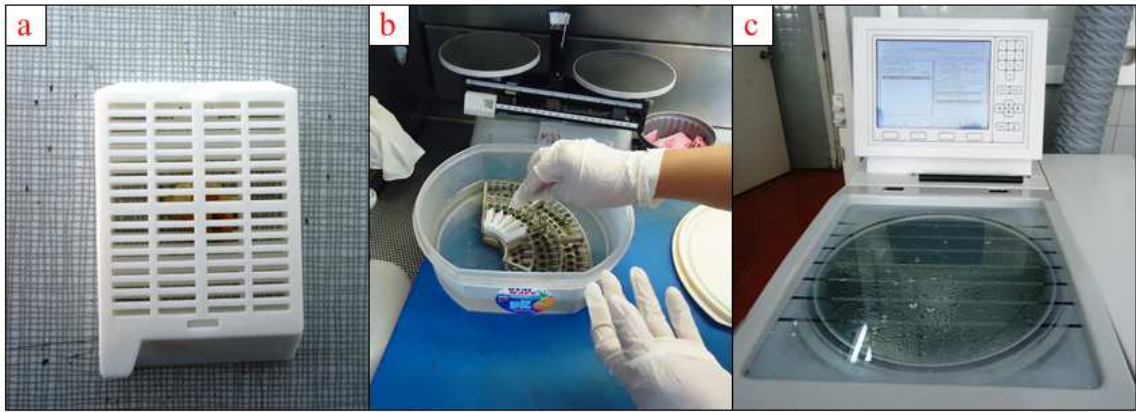


**Figura 2.9:** Cortes de las porciones de callo con sus embriones.

Estas muestras fueron colocadas en pequeñas canastillas, a las cuales se las sumergió en una solución de fijador (formol bufferado al 10 %, pH=7) por 2 horas. A continuación se colocó las muestras en el procesador de tejidos (Thermo SCIENTIFIC, SHANDON PATHCENTRE) (figura 2.10), en este se realizó el proceso que se observa en la tabla 2.3:

**Tabla 2.3:** Protocolo de procesamiento de muestras de tejido.

<b>Componente</b>	<b>Tiempo</b>
Alcohol 75 %	1 hora
Alcohol 80 %	1 hora
Alcohol 90 %	1 hora
Alcohol 100 %	1 hora
Alcohol 100 %	1 hora
Alcohol 100 %	1 hora
Xilol 100 %	2 horas
Xilol 100 %	2 horas



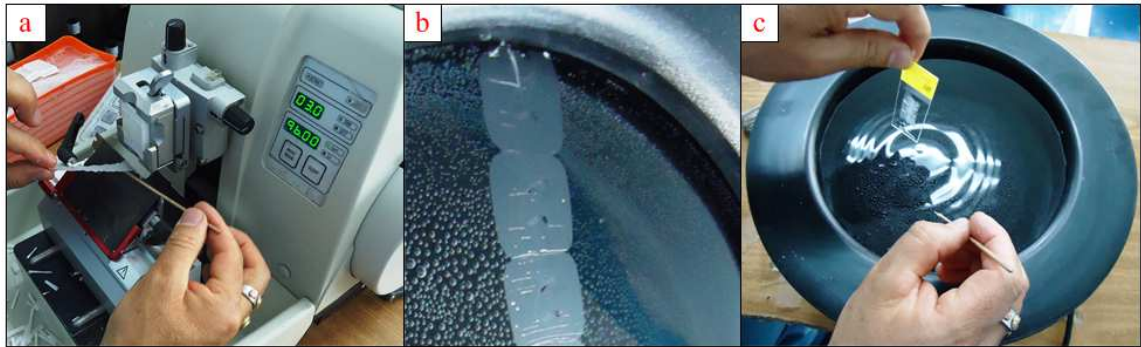
**Figura 2.10:** Muestra cortada y colocada en una canastilla (a), muestras sumergidas en la solución de fijador (b), muestras colocadas en el procesador de tejidos (c).

A continuación, se procedió a bloquear las muestras, es decir, se realizó pequeños bloques de parafina en el dispensador de parafina (Thermo SCIENTIFIC, HistoStar). Tal como se indica en la figura 2.11.



**Figura 2.11:** Dispensador de parafina (a), bloques de parafina enfriándose (b), bloques de parafina con tejido embrionario (c).

Estos bloques fueron llevados al micrótopo (Thermo SCIENTIFIC, SHANDON), en el cual se realizaron finos cortes de 3  $\mu\text{m}$ , estos se colocaron en agua tibia, se recogieron y se extendieron en portaobjetos adherentes (figura 2.12).

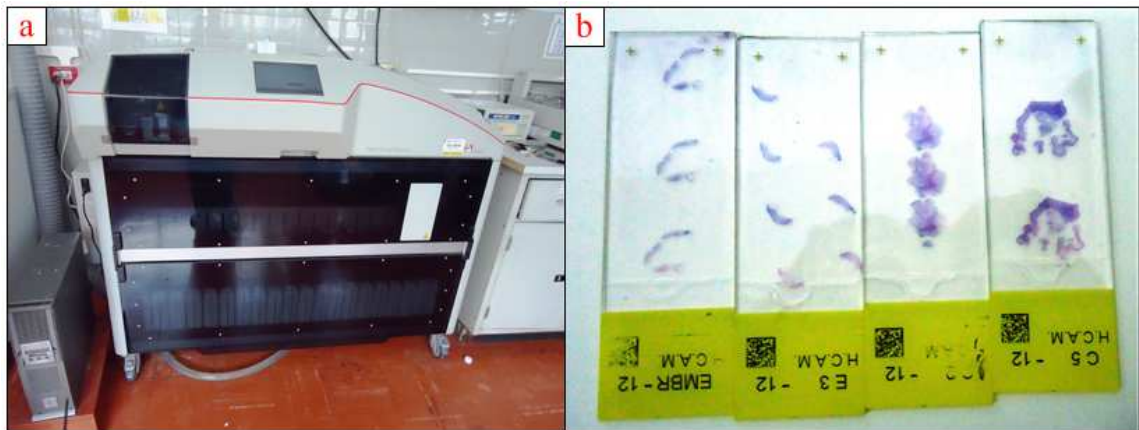


**Figura 2.12:** Cortes de las muestras en el micrótopo (a), microcorte colocado en agua tibia (b), microcorte recogido y extendido en un portaobjetos adherente (c).

Los portaobjetos con sus muestras fueron llevados a un equipo coloreador (Dako CoverStainer) para la desparafinización, hidratación y tinción del tejido (figura 2.13), para esto las muestras se sometieron a una temperatura de 60 °C, seguido de los pasos que se indican en la tabla 2.4.

**Tabla 2.4:** Procedimiento para la desparafinización, hidratación y tinción del tejido.

Componente	Tiempo
Xilol 100 %	30 minutos
Xilol 100 %	30 minutos
Alcohol 100 %	30 minutos
Alcohol 100 %	30 minutos
Alcohol 90 %	30 minutos
Alcohol 90 %	30 minutos
Alcohol 70 %	30 minutos
H <sub>2</sub> O destilada	30 minutos
H <sub>2</sub> O destilada	30 minutos
Hematoxilina-eosina	3 minutos
Agua amoniacal	2 segundos
H <sub>2</sub> O destilada	1 minuto



**Figura 2.13:** Equipo coloreador donde se realizó la desparafinización, hidratación y tinción del tejido (a), placas con las muestras teñidas (b).

Una vez teñidas las muestras se procedió a su observación en el microscopio óptico de fluorescencia (Nikon ECLIPSE 80i), tal como se observa en la figura 2.14.



**Figura 2.14:** Observación de las placas con sus muestras en el microscopio óptico de fluorescencia.

El análisis histológico (Fase IV) estuvo determinado por un *diseño descriptivo transversal*, donde la unidad experimental fue una placa conformada por un corte de tejido previamente fijado y teñido, lista para su observación en el microscopio óptico de fluorescencia. Para este estudio histológico, fueron evaluados los embriones somáticos obtenidos mediante medio sólido y sus callos y de forma cualitativa se evaluó la presencia o ausencia de tejido embrionario además de otros aspectos morfológicos, para verificar su viabilidad.

### 2.4.7 Fase V: Establecimiento de suspensiones celulares

Paralelamente con la fase III, los callos obtenidos del mejor tratamiento de la fase II, se emplearon para establecer las suspensiones celulares, constituyendo la fase V (Ver Anexo I).

#### 2.4.7.1 Factor de estudio

El factor de estudio en esta fase fue la concentración de BAP, para esto se evaluaron las concentraciones que se detallan a continuación:

- C<sub>1</sub>: 0.0 mg.L<sup>-1</sup> BAP
- C<sub>2</sub>: 0.2 mg.L<sup>-1</sup> BAP
- C<sub>3</sub>: 0.3 mg.L<sup>-1</sup> BAP
- C<sub>4</sub>: 0.4 mg.L<sup>-1</sup> BAP

De estas concentraciones se desglosan los siguientes tratamientos:

**Tabla 2.5:** Tratamientos de la fase V: establecimiento de suspensiones celulares

Factor BAP	
Tratamientos	Descripción
C <sub>1</sub>	0.0 mg.L <sup>-1</sup>
C <sub>2</sub>	0.2 mg.L <sup>-1</sup>
C <sub>3</sub>	0.3 mg.L <sup>-1</sup>
C <sub>4</sub>	0.4 mg.L <sup>-1</sup>

#### 2.4.7.2 Métodos específicos de manejo del experimento

- Todos los tratamientos se realizaron en el medio basal de Murashige & Skoog *MS* (1962) modificado a la mitad de su concentración (Fki *et al.*, 2003; Abohatem *et al.*, 2011), sus macro y micronutrientes, en un reactivo en polvo y sus vitaminas en una solución con extra tiamina (1 mg.L<sup>-1</sup>).
- Para las diferentes concentraciones de BAP que fueron evaluadas, se utilizó una solución 1:1 de este reactivo.

- También se tuvo una concentración fija de ácido naftalénacético (ANA) ( $0.01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Fki *et al.*, 2003; Scherwinski *et al.*, 2012). Este reactivo de igual forma se lo utilizó en una solución 1:1.
- La concentración de sacarosa fue de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  (Fki *et al.*, 2003, Steinmacher *et al.*, 2007).
- El pH de los medios de cultivo fue ajustado con la ayuda de un potenciómetro (JENWAY 3505) a un rango de 5.79-5.81, utilizando soluciones básicas y ácidas, de hidróxido de sodio (NaOH) y de ácido clorhídrico (HCl), en las concentraciones de 0.1 N y 0.1 M respectivamente (Steinmacher *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008).
- Los medios de cultivo fueron esterilizados en un autoclave horizontal (Tuttnaver 2540M) a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 minutos a  $1.53 \text{ kg.cm}^{-2}$  de presión (Ferreira *et al.*, 2008).
- De los explantes secundarios obtenidos en la fase II se retiró las porciones de tejido que no formaron callo, para tener únicamente tejido callogénico (Ver Anexo I, parte c y d), estas fracciones fueron cortadas y disgregadas con la ayuda de un bisturí y posteriormente se las inoculó en estos medios de cultivo, en frascos conteniendo 50 mL del medio líquido (Ver Anexo I, parte e, f, g, y h) (Fki *et al.*, 2003).
- Todos los tratamientos se mantuvieron incubados en un agitador orbital (LAB-LINE) a 100 rpm a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 12-12 horas luz/oscuridad por 6 semanas (Ver Anexo I, parte j y k), con un subcultivo en el mismo medio a las 3 semanas. Este subcultivo se lo realizó filtrando la masa de células en suspensión con filtros cuantitativos (MUNKTELL) e inoculándola en un medio líquido fresco (Ver Anexo J) (Fki *et al.*, 2003; Abohatem *et al.*, 2011).

#### **2.4.7.3 Diseño estadístico**

Esta última fase se basó en un *diseño experimental completamente al azar (DCA)*, constó de 4 niveles o tratamientos, cada uno de estos con 5 repeticiones. Los tratamientos corresponden a las concentraciones de BAP ( $0.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $0.3 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $0.4 \text{ mg.L}^{-1}$ ) en el medio de cultivo.



La unidad experimental consistió en un frasco conteniendo medio de cultivo líquido para la inducción de embriones somáticos, donde se inoculó una porción de callo resultado del mejor tratamiento de la fase II. La evaluación de las variables de respuesta determinó el mejor tratamiento de esta fase.

El modelo estadístico para este diseño está dado por (Gutiérrez *et al.*, 2008):

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde,

$Y_{ij}$  : medición correspondiente al tratamiento concentración de BAP.

$\mu$  : variación del peso y el número esperado de embriones somáticos por suspensión.

$\tau_i$  : efecto debido al tratamiento concentración de BAP.

$\varepsilon_{ij}$  : error aleatorio atribuible a la medición  $Y_{ij}$ .

#### 2.4.7.4 Variables de respuesta

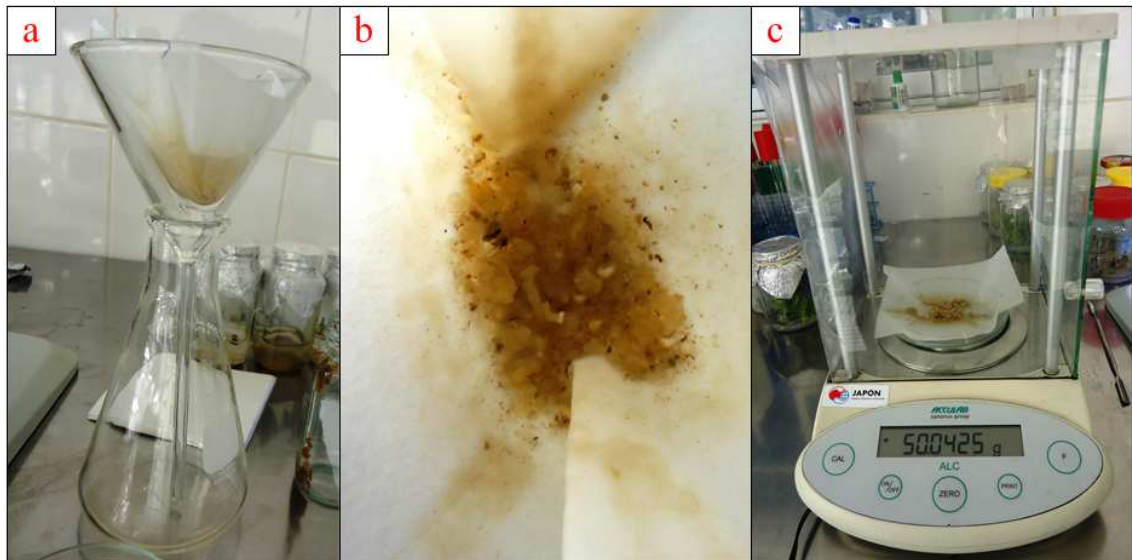
Las variables de respuesta evaluadas al término de esta fase fueron:

- **Número de embriones somáticos:** La evaluación de esta variable se la realizó con la ayuda de un estereoscopio (Olympus SZ) (figura 2.15).



**Figura 2.15:** Conteo del número de embriones somáticos con la ayuda del estereoscopio.

- **Peso de la masa celular:** masa embriogénica obtenida en el establecimiento de la suspensión celular. Esta variable fue determinada filtrando la masa de células en suspensión, y mediante una balanza analítica de precisión (*ACCULAB ALC*) se obtuvo dicha variable en gramos (g) (figura 2.16).



**Figura 2.16:** Filtrado de la suspensión de células (a y b); medición del peso de la suspensión filtrada (c).

## 2.5 Análisis de Datos

Para la comparación y análisis de los tratamientos en los tres diseños aplicados, en primer lugar se realizó un estudio exploratorio de datos, tanto en forma gráfica como numérica.

Seguidamente, en la fase II se aplicó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 3x3, mediante un análisis de varianza (ANOVA) por modelos mixtos con prueba de LSD de Fisher para agrupar a los tratamientos, en el caso de las variables peso y dimensión del callo.

En la fase III se aplicó un diseño experimental de bloques completos al azar, mediante un análisis de varianza (ANOVA), con prueba de Kruskal-Wallis para la variable número de embriones somáticos y con prueba de LSD de Fisher para la

variable dimensión del callo. Con el fin de analizar la correlación de ambas variables, se llevó a cabo un análisis de correlación, mediante el coeficiente de Pearson.

En la fase V se aplicó un diseño experimental completamente al azar, mediante un análisis de varianza (ANOVA), con prueba de Kruskal-Wallis para la variable número de embriones somáticos y con prueba de LSD de Fisher para la variable peso de la masa celular. Así mismo, se llevó a cabo un análisis de correlación entre estas dos variables, mediante el coeficiente de Pearson.

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) por modelos mixtos mediante prueba de LSD de Fisher, con el objetivo de comparar la variable número de embriones somáticos tanto en medio sólido (fase III) como en el medio líquido o suspensión celular (fase V).

Los análisis estadísticos se desarrollaron en los paquetes computacionales estadísticos InfoStat<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, además se utilizaron hojas de cálculo de Microsoft Excel del paquete de Office 2010.

A partir de los experimentos generados, se verificó los supuestos y se determinó los mejores tratamientos dependiendo de los resultados de los análisis estadísticos.

---

<sup>1</sup> Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

<sup>2</sup> R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

## CAPÍTULO 3 : RESULTADOS

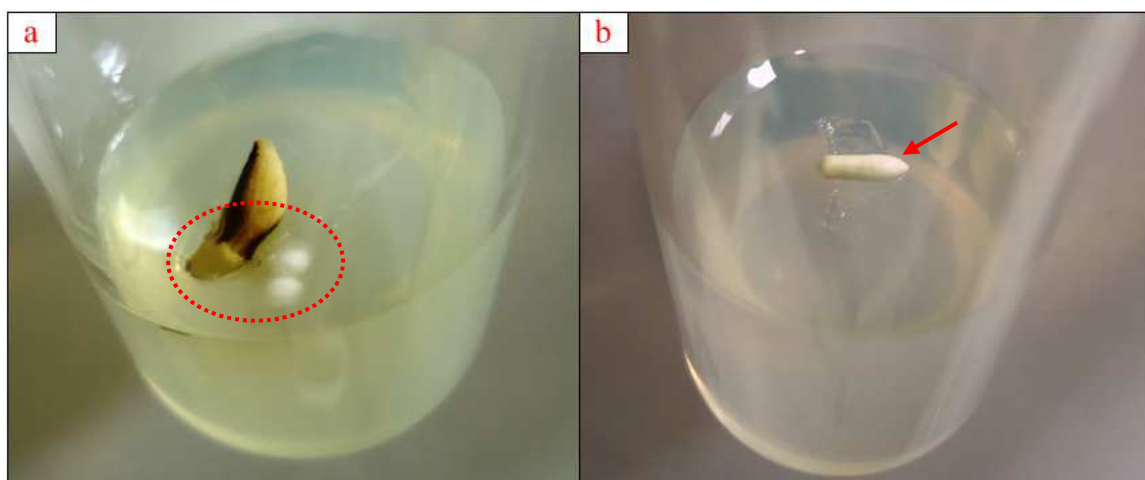
### 3.1 Fase I: Desinfección de los explantes

#### 3.1.1 Contaminación

El protocolo de desinfección llevado a cabo obtuvo al término de la fase un porcentaje de contaminación del 1.11 % (figura 3.1a), por tanto la sobrevivencia fue del 98.89 % (figura 3.1b); tal como se muestra en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1:** Frecuencia y porcentaje de la variable contaminación de la fase I.

		Contaminación														Subtotal
		Repeticiones														
Tratamiento	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>15</b>
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>15</b>
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>48</b>	<b>49</b>	<b>50</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>53</b>	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>56</b>	<b>57</b>	<b>58</b>	<b>59</b>	<b>60</b>	<b>15</b>
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>61</b>	<b>62</b>	<b>63</b>	<b>64</b>	<b>65</b>	<b>66</b>	<b>67</b>	<b>68</b>	<b>69</b>	<b>70</b>	<b>71</b>	<b>72</b>	<b>73</b>	<b>74</b>	<b>75</b>	<b>15</b>
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<b>76</b>	<b>77</b>	<b>78</b>	<b>79</b>	<b>80</b>	<b>81</b>	<b>82</b>	<b>83</b>	<b>84</b>	<b>85</b>	<b>86</b>	<b>87</b>	<b>88</b>	<b>89</b>	<b>90</b>	<b>15</b>	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
															<b>Total:</b>	<b>1 de 90</b>
															<b>Porcentaje:</b>	<b>1.11 %</b>



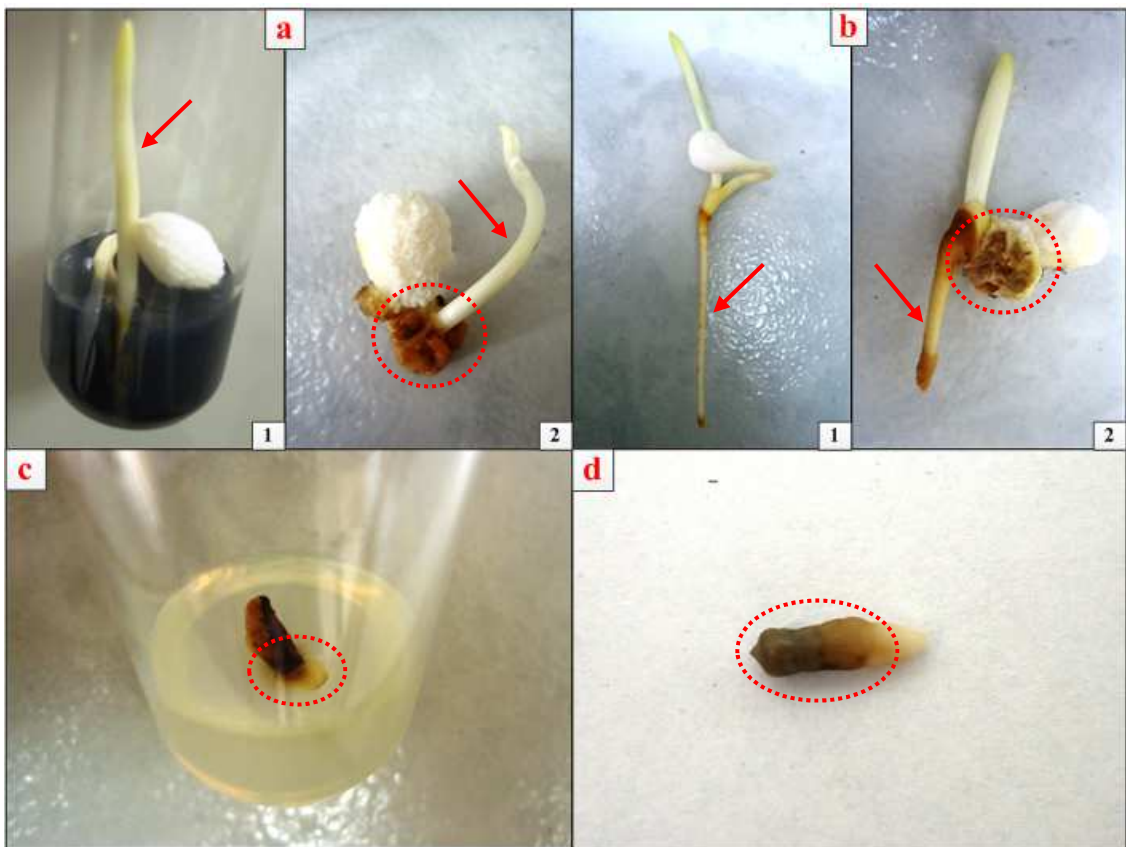
**Figura 3.1:** Explante contaminado (a), explante sano (b).

### 3.2 Fase II: Establecimiento e inducción de callos embriogénicos

Para esta fase se evaluaron 9 tratamientos con 10 repeticiones que consistían en diferentes concentraciones de 2,4-D ( $20 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $60 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y de  $\text{CA}^3$  ( $0 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$  y  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) combinadas, para determinar sus efectos en la formación de callo, friabilidad, coloración, morfología, peso y dimensión del callo formado.

#### 3.2.1 Viabilidad, formación de callo y friabilidad

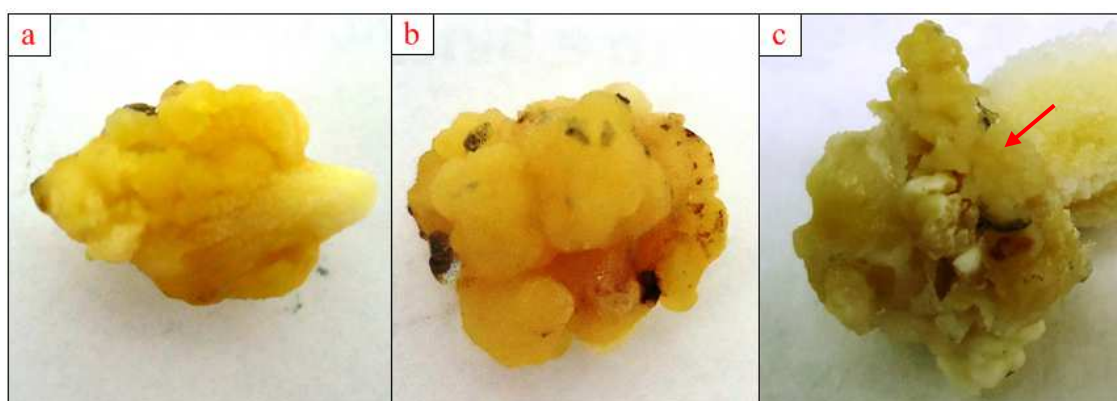
Al término de la fase, algunos tratamientos presentaron variables de respuesta como: formación de planta, formación de raíz, oxidación y necrosis; este grupo conformaba los explantes no viables para la formación de callo, mientras que los restantes fueron los viables. Tal como se indica en la figura 3.2.



**Figura 3.2:** Explantes no viables. Formación de planta (a), planta normal por germinación (a1), planta y callo (a2); formación de raíz (b), raíz de planta germinada (b1), raíz de planta con callo (b2); oxidación (c); necrosis (d).

<sup>3</sup> Carbón activado

De todos los tratamientos se determinó la formación de callo en los explantes viables, y si este a su vez era friable. Tal como se observa en la figura 3.3.



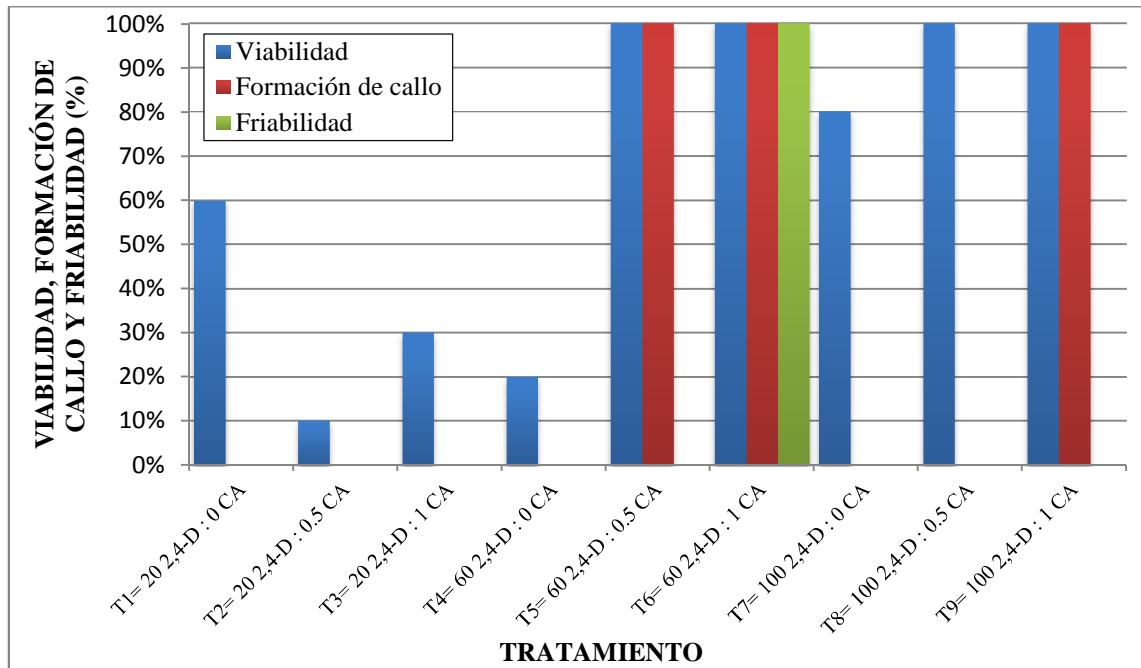
**Figura 3.3:** Formación de callo. Callo no friable de color amarillento (a y b), callo friable de color blanquecino amarillento (c).

En la tabla 3.2 se muestran todos los resultados antes mencionados:

**Tabla 3.2:** Frecuencias y porcentajes de las variables: viabilidad, formación de callo (F. callo) y friabilidad de los 9 tratamientos en la fase II.

	Variables	Repeticiones										Total	Porcentaje	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Tratamiento	1	Viabilidad	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	6	60 %
		F. callo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		Friabilidad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
	2	Viabilidad	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	10 %
		F. callo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		Friabilidad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
	3	Viabilidad	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	3	30 %
		F. callo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		Friabilidad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
	4	Viabilidad	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	20 %
		F. callo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		Friabilidad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
	5	Viabilidad	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %
		F. callo	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %
		Friabilidad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
	6	Viabilidad	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %
		F. callo	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %
		Friabilidad	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %
	7	Viabilidad	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	8	80 %
		F. callo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		Friabilidad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
	8	Viabilidad	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %
		F. callo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		Friabilidad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
	9	Viabilidad	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %
		F. callo	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %
		Friabilidad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %

En la figura 3.4, se observa gráficamente los valores porcentuales, además se puede apreciar que el T6 (60 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L<sup>-1</sup> CA) es el mejor tratamiento, puesto que en estas tres variables se tiene un porcentaje del 100 %. En cuanto al T5 (60 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 g.L<sup>-1</sup> CA) y T9 (100 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L<sup>-1</sup> CA), la viabilidad y la formación de callo es del 100 %, sin embargo ninguno de estos resultó friable. En cuanto al resto de tratamientos como se puede denotar ninguno de estos formaron callo.



**Figura 3.4:** Representación gráfica de los valores porcentuales de la viabilidad, formación de callo y friabilidad de los 9 tratamientos en la fase II.

### 3.2.2 Coloración

En cuanto a la variable coloración de los explantes, la escala arbitraria para su evaluación fue: **1:** Blanquecino, **2:** Blanquecino amarillento, **3:** Blanquecino marrón, **4:** Amarillento, **5:** Amarillento marrón, tal como se observa en la figura 3.5.



**Figura 3.5:** Escala de color. 1: Blanquecino (a), 2: Blanquecino amarillento (b), 3: Blanquecino marrón (c), 4: Amarillento (d), 5: Amarillento marrón (e).

En la tabla 3.3 se indican las frecuencias y porcentajes obtenidos en esta variable según la escala arbitraria establecida para los 9 tratamientos.

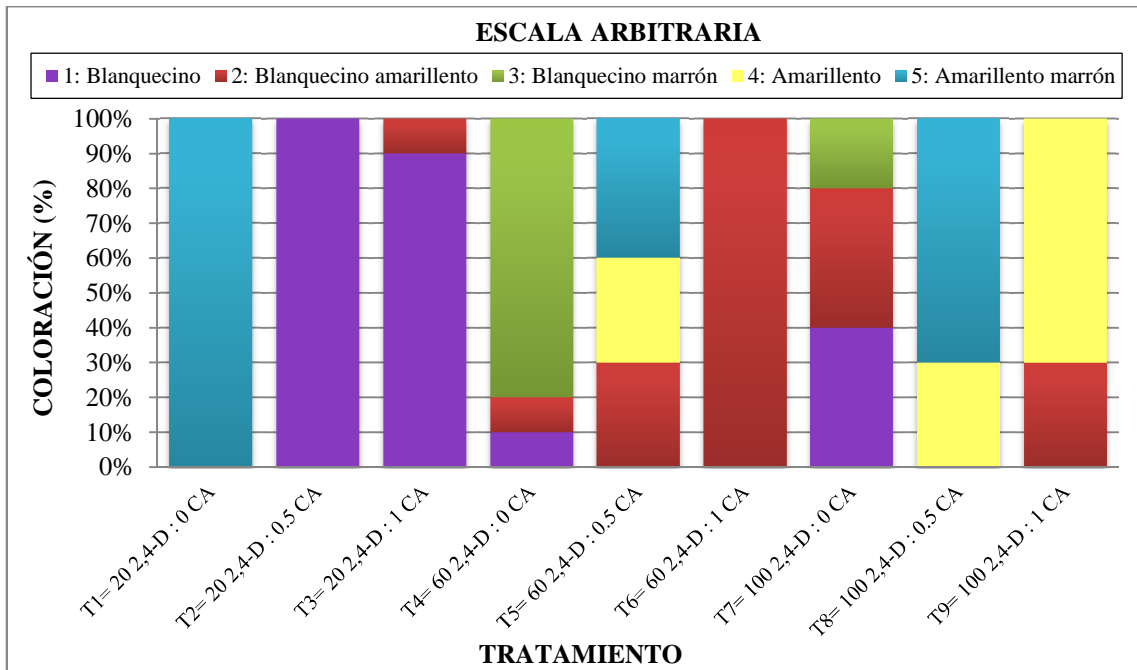
**Tabla 3.3:** Frecuencias y porcentajes de la variable coloración de los explantes, según la escala arbitraria establecida para los 9 tratamientos en la fase II.

	Coloración	Repeticiones										Total	Porcentaje	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Tratamiento	1	1 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		2 <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		3 <sup>c</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		4 <sup>d</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		5 <sup>e</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
	3	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	9	90 %
		2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	10 %
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	10 %
		2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	10 %
		3	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	8	80 %
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3	30 %	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	4	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	3	30 %	
	5	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	4	40 %	
6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
7	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	4	40 %	
	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	4	40 %	
	3	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	20 %	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	4	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	3	30 %	
	5	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	7	70 %	
9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	2	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	3	30 %	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	4	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	7	70 %	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	

<sup>a</sup> Blanquecino, <sup>b</sup> Blanquecino amarillento, <sup>c</sup> Blanquecino marrón, <sup>d</sup> Amarillento, <sup>e</sup> Amarillento marrón



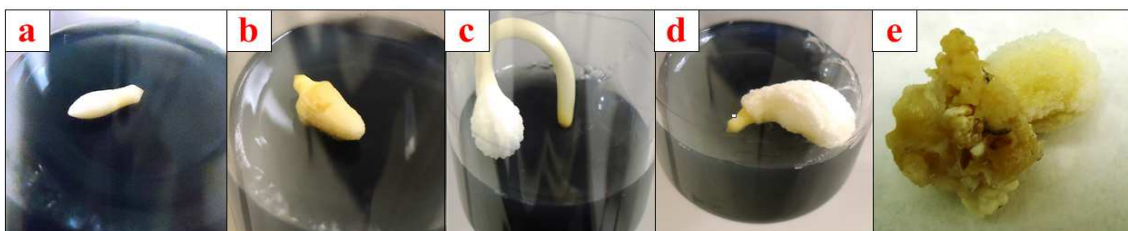
En la figura 3.6 se observa gráficamente los valores porcentuales, además se puede denotar que en los tratamientos que obtuvieron el 100 % en la formación de callo y en la viabilidad (T5, T6, T9) se tuvo una coloración: 2, 4 y 5. En el T6 que fue el mejor tratamiento según el análisis anterior, la coloración fue **2**: Blanquecino amarillento en el 100 % de los explantes, es decir, fue homogénea; lo cual muestra que esta categoría en la escala de color indica la formación de un callo friable.



**Figura 3.6:** Representación gráfica de la coloración de los explantes según la escala arbitraria establecida, de los 9 tratamientos en la fase II.

### 3.2.3 Morfología

En cuanto a la variable morfología de los explantes, la escala arbitraria establecida para su evaluación fue: **1**: Normal, **2**: Normal e hinchado, **3**: Curvo, **4**: Curvo e hinchado, **5**: Amorfo, tal como se puede observar en la figura 3.7.



**Figura 3.7:** Escala de morfología. 1: Normal (a), 2: Normal e hinchado (b), 3: Curvo (c), 4: Curvo e hinchado (d), 5: Amorfo (e).

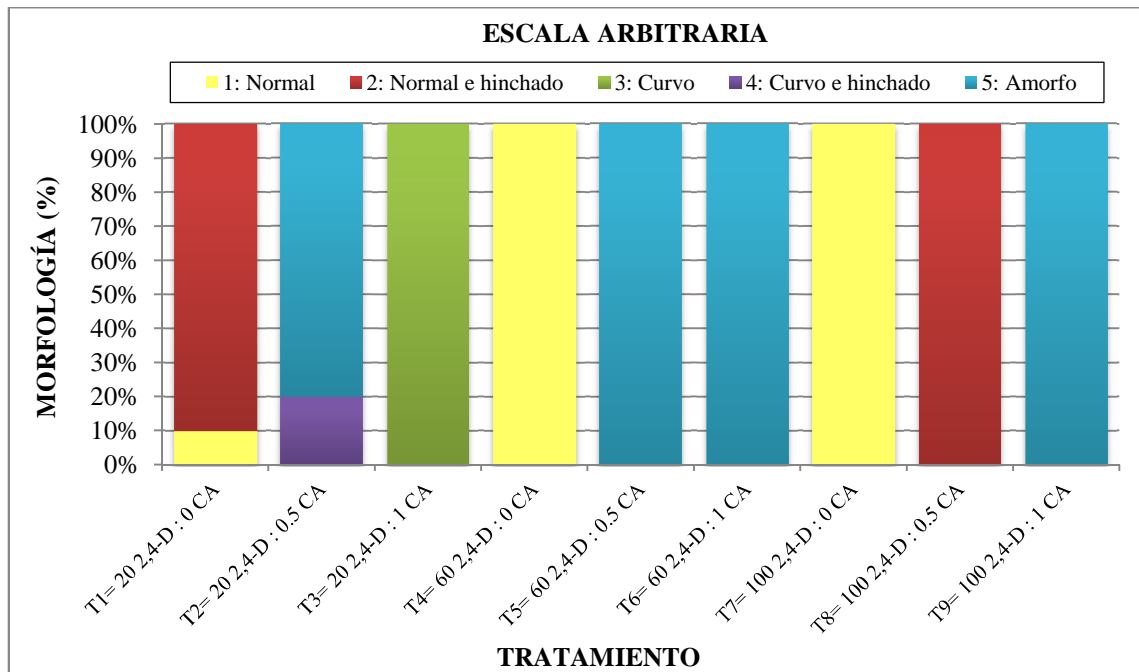
En la tabla 3.4 se indican las frecuencias y porcentajes obtenidos esta variable, según la escala arbitraria establecida para los 9 tratamientos de esta fase.

**Tabla 3.4:** Frecuencias y porcentajes de la variable morfología de los explantes, según la escala arbitraria establecida para los 9 tratamientos en la fase II.

	Morfología	Repeticiones										Total	Porcentaje	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Tratamiento	1	1 <sup>a</sup>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10 %
		2 <sup>b</sup>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	9	90 %
		3 <sup>c</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		4 <sup>d</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		5 <sup>e</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	20 %
		5	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	8	80 %
	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %
5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %	
6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %	
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 %	
	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	100 %	

<sup>a</sup> Normal, <sup>b</sup> Normal e hinchado, <sup>c</sup> Curvo, <sup>d</sup> Curvo e hinchado, <sup>e</sup> Amorfo

En la figura 3.8 se observa los valores porcentuales, además se puede apreciar que la categoría **5: Amorfo** indica la formación de callo, puesto que en los tratamientos (T5, T6, T9) que tuvieron 100 % en la formación de callo se obtuvo esta morfología. En cuanto al T2, el 80 % de sus explantes también presenta este tipo de morfología, sin embargo, se trata en su mayoría de formaciones de callo con planta, lo cual para esta investigación constituyen explantes no viables.



**Figura 3.8:** Representación gráfica de la morfología de los explantes según la escala arbitraria establecida, de los 9 tratamientos en la fase II.

### 3.2.4 Peso y dimensión del callo

Para las variables cuantitativas peso y dimensión del callo formado, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), por modelos mixtos mediante prueba de LSD de Fisher con  $\alpha = 0.05$ , para agrupar a los tratamientos, tomando como factores fijos: al factor 1 (2,4-D), al factor 2 (CA) y a su interacción (factor 1\*factor 2) y como factores aleatorios a la coloración, la morfología, la formación de callo y la friabilidad, con el fin de observar la correlación ( $R^2$ ) de ambas variables con cada uno de estos factores aleatorios.

Para esto, se tomó en cuenta estas variables únicamente en los tratamientos que formaron callo, esto es en los tratamientos 5 (60 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 g.L<sup>-1</sup> CA), 6 (60 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L<sup>-1</sup> CA) y 9 (100 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L<sup>-1</sup> CA), puesto que el peso y la dimensión del callo formado es el factor de interés de este estudio. En cuanto al resto de tratamientos, se asignó el valor de 0 para ambas variables con el fin de realizar el análisis estadístico.

En el caso del *peso del callo* se realizó el ajuste del modelo, tal como se puede observar en la tabla 3.5, para un total de 90 datos (N), 9 tratamientos con 10 repeticiones, los indicadores de la calidad del ajuste (AIC y BIC) fueron bastante bajos, lo cual indica que se trata de un buen ajuste; por otro lado, la correlación de todo el modelo (R<sup>2</sup> 0) fue de 0.92, al igual que la correlación de cada factor aleatorio (R<sup>2</sup> 1, R<sup>2</sup> 2, R<sup>2</sup> 3, R<sup>2</sup> 4), esto indica que si existe una correlación entre los factores aleatorios indicados y la variable en cuestión puesto que R<sup>2</sup> tiende a 1.

**Tabla 3.5:** Medidas de ajuste del modelo según la variable peso del callo de la fase II.

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R <sup>2</sup> 0	R <sup>2</sup> 1	R <sup>2</sup> 2	R <sup>2</sup> 3	R <sup>2</sup> 4
90	-195.78	-162.26	111.89	0.05	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92

En cuanto al análisis de varianza, mostrando las pruebas de hipótesis de tipo secuencial, tanto para el factor 1, el factor 2 como para su interacción (factor 1\*factor 2), se tiene que el valor p es <0.0001, el cual es menor al nivel de significancia  $\alpha=0.01$ , por tanto se rechaza la hipótesis de igualdad de medias de los niveles de cada factor y sus tratamientos, es decir, existen diferencias altamente significativas entre cada uno de estos en cuanto a la variable peso del callo. Esto se indica en la tabla 3.6.

**Tabla 3.6:** Análisis de varianza mostrando las pruebas de hipótesis secuenciales según la variable peso del callo de la fase II.

	numDF	F-valor	p-valor
(Intercept)	1	372.26	<0.0001**
Factor 1	2	132.70	<0.0001**
Factor 2	2	215.92	<0.0001**
Factor 1*Factor 2	4	64.22	<0.0001**

\*\* indica diferencias altamente significativas

Adicionalmente, como se puede observar en la tabla 3.7, según la comparación de medias obtenidas por LSD de Fisher para los 3 niveles del factor 1, en orden descendente se establecieron 3 grupos, es decir, todos los niveles presentaron diferencias altamente significativas entre ellos, es así que el nivel “60 2,4-D” posee la media más alta (0.22 g) y pertenece al grupo “a”, el siguiente nivel “100 2,4-D” corresponde al grupo “b” y por último el nivel “20 2,4-D” se encuentra en el grupo “c”.

**Tabla 3.7:** Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para el Factor 1 según la variable peso del callo de la fase II.

<b>Factor 1</b>	<b>Medias</b>	<b>E.E.</b>	<b>Grupos</b>		
60 2,4-D	<b>0.22</b>	0.01	a		
100 2,4-D	0.10	0.01		b	
20 2,4-D	5.8E-09	0.01			c

De la misma forma que en el caso anterior, se realizó la prueba de LSD de Fisher para el factor 2, se establecieron igualmente 3 grupos en orden descendente, es decir, sus 3 niveles presentaron diferencias altamente significativas entre ellos, de esta manera el nivel “1 CA” posee la media más alta (0.27 g) encontrándose en el grupo “a”, el nivel “0.5 CA” pertenece al grupo “b”, mientras que el nivel “0 CA” conforma el grupo “c”. Tal como se indica en la tabla 3.8.

**Tabla 3.8:** Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para el Factor 2 según la variable peso del callo de la fase II.

<b>Factor 2</b>	<b>Medias</b>	<b>E.E.</b>	<b>Grupos</b>		
1 CA	<b>0.27</b>	0.01	a		
0.5 CA	0.05	0.01		b	
0 CA	1.6E-08	0.01			c

Efectuando la misma prueba de LSD de Fisher, para los tratamientos desprendidos por la interacción del Factor 1\*Factor 2, en orden descendente se establecieron 4 grupos entre aquellos que no presentaron diferencias altamente significativas, de la siguiente manera, el T6 conforma el grupo “a” con la media más alta, el T9 constituye el grupo “b”, el T5 conforma el grupo “c”, mientras que los T7, T1, T3, T4, T2 y T8 están dentro del último grupo “d” y su media tiende a 0.

Por lo tanto, según lo descrito el T6 (60 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L<sup>-1</sup> CA) es el mejor tratamiento en cuanto a la variable peso ya que posee la media más alta (0.51 g). Como se puede observar en la tabla 3.9

**Tabla 3.9:** Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para cada tratamiento (Factor 1\*Factor 2) según la variable peso del callo de la fase II.

Tratamiento	Factor 1	Factor 2	Medias	E.E.	Grupos
T6	60 2,4-D	1 CA	<b>0.51</b>	0.02	a
T9	100 2,4-D	1 CA	0.31	0.02	b
T5	60 2,4-D	0.5 CA	0.16	0.02	c
T7	100 2,4-D	0 CA	2.9E-08	0.02	d
T1	20 2,4-D	0 CA	1.0E-08	0.02	d
T3	20 2,4-D	1 CA	7.4E-09	0.02	d
T4	60 2,4-D	0 CA	7.4E-09	0.02	d
T2	20 2,4-D	0.5 CA	0.00	0.02	d
T8	100 2,4-D	0.5 CA	-1.8E-08	0.02	d

En lo que se refiere a la *dimensión del callo*, de la misma forma que en la variable anterior, se realizó el ajuste del modelo tal como se puede observar en la tabla 3.10, para un total de 90 datos (N), los indicadores de la calidad del ajuste (AIC y BIC) fueron bastante bajos, lo cual indica que se trata de un buen ajuste; por otro lado, la correlación de todo el modelo ( $R^2 0$ ) fue de 0.99, al igual que la correlación de cada factor aleatorio ( $R^2 1$ ,  $R^2 2$ ,  $R^2 3$ ,  $R^2 4$ ), esto indica que si existe una correlación entre los factores aleatorios indicados y la variable en cuestión puesto que  $R^2$  tiende a 1.

**Tabla 3.10:** Medidas de ajuste del modelo según la variable dimensión del callo de la fase II.

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	$R^2 0$	$R^2 1$	$R^2 2$	$R^2 3$	$R^2 4$
90	-139.82	-106.29	83.91	0.07	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99

Con respecto al análisis de varianza, mostrando las pruebas de hipótesis de tipo secuencial, tanto para el factor 1, el factor 2 como para su interacción (factor 1\*factor 2), se tiene que el valor p es <0.0001, el cual es menor al nivel de significancia  $\alpha=0.01$ , por tanto se rechaza la hipótesis de igualdad de medias de los niveles de cada factor y sus tratamientos, es decir, existen diferencias altamente significativas entre cada uno de estos en cuanto a la variable dimensión del callo. Esto se muestra en la tabla 3.11.

**Tabla 3.11:** Análisis de varianza mostrando las pruebas de hipótesis secuenciales según la variable dimensión del callo de la fase II.

	numDF	F-valor	p-valor
(Intercept)	1	989.81	<0.0001**
Factor 1	2	412.60	<0.0001**
Factor 2	2	603.44	<0.0001**
Factor 1*Factor 2	4	287.11	<0.0001**

\*\* indica diferencias altamente significativas

Adicionalmente, como se indica en la tabla 3.12, según la comparación de medias obtenidas por LSD de Fisher para los 3 niveles del factor 2, en orden descendente se establecieron 3 grupos, es decir, todos los niveles presentaron diferencias altamente significativas entre ellos, de esta manera el nivel “60 2,4-D” posee la media más alta (0.96 cm) y conforma el grupo “a”, el nivel “100 2,4-D” corresponde al grupo “b” y por último el nivel “20 2,4-D” se encuentra en el grupo “c”.

**Tabla 3.12:** Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para el Factor 1 según la variable dimensión del callo de la fase II.

Factor 1	Medias	E.E.	Grupos
60 2,4-D	<b>0.96</b>	0.02	a
100 2,4-D	0.39	0.02	b
20 2,4-D	2.4E-03	0.02	c

De la misma manera que en el caso anterior, se realizó la prueba de LSD de Fisher para el factor 2, se establecieron igualmente 3 grupos en orden descendente, es decir, sus 3 niveles presentaron diferencias altamente significativas entre ellos, de esta manera el nivel “1 CA” posee la media más alta (0.99 cm) perteneciendo al grupo “a”, el nivel “0.5 CA” conforma el grupo “b”, mientras que el nivel “0 CA” constituye el grupo “c”. Tal como se señala en la tabla 3.13.

**Tabla 3.13:** Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para el Factor 2 según la variable dimensión del callo de la fase II.

Factor 2	Medias	E.E.	Grupos
1 CA	<b>0.99</b>	0.02	a
0.5 CA	0.36	0.02	b
0 CA	3.1E-03	0.02	c

Desarrollando la misma prueba de LSD de Fisher, para los tratamientos desprendidos por la interacción del factor 1\*factor 2, en orden descendente se establecieron 4 grupos entre aquellos que no presentaron diferencias altamente significativas, de la siguiente manera, el T6 conforma el grupo “a” con la media más alta, el T9 constituye el grupo “b”, el T5 conforma el grupo “c”, los T1, T7, T3, T4, T2 y T8 conforman el grupo “d” y su media tiende a 0.

Por consiguiente, según lo detallado el T6 (60 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L<sup>-1</sup> CA) es el mejor en cuanto a la variable dimensión ya que posee la media más alta (1.81 cm). Como se indica en la tabla 3.14.

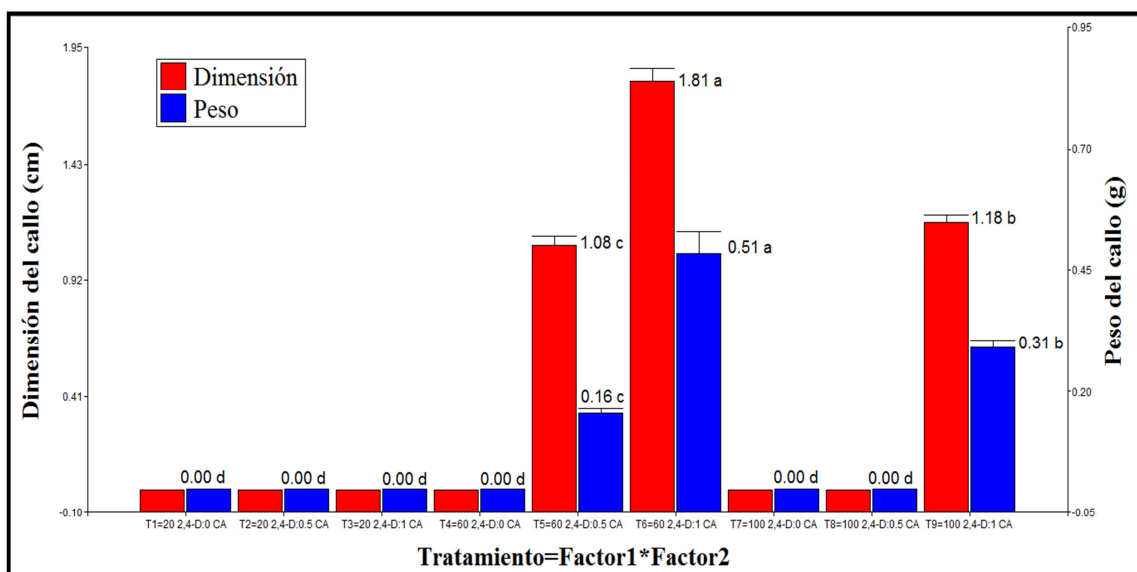
**Tabla 3.14:** Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para cada tratamiento (Factor 1\*Factor 2) según la variable dimensión del callo de la fase II.

Tratamiento	Factor 1	Factor 2	Medias	E.E.	Grupos		
T6	60 2,4-D	1 CA	<b>1.81</b>	0.04	a		
T9	100 2,4-D	1 CA	1.16	0.03		b	
T5	60 2,4-D	0.5 CA	1.08	0.03			c
T1	20 2,4-D	0 CA	4.8E-03	0.03			d
T7	100 2,4-D	0 CA	2.9E-03	0.03			d
T3	20 2,4-D	1 CA	1.7E-03	0.03			d
T4	60 2,4-D	0 CA	1.6E-03	0.03			d
T2	20 2,4-D	0.5 CA	7.6E-04	0.03			d
T8	100 2,4-D	0.5 CA	-4.9E-04	0.03			d

Finalmente, se realizó un gráfico de barras (figura 3.9) tanto para el peso como para la dimensión del callo formado, en el que se observa las medias de los tratamientos (Factor 1\*Factor 2), sus grupos y la dispersión de los datos, esta última fue baja en ambas variables para la mayoría de los tratamientos.

El T6 (60 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L<sup>-1</sup> CA) posee la media más alta en ambas variables (peso y dimensión del callo), 0.51 g y 1.81 cm respectivamente, confirmando lo mencionado anteriormente.



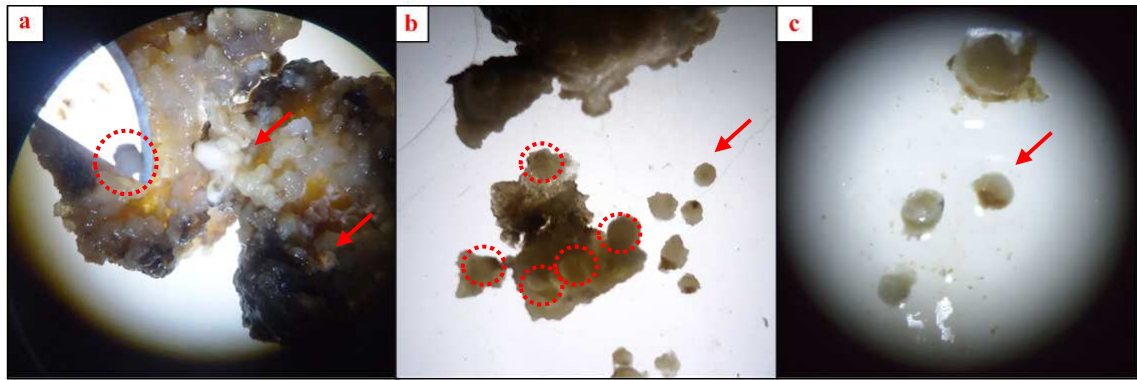


**Figura 3.9:** Representación gráfica de las variables peso y dimensión del callo de la fase II, según el tratamiento (Factor 1\*Factor 2).

### 3.3 Fase III: Inducción de embriones somáticos

Para esta fase se evaluaron 6 tratamientos con un tratamiento adicional como control negativo con 5 repeticiones cada uno que consistían en diferentes concentraciones ( $0 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) de BAP y Kin en forma separada, para determinar sus efectos en el número de embriones somáticos y la dimensión del callo.

Los embriones somáticos obtenidos al término de esta fase, es decir, después de 6 semanas de incubación en el medio sólido de inducción de embriones, se encontraban en estado globular y presentaban independencia del tejido materno, en todos los tratamientos que presentaron respuesta. Tal como se puede observar en la figura 3.10.



**Figura 3.10:** Embriones globulares vistos al estereoscopio. Separación de los embriones de su callo de origen 0.67X (a y b), embriones separados de su tejido materno 1X (c).

### 3.3.1 Número de embriones somáticos

Para la variable cuantitativa no continua, número de embriones somáticos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrica, mediante prueba de Kruskal-Wallis con  $\alpha=0.05$ , tomando como criterio de clasificación al bloque y al tratamiento.

Según este ajuste se tiene un valor  $p=0.0043$ , el cual es menor al nivel de significancia  $\alpha=0.01$ , por tanto se rechaza la hipótesis de igualdad de medias de los tratamientos, es decir, existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos considerando la variable número de embriones somáticos.

La media más alta (22.60) con un número aproximado de 23 embriones somáticos por callo la tiene el T1 (Control:  $0 \text{ mg. L}^{-1}$  BAP/Kin), que es el tratamiento control libre de regulador del tipo citoquinina, por tanto es el mejor. Esto indica que ninguno de los factores bloque a prueba (BAP y Kin) contribuye a la formación de embriones somáticos en medio sólido. Tal como se muestra en la tabla 3.15.

**Tabla 3.15:** Prueba de Kruskal-Wallis ( $\alpha= 0.05$ ) para la variable número de embriones somáticos de la fase III.

No.	Bloque	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
T1	Control	0	5	<b>22.60</b>	15.22	16.00	18.63	0.0043**
T2	BAP	1	5	9.40	2.61	9.00		
T3	BAP	2	5	13.00	10.61	10.00		
T4	BAP	3	5	10.80	6.72	12.00		
T5	Kin	1	5	4.20	6.22	3.00		
T6	Kin	2	5	2.20	2.77	1.00		
T7	Kin	3	5	1.00	2.24	0.00		

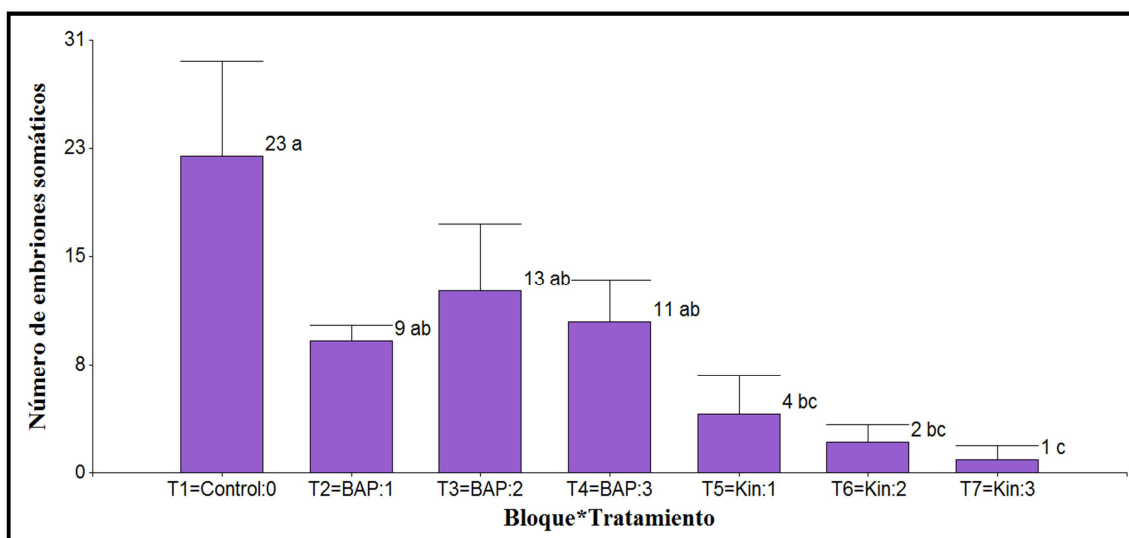
\*\* indica diferencias altamente significativas

Adicionalmente se realizaron comparaciones de a pares entre las medias de los rangos de tratamientos, con el fin de agrupar a aquellos que estadísticamente no presentan diferencias altamente significativas entre ellos, se tuvo así 3 grupos en orden descendente, de la siguiente manera, los T1, T3, T4 y T2 conforman el grupo “a” con las medias más altas; el grupo “b” está conformado por los T3, T4, T2, T5 y T6; mientras que el grupo “c” está constituido por los T5, T6 y T7, con las medias más bajas. Por tanto, el T1 (Control: 0 mg. L<sup>-1</sup> BAP/Kin) es el mejor tratamiento ya que posee la media más alta, aunque estadísticamente no presente diferencias altamente significativas con los T2, T4 y T3. Tal como se observa en la tabla 3.16.

**Tabla 3.16:** Comparaciones de a pares entre las medias de los rangos de tratamientos para la variable número de embriones somáticos de la fase III.

No.	Bloque*Tratamiento	Rangos	Grupos	
T1	Control : 0	<b>28.70</b>	a	
T3	BAP : 2	23.00	a	b
T4	BAP : 3	22.90	a	b
T2	BAP : 1	21.60	a	b
T5	Kin : 1	12.80		b c
T6	Kin : 2	10.40		b c
T7	Kin : 3	6.60		c

Realizando un gráfico de barras, se puede observar en la figura 3.11, las medias, sus grupos y la dispersión de los datos para todos los tratamientos, el T1 (Control: 0 mg.L<sup>-1</sup> BAP/Kin) es el mejor tratamiento, ya que posee la media más alta (23). En cuanto a las dispersiones de los datos, estas son altas en los T1, T3, T4 y T5.



**Figura 3.11:** Representación gráfica de la variable número de embriones somáticos de la fase III, según el bloque\*tratamiento.

### 3.3.2 Dimensión del callo

Para esta variable cuantitativa continua, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), mediante prueba de LSD de Fisher con  $\alpha= 0.05$ , tomando como variable de clasificación al bloque y al tratamiento.

Según este ajuste, tal como se puede observar en la tabla 3.17, para un total de 35 datos (N), 7 tratamientos con 5 repeticiones, se tiene una correlación de 0.25 ( $R^2$ ) entre la variable y los tratamientos, por tanto la dimensión del callo no depende mayormente del tratamiento que se le aplique.

Se obtuvo además un valor p superior al nivel de significancia  $\alpha= 0.05$ , en el caso de: el modelo en general ( $p= 0.1913$ ), el tratamiento ( $p= 0.2969$ ) y el bloque\*tratamiento ( $p= 0.6218$ ), por tanto en cuanto a esto se acepta la hipótesis de igualdad de medias de los tratamientos, es decir, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos considerando la variable dimensión del callo. Sin embargo, en el caso del bloque, el valor es  $p= 0.0406$ , el cual es menor al  $\alpha= 0.05$ , por consiguiente en este caso si existen diferencias significativas entre los bloques.

Con respecto al coeficiente de variación (CV) este es de 33.23, esto indica una variabilidad alta en la respuesta de la variable dimensión del callo.

**Tabla 3.17:** Análisis de varianza (ANOVA) para la variable dimensión del callo de la fase III.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Dimensión del callo	35	0.25	0.09	33.23

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5.05	6	0.84	1.58	0.1913
Tratamiento	2.07	3	0.69	1.29	0.2969
Bloque	2.47	1	2.47	4.61	0.0406*
Bloque*Tratamiento	0.52	2	0.26	0.48	0.6218
Error	14.97	28	0.53		
Total	20.02	34			

\* indica diferencias significativas

Adicionalmente, como se puede observar en la tabla 3.18, según la comparación de medias obtenidas por LSD de Fisher con  $\alpha= 0.05$  para los bloques, en orden descendente se establecieron 2 grupos, entre aquellos que estadísticamente no presentaban diferencias significativas entre sí; de esta manera, el grupo “a” está constituido por el control y el bloque BAP, mientras que el grupo “b” lo conforma el bloque Kin. Claramente se puede distinguir que el control posee la media más alta (2.76 cm), y que ninguno de los bloques evaluados contribuye al aumento de la dimensión de los callos.

**Tabla 3.18:** Prueba de LSD de Fisher con  $\alpha= 0.05$  y DMS= 0.64342 (Error: 0.5162, gl: 30) para los bloques según la variable dimensión del callo de la fase III.

Bloque	Medias	n	E.E.	Grupos
Control	2.76	5	0.33	a
BAP	2.39	15	0.19	a
Kin	1.82	15	0.19	b

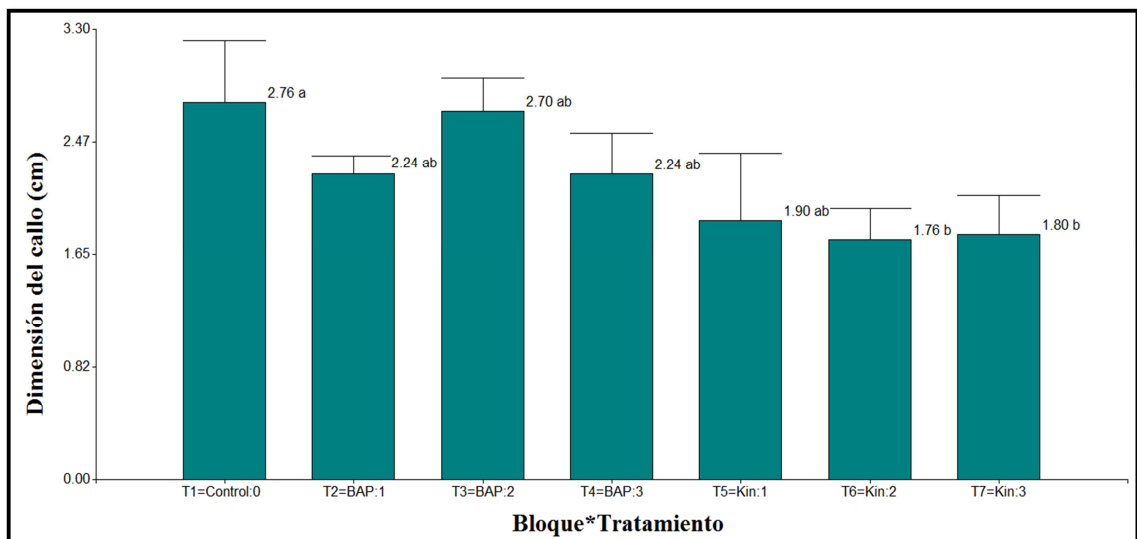
Complementario a esto, buscando la mínima diferencia significativa entre todos los tratamientos por una prueba de LSD de Fisher con  $\alpha= 0.05$ , se puede observar en la tabla 3.19, que según la comparación de medias obtenidas en orden descendente se establecieron 2 grupos, entre los tratamientos que estadísticamente no presentaban

diferencias significativas entre sí; de esta manera, el grupo “a” está conformado por los T1, T3, T4, T2 y T5 y el grupo “b” lo constituyen los tratamientos T3, T4, T2, T5, T7 y T6. Es así, que el T1 (Control: 0 mg. L<sup>-1</sup> BAP/Kin), tal como ya se mencionó posee la media más alta (2.76 cm), por tanto es el mejor tratamiento.

**Tabla 3.19:** Prueba de LSD de Fisher con  $\alpha= 0.05$  y DMS= 0.94722 (Error: 0.5346, gl: 28) para todos los tratamientos según la variable dimensión del callo de la fase III.

No.	Bloque	Tratamiento	Medias	n	E.E.	Grupos
T1	Control	0	2.76	5	0.33	a
T3	BAP	2	2.70	5	0.33	a b
T4	BAP	3	2.24	5	0.33	a b
T2	BAP	1	2.24	5	0.33	a b
T5	Kin	1	1.90	5	0.33	a b
T7	Kin	3	1.80	5	0.33	b
T6	Kin	2	1.76	5	0.33	b

Realizando un gráfico de barras, se puede observar en la figura 3.12 las medias, sus grupos y la dispersión de los datos en cada tratamiento, aquí se confirma que el control (0 mg. L<sup>-1</sup> BAP/Kin) es el mejor tratamiento, ya que posee la media más alta (2.76 cm). En cuanto a las dispersiones de los datos, estas son altas en los T1 y T5.



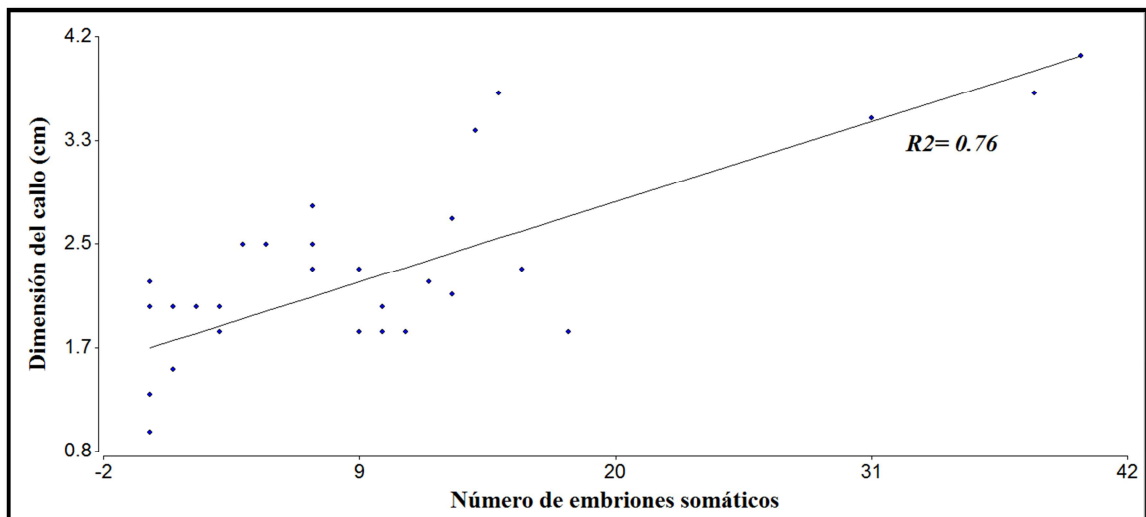
**Figura 3.12:** Representación gráfica de la variable dimensión del callo de la fase III, según el bloque\*tratamiento.

### 3.3.3 Correlación entre las variables número de embriones somáticos y dimensión del callo

Para determinar si existe correlación alguna entre ambas variables, es decir, si la una se encuentra en dependencia de la otra o viceversa, se efectuó un análisis de correlación mediante el coeficiente de Pearson (tabla 3.20). Según este análisis, el número de embriones somáticos no depende de la dimensión del callo, puesto que el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) es muy bajo ( $8.9E-08$ ), mientras que la dimensión del callo si depende del número de embriones somáticos en cierto grado, ya que el  $R^2$  es de 0.76; es decir, el 76 % de la dimensión del callo depende del número de embriones somáticos que se encuentren en este. De igual forma, esto se puede apreciar en la figura 3.13, mediante un gráfico de dispersión, donde la variable independiente (X) es el número de embriones somáticos y la variable dependiente (Y) es la dimensión del callo.

**Tabla 3.20:** Análisis de correlación de Pearson entre las variables número de embriones somáticos y dimensión del callo de la fase III.

Coeficiente de correlación $R^2$	Número de embriones somáticos	Dimensión del callo
Número de embriones somáticos	1.00	8.9E-08
Dimensión del callo	<b>0.76</b>	1.00



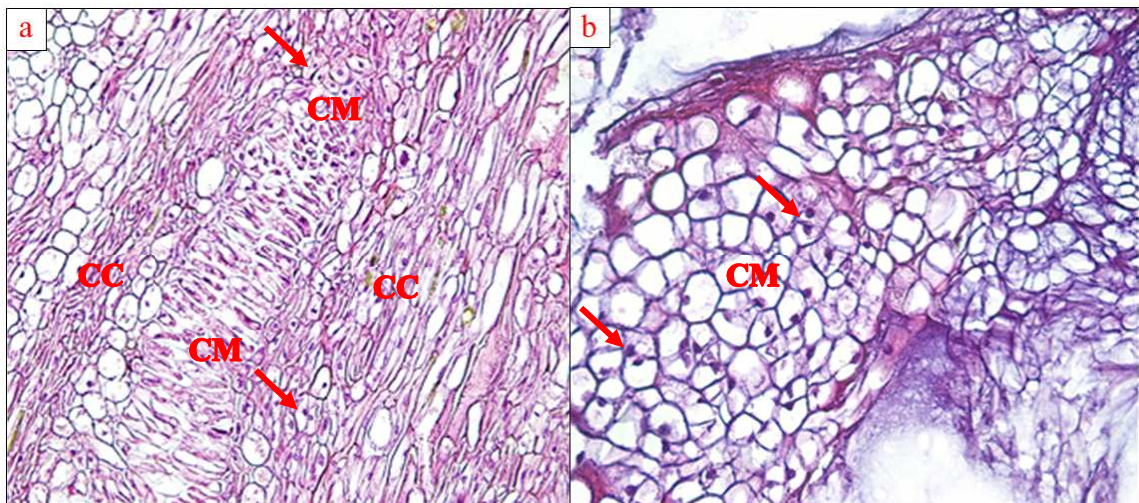
**Figura 3.13:** Representación gráfica de la correlación ( $R^2=0.76$ ) entre la dimensión del callo (Y) y el número de embriones somáticos (X) en la fase III.

### 3.4 Fase IV: Análisis histológico

Con el fin de verificar los aspectos morfológicos y la viabilidad de los callos y sus embriones somáticos obtenidos del mejor tratamiento de la fase III, se procedió con el análisis histológico.

Este análisis fue realizado después de esta fase, puesto que en las suspensiones celulares los callos se encontraban disgregados, lo cual dificultaba el procedimiento llevado a cabo, con la técnica empleada.

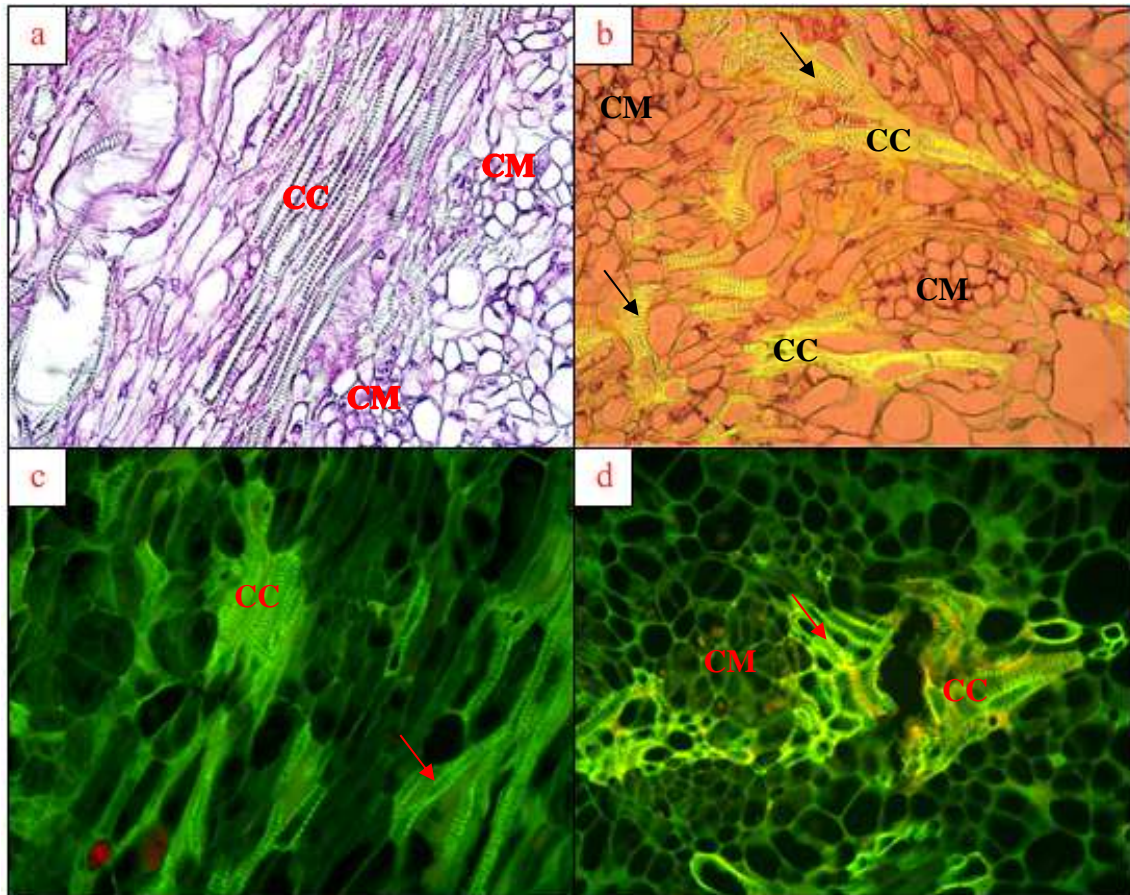
Inicialmente, se observó que los callos poseían una morfología granular con una composición heterogénea de células. El mayor componente fue el tejido meristemático, conformado por células isodiamétricas con el citoplasma denso y su núcleo claramente visible; este tejido se encontraba tanto en la parte interna como en la periferia de las porciones de callo, tal como se muestra en la figura 3.14, donde la actividad mitótica es clara; además se pudo denotar la presencia de células conductoras cercanas a las células meristemáticas o embriogénicas.



**Figura 3.14:** Tejido meristemático y células conductoras de las porciones de callo 10x (a), actividad mitótica en el callo embriogénico, células en división con núcleos claramente visibles 40x (b). CM= células meristemáticas, CC= células conductoras.

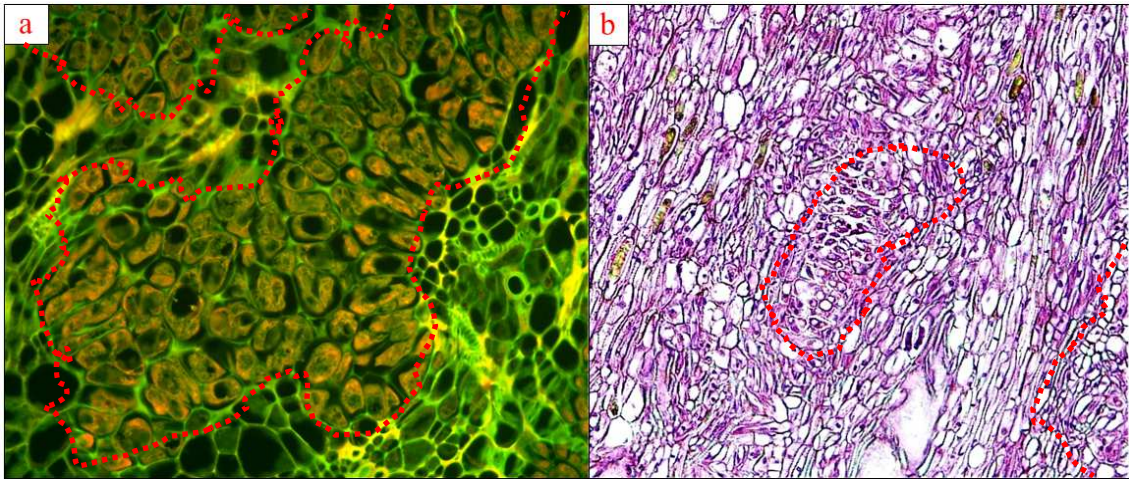


Estas células conductoras o elementos traqueales, que formarán parte del xilema de la planta se observaron en varios cortes histológicos de los callos; cercanas al tejido meristemático, tal como se indica en la figura 3.15.



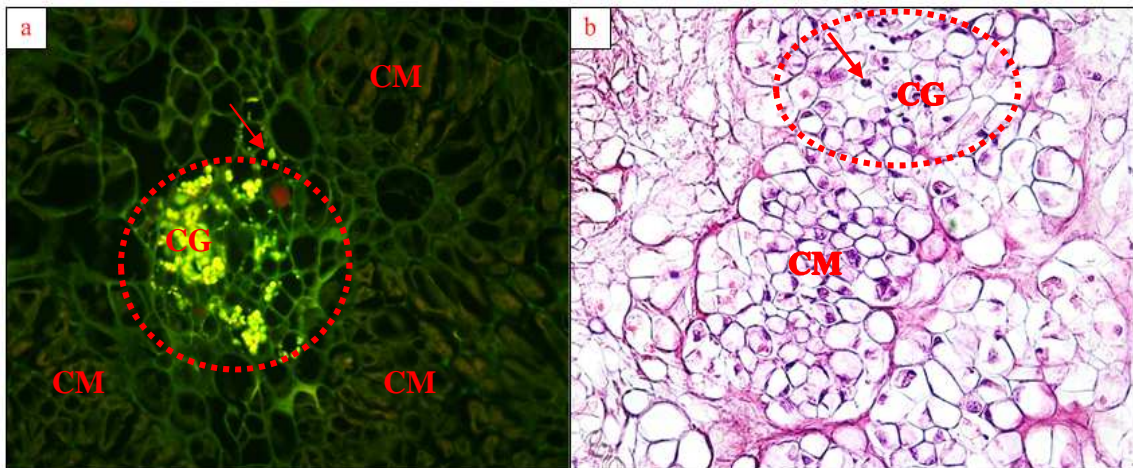
**Figura 3.15:** Células conductoras cercanas a las meristemáticas 40x (a y b), células conductoras en fluorescencia 40x (c), células conductoras próximas a las meristemáticas en fluorescencia 40x (d). CM= células meristemáticas, CC= células conductoras.

Por otro lado, se pudo apreciar que estas células meristemáticas en algunos cortes histológicos de los callos se encontraban formando zonas de mayor división celular o actividad mitótica, donde posiblemente se estaba dando lugar la formación de uno o varios embriones somáticos. Dichos cortes histológicos se observan en la figura 3.16.



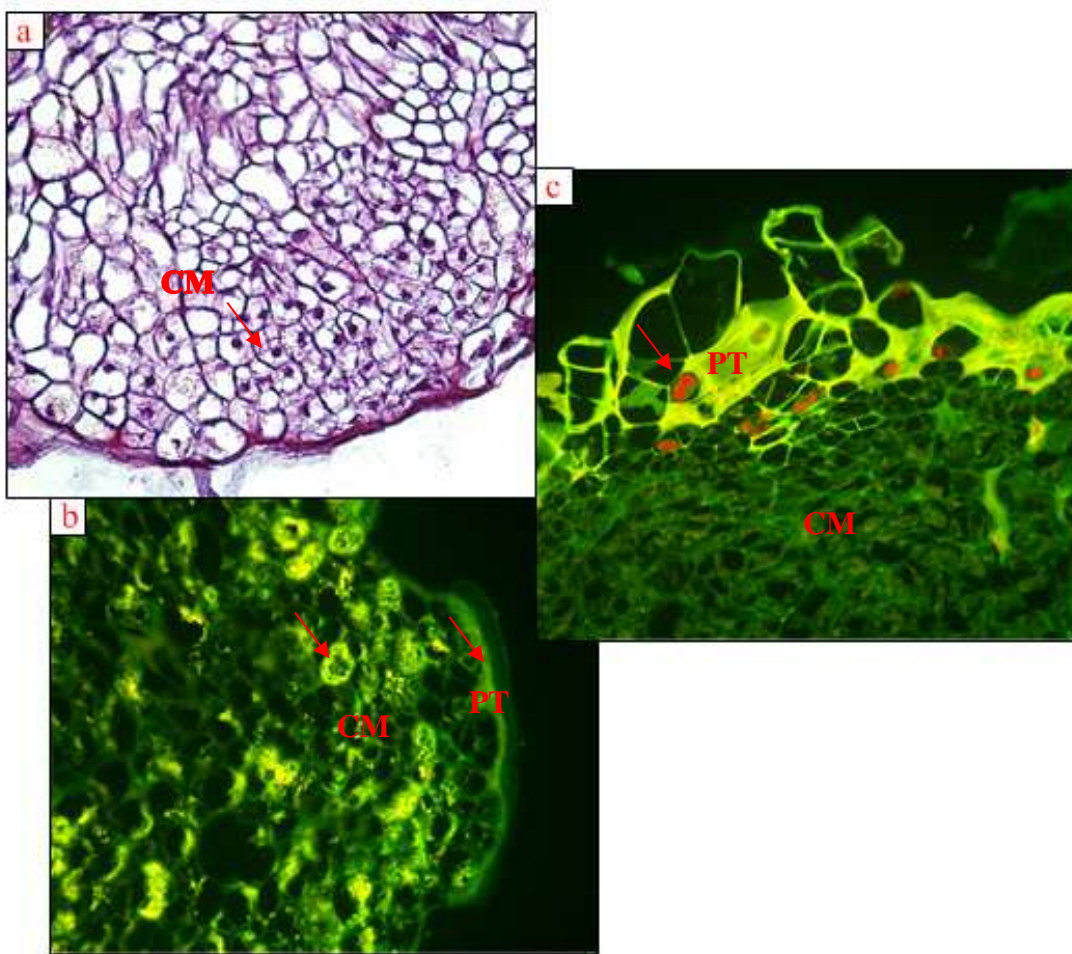
**Figura 3.16:** Corte histológico de un callo embriónico. Zonas de células en fluorescencia que se encuentran en constante división celular 40x (a), zonas de células en división celular 10x (b).

Adicionalmente, se observó células que contenían gránulos de almidón, las cuales se situaban cerca de las células meristemáticas que se encontraban en constante división celular; las células que contenían los gránulos, no presentaban características embriónicas, y estos gránulos se observaron claramente con fluorescencia. Tal como se puede ver en la figura 3.17.



**Figura 3.17:** Células con gránulos de almidón en fluorescencia, cercanas a células meristemáticas 40x (a), grupo de células no embriónicas que contienen gránulos de almidón próximas a células meristemáticas 40x (b). CM= células meristemáticas, CG= células con gránulos de almidón.

En cuanto a los embriones somáticos, se observó que estos contenían células meristemáticas organizadas y distribuidas en todo su entorno; además se pudo confirmar que el embrión se encontraba en su primer estadio (etapa globular), puesto que se observó tejidos como el protoderma del embrión, el cuál es la capa más externa de células en constante división, característica de la primera etapa de desarrollo de un embrión, la cual se convertiría posteriormente en la epidermis de la planta. Esta capa se notó más claramente en fluorescencia. Todas estas características se observan en la figura 3.18.

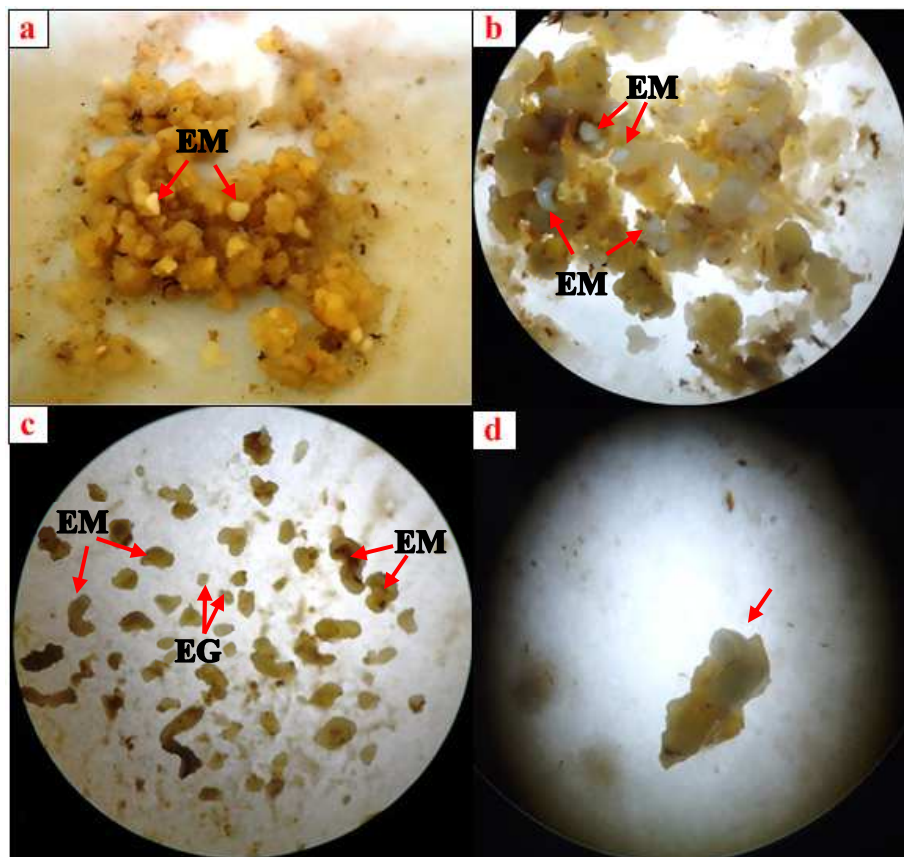


**Figura 3.18:** Corte histológico de un embrión en estado globular. Parte de un embrión con células meristemáticas organizadas claramente visibles 40x (a), embrión en fluorescencia con células meristemáticas y protoderma 40x (b), división celular en el protoderma, núcleos de color rojo y células meristemáticas adyacentes 100x (c). CM= células meristemáticas, PT= protoderma.

### 3.5 Fase V: Establecimiento de suspensiones celulares

Para esta última fase se evaluaron 4 tratamientos con 5 repeticiones cada uno, que consistían en diferentes concentraciones de BAP ( $0 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $0.3 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $0.4 \text{ mg.L}^{-1}$ ), para determinar sus efectos en el número de embriones somáticos y el peso de la masa celular.

Al término de esta fase, es decir, después de 6 semanas de incubación en medio líquido, los embriones somáticos obtenidos se encontraban en estado globular en la mayoría de los casos, sin embargo, en los tratamientos 3 y 4, y especialmente en este último los embriones somáticos se encontraban en estadios más maduros, tal como se puede observar en la figura 3.19.



**Figura 3.19:** Suspensión celular con embriones somáticos (a), suspensión celular con embriones somáticos vista al estereoscopio 0.67X (b), embriones somáticos globulares y maduros 0.67X (c), embrión somático maduro 1X (d). EM= Embriones somáticos maduros, EG= Embriones somáticos globulares.

### 3.5.1 Número de embriones somáticos

Para la variable cuantitativa no continua, número de embriones somáticos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrica, mediante prueba de Kruskal-Wallis con  $\alpha=0.05$ , tomando como criterio de clasificación al tratamiento.

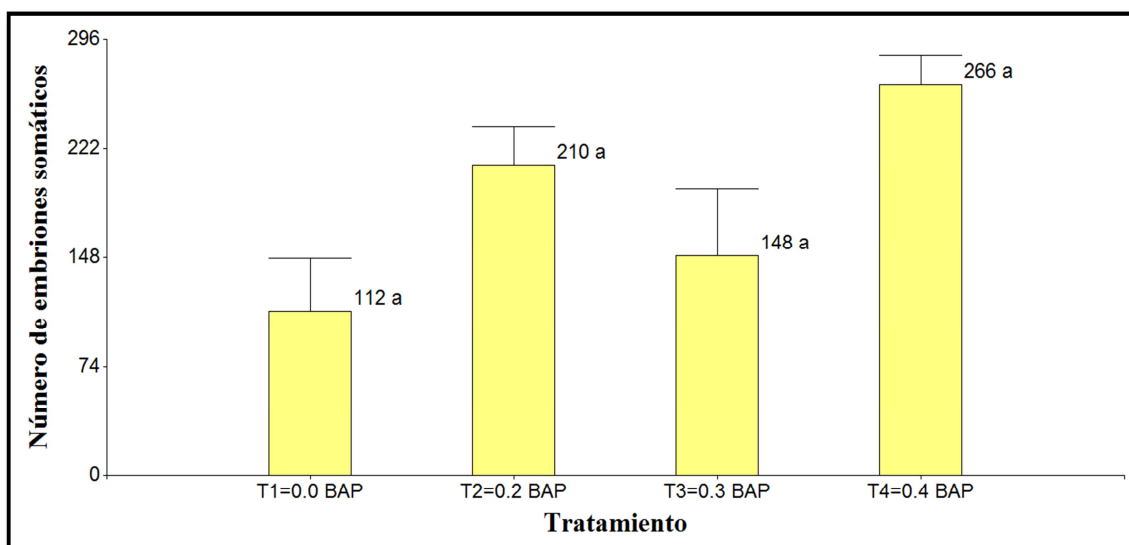
Según este ajuste se tiene un valor  $p=0.0518$ , el cual es mayor al nivel de significancia  $\alpha=0.05$ , por tanto se acepta la hipótesis de igualdad de medias de los tratamientos, es decir, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos considerando la variable número de embriones somáticos.

La media más alta (265.60) con un número aproximado de 266 embriones somáticos por suspensión la tiene el T4 (0.4 mg. L<sup>-1</sup> BAP), por tanto es el mejor tratamiento, aunque estadísticamente no presente diferencias significativas con el resto de tratamientos. Tal como se observa en la tabla 3.21.

**Tabla 3.21:** Prueba de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0.05$ ) para la variable número de embriones somáticos de la fase V.

No.	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
T1	0.0 BAP	5	111.60	79.28	58.00	7.71	0.0518
T2	0.2 BAP	5	210.40	58.01	208.00		
T3	0.3 BAP	5	148.40	102.41	104.00		
T4	0.4 BAP	5	<b>265.60</b>	43.51	284.00		

Mediante la elaboración de un gráfico de barras, en la figura 3.20 se puede observar las medias en un solo grupo y la dispersión de los datos para todos los tratamientos, de esta forma se tiene que el T4 (0.4 mg.L<sup>-1</sup> BAP) posee la media más alta (266), lo cual confirma que es el mejor tratamiento. En cuanto a las dispersiones de los datos, estas son altas en los T1 y T3.



**Figura 3.20:** Representación gráfica de la variable número de embriones somáticos de la fase V, según el tratamiento.

### 3.5.2 Peso de la masa celular

Para esta variable cuantitativa continua, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), mediante prueba de LSD de Fisher con  $\alpha = 0.05$ , tomando como variable de clasificación al tratamiento.

Según este ajuste, tal como se observa en la tabla 3.22, con un total de 20 datos (N), 4 tratamientos con 5 repeticiones, se tiene una correlación de 0.29 ( $R^2$ ) entre la variable y los tratamientos, por tanto el peso de la masa celular no depende mayormente del tratamiento que se le aplique.

Se obtuvo además un valor  $p = 0.1308$ , el cual es mayor al nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , por consiguiente se acepta la hipótesis de igualdad de medias de los tratamientos, es decir, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos considerando la variable peso de la masa celular.

Con respecto al coeficiente de variación (CV) este es de 18.01, esto indica una variabilidad media alta en la respuesta de la variable peso de la masa celular.

**Tabla 3.22:** Análisis de varianza (ANOVA) para la variable peso de la masa celular de la fase V.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso de la masa celular	20	0.29	0.16	18.01

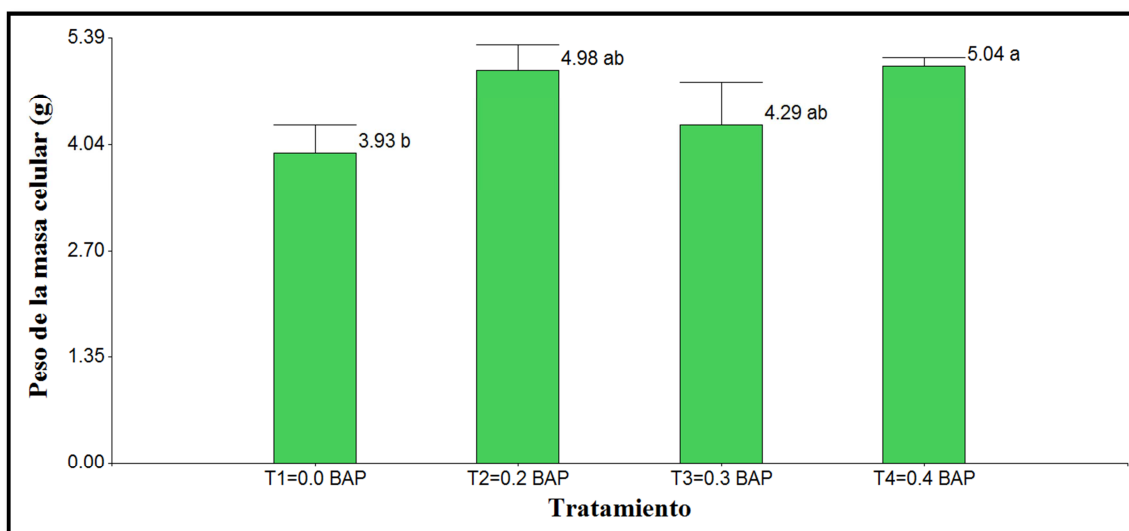
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4.40	3	1.47	2.17	0.1308
Tratamiento	4.40	3	1.47	2.17	0.1308
Error	10.80	16	0.67		
Total	15.20	19			

Sin embargo, buscando la mínima diferencia significativa mediante una prueba LSD de Fisher con  $\alpha = 0.05$ , se puede observar en la tabla 3.23, según la comparación de medias obtenidas en orden descendente se establecieron 2 grupos, con los tratamientos que estadísticamente no presentaban diferencias significativas entre sí; de esta manera, el grupo “a” está conformado por los T4, T2 y T3 y el grupo “b” lo constituyen los T2, T3 y T1. Sin embargo, el T4 (0.4 mg.L<sup>-1</sup> BAP) posee la media más alta (5.04 g), por tanto este último es el mejor tratamiento.

**Tabla 3.23:** Prueba de LSD de Fisher con  $\alpha = 0.05$  y DMS= 1,10145 (Error: 0.6749, gl: 16) para la variable peso de la masa celular de la fase V.

No.	Tratamiento	Medias	N	E.E.	Grupos
T4	0.4 BAP	<b>5.04</b>	5	0.37	a
T2	0.2 BAP	4.98	5	0.37	a b
T3	0.3 BAP	4.29	5	0.37	a b
T1	0.0 BAP	3.93	5	0.37	b

Mediante la realización de un gráfico de barras, se puede observar en la figura 3.21 las medias, sus grupos y la dispersión de los datos en cada tratamiento, de esta forma el T4 (0.4 mg.L<sup>-1</sup> BAP) es el más óptimo, ya que posee la media más alta (5.04 g). En cuanto a las dispersiones de los datos, estas son altas en los T1, T2 y T3.



**Figura 3.21:** Representación gráfica de la variable peso de la masa celular de la fase V, según el tratamiento.

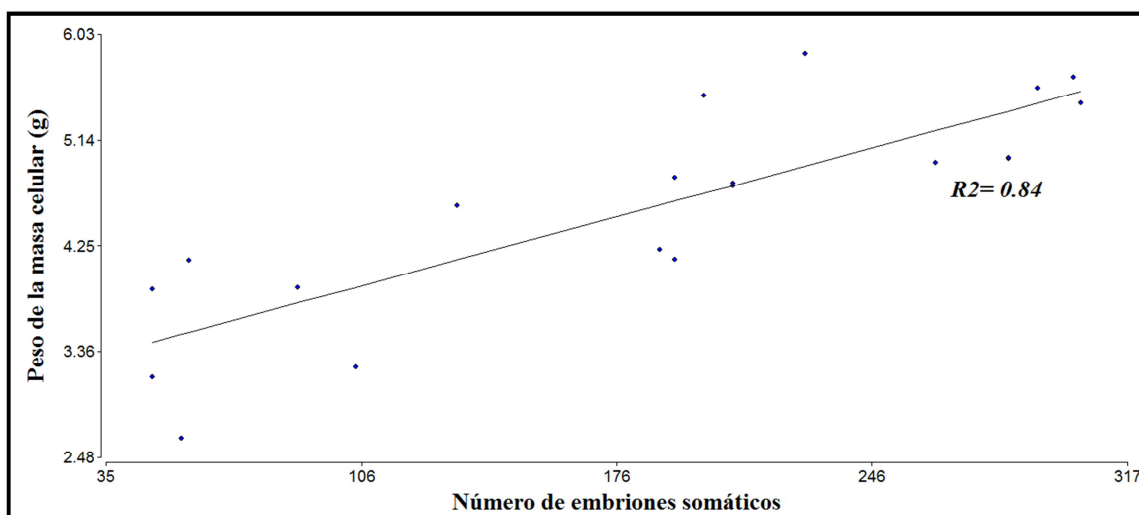
### 3.5.3 Correlación entre las variables número de embriones somáticos y peso de la masa celular

Para establecer si existe correlación alguna entre ambas variables, es decir, si la una se encuentra en dependencia de la otra o viceversa, se realizó un análisis de correlación mediante el coeficiente de Pearson (tabla 3.24). Este análisis muestra que el número de embriones somáticos no depende del peso de la masa celular ya que posee un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) muy bajo ( $3.7E-06$ ), mientras que el peso de la masa celular si depende del número de embriones somáticos, ya que el  $R^2$  se acerca a 1 (0.84); es decir, el 84 % del peso de la masa celular depende del número de embriones somáticos diferenciados. De igual manera, esto se puede observar en la figura 3.22, mediante un gráfico de dispersión, donde la variable independiente (X) es el número de embriones somáticos y la variable dependiente (Y) es el peso de la masa celular.

**Tabla 3.24:** Análisis de correlación de Pearson entre las variables número de embriones somáticos y peso de la masa celular de la fase V.

Coeficiente de correlación $R^2$	Número de embriones somáticos	Peso de la masa celular
Número de embriones somáticos	1.00	3.7E-06
Peso de la masa celular	<b>0.84</b>	1.00





**Figura 3.22:** Representación gráfica de la correlación ( $R^2=0.84$ ) entre el peso de la masa celular (Y) y el número de embriones somáticos (X) en la fase V.

### 3.6 Comparación de la variable número de embriones somáticos en medio sólido (fase III) y en suspensión celular (fase V)

Con el fin de comparar el número de embriones somáticos en medio sólido y en suspensión celular (medio líquido), se realizó un análisis de varianza (ANOVA), por modelos mixtos mediante prueba de LSD de Fisher con  $\alpha=0.05$ , tomando como factor fijo al medio (sólido y líquido).

El resultado de este ajuste se muestra en la tabla 3.25, donde el valor p obtenido es  $<0.0001$ , el cual es menor al nivel de significancia  $\alpha=0.01$ , por tanto se rechaza la hipótesis de igualdad de medias del factor fijo: medio (sólido y líquido), es decir, existen diferencias altamente significativas entre estos, en cuanto a la variable número de embriones somáticos.

**Tabla 3.25:** Análisis de varianza mostrando las pruebas de hipótesis secuenciales según la variable número de embriones somáticos para el factor medio.

	numDF	F-valor	p-valor
(Intercept)	1	95.62	$<0.0001^{**}$
Medio	1	128.33	$<0.0001^{**}$

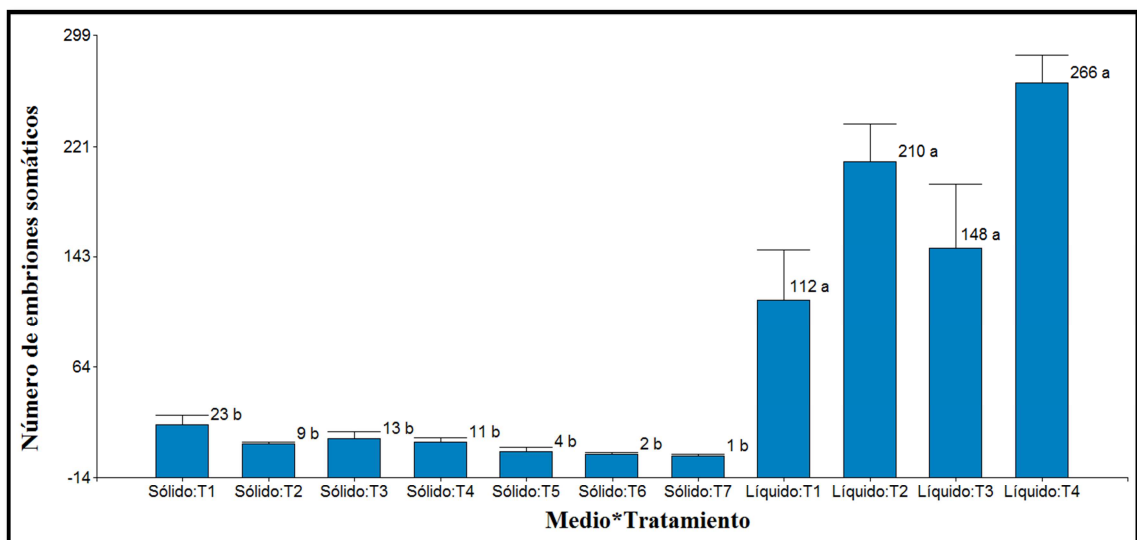
\*\* indica diferencias altamente significativas

De esta forma, tal como se puede observar en la tabla 3.26, mediante la prueba de LSD de Fisher con  $\alpha= 0.05$ , cada medio forma un grupo diferente, es así que la media (184) de la variable número de embriones somáticos de todos los tratamientos en medio líquido es claramente superior a la media de todos los tratamientos en medio sólido (9.03).

**Tabla 3.26:** Medias ajustadas y errores estándares por LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para cada medio según la variable número de embriones somáticos.

Medio	Medias	E.E.	Grupos
Líquido	<b>184.00</b>	12.32	a
Sólido	9.03	9.31	b

Adicionalmente, mediante un gráfico de barras se puede observar en la figura 3.23, las medias de todos los tratamientos tanto del medio sólido como del líquido; denotándose claramente que aquellos pertenecientes al medio líquido poseen una media superior a la de los tratamientos del sólido, por tanto el mejor tratamiento es el T4 (0.4 mg.L<sup>-1</sup> BAP) del medio líquido con un número aproximado 266 embriones somáticos por suspensión, confirmando lo expuesto anteriormente.



**Figura 3.23:** Representación gráfica de la variable número de embriones somáticos según el Medio\*Tratamiento.

### **3.7 Difusión del trabajo de investigación**

Respecto a la difusión de este trabajo de investigación se preparó un artículo científico para su publicación en la revista Biogénesis<sup>4</sup> (Ver Anexo Q).

---

<sup>4</sup> Revista de la Carrera de Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército

## CAPÍTULO 4 : DISCUSIÓN

En general, los resultados obtenidos en algunas variables de respuesta presentaron una alta variabilidad, ya que los coeficientes de variación (CV) arrojados en estos casos fueron de 18 a 33. Esto se debe a que existieron valores atípicos y los llamados “outliers”, que son aquellos que se encuentran numéricamente distantes del resto de datos. La alta variabilidad es común en el área de cultivo de tejidos (Ascanio *et al.*, 2003); esto es debido a dos factores muy importantes como son las características genotípicas de la planta y los efectos ambientales (Roca & Mroginski, 1993).

Normalmente, este coeficiente de variación es bajo en plantas con estudios frecuentes como son el maíz, el trigo y la caña de azúcar, el valor no sobrepasa de 20. No obstante, en otro tipo de plantas como son los árboles frutales y los leñosos el CV puede ser mayor de 50 (Ruiz, 2009).

Hablando de palmas específicamente, se ha reportado coeficientes de variación altos (38), como en el caso de la palma aceitera, Velázquez & Gómez (2010) indican que en el cultivo de este tipo de plantas suele ser normal que algunas de las variables evaluadas tiendan a presentar CV elevados.

Sin embargo, la presencia de una alta variabilidad puede ser de gran importancia, ya que los ensayos llevados a cabo pueden servir como base para futuros estudios genéticos, lo cual se traduce en la selección de individuos superiores (Roca & Mroginski, 1993).

### **4.1 Fase I: Desinfección de los explantes**

El protocolo de desinfección utilizado, fue básico y sin un excesivo gasto de recursos, ya que únicamente se empleó el hipoclorito de sodio (NaClO) como reactivo y único agente desinfectante. Este procedimiento logró un alto porcentaje de sobrevivencia, por lo que no fue necesario el planteamiento de un diseño experimental para esta primera fase.

La contaminación existente pudo deberse no únicamente al proceso de desinfección de los explantes llevado a cabo, sino a la manipulación de los mismos dentro de la cámara de flujo laminar en el momento de la siembra. Dicho error, es de tipo experimental el cuál puede ser fácilmente corregido, optimizando la técnica de siembra y de manejo de los explantes, para así lograr porcentajes nulos de contaminación en trabajos futuros (Pérez, 1998).

Comparando este protocolo con aquellos realizados en trabajos similares, en los cuales utilizan de igual forma el mismo tipo de explante (endospermos conteniendo embriones cigóticos) en otras especies de palmas, este resulta ser más simple y eficiente. A pesar de que en dichos trabajos los resultados obtenidos son también muy buenos, con porcentajes casi nulos de contaminación, estos emplean además del hipoclorito de sodio, otros compuestos. Varios autores utilizan en los protocolos de desinfección de sus investigaciones además del NaClO una solución de etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) al 70 %, reactivo que resulta ser muy costoso a gran escala (Da Silva *et al.*, 2002; Steinmacher *et al.*, 2007; Alencar *et al.*, 2010; Scherwinski *et al.*, 2012). Por otro lado, en estudios similares emplean reactivos muy tóxicos, además de ser contaminantes ambientales como es el caso del cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ), solo o en combinación con el NaClO (Rajesh *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2008).

#### **4.2 Fase II: Establecimiento e inducción de callos embriogénicos**

Después de 18 semanas de cultivo se presentaron varias respuestas morfogénicas en los 9 tratamientos ensayados; en aquellos que contenían bajas concentraciones de 2,4-D, la respuesta más común fue la germinación del embrión cigótico inmaduro y en algunos casos hasta la formación de raíces. Estos resultados coinciden con los reportados por Da Silva *et al.* (2002) en su estudio sobre embriones cigóticos de la palma de asaí (*Euterpe oleracea* Mart.), en el cuál a bajas concentraciones de 2,4-D se observó la progresión de la germinación y el desarrollo de plántulas normales y vigorosas.

De la misma forma, Scherwinski *et al.* (2012), en su estudio sobre la misma especie de palma *Euterpe oleracea* también reportan que a bajas concentraciones de

auxinas o sin la presencia de estas el resultado más observado fue la germinación de los embriones cigóticos inmaduros.

Es así que, la concentración de auxina, en este caso de 2,4-D resulta importante para la inducción del proceso de embriogénesis somática. Esto es corroborado por Viñas & Jiménez (2011), quienes afirman que todas las células somáticas dentro de una planta contienen la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional. Por tanto, la inducción de la embriogénesis somática consiste en una reprogramación del patrón de expresión de los genes presentes en la célula somática; por lo que las auxinas juegan un papel muy importante en la transducción de señales para desencadenar un patrón de expresión génica determinado; y de todas las auxinas, el 2,4-D es el que promueve la hipermetilación del ADN con mayor facilidad.

En cuanto al carbón activado, en los tratamientos que no contenían este cofactor, los explantes no presentaron respuesta y en otros casos estos se oxidaron y necrosaron. Esto da un claro indicio de que la combinación del carbón activado con el 2,4-D, contribuye en gran medida al proceso de inducción de la callogénesis. Esto fue verificado también por Scherwinski *et al.* (2012), en su estudio indican que la auxina combinada con el carbón activado mejora significativamente el proceso de inducción de callos embriogénicos.

Igualmente, Perera *et al.* (2007) en su investigación sobre la palma de coco (*Cocos nucifera* L.), utilizando como potenciales explantes ovarios no fecundados aislados de inflorescencias inmaduras femeninas de esta palma, encontraron que la concentración de 2,4-D y de carbón activado son variables críticas para el proceso de callogénesis. Ellos atribuyen que para lograr una exitosa producción de callo en explantes de coco, es de suma importancia definir la combinación más adecuada de 2,4-D y de carbón activado, dos de los componentes más esenciales en un medio de inducción de callo. Así mismo, indican que los efectos beneficiosos del carbón activado se atribuyen a su adsorción de fenoles y otras sustancias inhibidoras de crecimiento. Sin embargo, también adsorbe el 2,4-D presente en el medio de cultivo, lo que lleva a concentraciones no definidas de este regulador en el mismo.

Por otro lado, de los 9 tratamientos llevados a cabo, apenas 3 de estos formaron callos (Ver Anexo K), con las más altas concentraciones de 2,4-D y en presencia de CA, sin embargo, 2 de estos (T5: 60 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.5 g.L<sup>-1</sup> CA y T9: 100 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L<sup>-1</sup> CA) presentaron la formación de un callo no embriogénico, no friable de color amarillento; el cual se formó en toda la superficie del explante. De esta forma, solo 1 tratamiento (T6: 60 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L<sup>-1</sup> CA), dio como resultado la formación de un callo friable embriogénico de color blanquecino amarillento, su primera respuesta fue una ligera hinchazón, la cual fue aumentando, hasta darse el crecimiento del callo en toda la parte basal del embrión; siendo este crecimiento proporcionalmente mayor, que el presentado por los callos no embriogénicos (Ver Anexo L). Estos resultados confirman lo mencionado anteriormente, es decir, la interacción del 2,4-D con el carbón activado juega un papel muy importante en la respuesta al proceso de calogénesis y por tanto en la inducción de la embriogénesis somática.

Resultados semejantes en cuanto a la coloración y al crecimiento del callo embriogénico, Rajesh *et al.* (2003) reportan en su trabajo sobre la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) utilizando como explantes los embriones cigóticos; ellos obtienen dos tipos de callos claramente distintivos empleando 25 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D y otros aditivos, pero sin la presencia de CA; el primero un callo embriogénico que era friable, blanquecino amarillento, de rápido crecimiento y el segundo un callo no embriogénico, translúcido y viscoso; después de 7 semanas de cultivo.

Adicionalmente, Steinmacher *et al.* (2007) y Scherwinski *et al.* (2012) en sus trabajos sobre embriogénesis somática en embriones cigóticos de las especies: chontaduro (*Bactris gasipaes* Kunth) y palma de asaí (*Euterpe oleracea*) respectivamente, indican que obtuvieron callos embriogénicos de color blanquecino amarillento y de aspecto globular a las 20 semanas de cultivo en ambos casos, pero con la utilización de otro tipo de auxina: picloram más 1.5 g.L<sup>-1</sup> CA.

En este estudio se logró un porcentaje de formación de callos friables embriogénicos del 100 % en el mejor tratamiento (T6: 60 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 g.L<sup>-1</sup> CA) después de 18 semanas de cultivo. Contrariamente a lo obtenido por Scherwinski *et al.*

(2012), donde ellos afirman que en el medio de cultivo con 2,4-D, los embriones cigóticos cultivados solo formaron callos no embriogénicos incluso en los tratamientos con las más altas concentraciones de este regulador.

Resultados similares a los de esta investigación, reportan Fernando & Gamage (2000), en su estudio empleando embriones cigóticos inmaduros de la especie *Cocos nucifera* L., ellos logran la obtención de callos embriogénicos en más del 70 % de los explantes cultivados, utilizando  $5.3 \text{ mg.L}^{-1}$  2,4-D +  $2.5 \text{ g.L}^{-1}$  CA, después de 12 semanas aproximadamente de cultivo. Estos son buenos resultados, sin embargo, en este estudio se logra un porcentaje mayor de formación de callos embriogénicos, que es del 100 %.

De la misma forma, existen otros trabajos sobre embriogénesis somática que obtienen resultados semejantes a los de este estudio, pero en estos utilizan otros tipos de explantes. Al-Khayri & Al-Bahrany (2001) en su investigación sobre la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) emplean como explantes los ápices, logrando la obtención de callo embriogénico a las 12 semanas de cultivo en un medio que contenía  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  2,4-D +  $1.5 \text{ g.L}^{-1}$  CA.

Por otro lado, Othmani *et al.* (2009) en su estudio sobre la misma especie *Phoenix dactylifera* L., pero con la utilización de hojas jóvenes, logran la obtención de callo embriogénico después de 28 semanas de cultivo en un medio que contenía  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  2,4-D +  $0.3 \text{ g.L}^{-1}$  CA.

Según todo lo señalado, estos resultados nos muestran que la inducción de la embriogénesis somática, depende de muchos factores, tal como lo menciona Alencar *et al.* (2010) en su estudio sobre embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros de la especie *Bactris gasipaes* Kunth, estos autores establecen que la inducción de la ruta embriogénica es influenciada y determinada por el tipo de explante, el genotipo de la planta, los reguladores de crecimiento, el medio de cultivo y las condiciones del mismo; por tanto, el éxito en la iniciación y el establecimiento de cultivos embriogénicos depende básicamente de la etapa fisiológica en la que se



encuentren los explantes y su interacción con el tipo y las concentraciones de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo. En el caso de este estudio la utilización de embriones cigóticos en estado inmaduro y el empleo de 2,4-D y CA, llevaron a buenos resultados en la etapa de establecimiento e inducción de callos embriogénicos.

### **4.3 Fase III: Inducción de embriones somáticos**

Después de 6 semanas de cultivo, de los 7 tratamientos ensayados con diferentes concentraciones de BAP y Kin, y una fija de ANA ( $0.01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para la inducción de embriones somáticos en medio de cultivo sólido, con los callos embriogénicos del mejor tratamiento (T6:  $60 \text{ mg.L}^{-1}$  2,4-D +  $1 \text{ g.L}^{-1}$  CA) de la fase anterior; se dio la formación de embriones somáticos en estado globular, estos eran redondos, blanquecinos, y no presentaban conexión con el tejido materno (Ver Anexo M). Esto ocurrió en todos los tratamientos pero con diferencias significativas entre estos.

Sin embargo, además de la obtención de embriones somáticos en algunos tratamientos se formaron raíces adventicias en el callo (Ver Anexo N), las cuáles fueron eliminadas en los subcultivos, para que no absorbieran los nutrientes del medio de cultivo. Estos resultados coinciden con los reportados por Ferreira *et al.* (2008), en su estudio sobre el coyol (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius), utilizando como explantes embriones cigóticos; ellos afirman que además de la formación de embriones somáticos las células embriogénicas también pueden dar lugar a la formación de raíces adventicias, y esto se puede dar básicamente por un desbalance hormonal, específicamente de la dosis de auxina en el medio de cultivo.

Por otro lado, en los tratamientos que contenían Kinetina se obtuvo el promedio más bajo de embriones somáticos por callo, lo cual nos indica que este tipo de citoquinina no contribuye a la formación de embriones somáticos en la palma coco cumbé. Contrariamente a lo obtenido por Al' Utbi & AL- Husaibi (2008), en su estudio sobre ápices de la especie *Phoenix dactylifera* L., con  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  Kin +  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA y

demás aditivos en el medio de cultivo, logran obtener embriones somáticos en la mayoría de los callos embriogénicos.

En cuanto a los tratamientos con BAP, estos obtuvieron un número más alto de embriones somáticos por callo, comparado con los tratamientos de Kin, sin embargo ninguno de estos fue el mejor tratamiento de este ensayo. De las tres concentraciones evaluadas con este regulador la mejor fue  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP, con un promedio de 13 embriones somáticos por callo.

En trabajos similares obtienen mayor número de embriones somáticos por callo utilizando altas concentraciones de BAP. Montero *et al.* (2011), en su estudio sobre cocotero (*Cocos nucifera* L.) empleando plúmulas de embriones cigóticos como explantes, con la adición de  $67.58 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP, logran un promedio de 27 embriones somáticos por callo a los 150 días de cultivo.

Por otro lado, el tratamiento control libre de regulador del tipo citoquinina (BAP/Kin), únicamente conteniendo la auxina ANA ( $0.01 \text{ mg.L}^{-1}$ ), logra el promedio más alto de embriones somáticos por callo, este es de 23 embriones aproximadamente, además que alcanza la mayor dimensión (2.76 cm) de los callos. Es así que se comprueba mediante una correlación que la dimensión si depende del número de embriones, por tanto, a más número de embriones mayor dimensión del callo. Por ende, se puede señalar que ninguna de las citoquininas empleadas (BAP y Kin) contribuye a la inducción de embriones somáticos en medio sólido. No obstante, esto pudo deberse a que tal vez las concentraciones ensayadas no fueron suficientes o no fueron las precisas, para que exista un contacto citoquinina-células embriogénicas, y que este regulador a su vez contribuya a la formación de embriones somáticos, especialmente en el caso del BAP, cuya acción se comprobó que es mejor que la de la Kin.

Resultados similares a los arrojados en esta investigación los reportan Ferreira *et al.* (2008), en su estudio los autores logran la inducción de embriones somáticos en 120 días, disminuyendo la concentración de auxina sin adicionar ningún tipo de citoquinina.

De la misma forma, Goh *et al.* (2001) indican en su estudio sobre dos especies de palmas, originarias del sur-este de Asia, palma manila (*Calamus merrillii*) y kakaki (*Calamus subinerm*), empleando varios tipos de explantes, que la diferenciación de los callos en embriones somáticos se da únicamente con la disminución de la auxina en el medio de cultivo.

Por tanto, según lo citado la reducción de la concentración y la sustitución del tipo de auxina, es decir, la utilización de una auxina menos potente como es el ANA con respecto al 2,4-D, contribuyó en gran medida a la inducción de embriones somáticos en medio sólido en este estudio.

Tal como lo sugiere Freire (2003), este autor indica que para la formación de embriones somáticos, es necesario adicionar al medio de cultivo bajas concentraciones de auxina (2,4-D, AIA) o auxinas menos potentes (ANA). De la misma forma lo afirman Ferreira *et al.* (2008) en su estudio, los autores indican que la reducción del nivel de auxina en el medio de cultivo tiende a inducir la maduración y regeneración de las células embriogénicas en embriones somáticos.

Es así que la diferenciación de embriones somáticos a partir de callos embriogénicos se da por un tratamiento inicial de altas concentraciones de auxinas en la fase de inducción de callos, seguida de una reducción de las concentraciones de estas al transferirlos a otro medio de cultivo para la formación de embriones. Esto a su vez confirma que en general, el proceso de embriogénesis somática puede dividirse en dos fases: la primera de inducción de callos embriogénicos y la segunda de expresión de embriones somáticos, tal como lo afirma Scherwinski *et al.* (2012) en su estudio sobre embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros de *Euterpe oleracea*.

#### **4.4 Fase IV: Análisis histológico**

Los cortes histológicos de los callos y de sus embriones del mejor tratamiento ( $0 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP/Kin) de la fase anterior, mostraron varios aspectos morfológicos, como es una composición heterogénea de células, siendo el mayor componente el tejido

meristemático, lo cual es una característica distintiva de un callo embriogénico (Perera *et al.*, 2007).

Las características de estas células meristemáticas coinciden con los resultados reportados por Ferreira *et al.* (2008) en su estudio sobre la especie de palma *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius, utilizando como explantes embriones cigóticos, donde el análisis histológico muestra células que exhiben un citoplasma denso, y un núcleo muy evidente, e indican que esta morfología celular es una señal de adquisición de una competencia embriogénica.

Estos resultados son también corroborados por Perera *et al.* (2007), en su estudio sobre la palma de coco (*Cocos nucifera* L.), utilizando ovarios no fecundados como explantes, mediante un análisis histológico afirman que un núcleo prominente con un nucléolo distintivo en la mitad de la célula es un rasgo característico de células meristemáticas; y estas células con diferentes etapas de división se pueden encontrar en toda el área de actividad meristemática de un callo embriogénico.

Así mismo, Scherwinski *et al.* (2012) en su estudio sobre embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros de *Euterpe oleracea*, observan mediante un corte histológico en el callo, pequeñas células con núcleos prominentes, citoplasma denso y paredes delgadas, que se encontraban en varios niveles de división celular, lo cual afirman que es característico de células con una competencia embriogénica.

Adicionalmente dentro de la composición de células del callo se observó, la presencia de células conductoras o elementos traqueales, las cuáles tal como indica Gonzalez *et al.* (2000) forman parte del xilema, y su función es la de conducción y sostén.

En el estudio histológico llevado a cabo por Ferreira *et al.* (2008), también observan elementos traqueales, estos autores indican que probablemente sea que estos elementos se formaron a partir de células predeterminadas para diferenciarse en el

xilema. Y posiblemente, estas células se encuentren en etapas más avanzadas de la diferenciación celular, y que la auxina empleada haya ayudado a su maduración.

Por otro lado, Alencar *et al.* (2010) en su estudio histológico de la embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros de la especie *Bactris gasipaes* Kunth, aseguran que la diferenciación de los elementos traqueales en los callos embriogénicos, se debe a la conexión de estos callos con el explante de origen.

En los cortes de los callos, también se observó grupos de células con mayor actividad embriogénica que otras, lo cual da un indicio de que se está dando la formación de uno o varios embriones somáticos en esas zonas, es decir, que estos embriones pueden ser de origen uni o multicelular, sin embargo, para profundizar en esto se necesitaría un estudio histológico completo de todas las etapas de formación del embrión.

En varios estudios se da la formación de embriones somáticos ya sea de origen unicelular o multicelular según varios factores que afectan este proceso desde el inicio de la embriogénesis somática (Steinmacher *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008), sin embargo, en algunos casos se puede dar los dos orígenes de formación de embriones en un mismo callo, como en el estudio realizado por Scherwinski *et al.* (2012), donde reportan que además de embriones de origen multicelular, encontraron embriones de origen unicelular, lo cual fue corroborado mediante un análisis histológico de los callos embriogénicos.

Otro aspecto relevante en este análisis histológico fue la presencia de células con reservas de almidón sin características embriogénicas, próximas a las células meristemáticas.

Este hecho fue observado por Ferreira *et al.* (2008) en su investigación, donde indican que las reservas de almidón en los callos, ocurren mayormente en células sin características embriogénicas. También señalan que estas reservas en células adyacentes

a las embriogénicas, es un fenómeno que indica comúnmente la adquisición de una competencia embriogénica. Sin embargo, mencionan que la probable función del almidón en el proceso de embriogénesis somática no es claro todavía, pero se cree que el almacenamiento de almidón puede estar relacionado con la baja actividad mitótica de las células que lo contienen, ya que las células embriogénicas tienen una mayor actividad mitótica y una menor reserva de almidón.

Por otro lado, Scherwinski *et al.* (2012) corroboran el hecho de que en general, los gránulos de almidón se acumulan solamente en células que no exhiben características embriogénicas y que estas se sitúan cerca de las regiones donde está ocurriendo la división celular; pero sugieren que el almidón se incrementa con la formación de embriones somáticos.

En cuanto al análisis histológico de los embriones somáticos, se pudo observar que estos poseían células meristemáticas organizadas en toda su superficie, además se encontraban en etapa globular, por la presencia de una capa de células en constante división en la periferia, las cuales conformaban el protoderma del mismo. Estos resultados coinciden con los presentados por Steinmacher *et al.* (2007) en la especie de palma *Bactris gasipaes* Kunth, donde mediante un estudio histológico observan estructuras globulares con un protoderma bien definido, y aclaran que esta es una característica básica de la primera etapa del desarrollo embrionario.

Resultados similares obtienen Scherwinski *et al.* (2012), donde observan que los embriones somáticos estaban formados por numerosas células esféricas organizadas, lo cual afirman caracteriza a un embrión somático en estado globular.

Igualmente, Ferreira *et al.* (2008) observan que los embriones somáticos en estado globular obtenidos en su estudio mostraban un protoderma definido, y no estaban conectados con el tejido materno.

Todo lo expuesto, conlleva a la afirmación de que los callos y embriones analizados son viables tanto morfológica como histológicamente, y estos últimos podrán seguir sus etapas de desarrollo hasta formar plántulas normales y vigorosas.

#### **4.5 Fase V: Establecimiento de suspensiones celulares**

Después de 6 semanas de cultivo, de los 4 tratamientos ensayados con diferentes concentraciones de BAP y una concentración fija de ANA ( $0.01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para la inducción de embriones somáticos en medio de cultivo líquido, con los callos embriogénicos del mejor tratamiento (T6:  $60 \text{ mg.L}^{-1}$  2,4-D +  $1 \text{ g.L}^{-1}$  CA) de la fase II; se dio la formación embriones somáticos tanto en estado globular como en estadios más maduros, estos últimos se presentaron en los tratamientos 3 y 4, los cuáles contenían mayor concentración de BAP. El aspecto de los embriones globulares fue igual a los obtenidos en la fase III, pero los embriones maduros tenían un color blanquecino más intenso y distinguible a simple vista, eran alargados y curvos (Ver Anexo O).

Además se observó que existió oxidación en un pequeño porcentaje de suspensiones en todos los tratamientos (Ver Anexo P), esto no afectó en gran medida a la formación de embriones, puesto que en el 100 % de suspensiones de todos los tratamientos se dio a lugar la formación de los mismos; sin embargo, se sabe que los compuestos fenólicos pueden afectar al desarrollo y al número de embriones en las suspensiones celulares (Viñas & Jiménez, 2011).

Por tanto, este fenómeno de oxidación se podría evitar con el uso de antioxidantes como es el carbón activado, sin embargo, este cofactor puede adsorber las concentraciones de reguladores en el medio de cultivo, en este caso el BAP, además de dificultar en el caso de las suspensiones la distinción de los embriones somáticos. A pesar de esto, el carbón activado se utilizó en el cultivo en suspensión de la especie *Phoenix dactylifera* L., con una dosis de  $0.3 \text{ g.L}^{-1}$  CA (Fki *et al.*, 2003).

Otra forma de evitar este fenómeno, es la realización de varios subcultivos, como lo realizaron Abohatem *et al.* (2011) en su estudio sobre la especie *Phoenix dactylifera*, ellos indican que la oxidación puede afectar al número de embriones

somáticos en los cultivos en suspensión, por tanto los autores desarrollan un protocolo eficiente que limita la oxidación mediante altas tasas de subcultivos, permitiendo así un buen establecimiento de las células embriogénicas y una multiplicación mayor de los embriones somáticos.

Por otro lado, no existieron diferencias significativas entre los 4 tratamientos ya que todos produjeron un gran número de embriones somáticos, sin embargo, el tratamiento 4 ( $0.4 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP) obtuvo la media más alta con un total de 266 embriones por suspensión y alcanzó además el mayor peso de la masa embriogénica (5.04 g), aparte de que los embriones se desarrollaron más en este medio de cultivo; por tanto se puede decir que fue el mejor tratamiento. Aquí también se corrobora que existe una correlación entre el peso de la masa celular y el número de embriones somáticos, es decir, a mayor número de embriones mayor masa celular.

De esta forma, se puede afirmar que en este trabajo de investigación el BAP sí contribuye a la inducción de embriones en medio líquido, e incluso ayuda a la maduración de estos, lo cual no ocurrió en el ensayo llevado a cabo en medio sólido; probablemente debido a que en la suspensión celular el área de contacto BAP-células embriogénicas es mayor, lo cual permite una penetración de esta citoquinina en dichas células, traduciéndose en la diferenciación de embriones somáticos.

Contrario al hecho de que la citoquinina BAP ayuda en este proceso, Sané *et al.* (2006) en su trabajo sobre *Phoenix dactylifera* obtienen embriones somáticos en suspensión celular solamente en un medio de cultivo libre de auxina, después de 6 semanas de cultivo.

En otros trabajos en cambio se afirma que la utilización únicamente de bajas concentraciones de auxina favorece a la formación de embriones, como en el caso del control negativo de este ensayo ( $0.01 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA). Aslam *et al.* (2011) en su estudio sobre la especie *Phoenix dactylifera* L., reporta que existe un rápido desarrollo de embriones somáticos en un medio de cultivo líquido que contenía  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA, después de 6 semanas de incubación. También afirman que la auxina 2,4-D solo ayudó



a la formación de callos embriogénicos, pero comparado con el ANA, este no contribuyó a la inducción y proliferación de embriones.

Sin embargo, en otro estudio sobre la misma especie *Phoenix dactylifera* L., utilizan no solamente el ANA sino en combinación con el 2,4-D ( $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA +  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$  2,4-D), con esto logran un total de 48 embriones por suspensión a las 9 semanas de cultivo (Badawy *et al.*, 2009).

También existen investigaciones que concuerdan con los resultados expuestos en este trabajo, como es el caso del estudio reportado por Abohatem *et al.* (2011), donde utilizan un medio líquido MS a la mitad de su concentración suplementado con  $0.3 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP y obtienen un alto número de embriones somáticos por frasco a los 45 días de cultivo, con subcultivos cada 7 días. Es así que por cada 25.13 g de masa embriogénica obtienen 537 embriones somáticos. Esta es una alta tasa de producción de embriones, no obstante la tasa obtenida en este estudio fue superior (266 embriones/ 5.04 g masa celular).

Según los resultados obtenidos en esta fase (inducción de embriones en suspensión celular), comparados con los obtenidos en la fase III (inducción de embriones en medio sólido), después de 6 semanas de cultivo en ambos casos, se puede verificar que el número de embriones somáticos obtenidos en el mejor tratamiento del medio líquido (266) es aproximadamente 12 veces mayor al obtenido en el mejor tratamiento del medio sólido (23). Lo que sugiere que el protocolo llevado a cabo en medio líquido es mucho más eficiente que el de medio sólido.

Este hecho es corroborado por Fki *et al.* (2003), en su estudio llevó a cabo dos protocolos para la obtención de embriones, uno el establecimiento de suspensiones celulares y el otro el cultivo en medio sólido. Sus resultados mostraron que por cada 100 mg de callo recuperaron  $10 \pm 2$  embriones en medio sólido, mientras que por la misma cantidad de callo obtuvieron  $200 \pm 10$  embriones en medio líquido; después de un mes de cultivo. Por tanto, la productividad de los cultivos aumentó en 20 veces cuando se utilizaron suspensiones celulares en lugar de los cultivos estándar en medio sólido.

## CAPÍTULO 5 : CONCLUSIONES

- El protocolo de desinfección llevado a cabo en este estudio, que consiste básicamente en el empleo de hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ , 2.5 %) por 10 min a 160 rpm es eficiente, puesto que a bajos costos logra un alto porcentaje de sobrevivencia (98.89 %).
- El medio de cultivo compuesto por  $60 \text{ mg.L}^{-1}$  2,4-D más  $1 \text{ g.L}^{-1}$  CA, es el medio más óptimo para el establecimiento y la inducción de callos embriogénicos en la especie *Parajubaea cocoides* Burret, ya que logra un porcentaje del 100 % en la formación de estos.
- La auxina ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y el carbón activado (CA) son elementos claves y su interacción juega un papel muy importante para la respuesta al proceso de callogénesis.
- No se requiere ningún tipo de citoquinina para la inducción de embriones somáticos en medio sólido, solo es necesario una baja concentración ( $0.01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) de la auxina ácido naftalenacético (ANA) para lograr un promedio de 23 embriones por cada callo embriogénico.
- La citoquininas 6-bencilaminopurina (BAP) y kinetina (Kin) no contribuyen en el proceso de inducción de embriones en medio sólido.
- La dimensión de los callos embriogénicos depende del número de embriones somáticos que se formen en estos.
- Los callos embriogénicos presentan una composición heterogénea de células y su mayor componente son las células meristemáticas.
- La presencia de reservas de gránulos de almidón en las células próximas a las embriogénicas implica que existe formación de embriones somáticos.

- Los embriones somáticos en estado globular se caracterizan por poseer una capa bien definida de células en constante división en la periferia del mismo, denominada protoderma.
- Los callos embriogénicos y sus embriones somáticos obtenidos en medio sólido son viables tanto morfológica como histológicamente.
- El medio de cultivo líquido compuesto por  $0.4 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP más  $0.01 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA, es el medio óptimo para producción de embriones somáticos en suspensión celular, ya que logra un promedio de 266 embriones por suspensión.
- La citoquinina BAP favorece a la formación de embriones somáticos en medio líquido, así como a su desarrollo y maduración.
- El peso de la masa embriogénica en la suspensión celular depende del número de embriones somáticos de la misma.
- Mediante los resultados obtenidos en los dos protocolos llevados a cabo en este estudio para la inducción de embriones somáticos, se puede concluir, que el medio líquido es más eficiente en la formación de embriones, ya que la productividad aumenta en 12 veces comparada con el medio sólido.

## CAPÍTULO 6 : RECOMENDACIONES

- Las condiciones medioambientales a las que se somete la planta madre pueden afectar a la respuesta *in vitro*, por tanto se recomienda que en lo posible se controle estos factores, trabajando únicamente con plantas de invernaderos o en el mejor de los casos con vitroplantas.
- Se recomienda no utilizar frascos de mucha capacidad o volumen en todo el proceso del cultivo *in vitro*, puesto que la contaminación en la siembra y durante la incubación puede aumentar.
- De igual forma, se recomienda que la unidad experimental de todos los ensayos sea un explante por frasco, para en caso de una eventual contaminación, no se disminuya el tamaño muestral.
- Es adecuado contar con un número mayor de repeticiones en todos los ensayos, para obtener mejores resultados y que estos a su vez sean más veraces; de igual forma esto ayudaría a despreciar valores negativos atípicos o los llamados “outliers”, y a su vez se disminuiría la variabilidad.
- En el caso de los valores “outliers” o atípicos positivos, se podría llevar a cabo un estudio genético para saber con qué tipo de planta fenotípica y genotípicamente se debería trabajar para obtener resultados óptimos.
- En cuanto al proceso de callogénesis para lograr un mejor efecto en este, se recomienda, que desde el primer subcultivo se sumerja en el medio de cultivo la base del explante para la formación más efectiva de los callos.
- Se recomienda realizar un estudio histológico en cada una de las etapas del proceso de embriogénesis somática para determinar de mejor manera los cambios estructurales y los aspectos morfológicos tanto de los callos como de los embriones; así como también se sugiere establecer un protocolo para analizar histológicamente las células en suspensión.

- Se sugiere realizar subcultivos sucesivos mínimo cada 15 días en la fase de establecimiento de las suspensiones celulares, para evitar el fenómeno de oxidación en los cultivos y promover el desarrollo de los embriones.
- Es necesario continuar con el proceso de embriogénesis somática hasta la germinación de los embriones somáticos, su conversión en plántulas y aclimatización, para así determinar de mejor forma la efectividad del protocolo.
- El protocolo de formación de embriones mediante cultivos en suspensión llevado a cabo en este estudio puede servir como base para su implementación a gran escala en biorreactores, abriendo así un camino para la producción de semillas artificiales.

## CAPÍTULO 7 : BIBLIOGRAFÍA

- Abohatem, M., Zouine, J., & El Hadrami, I. (2011). Low concentrations of BAP and high rate of subcultures improve the establishment and multiplication of somatic embryos in date palm suspension cultures by limiting oxidative browning associated with high levels of total phenols and peroxidase activities. *Scientia Horticulturae*, *130*(1), 344–348.
- Aguirre, Z., Madsen, J., Cotton, E., & Balslev, H. (2002). *Botánica Austroecuatorialiana. Estudios sobre los recursos vegetales* (Primera ed.). Quito, Ecuador: ABYA YALA.
- Alemán, S., González, G., & Barredo, F. (2002). Estudio histológico de la embriogénesis somática en *Agave fourcroydes*. *Biotecnología vegetal*, *2*(1), 51-56.
- Al' Utbi, S., & AL- Husaibi, F. (2008). *In vitro* culture of date palm *Phoenix dactylifera* L. and the effect of the addition of some materials on shoot tip and callus growth. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, *21*(1), 202-210.
- Alencar, S., Poeta, P., Da Silva, R., & Scherwinski-Pereira, J. (2010). Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. *Acta Scientiarum Agronomy*, *32*(2), 263-267.
- Alkhateeb, A. (2008). Comparison Effects of Sucrose and Date Palm Syrup on Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L ). *American Journal of Biotechnology and Biochemistry*, *4*(1), 19-23.
- Al-Khayri, J. (2011). Basal Salt Requirements Differ According to Culture Stage and Cultivar in Date Palm Somatic Embryogenesis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, *7*(1), 32-42.

- Al-Khayri, J., & Al-Bahrany, A. (2001). Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae*, *89*(4), 291-298.
- Ascanio, M., Cobo, M., Chacín, F., Machado, W., Guerrero, J., & Ascanio, E. (2003). Método del Factor Unico aplicado al cultivo de tejidos vegetales en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)*, *29*(1), 19-31.
- Aslam, J., Ahmad, S., Jaleel, A., Mujib, A., Pershad, M., & Shanker, P. (2011). Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *18*(4), 369–380.
- Badawy, E., Habib, A., El-Banna, A., & Yousry, G. (2009). Effect of some factors on somatic embryos formation from callus suspensions cultures in *Phoenix dactylifera* L. cv. Sakkoty. *4th Conference on Recent Technologies in Agriculture*, (págs. 593-599). Giza-Egipto.
- Borchsenius, F., & Moraes, M. (2006). Diversidad y usos de palmeras andinas (Arecaceae). *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 412-433.
- Catalogue of Life. (15 de Marzo de 2012). *Indexing the world's know species*. Recuperado el 8 de Arbril de 2012, de ITIS: <http://www.catalogueoflife.org>
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D., & Toribio, M. (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación agraria: Sistemas y recursos forestales*, *14*(3), 345-357.
- Da Silva, A., Alves, O., Kemaleddine, A., Campos, I., Do Socorro, M., & Medeiros, S. (2002). Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *24*(3), 601-603.

- Distrito Metropolitano de Quito. (2012). *Agencia Pública de Noticias de Quito*. Recuperado el 16 de Abril de 2012, de Mingas de reforestación para un Quito más verde: <http://www.noticiasquito.gob.ec/>
- Fernández, D., Trovant, B., & López, J. (2009). *Reintegración ecológica y económica de una ladera interandina del noreste de Gualaceo (Azuay, Ecuador)*. Universidad Internacional Menendez Pelayo (IUMP) y la Universidad Central del Ecuador.
- Fernando, S., & Gamage, C. (2000). Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Science*, *151*(2), 193 – 198.
- Ferreira, E., Contin, M., Yoshimitsu, S., Quirino, A., Carvalho, M., & Manfio, C. (2008). Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *95*(2), 175–184.
- Fisher, J., & Tsai, J. (1978). *In vitro* Growth of Embryos and Callus of Coconut Palm. *In vitro*, *14*(3), 307-311.
- 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.
- Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, *3*(4), 195 - 209.
- Fuentes, G., Talavera, C., Oropeza, C., Desjardins, Y., & Santamaria, J. (2005). Exogenous Sucrose Can Decrease *In vitro* Photosynthesis but Improve Field Survival and Growth of Coconut (*Cocos nucifera* L.) *In vitro* Plantlets. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, *41*(1), 69-76.



- Germplasm Resources Information Network . (2012). *GRIN Taxonomy for Plants*. Recuperado el 20 de Abril de 2012, de *Parajubaea cocoides* Burret: <http://www.ars-grin.gov>
- Goh, D., Bon, M., Aliotti, F., Escoute, J., Ferrière, M., & Monteouis, O. (2001). *In vitro* Somatic Embryogenesis in Two Major Rattan Species: *Calamus merrillii* and *Calamus subinermis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 37(3), 375-381.
- Gonzalez, A., Aguirre, M., & J, R. (2000). *Las plantas y su estructura*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2012, de <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/planta2.htm>
- González, O., Sam, O., Hernández, M., Coronado, M., & Silva, J. (2005). Caracterización histológica de la embriogénesis somática a partir de limbos foliares de boniato (*Ipomoea batatas* L. Lam.). *Cultivos Tropicales*, 26(4), 37-41.
- Google Earth. (2 de Febrero de 2012). 6.2.1.6014 (beta). Recuperado el 10 de Mayo de 2012, de DirectX 9 Microsoft Windows (6.1.7600.0): kh.google.com
- Gutierrez, H., De La Vara, R., Cano, A., & Osorio, M. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda ed.). Mexico: McGraw-Hill.
- Josse, C., Mena, P., & Medina, G. (2000). *La Biodiversidad de los Páramos*. Quito: GTP/Abya Yala.
- Lara, A., Valverde, R., & Gómez, L. (2003). Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense*, 27(1), 37-48.
- Marinucci, L., Ruscitti, M., & Abedini, W. (2004). Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 105(2), 27-36.

- Montero, M., Chan, J., Cordova, I., Oropeza, C., & Sáenz, L. (2011). La adición de benciladenina a explantes de cocotero cultivados *In vitro* mejora la formación de embriones somáticos y su germinación. *Agrociencia*, *45*(6), 663-673.
- Moraes, M., & Henderson, A. (1990). The Genus *Parajubaea* (Palmae). *Brittonia*, *42*(2), 92-99.
- Muniran, F., Bhore, S., & Shah, F. (2008). Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq. 'Dura': Comparison of three basal media for efficient regeneration. *Indian Journal of Experimental Biology*, *46*(1), 79-82.
- Othmani, A., Bayouhd, C., Drira, N., Marrakchi, M., & Trifi, M. (2009). Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *97*(1), 71-79.
- Peña, L., Ruiz, H., & Tovar, J. (2008). Proyecto de producción de material genético de especies de palmas andinas amenazadas (*Parajubaea cocoides* Burret, *Ceroxylon parvifons*, *Ceroxylon ventricosum* y *Ceroxylon vogelianum*). Pasto: Fundación Palmas Andinas.
- Perera, P., Hocher, V., Verdeil, J., Doulebeau, S., Yakandawala, D., & Kaushalya, L. (2007). Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, *26*(1), 21-28.
- Pérez, J. (1998). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología (Vol. I). Villa Clara, Cuba: Ediciones GEO.
- Pérez, M., Chan, J., Sáenz, L., González, T., Verdeil, J., & Oropeza, C. (2006). Improved Somatic Embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) Plumule Explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, *42*(1), 37-43.

- PhytoTechnology Laboratories. (2009). *Murashige & Skoog (MS) Basal Salt Mixture*. Recuperado el 12 de Septiembre de 2012, de Product Information Sheet: <http://www.phytotechlab.com/TechInfo/M524-Info.pdf>
- Pintaud, J., & Ludeña, B. (2008). Andean Palms in Ecuadorean Cities. *Ecuadorean Cities*, 52(4), 165–173.
- Rajesh, M., Radha, E., Karun, A., & Parthasarathy, V. (2003). Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm – the effect of exogenous polyamines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75(1), 41–47.
- Roca, W., & Mroginski. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT. Centro Internacional de la Agricultura Tropical.
- Ruiz, J. (2009). Eficiencia relativa y calidad de los experimentos de fertilización en el cultivo de caña de azúcar. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 149-154.
- Sané, D., Aberlenc-Bertossi, F., Gassama-Dia, Y., Sagna, M., Trouslot, M., Duval, Y., y otros. (2006). Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm ( *Phoenix dactylifera*). *Annals of Botany*, 98(2), 301–308.
- Scherwinski, J., Da Silva, R., Da Silva, R., Poeta, P., Gomes, Z., & Oliveira, E. (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration in acaí palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108(1), 1-8.
- Secretaria de Ambiente del Ecuador. (2012). *Quito Verde*. Recuperado el 15 de Abril de 2012, de Patrimonio Natural: <http://www.quitoambiente.gob.ec>
- Sidky, R., & Zaid, Z. (2011). Direct production of somatic embryos and plant regeneration using TDZ and CPPU of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Academic Research*, 3(2), 792-796.

- Squire, D. (2008). Guía completa para seleccionar, cultivar y propagar 220 especies de Palmeras y Cidáceas (Primera ed.). Barcelona, España: BLUME.
- Steinmacher, D., Cangahuala-Inocente, G., Clement, C., & Guerra, M. (2007). Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant, *43*(2), 124-132.
- Texeira, J., Sondahl, M., & Kirby, E. (1993). Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, *34*(3), 227-233.
- Ulloa, C., & Moller, P. (1995). Árboles y arbustos de los Andes (Segunda ed.). Quito, Ecuador: ABYA YALA.
- Velázquez, J., & Gómez, A. (2010). Palma africana en Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa: José N. Rovirosa.
- Verdeil, J., Huet, C., Grosdemange, F., & Buffard-Morel, J. (1994). Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. Plant Cell Reports, *13*(3-4), 218-221.
- Viñas, M., & Jiménez, V. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). Revista Colombiana de Biotecnología, *13*(2), 229-242.
- Zura, A., Jaafar, H., & Afriffin, A. (2011). Optimization of Sterilization Method and Callus Induction of *Salacca glabrescens*. International Conference on Biology, Environment and Chemistry. *24*, págs. 106-111. Singapoore: IACSIT Press.