



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: ENCALADA ALDAZ, BLANCA ESTHELA

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

**DIRECTOR: ING. PEÑA PONTÓN, CRISTIAN JAVIER
CO-DIRECTOR: M.Sc. PÁEZ BARRERA, GRACE TATIANA**

SANGOLQUÍ, JULIO DEL 2014

CERTIFICACIÓN

Ing. Cristian Peña Pontón

M.Sc. Grace Tatiana Páez Barrera

Certifican:

Que el trabajo titulado EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ÁCIDO GIBERÉLICO CON AGUA DE COCO Y CASEÍNA HIDROLIZADA COMO FUENTES DE NITRÓGENO EN LA MADURACIÓN DE EMBRIONES DE PALMA COCO CUMBÉ (*Parajubaea cocoides* Burret) OBTENIDOS A PARTIR DE CALLOS, MEDIANTE ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES, realizado por BLANCA ESTHELA ENCALADA ALDAZ, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – “ESPE”.

El mencionado trabajo consta de (un) documento empastado y (un) disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a BLANCA ESTHELA ENCALADA ALDAZ que lo entregue a ING. MARÍA AUGUSTA CHÁVEZ, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, Julio 2014.

Ing. Cristian Peña Pontón

DIRECTOR

M.Sc. Grace Tatiana Páez Barrera.

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

BLANCA ESTHELA ENCALADA ALDAZ

Declaro que:

El proyecto de grado denominado EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ÁCIDO GIBERÉLICO CON AGUA DE COCO Y CASEÍNA HIDROLIZADA COMO FUENTES DE NITRÓGENO EN LA MADURACIÓN DE EMBRIONES DE PALMA COCO CUMBÉ (*Parajubaea cocoides* Burret) OBTENIDOS A PARTIR DE CALLOS, MEDIANTE ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES, ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando los derechos intelectuales de terceros, conforme a las citas que constan en el texto cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

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

Sangolquí, Julio 2014.

AUTORIZACIÓN

BLANCA ESTHELA ENCALADA ALDAZ

Autorizo que:

El proyecto de grado denominado EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ÁCIDO GIBERÉLICO CON AGUA DE COCO Y CASEÍNA HIDROLIZADA COMO FUENTES DE NITRÓGENO EN LA MADURACIÓN DE EMBRIONES DE PALMA COCO CUMBÉ (*Parajubaea cocoides* Burret) OBTENIDOS A PARTIR DE CALLOS, MEDIANTE ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES; sea publicado en la biblioteca virtual de la Universidad de las Fuerzas Armadas- “ESPE”.

Sangolquí, Junio 2014.

DEDICATORIA

A mis padres Mariana y Jaime quienes formaron en mi ser, una persona de valores pues siempre estuvieron ayudándome y brindándome ánimos para seguir adelante, y jamás rendirme por más difícil que sea el obstáculo, gracias a ellos sigo luchando por mis sueños y metas.

A mi abuelito Segundo que desde el cielo me cuida, protege y me da las fuerzas necesarias para enfrentar los problemas que se presentan en mi vida.

Blanca Esthela Encalada Aldaz

AGRADECIMIENTO

A Dios en primer lugar, por bendecirme, guiarme, darme salud y fuerza para seguir alcanzando mis metas.

A mi mamita Mariana, por siempre estar conmigo en todo momento brindándome su cariño y comprensión, te amo mami gracias por enseñarme a ser una mujer de bien.

A mi papi Jaime, por enseñarme que el éxito se logra con trabajo y sacrificio, te amo y gracias por siempre brindarme tu apoyo para cumplir mis metas.

A mis Abuelitas, por siempre confiar en mí y darme ánimos para seguir luchando por mis sueños.

A mis hermanos, tíos y primos, por su apoyo incondicional en todo momento.

A mi prima Adry, por siempre escucharme y brindarme su apoyo incondicional, por recordarme que siempre debo ser feliz y que vamos a estar juntas apoyándonos en la culminación de nuestros sueños, te adoro prima.

A mis amigos, por brindarme su ayuda y apoyo durante mi vida universitaria, espero que nuestra amistad perdure.

A la Ing. María José Basantes jefa del laboratorio de Micropropagación de la EPMMOP, por compartir sus conocimientos y brindarme su ayuda incondicional, gracias por ser una amiga más que una jefa.

Al Ing. Segundo Aguilar y a todo el personal del vivero, por su contribución en esta investigación.

Al Ing. Pedro Romero, por el tiempo y la ayuda prestada en la realización de mi proyecto de investigación.

A mi director Ing. Cristian Peña Pontón y codirectora la Ing. Grace Tatiana Páez Barrera, por el tiempo y dedicación que me brindaron durante el desarrollo de mi investigación, impartiendo sus conocimientos para el éxito de este trabajo.

Blanca Esthela Encalada Aldaz

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	i
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
LISTADO DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT	xix
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación del problema.....	2
1.3. Objetivos de la investigación	4
1.3.1. Objetivo general del proyecto	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
1.4. Marco teórico	4
1.4.1. Generalidades	4
1.4.2.1. Clasificación taxonómica	6
1.4.2.2. Características morfológicas	7

1.4.3. Cultivo <i>in vitro</i>	7
1.4.3.1. Embriogénesis somática	9
1.4.3.2. Tipos de embriogénesis somática	11
1.4.3.2.1. Formación de embriones somáticos	12
1.4.3.2.2. Etapas de la embriogénesis somática indirecta	13
1.4.4. Suspensiones celulares embriogénicas	16
1.4.5. Cinética de crecimiento celular	17
1.4.5.1. Métodos para medir el crecimiento celular	18
1.5. Hipótesis de investigación.....	21
CAPÍTULO 2	22
MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1. Participantes	22
2.2. Zona de estudio	22
2.3. Período de tiempo de investigación	22
2.4. Procedimiento	22
2.4.1. Etapa de validación del proyecto.....	22
2.4.1.1. Fase de campo	22
2.4.1.2. Fase de laboratorio	23
2.4.2. Etapa actual del proyecto	25
2.4.2.1. Establecimiento de las suspensiones celulares	25
2.4.2.2. Maduración de embriones somáticos	28
2.4.2.3. Fase de identificación embrionaria.....	29
CAPÍTULO 3	31
RESULTADOS.....	31
3.1. Desinfección.....	31

3.2. Establecimiento e inducción de callos embriogénicos	31
3.3. Suspensiones celulares	32
3.3.1. Establecimiento de las suspensiones celulares	32
3.4. Maduración	39
CAPÍTULO 4	52
DISCUSIÓN	52
4.1. Desinfección.....	52
4.2. Establecimiento e inducción de callos embriogénicos.....	53
4.3. Suspensiones celulares.....	54
4.4. Maduración e identificación embrionaria	58
CAPÍTULO 5	63
CONCLUSIONES	63
CAPÍTULO 6	64
RECOMENDACIONES	64
CAPÍTULO 7	65
BIBLIOGRAFÍA.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1. Partes morfológicas inflorescencias (A), fruto (B) de <i>Parajubaea cocoides</i> Burret (Balslev et al., 2013).	7
Figura2. Fases o etapas de la embriogénesis somática y cigótica (Guerra, 1999).	9
Figura3. Etapas de desarrollo morfológico de embriones somáticos en café (Guerra, 1999).	10
Figura4. Embriogénesis somática directa de zanahoria (Girón, 1998).	11
Figura5. Embriogénesis somática indirecta de un disco de hoja (Barreto, 2003).	12
Figura6. Embriogénesis somática en zanahoria (<i>Daucus carota</i>) (Yeung <i>et al.</i> , 1996).	16
Figura7. Curva de crecimiento celular típica (Roca & Mroginski, 1993).	18
Figura8. Diagrama de la cámara de Neubauer (Lugo, 2004).	19
Figura9. Palmas coco cumbé (<i>Parajubaea cocoides</i> Burret) y su fruto recolectado en la hacienda (Encalada, 2014).	23
Figura10. Desinfección de los endospermos (Encalada, 2014).	24
Figura11. Siembra de los embriones e incubación en la oscuridad (Encalada, 2014).	24
Figura12. Establecimiento de las suspensiones (A) Disgregación del callo, (B) Eliminación de callo no friable, (C) Siembra de los pedazos de callo en el medio líquido, (D) Incubación de las suspensiones en un agitador (Encalada, 2014).	26
Figura13. Conteo celular (A) Toma de la muestra de la suspensión, (B) Cámara de Neubauer cargada con la muestra, (C) Conteo en la cámara de Neubauer (Encalada, 2014).	27
Figura14. Recuento celular de las suspensiones (Encalada, 2014).	27
Figura15. Identificación embrionaria (A) Disgregación de los embriones, (B) Conteo de los embriones (Encalada, 2014).	30
Figura16. Desinfección (A) Embriones sembrados después de la desinfección, (B) Explante sin contaminación, (C) Explante contaminado (Encalada, 2014).	31

Figura17. Formación de los callos (A) Callos sembrados, (B) Porción de callo friable (Encalada, 2014).	32
Figura18. Conteo celular en <i>Parajubaea cocoides</i> Burret en la fase lineal (Encalada, 2014).	32
Figura19. Curva de la cinética celular para la suspensión uno (Encalada, 2014).	33
Figura20. Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión uno (Encalada, 2014).	33
Figura21. Curva de la cinética celular para la suspensión dos (Encalada, 2014).	34
Figura22. Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión dos (Encalada, 2014).	35
Figura23. Curva de la cinética celular para la suspensión tres (Encalada, 2014).	35
Figura24. Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión tres (Encalada, 2013).	36
Figura25. Curva de la cinética celular para la suspensión cuatro (Encalada, 2014).	37
Figura26. Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión cuatro (Encalada, 2014).	37
Figura27. Tratamientos de maduración (A) embriones necrosados en el tratamiento testigo, (b) embriones en desarrollo (Encalada, 2014).	39
Figura28. Porcentaje de embriones en fase globular en los cuatro tratamientos (Encalada, 2014).	40
Figura29. Embriones en fase globular (Encalada, 2014).	40
Figura30. Porcentaje de embriones en fase corazón en los cuatro tratamientos (Encalada, 2014).	42
Figura 31. Embrión en fase corazón (Encalada, 2014).	42
Figura32. Porcentaje de embriones en fase torpedo en los cuatro tratamientos (Encalada, 2014).	44
Figura33. Embriones en fase torpedo (Encalada, 2014).	44
Figura34. Porcentaje de embriones en fase cotiledonar en los cuatro tratamientos (Encalada, 2014).	46

Figura 35. Embriones en fase cotiledonar (Encalada, 2014).	46
Figura36. Porcentajes de embriones en sus distintas fases en la maduración (Encalada, 2014).	48
Figura37. Número total de embriones formados en las cuatro suspensiones (Encalada, 2014).	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1. Especies de palmas nativas registradas en el Ecuador (Balslev et al., 2013; Moraes et al., 2006).....	5
Tabla2. Taxonomía de la palma coco cumbé (Acosta, 1971).	6
Tabla3. Tratamientos para el establecimiento de las suspensiones (Encalada, 2014).	25
Tabla4. Tratamientos para la maduración de embriones (Encalada, 2014).	28
Tabla5. Análisis de varianza paramétrica en la formación de células (Encalada, 2014).	38
Tabla6. Porcentaje de formación de embriones en fase globular (Encalada, 2014).	41
Tabla7. Análisis de varianza no paramétrica de la fase globular (Encalada, 2014).	41
Tabla8. Prueba de Kruskal-Wallis de la fase globular (Encalada, 2014).....	42
Tabla9. Porcentaje de formación de embriones en fase corazón (Encalada, 2014).	43
Tabla10. Análisis de varianza no paramétrica de la fase corazón (Encalada, 2014).	43
Tabla11. Prueba de Kruskal-Wallis de la fase corazón (Encalada, 2014).	44
Tabla12. Porcentaje de formación de embriones en fase torpedo (Encalada, 2014).	45
Tabla13. Análisis de varianza no paramétrica de la fase torpedo (Encalada, 2014).	45
Tabla14. Prueba de Kruskal-Wallis de la fase torpedo (Encalada, 2014).....	46
Tabla15. Porcentaje de formación de embriones en fase cotiledonar (Encalada, 2014).	47
Tabla16. Análisis de varianza no paramétrica de la fase cotiledonar (Encalada, 2014).	47
Tabla17. Prueba de Kruskal-Wallis de la fase cotiledonar (Encalada, 2014).	48
Tabla 18. Conteo de embriones en todas las fases encontradas en la suspensión uno (Encalada, 2014).	49

Tabla19. Conteo de embriones en todas las fases encontradas en la suspensión dos (Encalada, 2014).....	49
Tabla20. Conteo de embriones en todas las fases encontradas en la suspensión tres (Encalada, 2014).....	49
Tabla21. Conteo de embriones en todas las fases encontradas en la suspensión cuatro (Encalada, 2014).	50
Tabla22. Análisis de varianza no paramétrica de las cuatro suspensiones (Encalada, 2014).	50
Tabla23. Prueba de Kruskal-Wallis de las cuatro suspensiones (Encalada, 2014).	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Composición del medio basal de Murashige y Skoog (1962) modificado (PhytoTechnology Laboratories, 2009).	70
Anexo B. Tratamientos de maduración (A) MS con agua de coco y 1.5 mg L ⁻¹ de ácido giberélico, (B) MS con agua de coco y 3 mg L ⁻¹ de ácido giberélico, (C) MS con caseína hidrolizada y 1.5 mg L ⁻¹ de ácido giberélico, (D) MS con caseína hidrolizada y 3 mg L ⁻¹ (Encalada, 2014).	71
Anexo C. Conteo celular en <i>Parajubaea cocoides</i> Burret (A) fase de retraso, (B) fase exponencial, (C) fase logarítmica, (D) fase estacionaria (Encalada, 2014).	71
Anexo D. Embriones observados en los tratamientos uno y dos (A) Globular, (B) Corazón, (C) Torpedo (Encalada, 2014).	72
Anexo E. Comercialización nacional de <i>Parajubaea cocoides</i> Burret para uso ornamental (Balslev et al., 2013).	72

LISTADO DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido indolacético
BAP	6-Bencilaminopurina
GA3	Ácido giberélico
ABA	Ácido abcísico
2,4D	Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético
NH ₄ ⁺	Catión amonio
NO ₃	Nitrato
AIB	Ácido indol butírico
MS	Medio Murashige & Skoog con micro y macro nutrientes (1962)
g L ⁻¹	gramo/Litro
mg L ⁻¹	miligramo/Litro
mL	mililitro
°C	Grado centígrado
min	minutos
nm	nanómetro
NaOH	Hidróxido de sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto

pH	Potencial hidrógeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
HD	High Definition
ES	Embriones somáticos
EPMMOP	Empresa Pública Municipal de Movilidad y Obras Públicas
UEP	Unidad de espacio público
DMQ	Distrito Metropolitano de Quito

RESUMEN

Actualmente en el Distrito Metropolitano de Quito y sus alrededores, existen aproximadamente veinticuatro palmeras, especies que en la actualidad se encuentran catalogadas como plantas nativas. Se debe considerar su protección y conservación como especies icónicas de parques, jardines y bosques protectores de la capital. *Parajubaea cocoides* Burret es una palma alto andina propia de los valles y alturas ecuatoriales desde Loja hasta Ibarra, debido a que la germinación es complicada se ha implementado el cultivo *in vitro* como una opción para la producción de esta palma. En el presente trabajo de investigación se estableció un protocolo para la maduración de embriones somáticos mediante el establecimiento de suspensiones celulares, a partir de embriones cigóticos inmaduros. En el establecimiento de las suspensiones los resultados mostraron que las mismas alcanzan el crecimiento exponencial a los 16 y 22 días. Los resultados indicaron que en los tratamientos que contenían 1.5 - 3 mg L⁻¹ de GA₃ y 200 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada, se observó la presencia de embriones en fase cotiledonar, la capacidad embriogénica a las 12 semanas fue del 40.79% al utilizar 1.5 mg L⁻¹ de GA₃, y al utilizar 3 mg L⁻¹ de GA₃, se obtuvo una capacidad embriogénica del 45.36 %. Finalmente, se concluye que el emplear fuentes de nitrógeno orgánico en las suspensiones celulares, genera excelentes resultados en la maduración de embriones.

PALABRAS CLAVES: EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA, MADURACIÓN, ÁCIDO GIBERÉLICO, CASEÍNA HIDROLIZADA, SUSPENSIÓN CELULAR.

ABSTRACT

Currently in the Metropolitan District of Quito and the surrounding area there are approximately twenty-four palm species that are currently cataloged as native plants. Consideration should be given protection and conservation as iconic species of parks, gardens and protective forests in the capital. *Parajubaea cocoides* Burret is a palm own high Andean valleys and equatorial heights from Loja to Ibarra, because germination is complicated is implemented in vitro culture as an option for the production of this palm. In the present research a protocol for maturation of somatic embryos was established by setting cell suspensions from immature zygotic embryos. In suspension establishment, results showed that suspensions reach the highest point on the exponential growth curve between at 16 to 22 days, after this time cellular decay begins. The results showed that contain 1.5 - 3 mg L⁻¹ de GA₃ and 200 mg L⁻¹ casein hydrolyzate shown cotyledonary stage embryos, using 1.5 mg L⁻¹ GA₃, 40.79% of embryogenic capacity was observed at 12 weeks. On the other hand, using 3 mg L⁻¹ GA₃ an embryogenic capacity of 45.36 % was obtained. Finally, we conclude that using of organic nitrogen sources on cell suspensions provides excellent results in maturing embryo.

KEYWORDS: SOMATIC EMBRYOGENESIS, MATURATION, GIBBERELIC ACID, HYDROLYZED CASEIN, SUSPENSION CELL.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

Ecuador posee 136 especies y 32 géneros de palmas Sudamericanas. Los géneros *Geonoma*, *Bactris*, *Wettinia* y *Aiphanes*, son los más diversos e incluyen a la mitad de las especies, esta diversidad se atribuye a la variedad de ambientes climáticos de Ecuador. Las palmas crecen entre 0 y 3300 metros de altitud en todas las regiones naturales del Ecuador continental. En las estribaciones externas de la cordillera existe mayor diversidad de palmas, mientras que en los valles interandinos encontramos palmas ornamentales, como el coco cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret) y varias especies de la palma de cera (Balslev, Montúfar, Navarrete, Valencia, 2013).

Las palmas nos proveen de alimento, medicina y materia prima a las poblaciones rurales en la Amazonia, Costa y los Andes. Los múltiples servicios que brindan las convierten en referentes culturales de los pueblos de Ecuador, por lo que se ha propuesto catalogar a ciertas especies como Patrimonio Cultural, para abogar por su conservación y su valor histórico (Balslev *et al.*, 2013).

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

Parajubaea cocoides Burret, es una palma alto andina de los valles y alturas ecuatoriales desde Loja hasta Ibarra, puede llegar a alcanzar veinte metros de altura;

son palmeras decorativas e interesantes por su resistencia al frío, ya que se ha constatado que pueden superar temperaturas mínimas de cuatro a cinco grados bajo cero, también favorecen la captación de CO₂, control de erosión y actúan como regulador climático, por tanto sería conveniente que se cultiven en mayor cantidad (Pintaud & Aleano, 2008).

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

Una de las razones principales para que no se cultive la palma, es debido a que la germinación puede tardar de seis a ocho meses, y puede incluso no darse este proceso ya que el endospermo de esta especie es muy sensible al ataque de microorganismos y a la humedad. La germinación convencional de esta palmera, es poco constante. Las semillas se secan durante varios meses antes de sembrar, y luego se ponen en la superficie de la tierra, sin enterrarlas completamente y finalmente después de ocho meses comienza a brotar (Henderson & Bernal, 1995).

Esta palma tiene raíces muy sensibles a la manipulación, rasguños, desgarros, rupturas, cambio de temperatura, humedad y en general al cambio de pH, dificultando su trasplante y por ende su desarrollo vegetativo y adaptación al campo; por estas razones se sugiere como una opción para la producción de *Parajubaea cocoides* Burret, la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* (Pintaud & Aleano, 2008).

1.2. Justificación del problema

Las palmas son un elemento notable de la naturaleza ecuatoriana por su diversidad y su abundancia en todos los ambientes. La Sierra acoge gran variedad de especies, principalmente en las estribaciones externas de la Cordillera Oriental, entre los 1000 y 1500 metros de altitud. La conservación, variedad e intensidad de usos varían entre regiones, siendo la Sierra la más amenazada por la deforestación y el manejo inadecuado de las palmas (Acosta, 1944; Balslev *et al.*, 2013).

Las palmeras forman parte de la familia Arecaceae, la misma que incluye a 200 géneros y 2450 especies distribuidas en la región tropical a nivel mundial, con algunas especies que se extienden en áreas subtropicales en ambos hemisferios. Son un grupo diverso y ecológicamente importante por su extraordinaria utilidad para las comunidades humanas, siendo explotadas en amplios rangos de escalas económicas a nivel mundial (Acosta, 1971; Balslev *et al.*, 2013).

El género *Parajubaea* es estrictamente endémico de la región andina, tienen un rango promedio de 1000 y 3000 metros de altitud. La mayoría de las especies de palmeras andinas se localizan en Los Andes del norte, particularmente en Colombia y Ecuador, se encuentra frecuentemente como palma ornamental. Su endosperma es comestible y se vende a menudo en mercados locales (Borchsenius *et al.*, 1998; Moraes, Ollgaard, Kvist, Borchsenius & Balslev, 2006).

El Municipio de Quito, impulsa la construcción de corredores verdes, empleando especies nativas contribuyendo en la conservación de la biodiversidad. Por lo tanto, la palma coco cumbé, considerada una especie ornamental, puede usarse para este fin (Distrito Metropolitano de Quito, 2012).

Parajubaea cocoides Burret, es cultivada en las aceras, redondeles, parques y espacios públicos, es catalogada como una planta ornamental, además genera actividades económicas como la elaboración de botones en base al uso de su endocarpio, o la venta de su endospermo comestible (Aguirre *et al.*, 2002).

La embriogénesis somática permite la producción masiva de plantas *in vitro*, ya que incrementa los porcentajes de multiplicación en un periodo corto de tiempo, por esta razón la multiplicación de *Parajubaea cocoides* Burret, por embriogénesis somática es de gran importancia (Celestino *et al.*, 2005).

Se debe especificar que existe una investigación previa denominada “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)”, realizado por Verónica Sánchez en el 2013.

En el presente estudio se continúa con la etapa de maduración, para así obtener embriones en todas las fases de desarrollo principalmente en estado cotiledonar, y así proseguir a la fase final de embriogénesis para regenerar plantas; ya que *Parajubaea cocoides* Burret, se encuentra dentro del grupo de plantas nativas y se utiliza para la reforestación en el Distrito Metropolitano de Quito.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general del proyecto

Evaluar el efecto de ácido giberélico, agua de coco y caseína hidrolizada en la maduración de embriones somáticos de palma coco cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret) obtenidos a partir de callos, mediante establecimiento de suspensiones celulares.

1.3.2. Objetivos específicos

- Validar el método de desinfección, establecimiento e inducción de callo embriogénico de palma coco cumbé.
- Evaluar el efecto y la concentración adecuada de ácido giberélico en la maduración de los embriones somáticos.
- Evaluar el efecto del agua de coco y caseína hidrolizada como fuente de nitrógeno orgánico.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Generalidades

Las palmas son plantas que pertenecen al orden Arecales y la familia Arecaceae. Desde el punto de vista económico, constituyen una de las tres familias de plantas importantes para el hombre, son un elemento ornamental por excelencia, por lo que son propagadas, sembradas y trasplantadas en la mayoría de las ciudades del mundo, de manera particular en las zonas tropicales y subtropicales (Acosta, 1971).

Es importante considerar que las palmas ofrecen un gran potencial para impulsar su explotación sustentable, ya que muchos productos provienen de distintas partes de la planta como los frutos y hojas, de manera que el aprovechamiento no

necesariamente determina la destrucción o muerte de la planta (Moraes & Henderson, 1990).

En la actualidad existe el 29% de especies y 64% de géneros de palmeras nativas que se encuentran en la región andina, de las 715 especies de palmeras listadas para las Américas por Govaerts & Dransfield (2005). En la tabla 1 se puede identificar las especies nativas del Ecuador de las tres regiones, la lista está basada en la revisión más reciente realizada en el 2013.

Tabla 1

Especies de palmas nativas registradas en el Ecuador (Balslev et al., 2013; Moraes et al., 2006).

Especies exclusivas			
	COSTA	SIERRA	AMAZONIA
1	<i>Aiphanes bicarnis</i> √	<i>Aiphanes grandis</i> √	<i>Ammandra decasperma</i>
2	<i>Aiphanes eggersi</i>	<i>Aiphanes verrucosa</i> √ *	<i>Aphandranotalia</i>
3	<i>Aiphanes tricuspida</i>	<i>Ceroxylon echinulatum</i>	<i>Astrocaryum jouari</i>
4	<i>Astrocaryum standleyanum</i>	<i>Ceroxylon porvifrons</i> *	<i>Astrocaryum urostachys</i>
5	<i>Attalea colenda</i>	<i>Ceroxylon parvum</i> *	<i>Attalea butyracea</i>
6	<i>Bactris colaradonis</i>	<i>Ceroxylon ventricosum</i> *	<i>Attalea insignis</i>
7	<i>Bactris hondurensis</i>	<i>Ceroxylon vogelianum</i> *	<i>Attalea maripa</i>
8	<i>Bactris pilosa</i>	<i>Dictyocarym lamarckianum</i>	<i>Attalea phalerata</i>
9	<i>Desmoncus cirrhiferus</i>	<i>Geonoma fosteri</i> √	<i>Bactris acanthocarpa</i>
10	<i>Euterpe oleracea</i>	<i>Geonoma hollinensis</i> √	<i>Bactris concinna</i>
11	<i>Geonoma awensis</i>	<i>Geonoma arbygniana</i> *	<i>Bactris fissifrons</i>
12	<i>Geonoma calyptrogynoides</i>	<i>Geonoma skovii</i> √ *	<i>Bactris hirta</i>
13	<i>Geonoma irena</i> √	<i>Hyospate macrorhachis</i>	<i>Bactris martiana</i>
14	<i>Geonoma linearis</i>	<i>Parajubaea cocooides</i> *	<i>Bactris riparia</i>
15	<i>Geonoma trianda</i>	<i>Prestoea acuminata</i> *	<i>Bactris simplicifrons</i>
16	<i>Manicaria saccifera</i>	<i>Prestoea carderi</i>	<i>Chelyocarpus ulei</i>
17	<i>Phytelapha tumacana</i>	<i>Socratea rostrata</i>	<i>Desmoncus giganteus</i>
18	<i>Prestoea pubens</i>	<i>Wettinia aequatorialis</i> √ *	<i>Desmoncus mitis</i>
19	<i>Socratea hecatonandra</i>	<i>Wettinia anomala</i>	<i>Desmoncus polyacanthos</i>
20	<i>Synechanthus warszewiczianus</i>	<i>Wettinia fascicularis</i>	<i>Elais oleifera</i>

√ Especie endémica

* Especies registradas con colecciones botánicas sobre 2500 metros de altitud

1.4.2. Palma coco cumbé

Parajubaea cocoides Burret, es una especie que pertenece a la familia Arecaceae, es originaria de Suramérica desde Colombia hasta Ecuador, es una palma ornamental que se encuentra generalmente en avenidas y parques. Su atractivo paisajístico es emblemático ya que realza la belleza arquitectónica de las edificaciones de la ciudad, por tanto es considerada como una especie decorativa en Ecuador (Acosta, 1971).

Se propaga y comercializa en viveros privados y municipales en Quito y sus alrededores. Es una planta ornamental apreciada en las ciudades de la región andina, se considera una planta cara en comparación con otras especies ornamentales. Los comerciantes establecen su precio de acuerdo al tiempo que demora en germinar y crecer (Anexo E) (Balslev *et al.*, 2013).

En nuestro país, esta especie no registra estudios y datos poblacionales en estado silvestre, y tampoco se tiene evidencia que la especie esté en peligro de extinción en áreas naturales, sin embargo esta palma posee un valor cultural, ornamental y alimenticio, dentro de las zonas pobladas y urbanas, por ende se debería contribuir a su preservación. (Balslev *et al.*, 2013).

1.4.2.1. Clasificación taxonómica

Tabla 2

Taxonomía de la palma coco cumbé (Acosta, 1971).

Nombre científico:	<i>Parajubaea cocoides</i> Burret
Reino	Plantae
División	Espermatofita
Subdivisión:	Angiosperma
Clase	Dicotiledóna
Orden	Espadisflorales
Familia	Areceaceae
Género	<i>Parajubaea</i>
Especie	<i>Parajubaea cocoides</i>
Nombre común	Palma coco cumbé

1.4.2.2. Características morfológicas

Es una planta que pertenece a las palmas solitarias monoicas, llega a medir aproximadamente 20 metros de altura, posee un tallo solitario de 6-16 metros de color pardo oscuro y liso, constituida por 30 hojas arqueadas con foliolos dispuestos verticalmente. Produce varias inflorescencias e infrutescencias entre las hojas (figura 1 A). Flores unisexuales con 15-17 estambres organizadas en triadas, dos laterales masculinas de color morado ubicadas en la parte distal y una central femenina de color amarillo dorado ubicada en la parte proximal de la inflorescencia. Posee alrededor de 30-100 frutos elipsoides (4.5-5 x 2.8-4 cm) de coloración verde negruzcos al madurar (figura 1 B) (Moraes & Henderson, 1990; Balslev *et al.*, 2013; Acosta, 1971).

Es una palma de fácil identificación, aunque es parecida a un cocotero (*Cocos nucifera*), la diferencia radica en que esta palma crece en tierras bajas de la Costa y en la Amazonia. En Ecuador se ha observado que la palma coco cumbé permanece con flores y frutos todo el año, sus principales polinizadores son las abejas europeas africanizadas (Balslev *et al.*, 2013).



Figura 1. Partes morfológicas inflorescencias (A), fruto (B) de *Parajubaea cocoides* Burret (Balslev *et al.*, 2013).

1.4.3. Cultivo *in vitro*

Al referirnos al establecimiento de cultivo de tejidos, se debe mencionar que va a depender del tipo del explante, el genotipo de la especie utilizada, el método de regeneración y finalmente el objetivo que se quiere alcanzar. Es importante el aporte tecnológico ya que por medio de esta técnica se pretende obtener plantas libres de

patógenos y enfermedades, y con esto dar origen a una producción masiva de plantas (Roca & Mroginski, 1993).

El cultivo *in vitro*, está fundamentado en el principio de la totipotencia de las células, en donde se debe entender que toda célula vegetal contiene material genético de la planta madre, por esta razón posee la capacidad de regenerar una planta completa, el aporte de esta tecnología ha permitido la propagación masiva de plantas, clonación, obtención de plantas libres de virus, producción de semillas sintéticas, conservación de germoplasma, obtención de metabolitos secundarios, producción de nuevos híbridos y germinación de semillas (Pérez, 1998).

Se debe mencionar que la embriogénesis somática y organogénesis dentro del cultivo de tejidos, son dos eventos morfogénicos importantes para la regeneración de plantas, la embriogénesis somática como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas, puesto que posee una enorme capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, y permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente (Pérez, 1998).

Herman & Hass (1975), inducen por primera vez la formación de embriones somáticos a partir de secciones de hojas en *C. arabica*. Por otro lado, en 1977, Sondahl & Sharp, reportan investigaciones sobre embriogénesis en *C. arabica*, que a la fecha son las de mayor trascendencia, usando secciones de diferentes órganos de plantas (hojas, tallos, pecíolos, frutos inmaduros, etc.) en el medio de Murashige & Skoog, en el que adicionaron diferentes concentraciones de auxinas y citocininas, ellos demostraron la gran capacidad de embriogénesis somática de las secciones de hojas.

Girón (1998), descubrió que los conglomerados de células que se producen después de la siembra de la sección de la hoja “callos”, tienen la capacidad de producir una alta o baja frecuencia de embriones somáticos.

1.4.3.1. Embriogénesis somática

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

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

En dicotiledóneas, el desarrollo de un embrión somático, presenta características morfológicas semejantes a las de un embrión cigótico. Ambos se caracterizan por la diferenciación de una estructura bipolar, como se puede observar en la figura 2 (Guerra, 1999).

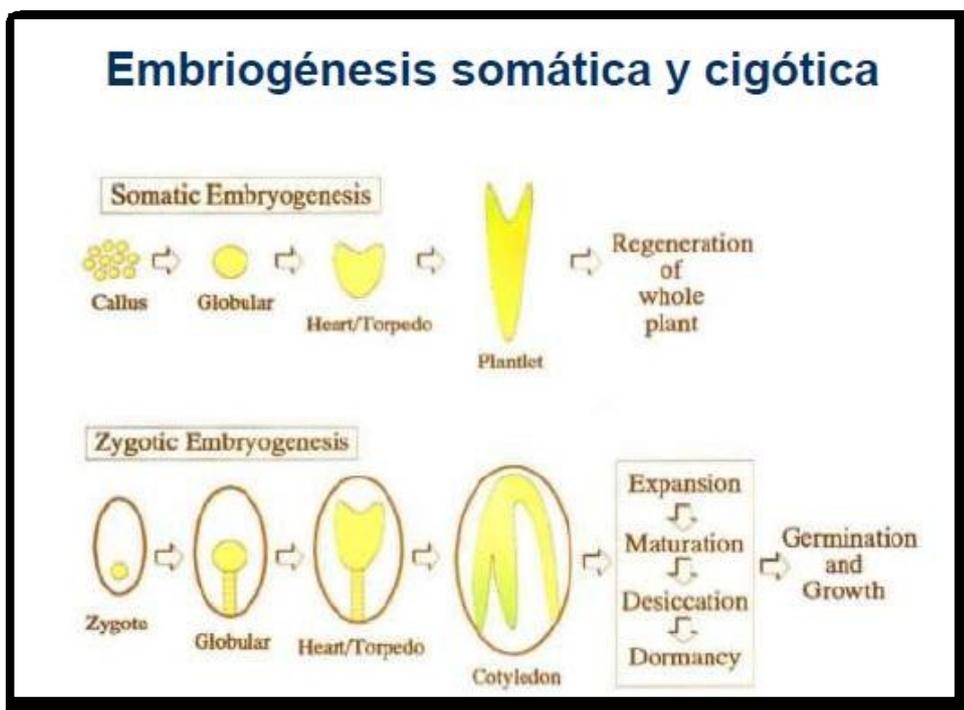


Figura 2. Fases o etapas de la embriogénesis somática y cigótica (Guerra, 1999).

El desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática, incluye las siguientes etapas: inducción de los embriones somáticos, desarrollo de los embriones somáticos, proliferación, maduración y germinación (Yeung *et al.*, 1996).

La diferencia principal entre embriones cigóticos y somáticos, son sus sistemas de iniciación; es decir los embriones cigóticos se forman a partir de la unión de los gametos, la doble fecundación y finalmente las plantas que se originan son híbridas por la recombinación meiótica de sus genes. Por el contrario, los embriones somáticos se originan de células vegetativas de un único individuo, y las plantas resultantes son duplicados genéticos o clones de la planta madre (Guerra, 1999).

El desarrollo de un embrión somático en dicotiledóneas, se caracteriza por presentar estadios de desarrollo pro embrionario y embrionario propiamente, como son el estado globular, corazón, torpedo y cotiledonar, que se pueden observar en la figura 3 (Guerra, 1999).



Figura 3. Etapas de desarrollo morfológico de embriones somáticos en café (Guerra, 1999).

Teóricamente esta técnica, es la más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* ya que el embrión posee una naturaleza bipolar, sus altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo y finalmente la posibilidad de encapsular estas estructuras formadas y obtener semillas artificiales. Sus desventajas

radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso (Yeung *et al.*, 1996).

1.4.3.2. Tipos de embriogénesis somática

Embriogénesis Somática Directa: se obtienen embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callo (figura 4). Este hecho se puede describir, como una formación accidental del embrión; este tipo de embriogénesis, ofrece varias aplicaciones como: clonado directo de híbridos comerciales F1; clonado rápido de un material de apreciado valor para el mejoramiento; selección *in vitro*, y mejoramiento de genotipos para diferentes caracteres de plantas completas en el estado más temprano del ciclo de su vida (Girón, 1998; Pérez, 1998).

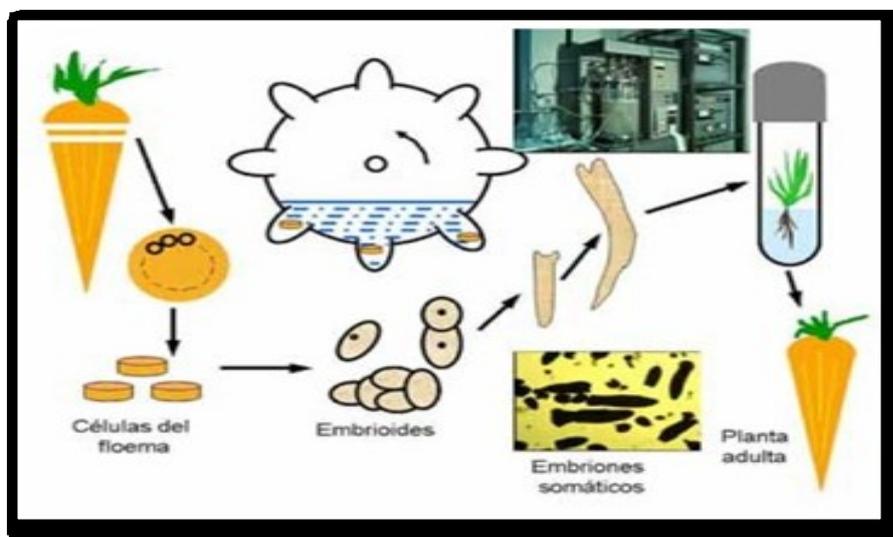


Figura 4. Embriogénesis somática directa de zanahoria (Girón, 1998).

Embriogénesis somática Indirecta: implica la necesidad de una inducción para que las células sigan la vía embriogénica, tras pasar por una fase proliferativa (callo) y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis (figura 5). Se utilizan dos medios de cultivo: el primero, de inducción, para la calogénesis y un segundo medio, de regeneración, para producir callos friables. Se producen cientos de miles de embriones somáticos por gramo de callo; los embriones somáticos completamente diferenciados pueden pasarse a un medio de regeneración, donde se desarrollan las

raíces y los tallos, hasta la formación de plántulas de 4 a 5 pares de hojas aptas para ser transferidas a condiciones *in vivo* (Barreto, 2003; Berthouly, 1989).

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia, en donde el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones somáticos por callo; estos embriones aparecen entre las 12 - 14 semanas de cultivo, en pequeños grupos o aislados, que se desarrollan completamente pasando por los diferentes estadios, mientras que en la embriogénesis somática de alta frecuencia, los embriones aparecen entre las 16 - 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en estado globular (Berthouly, 1989).

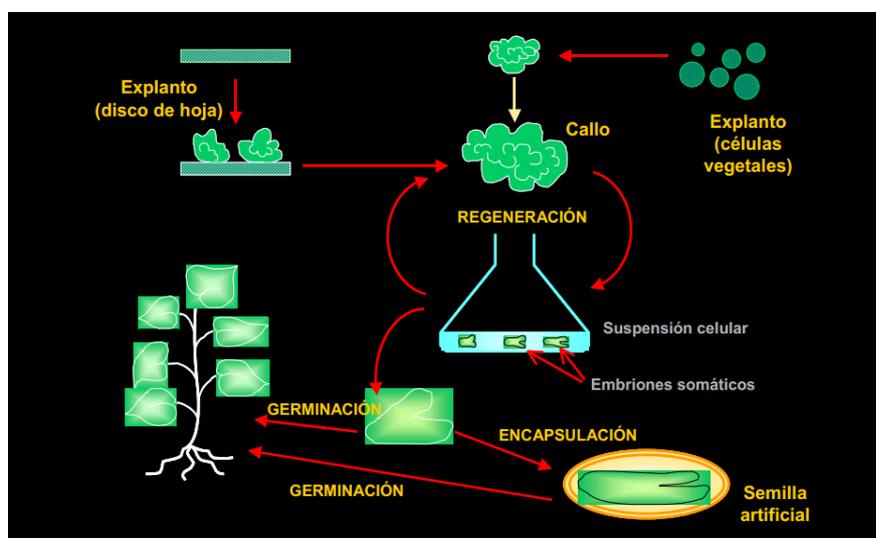


Figura 5. Embriogénesis somática indirecta de un disco de hoja (Barreto, 2003).

1.4.3.2.1. Formación de embriones somáticos

Para inducir la formación del embrión somático a partir de los proembriones, es necesario adicionar al medio de cultivo bajas concentraciones de auxina o auxinas menos fuertes e incluso no adicionar auxinas, especialmente cuando se trabaja con plantas monocotiledóneas. En algunas especies es necesario adicionar una citoquinina (Nomura & Komamine, 1995).

La densidad celular utilizada en una suspensión, influye en el comportamiento asincrónico de los embriones somáticos, siendo este uno de los

aspectos más importantes a resolver, ya que sólo los embriones que se encuentran en etapas más avanzadas del proceso de histodiferenciación, son capaces de germinar y dar lugar a plantas completas (Nomura & Komamine, 1995).

Nomura & Komamine (1995), señalaron algunos aspectos que influyen en la asincronía, ellos 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.

1.4.3.2.2. Etapas de la embriogénesis somática indirecta

Inducción: en esta fase la célula aislada por continuas divisiones, forma agregados celulares embriogénicos, con la presencia de una auxina en el medio de cultivo; esta etapa representa la transición de células somáticas ($2n$ cromosomas) en células embriogénicas capaces de producir embriones somáticos. Es la fase más importante del proceso, a la vez más difícil y menos conocida (Von, 2002).

Es importante mencionar que entre más joven sea el tejido utilizado, más fácil será desviarlo de su programa genético, para así obtener la dediferenciación hacia la formación de embriogénesis somática. Esta etapa se realiza en oscuridad porque la luz es un factor de diferenciación que se opone a la formación de células juveniles. Sin embargo, la respuesta embriogénica del callo depende también del genotipo de la planta (Roca, 1993), y por eso se presenta una de las mayores dificultades para establecer un proceso de embriogénesis somática, aplicable a todos los genotipos, y que sea reproducible (Girón, 1998; Pérez, 1998).

Es usualmente fácil, distinguir entre callo embriogénico y no embriogénico, basado en su morfología y color, el callo embriogénico es de color blanco amarillento, compacto, con estructuras nodulares y crecimiento lento; mientras que el no embriogénico es de color amarillo- café, translúcido, húmedo, rugoso, cristalino y de apariencia no organizada (Hussein, 2006; Von, 2002).

Proliferación del callo: uno de los más poderosos aspectos de la embriogénesis somática que permite su aplicación en la propagación masiva y la transferencia de

genes, es la habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas especies de plantas a proliferar o multiplicarse indefinidamente. El factor más fuerte asociado con la continua proliferación de las células embriogénicas es la auxina. Sin embargo, parece ser que el efecto de esta fitohormona, no puede ser considerado independiente a la reducción de la concentración de nitrógeno, existiendo una fuerte evidencia de la interacción entre ambos (Pérez, 1998).

Diferenciación y desarrollo de embriones somáticos: en esta etapa, las masas de células proembriogénicas, se diferencian y forman embriones somáticos, mediante una división y diferenciación celular. Estos embriones inicialmente se manifiestan en estado globular, luego en estado corazón y finalmente en estado torpedo. En la mayoría de las plantas esta fase es estimulada por una disminución de la concentración de auxina en el medio (Barreto, 2003).

Halperin y Welherell (1965), caracterizaron el “choque auxínico”, como el estímulo decisivo de la embriogénesis somática (Girón, 1998). Uno de los eventos más importantes que ocurre durante el desarrollo de los embriones, es la diferenciación de meristemos radicales y apicales (Hussein, 2006).

Maduración y germinación: La etapa de maduración es un período de transición entre las fases de desarrollo y de germinación del embrión, para lo cual participan un grupo de genes distintos. Durante esta fase, se da la acumulación de reservas de proteínas, glúcidos, lípidos y se realiza la desecación (Parrot, 1993); además de ocurrir el proceso de alargamiento celular sin división (Pérez, 1998). Durante la maduración los embriones somáticos se someten a varios cambios morfológicos y bioquímicos (Parrot, 1993).

Por otra parte, los niveles elevados de nutrientes obtenidos a través de diferentes factores como: volumen del medio, frecuente transferencia de los embriones a cultivos nuevos, etc., han incrementado el tamaño, el contenido total de proteínas de los embriones, y han mejorado la conversión de éstos a plantas (Girón, 1998).

Seguidamente, el proceso de alargamiento continúa y se produce una reactivación metabólica del embrión somático maduro, para convertirse en una

plántula. Para que esto suceda, se requiere estímulos de luz y la presencia de ácido giberélico o citocininas (Barreto, 2003).

Por lo que si embriones jóvenes, no son transferidos a un medio con baja concentración o sin presencia de auxinas, después de la inducción de embriogénesis, éstos no madurarán adecuadamente y generarán embriogénesis secundaria (Manzanilla, 2004).

En términos de nutrición, es fundamental tener en cuenta los suplementos del medio de cultivo como las auxinas, los carbohidratos, el nitrógeno y el ácido abscísico (Frenando & Gamage, 2000).

McKersie y Bowley (1996), encontraron que la adición de prolina como suplemento del medio de cultivo, favorece el número de embriones en estados avanzados y el tamaño de los embriones; por otro lado, la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo se garantiza con la adición de nitratos, amonios, aminoácidos y caseína hidrolizada.

Perera, Vidhanaarachchi, Gunathilake, Yakandawala, Hoher, Verdeil & Weerakoon (2009), utilizaron BAP (5 μM), en conjunto con 2ip (5 μM), en el medio de cultivo durante esta etapa, logrando aproximadamente un 85% de conversión de embriones de coco. Estos autores mostraron, además, que la inclusión de ácido giberélico (0,45 μM) al medio de cultivo, fomentó considerablemente la maduración de embriones.

Según Nolan & Ho (1988), la presencia de GA_3 en el medio aparentemente induce la expresión temprana de genes involucrados en el proceso de germinación. El GA_3 aumenta cinco veces la frecuencia de maduración y regeneración de plantas a partir de los callos completos. Sin embargo, la presencia de esta hormona no tendrá efecto en el porcentaje de germinación de embriones somáticos aislados.

La adición de hidrolizado de caseína en el medio MS, permite duplicar el número de plantas regeneradas. El digesto de caseína probablemente completa los requerimientos en aminoácidos para la síntesis de proteínas y el metabolismo hormonal, normalmente provisto por el endosperma como ocurre en la germinación

de los embriones (Frenando & Gamage, 2000). En la figura 6 se detalla las etapas de embriogénesis somática en zanahoria.

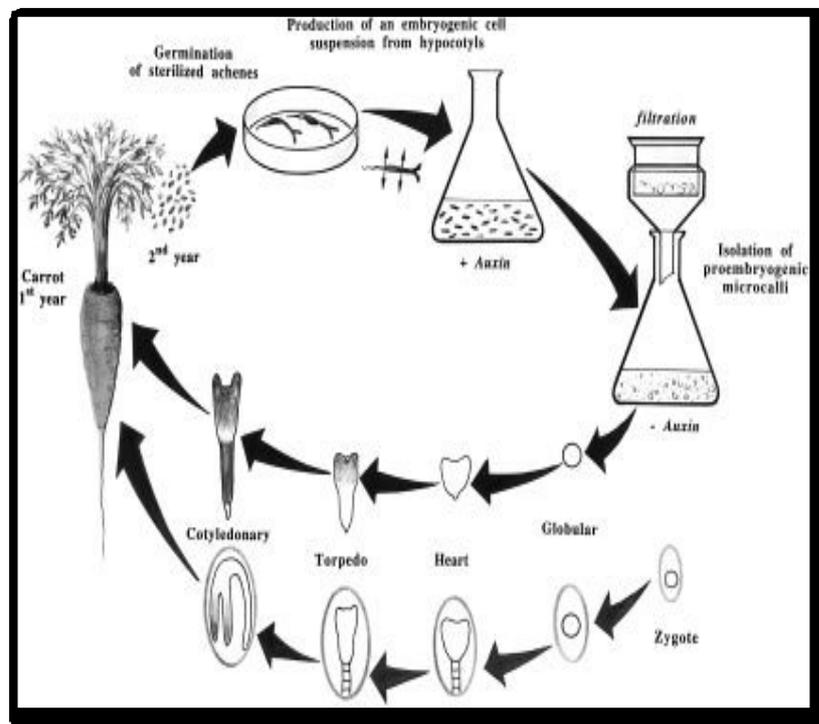


Figura 6. Embriogénesis somática en zanahoria (*Daucus carota*) (Yeung *et al.*, 1996).

1.4.4. Suspensiones celulares embriogénicas

El cultivo de células en suspensión, consiste en un conjunto de células aisladas, así como de agregados celulares (2 a 100 células), que se encuentran distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento; este sistema de cultivo, es un poderoso implemento para llevar a cabo estudios sobre la inducción de la embriogénesis somática, crecimiento y diferenciación (Parrot, 1993).

Las suspensiones celulares se obtienen transfiriendo segmentos de callo, generalmente friables, a un medio líquido, con agitación mecánica para liberar las células del inóculo inicial (Baran & Ghosh, 2005).

Según Abdelnour & Escalant (1994), el cultivo de células en suspensión necesita una cantidad inicial de callo, se puede establecer aproximadamente entre uno a veinte gramos de callo por cada 50 ml; luego de 10 a 14 días se generará la

suspensión celular, por otro lado la agitación tiene el propósito de romper los agregados celulares, mantener una distribución uniforme de las células y ayudar al intercambio gaseoso para suministrar oxígeno a las células que se encuentran en el medio líquido.

La velocidad de agitación adecuada varía en un rango entre 60 r.p.m. a 150 r.p.m., con un radio de dos a cuatro centímetros. La elección correcta de la agitación dependerá del cultivo celular, del medio de cultivo, del tipo de recipiente a usar y del volumen (Chawla, 2002).

Otro método para disgregar el callo es la utilización de enzimas pectinasas, las cuales pueden romper las paredes exteriores de las células vegetales. Las pectinasas, a bajas concentraciones, logran romper los agregados puesto que la pectina intracelular se disuelve (Dodds & Lorin, 1995).

Cuando la suspensión celular, ha alcanzado una densidad adecuada, se remueve parte del callo que no se ha disgregado, por medio de una filtración o trasvasando solo la suspensión de un recipiente a otro. Una suspensión celular ideal está caracterizada por una homogeneidad morfológica y bioquímica. El tamaño promedio de las células en suspensión oscila entre 25 μm y 475 μm dependiendo de su morfología; sin embargo, un mantenimiento largo de la suspensión celular muestra una diversidad genética en las poblaciones celulares que usualmente es resultado del cambio en el número o la morfología de los cromosomas (Trejo & Rodríguez, 2007).

1.4.5. Cinética de crecimiento celular

La cinética de crecimiento celular, es una curva que se obtiene haciendo un recuento del número de células en suspensión con respecto al tiempo. Es importante conocer esta curva para establecer los momentos apropiados en que es necesario un cambio de medio o un subcultivo para que las células continúen con sus procesos fisiológicos normales.

Un cultivo de células tiene cinco fases de crecimiento, las cuales se muestran en la figura 7 y son: fase de retraso, fase exponencial, fase lineal, fase de desaceleración progresiva y fase estacionaria.

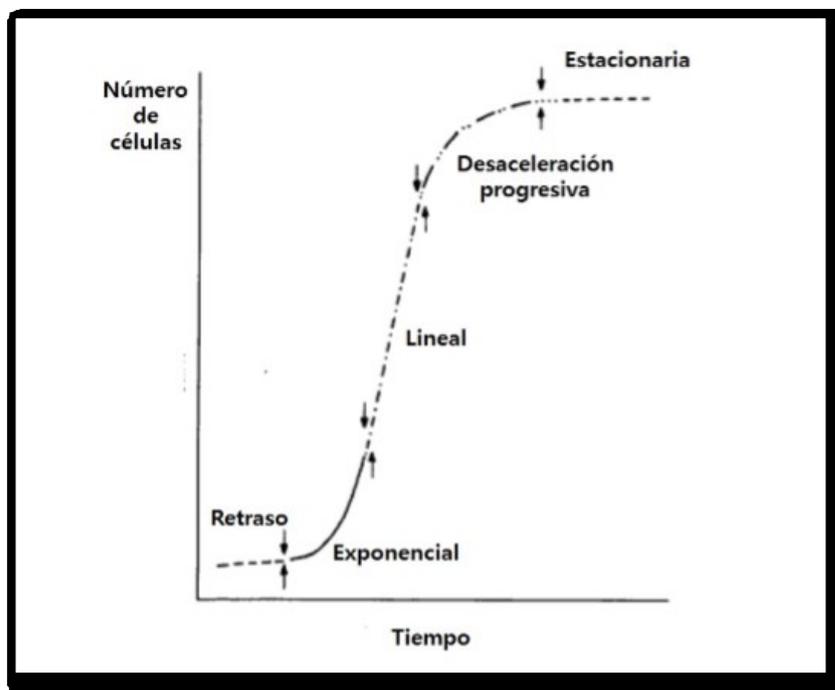


Figura 7. Curva de crecimiento celular típica (Roca & Mroginski, 1993).

Para mantener las suspensiones celulares es necesario subcultivarlas, es decir, adicionarles medio de cultivo, debido a que el crecimiento y el metabolismo de las células en suspensiones agotan al menos uno de los componentes del medio. Roca & Mroginski (1993), sugieren que para los primeros subcultivos se debe utilizar una tasa de dilución baja; el incremento de células es equivalente a que todas las células del inóculo se dividan en cuatro o seis veces, por lo que el tiempo de incubación del subcultivo puede ser entre 21 a 28 días.

1.4.5.1. Métodos para medir el crecimiento celular

Conteo de células

Es un parámetro de crecimiento, en el cual se toma una pequeña muestra de la suspensión celular y se la transfiere a una cámara de Neubauer o hematocitómetro (figura 8), que es un dispositivo con señales que determinan un volumen conocido en microlitros; luego de realizar el recuento bajo el microscopio y determinar el número

de células presentes en el volumen dado, se calcula la densidad de células en la suspensión de origen (Lugo, 2004).

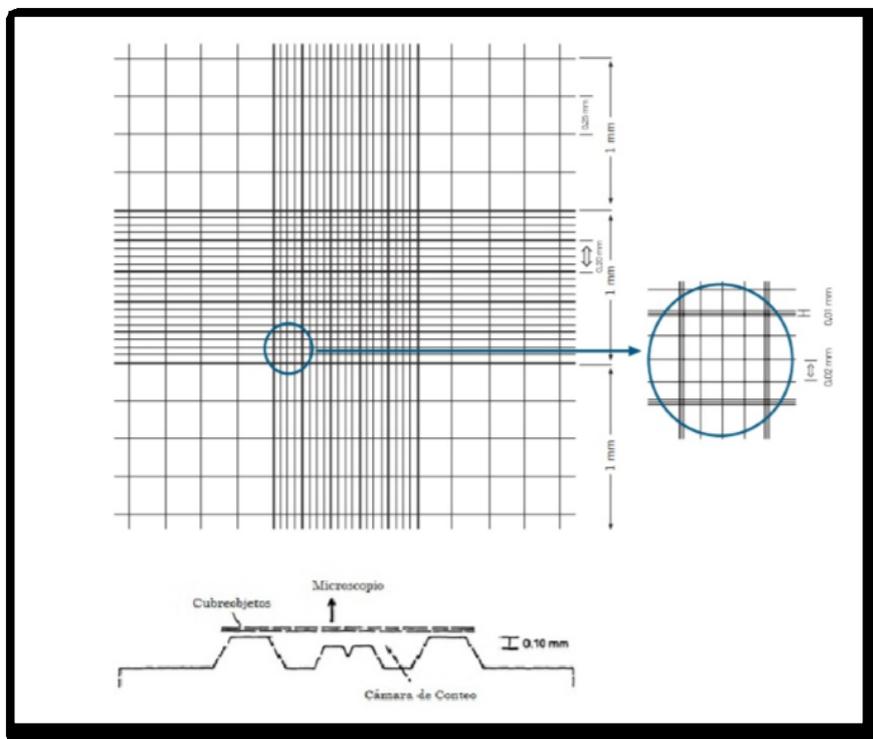


Figura 8. Diagrama de la cámara de Neubauer (Lugo, 2004).

Volumen celular

En esta técnica, se coloca un volumen conocido de suspensión en un tubo cónico graduado y se centrifuga durante tres minutos a 200 rpm. El material sedimentado son células y la concentración resultante (crecimiento celular) se expresa en mililitros de células por mililitro del medio (Lugo, 2004).

Peso fresco

Se pasa un volumen conocido de suspensión celular por un filtro previamente pesado. Este es lavado con agua destilada estéril, se filtra al vacío y se pesa. En esta técnica el crecimiento celular se expresa en gramos de peso fresco por mililitro de medio (Trejo & Rodríguez, 2007).

Peso seco

Es el mismo procedimiento que el peso fresco, pero después de pasar por el filtro, la suspensión se seca a 60°C durante 24 horas y se pesa; este método no se utiliza para cantidades pequeñas de suspensión celular (Trejo &Rodríguez, 2007).

Turbidez

En esta técnica se mide la turbidez con ayuda de un espectrofotómetro con filtro y longitud de onda de 400 nm a 465 nm; el crecimiento celular se expresa en gramos por mililitro (Trejo &Rodríguez, 2007).

1.5. Hipótesis de investigación

La aplicación de ácido giberélico y suplementos de nitrógeno como agua de coco y caseína hidrolizada, favorecen en forma significativa la maduración de embriones somáticos en una suspensión celular de la especie *Parajubaea cocoides* Burret.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

El trabajo de tesis, fue ejecutado por Esthela Encalada, con la dirección del Ing. Cristian Peña Pontón, codirección de la M.Sc. Grace Tatiana Páez Barrera y la Ing. María José Basantes, Jefa del Laboratorio de Micropropagación de la UEP.

2.2. Zona de estudio

Este trabajo de investigación, se realizó en el Laboratorio de Micropropagación de la Empresa Publica Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas (EPMMOP), localizado en el Vivero Municipal de Cununyacu, ubicado en la Provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia Cumbayà, sector Cununyacu en la 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: 2303 m.s.n.m.

2.3. Período de tiempo de investigación

El proyecto de tesis se desarrolló entre los meses de junio del 2013 y marzo del 2014.

2.4. Procedimiento

2.4.1. Etapa de validación del proyecto

2.4.1.1. Fase de campo

Se trabajó con plantas madre de palma coco cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret), de las cuales se recolectó las semillas, que deben tener un tamaño aproximado de 4 cm de diámetro y presentan una coloración verde oscuro, las

mismas que fueron transportadas en fundas ziploc desde el lugar de recolección en la parroquia de Sangolquí del Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha en la Hacienda “Las Magnolias”.



Figura 9. Palmas coco cumbé (*Parajubaea cocoides* Burret) y su fruto recolectado en la hacienda (Encalada, 2014).

Posteriormente fueron trasladadas hacia el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Unidad de Espacio Público (UEP) de la Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas (EPMOP).

Finalmente, en el laboratorio se procedió a separar el mesocarpio del endocarpio, y dentro de este el endospermo que contiene el embrión inmaduro, el cual se mantuvo en refrigeración a 4 °C, hasta su posterior desinfección y escisión en las siguientes 24 horas.

2.4.1.2. Fase de laboratorio

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



Figura 10. Desinfección de los endospermos (Encalada, 2014).

Según Sánchez (2013), los tratamientos se deben realizar en el Medio Basal de Murashige & Skoog (1962) modificado con (1 mg L^{-1}) de tiamina, sus macro y micro nutrientes en un reactivo en polvo y sus vitaminas en una solución. Se adicionó al medio 60 mg L^{-1} 2,4 D, 1 g L^{-1} carbón activado, 30 g L^{-1} de azúcar y 7 g L^{-1} de agar.

Previa la adición del agar, el pH de los medios de cultivo, se ajustó en un rango de 5.79-5.81, los medios fueron esterilizados a 121°C por 15 minutos en la autoclave, finalmente los embriones inmaduros fueron sembrados en tubos con 15 ml de medio de cultivo en posición horizontal en la cámara de flujo laminar y fueron incubados en la oscuridad por 18 semanas, con subcultivos cada 6 semanas (figura 11). Inicialmente se sembraron 90 embriones, para verificar los resultados obtenidos por Sánchez (2013), después, se procedió a sembrar 500 embriones. Se evaluó la formación de callo embriogénico y la contaminación.

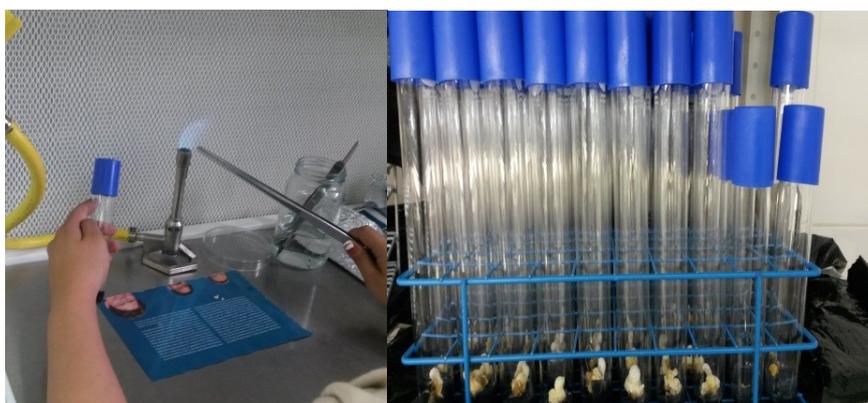


Figura 11. Siembra de los embriones e incubación en la oscuridad (Encalada, 2014).

2.4.2. Etapa actual del proyecto

2.4.2.1. Establecimiento de las suspensiones celulares

Después de 18 semanas de la siembra, se observó el apareamiento de estructuras embrionarias en los callos, con este material vegetal se procedió a establecer las suspensiones.

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

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

Tabla 3

Tratamientos para el establecimiento de las suspensiones (Encalada, 2014).

Tratamientos	GA ₃ (mg L ⁻¹)	Fuente de nitrógeno
C1	1.5	Agua de coco (35 ml)
C2	3	Agua de coco (35 ml)
C3	1.5	Caseína hidrolizada (200 mg L ⁻¹)
C4	3	Caseína hidrolizada (200 mg L ⁻¹)

El pH de los medios de cultivo, se ajustó en un rango de 5.79-5.81; los medios de cultivo fueron esterilizados a 121 °C por 15 minutos en la autoclave, posteriormente en cámara se agregó GA₃ en dos concentraciones, esterilizado en un filtro de jeringa Minisart de 0.1 - 5 µm, y se dispensó el medio de cultivo. Finalmente, se mantuvo en agitación orbital permanente a 110 rpm incubado a una temperatura de 25°C ± 2°C (figura 12).

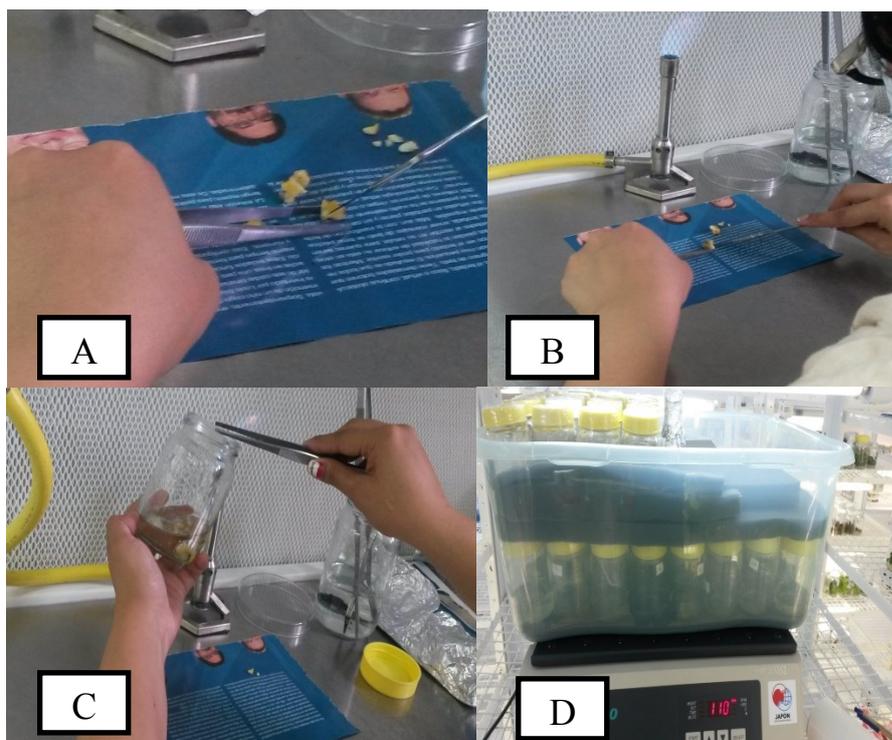


Figura 12. Establecimiento de las suspensiones (A) Disgregación del callo, (B) Eliminación de callo no friable, (C) Siembra de los pedazos de callo en el medio líquido, (D) Incubación de las suspensiones en un agitador (Encalada, 2014).

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

Se tomó 2 ml de la suspensión celular con una jeringa estéril, colocando la muestra en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer, dejando que penetre entre la cámara y el cubreobjetos por capilaridad, tratando que la muestra entre de forma uniforme a la cámara, evitando la formación de burbujas (figura 13).

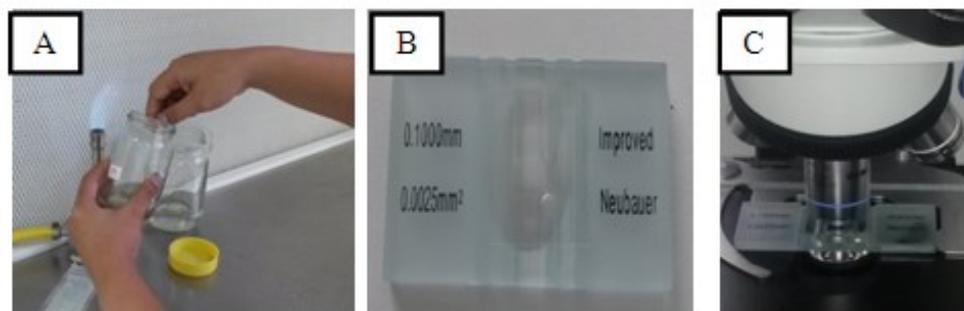


Figura 13. Conteo celular (A) Toma de la muestra de la suspensión, (B) Cámara de Neubauer cargada con la muestra, (C) Conteo en la cámara de Neubauer (Encalada, 2014).

Posteriormente se contó las células ubicadas en los cinco cuadrados grandes de la cámara de Neubauer, como se muestra en la figura 14, luego se aplicó la fórmula para el recuento con cuadros grandes en cámara de Neubauer:

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

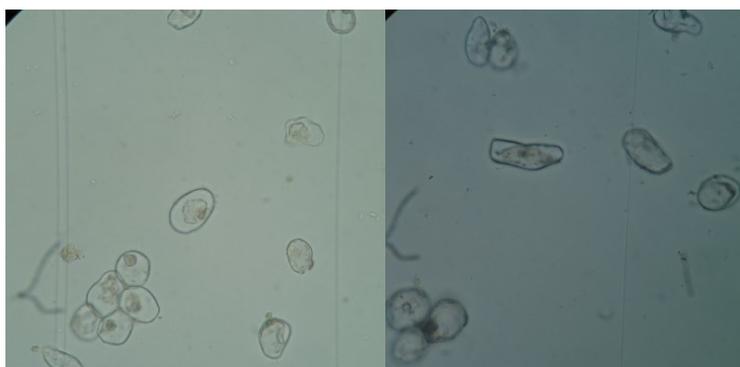


Figura 14. Recuento celular de las suspensiones (Encalada, 2014).

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

Es indispensable, determinar la cinética celular, para poder identificar el momento donde las células han agotado uno o todos los componentes del medio, necesitando por tanto de medio de cultivo fresco para continuar sus procesos fisiológicos normales.

2.4.2.2. Maduración de embriones somáticos

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

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

Se estableció cinco tratamientos para la maduración embrionaria, donde se evaluó dos concentraciones de ácido giberélico de 1.5 y 3 mg L^{-1} , combinados con 35 ml de agua de coco y 200 mg L^{-1} de caseína hidrolizada como fuentes de nitrógeno. Tomando en cuenta que existió un tratamiento testigo sin ácido giberélico y sin fuentes de nitrógeno (tabla 4).

Tabla 4

Tratamientos para la maduración de embriones (Encalada, 2014).

Tratamientos	GA ₃ (mg L ⁻¹)	Fuente de nitrógeno
M1	1.5	Agua de coco (35 ml)
M2	3	Agua de coco (35 ml)
M3	1.5	Caseína hidrolizada (200 mg L ⁻¹)
M4	3	Caseína hidrolizada (200 mg L ⁻¹)
Control	-	-

El pH de los medios de cultivo, se ajustó en un rango de 5.79-5.81; los medios de cultivo fueron esterilizados a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos en la autoclave, posteriormente en cámara se agregó GA₃ en dos concentraciones, esterilizado en un filtro de jeringa Minisart de $0.1 - 5 \text{ }\mu\text{m}$, y se dispensó el medio de cultivo.

Las variables que se evaluaron fueron:

Tiempo de la etapa de maduración: se observó y se identificó a las 12 semanas la aparición de embriones en los diferentes estadios de desarrollo.

Capacidad embriogénica: en los tratamientos que contenían 1.5 - 3 mg L⁻¹ de GA₃ y 200 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada, se observó la presencia de embriones en fase cotiledonar. Se realizó un recuento total de los embriones en cada uno de los tratamientos, y se los relaciono con el número de embriones en cada estadio, para de esta manera obtener los porcentajes de formación embrionaria en cada etapa, principalmente en la fase cotiledonar.

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

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

2.4.2.3. Fase de identificación embrionaria

A las 12 semanas de cultivo, se realizó la caracterización morfológica de los embriones somáticos obtenidos, se colocó un gramo de callo embriogénico de cada tratamiento dentro de una caja Petri procurando disgregarlo, facilitando el conteo de los embriones en sus diferentes estadios. Finalmente se colocó la caja Petri con los embriones sobre un microscopio estereoscopio para la identificación y conteo; las fotos se tomaron con una cámara digital HD (figura 15).

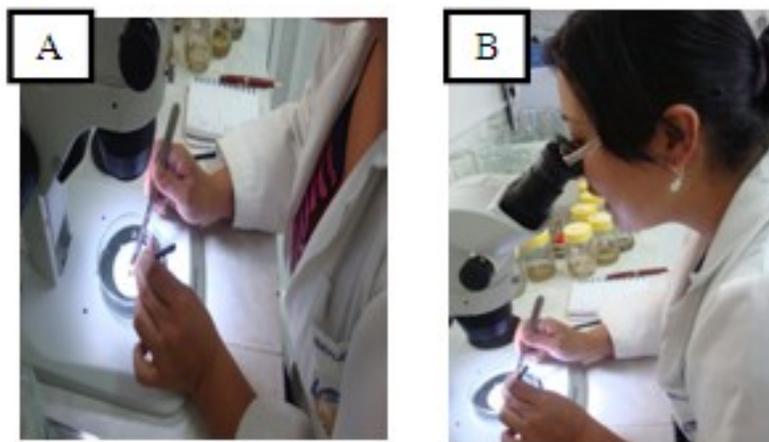


Figura 15. Identificación embrionaria (A) Disgregación de los embriones, (B) Conteo de los embriones (Encalada, 2014).

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

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Desinfección

En la validación de la desinfección se procedió a sembrar 15 embriones, tomando en cuenta que se repitió el procedimiento seis veces, es decir en total se obtuvieron 90 embriones sembrados, de los cuales solo uno se contaminó. Logrando un porcentaje de contaminación del 1,11%, por lo tanto la sobrevivencia de los embriones fue de 98,89% (figura 16).

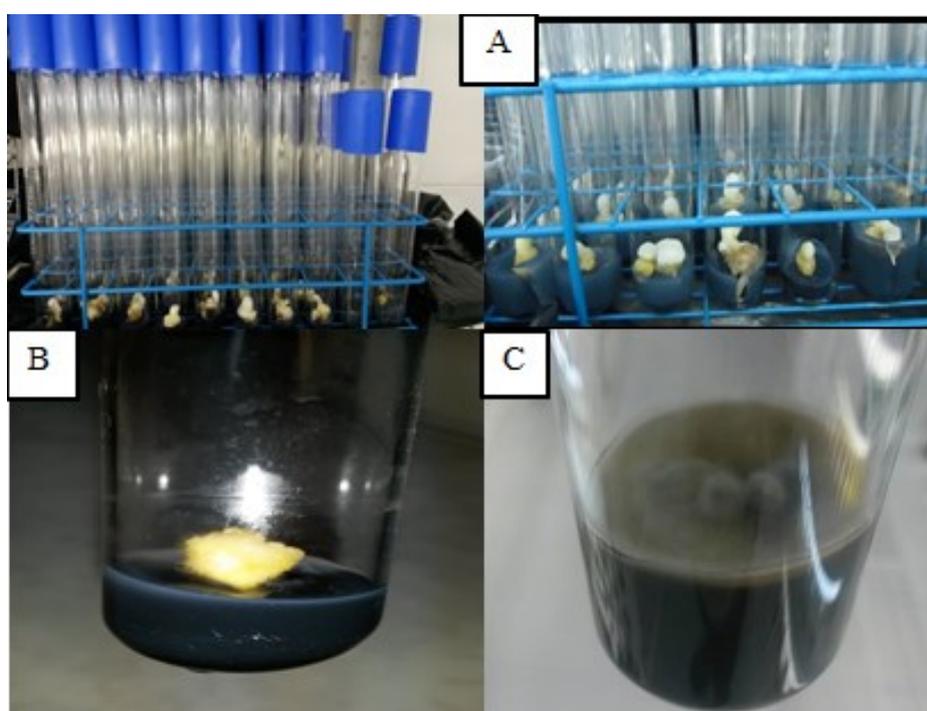


Figura 16. Desinfección (A) Embriones sembrados después de la desinfección, (B) Explante sin contaminación, (C) Explante contaminado (Encalada, 2014).

3.2. Establecimiento e inducción de callos embriogénicos

Se observó viabilidad, pues permitió la formación de un fragmento de callo friable (coloración blanquecina amarillenta) (figura 17 B) en los 90 callos que fueron sembrados, validando y obteniendo resultados similares con el protocolo establecido por Sánchez (2013).

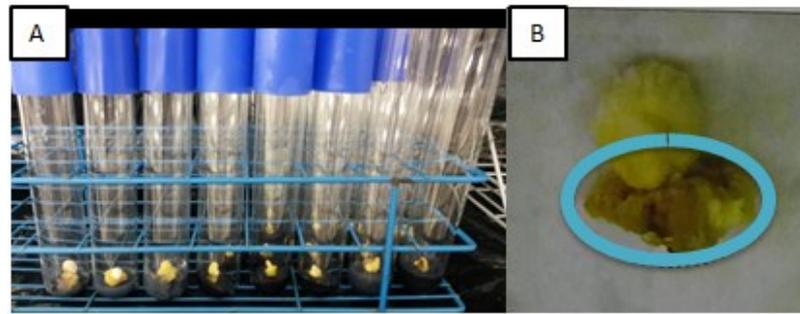


Figura 17. Formación de los callos (A) Callos sembrados, (B) Porción de callo friable (Encalada, 2014).

3.3. Suspensiones celulares

3.3.1. Establecimiento de las suspensiones celulares

Una vez transferido el callo a medio líquido se buscó el establecimiento de las suspensiones celulares, donde las células se adaptan a las nuevas condiciones, es decir a un medio líquido y agitación constante.

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

Como se mencionó anteriormente, existen cinco fases de crecimiento celular, las cuales se muestran en la figura 7 y son: fase de retraso, fase exponencial, fase lineal, fase de desaceleración progresiva y fase estacionaria. A continuación se muestra una de las fases observadas con la ayuda de la cámara de Neubauer (figura 18).

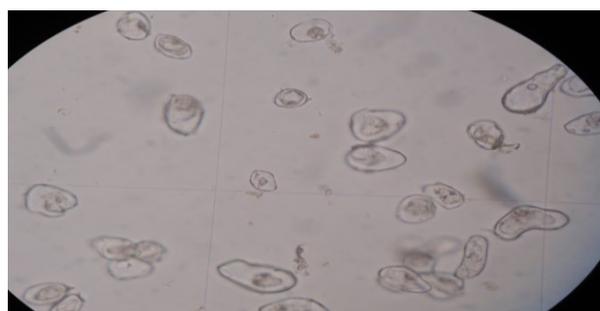


Figura 18. Conteo celular en *Parajubaea cocoides* Burret en la fase lineal (Encalada, 2014).

Con los datos obtenidos del conteo celular, se logró obtener la curva de la cinética celular de las cuatro suspensiones, en las figuras 19, 21, 23 y 25, se representa gráficamente la cinética celular para cada una de las suspensiones.

Como apreciamos en la figura 19, la curva cinética de la suspensión celular uno muestra un retraso en su etapa inicial hasta el día cuatro, con un aumento mínimo de la población, posteriormente se observa un aumento celular considerable hasta el día 16, luego el crecimiento es menor hasta el día 22, y a partir del día 25 se nota que empieza a bajar su densidad.

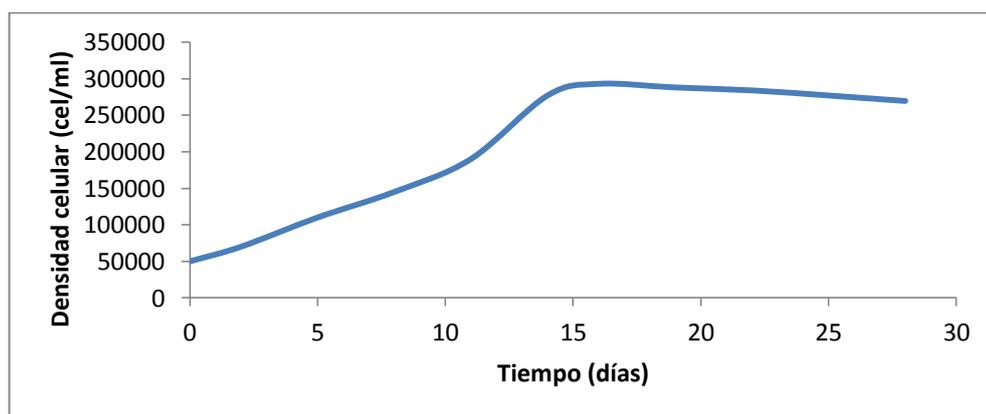


Figura 19. Curva de la cinética celular para la suspensión uno (Encalada, 2014).

Fruto del análisis de regresión, con ayuda del programa CurveExpert 2.4.0, se obtiene la ecuación interpolante de la suspensión, la cual es de tercer grado con un coeficiente de correlación de 0.999 y su representación gráfica se muestra en la figura 20.

$$y = 4,4407x10^4 + 1,1643x10^4 X + 5,5285x10^2 X^2 - 24,972X^3$$

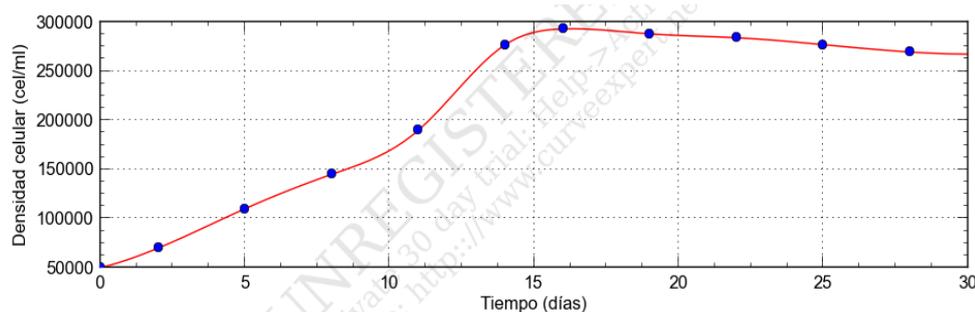


Figura 20. Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión uno (Encalada, 2014).

Donde x en la ecuación es el tiempo, mientras que, y es la densidad celular. Por ende podemos determinar la densidad celular máxima, al reemplazar el valor de x en la ecuación, corroborando lo observado en la figura 20, de la siguiente forma:

$$y_{max} = 4,4407x10^4 + 1,1643x10^4 (16) + 5,5285x10^2(16)^2 - 24,972(16)^3$$

$$y_{max} = 4,4407x10^4 + 186288 + 1,415296x10^5 - 102285,312$$

$$y_{max} = 293000 \text{ cel/ml}$$

En la figura 21, que representa la suspensión dos, se observa que hay un aumento del número de células desde el primer día con una curva creciente moderada hasta el día 5, luego hay un incremento acelerado de células hasta el día 16. A partir del día 17 hasta el 25, empieza a desacelerarse el incremento del número de células y para el día 28 se observa una disminución notoria en la densidad celular.

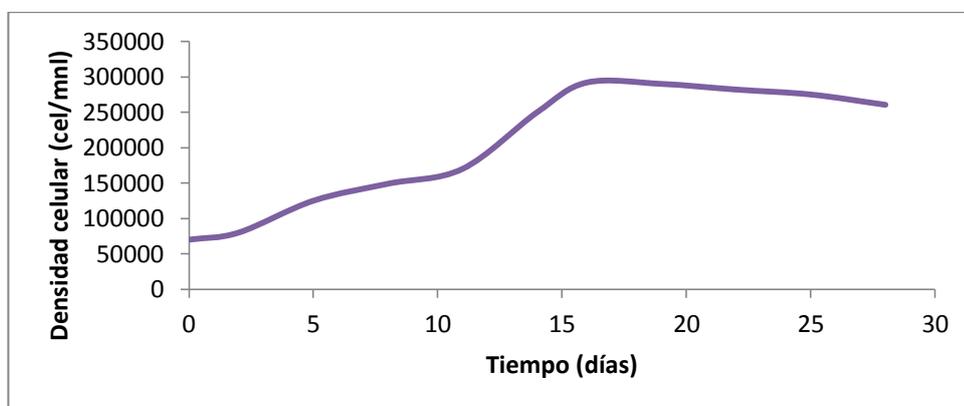


Figura 21. Curva de la cinética celular para la suspensión dos (Encalada, 2014).

El análisis de regresión realizado con el programa CurveExpert 2.4.0, genera una ecuación interpolante de la suspensión dos de tercer grado con un coeficiente de correlación de 0.992, y su representación gráfica se muestra en la figura 22.

$$y = 6,8250x10^4 + 5,6191x10^3 X + 9,068x10^2 X^2 - 31,267X^3$$

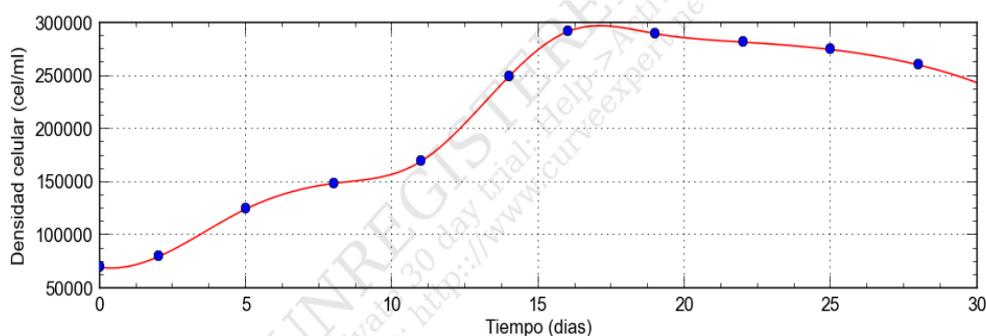


Figura 22. Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión dos (Encalada, 2014).

Donde x en la ecuación es el tiempo, mientras que y es la densidad celular. Por ende podemos determinar la densidad celular máxima, al reemplazar el valor de x en la ecuación, corroborando lo observado en la figura 22, de la siguiente forma:

$$y_{max} = 6,8250 \times 10^4 + 5,6191 \times 10^3 (16) + 9,068 \times 10^2 (16)^2 - 31,267 (16)^3$$

$$y_{max} = 6,8250 \times 10^4 + 89905,6 + 2,321408 \times 10^5 - 128069,632$$

$$y_{max} = 292000 \text{ cel/ml}$$

En la figura 23, que representa la suspensión tres, se observa que hay un aumento del número de células con una curva creciente moderada hasta el día 8, luego hay un incremento acelerado de células hasta el día 22. A partir del día 25, empieza a desacelerarse el incremento del número de células y para el día 28, se observa una disminución en la densidad celular.

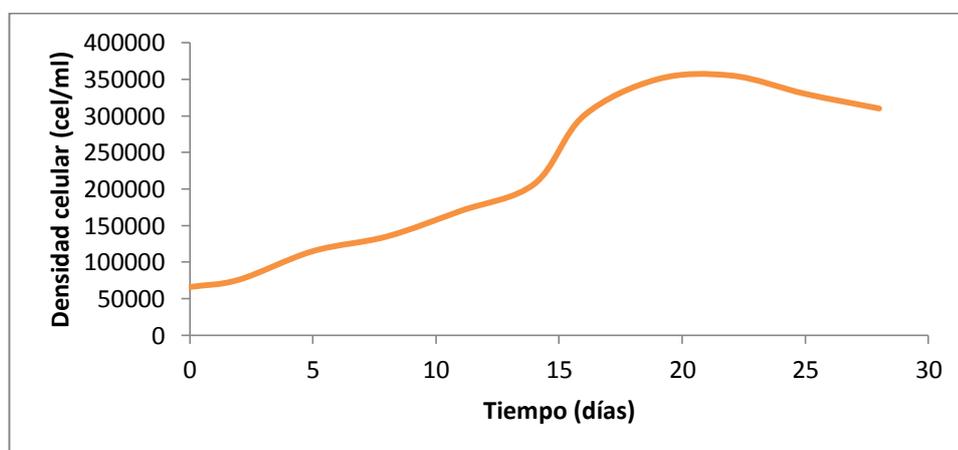


Figura 23. Curva de la cinética celular para la suspensión tres (Encalada, 2014).

El análisis de regresión nos permitió obtener una ecuación interpolante de la suspensión tres, la cual es de tercer grado con un coeficiente de correlación de 0.996, y su representación gráfica se muestra en la figura 24.

$$y = 7,6384x10^4 - 5,7221x10^3X + 2,0345x10^3X^2 - 54,909X^3$$

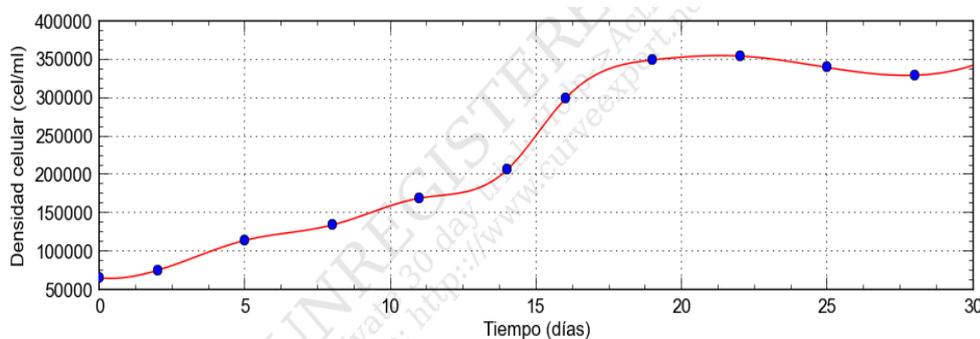


Figura 24. Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión tres (Encalada, 2013).

Donde x en la ecuación es el tiempo, mientras que, y es la densidad celular. Por ende podemos determinar la densidad celular máxima, al reemplazar el valor de x en la ecuación, corroborando lo observado en la figura 24, de la siguiente forma:

$$y_{max} = 7,6384x10^4 - 5,7221x10^3(22) + 2,0345x10^3(22)^2 - 54,909(22)^3$$

$$y_{max} = 7,6384x10^4 - 1,258862x10^5 + 9,84698x10^5 - 584671,032$$

$$y_{max} = 355000 \text{ cel/ml}$$

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

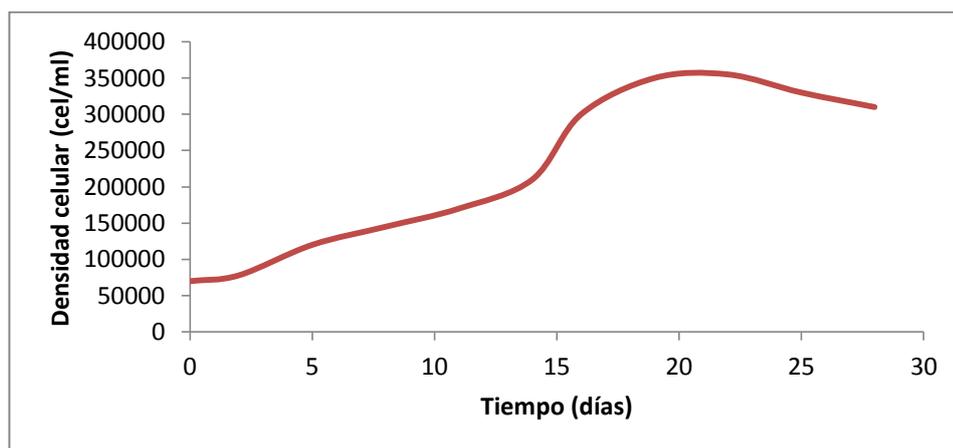


Figura 25. Curva de la cinética celular para la suspensión cuatro (Encalada, 2014).

El análisis de regresión nos permitió obtener una ecuación interpolante de la suspensión cuatro de tercer grado con un coeficiente de correlación de 0.997, y su representación gráfica se muestra en la figura 26.

$$y = 7,9363x10^4 - 4,8471x10^3X + 1,9373x10^3X^2 - 52,659X^3$$

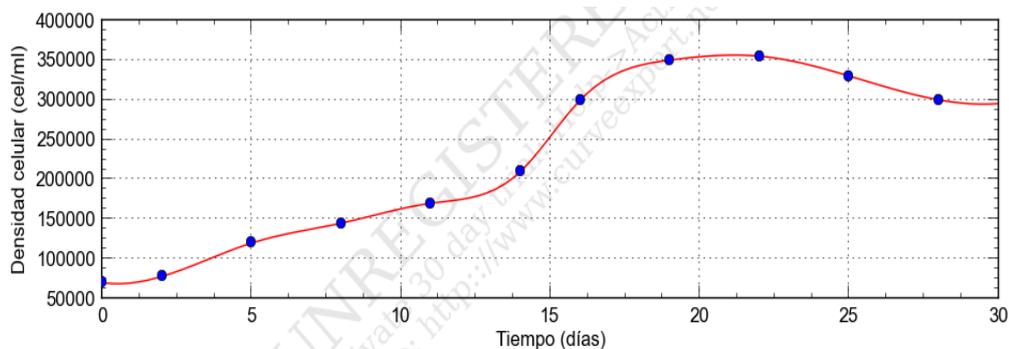


Figura 26. Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión cuatro (Encalada, 2014).

Donde x en la ecuación es el tiempo, mientras que, y es la densidad celular. Por ende podemos determinar la densidad celular máxima, al reemplazar el valor de x en la ecuación, corroborando lo observado en la figura 26, de la siguiente forma:

$$y_{max} = 7,9363x10^4 - 4,8471x10^3(22) + 1,9373x10^3(22)^2 - 52,659(22)^3$$

$$y_{max} = 7,9363x10^4 - 1,066362x10^5 + 9,376532x10^5 - 560713,032$$

$$y_{max} = 355000 \text{ cel/ml}$$

Por lo tanto, según lo observado en las figuras 19 y 21, que corresponden a la suspensión uno (1.5 mg L^{-1} de ácido giberélico y 35 ml de agua de coco), y a la

suspensión dos (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico y 35 ml de agua de coco), se puede establecer que a los 16 días, comienza el decrecimiento celular y por ende se realizó el cambio de medio, mientras que para la suspensión tres (1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico y 200 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada), y la suspensión cuatro (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico y 200 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada), se realizó el cambio de medio a los 22 días, como se puede observar en las figuras 23 y 25 respectivamente.

Mediante un análisis de varianza paramétrica, para el efecto de la mejor suspensión en relación a la cantidad de células, se encontró un valor ($p < 0,0001\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de las medias de los tratamientos.

Con respecto a la prueba de LSD Fisher, se encontró tres grupos estadísticos, donde se observa que la concentración de 1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco pertenece al grupo A, y las concentración de 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco están en el grupo B, mientras que las concentraciones de 1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada pertenecen al grupo C, por lo tanto se evidencia que las suspensiones tres y cuatro, presenta la media más alta con respecto a la formación de células en relación al tiempo (tabla 5).

Tabla 5

Análisis de varianza paramétrica en la formación de células (Encalada, 2014).

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7813500000,00	3	2604500000,00	20836,00	<0,0001
Tratamiento	7813500000,00	3	2604500000,00	20836,00	<0,0001
Error	500000,00	4	125000,00		
Total	7814000000,00	7			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=981,62139					
Error: 125000,0000 gl: 4					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
C2	292000,00	2	250,00	A	
C1	293000,00	2	250,00		B
C4	355000,00	2	250,00		C
C3	355000,00	2	250,00		C

Se uso la interpolación para disminuir el grado de error, ocasionado por la temperatura, medio de cultivo, rapidez de adaptación de las células. Se logró disminuir cierto grado de error, y con la aplicación de la interpolación a partir de

valores previos es posible que ésta vaya determinando su comportamiento variable, logrando obtener una función más acorde a la realidad, y con un método que nos permite determinar la cantidad de células y el tiempo en que se obtendrán.

3.4. Maduración

Se debe especificar y mencionar que los embriones colocados en el tratamiento testigo, sin fuentes de nitrógeno y ácido giberélico se necrosaron y finalmente murieron (figura 27 A).



Figura 27. Tratamientos de maduración (A) embriones necrosados en el tratamiento testigo, (b) embriones en desarrollo (Encalada, 2014).

Para los tratamientos de maduración embrionaria, se probaron dos fuentes de nitrógeno orgánico 35 ml de agua de coco y 200 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada, combinados con dos diferentes concentraciones de ácido giberélico 1.5 y 3 mg L⁻¹ (tabla 3). Para identificar el mejor o los mejores tratamientos en lo que se refiere a la maduración o crecimiento óptimo de los embriones somáticos, se identificó las estructuras características del crecimiento embrionario en las diferentes fases de desarrollo luego de 12 semanas en suspensión. En la figura 28, se identifica los diferentes porcentajes de embriones formados en fase globular en las cuatro suspensiones empleadas, y en la figura 29, se observa un embrión en fase globular.

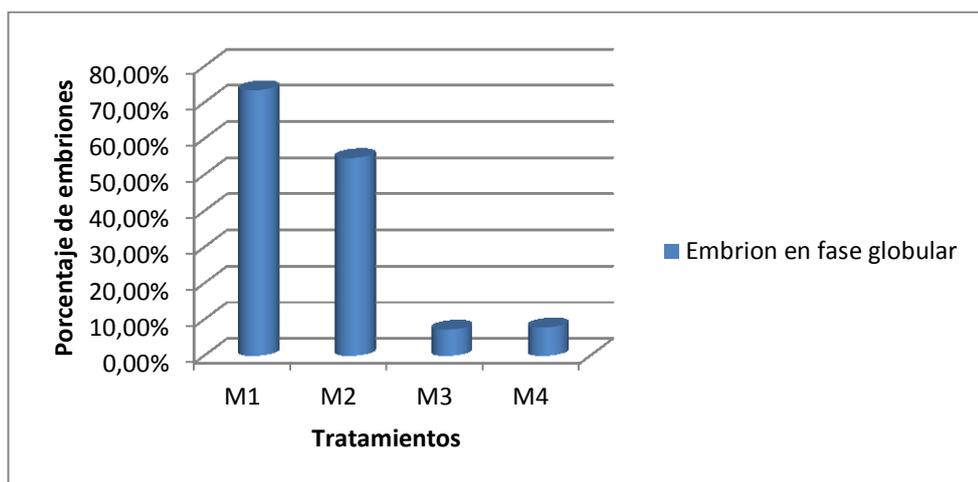


Figura 28. Porcentaje de embriones en fase globular en los cuatro tratamientos (Encalada, 2014).



Figura 29. Embriones en fase globular (Encalada, 2014).

En la tabla 6, se indica el respectivo porcentaje de formación de embriones globulares, se obtuvo mayor formación de embriones en fase globular en la suspensión uno (1.5 mg L^{-1} de ácido giberélico con agua de coco), con un 73,43%, y el menor porcentaje de formación de embriones se observó en la suspensión tres (1.5 mg L^{-1} de ácido giberélico con caseína hidrolizada), con un 7,22%.

Tabla 6

Porcentaje de formación de embriones en fase globular (Encalada, 2014).

Tratamientos	Embrión en fase globular
M1	73,43%
M2	54,66%
M3	7,22%
M4	7,84%

De acuerdo al análisis de varianza no paramétrica para el efecto de la concentración del ácido giberélico, se encontró un valor ($p < 0,0001\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de las medias de los tratamientos (tabla 7).

Tabla 7

Análisis de varianza no paramétrica de la fase globular (Encalada, 2014).

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Embriones globulares M1		10	24,60	1,96	25,00	32,26	<0,0001
Embriones globulares M2		10	21,10	1,79	21,50		
Embriones globulares M3		10	3,10	0,99	3,00		
Embriones globulares M4		10	3,80	1,03	4,00		

Con respecto a la prueba de Kruskal-Wallis (tabla 8), se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que las concentraciones de 1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada pertenecen al grupo A, y las concentraciones de 1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco están en el grupo B, por lo tanto se evidencia que la suspensión uno, presenta la media más alta con respecto a la formación de embriones en fase globular.

Tabla 8

Prueba de Kruskal-Wallis de la fase globular (Encalada, 2014).

Trat.	Ranks	
M3	8,60	A
M4	12,40	A
M2	26,40	B
M1	34,60	B

En la figura 30, se identifica los diferentes porcentajes de embriones formados en fase corazón en las cuatro suspensiones empleadas, y en la figura 31, se observa un embrión es fase corazón.

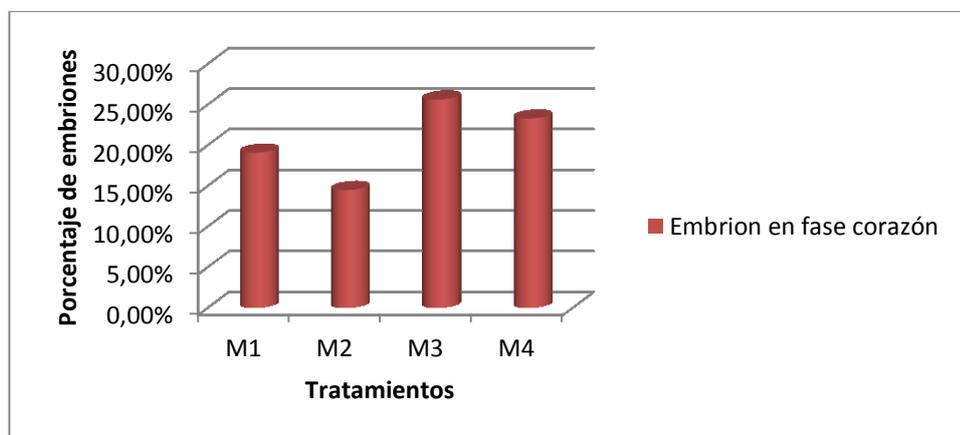


Figura 30. Porcentaje de embriones en fase corazón en los cuatro tratamientos (Encalada, 2014).



Figura 31. Embrión en fase corazón (Encalada, 2014).

En la tabla 9, se puede observar, que la mayor formación de embriones en fase corazón, se da en la suspensión dos (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), con un 25,64%, y el menor porcentaje de formación de embriones se observó en la suspensión uno (1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), con un 14,50%.

Tabla 9

Porcentaje de formación de embriones en fase corazón (Encalada, 2014).

Tratamientos	Embrión en fase corazón
M1	19,10%
M2	14,50%
M3	25,64%
M4	23,30%

De acuerdo al análisis de varianza no paramétrica para el efecto de la concentración del ácido giberélico, se encontró un valor ($p < 0,0001\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de las medias de los tratamientos (tabla 10).

Tabla 10

Análisis de varianza no paramétrica de la fase corazón (Encalada, 2014).

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Embriones corazón	M1	10	6,40	1,51	6,50	29,26	<0,0001
Embriones corazón	M2	10	5,60	1,26	5,50		
Embriones corazón	M3	10	11,10	1,52	11,50		
Embriones corazón	M4	10	11,30	1,34	11,50		

Con respecto a la prueba de Kruskal-Wallis (tabla 11), se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que las concentraciones de 1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada pertenecen al grupo B, y las concentraciones de 1.5 y 3 mg L⁻¹ con agua de coco está en el grupo A, por lo tanto se evidencia que nos existen diferencias estadísticamente significativas entre las suspensiones tres y cuatro.

Tabla 11

Prueba de Kruskal-Wallis de la fase corazón (Encalada, 2014).

Trat.	Ranks	
M2	8,90	A
M1	12,25	A
M3	30,05	B
M4	30,80	B

En la figura 32, se identifica los diferentes porcentajes de embriones formados en fase torpedo en las cuatro suspensiones empleadas, y en la figura 33, se observa un embrión en fase torpedo.

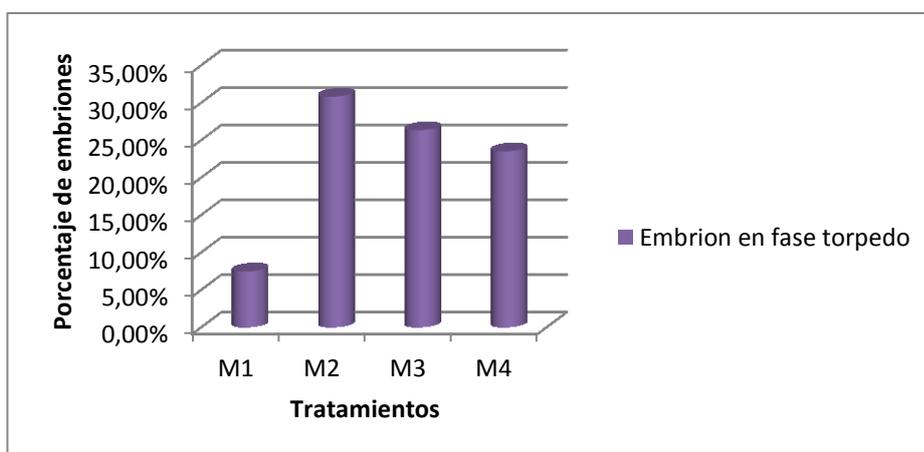


Figura 32. Porcentaje de embriones en fase torpedo en los cuatro tratamientos (Encalada, 2014).



Figura 33. Embriones en fase torpedo (Encalada, 2014).

En la tabla 12, se identificó que la mayor formación de embriones en fase torpedo, se da en la suspensión tres (1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), con un 30,82%, y el menor porcentaje de formación de embriones se observó en la suspensión uno (1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), con un 7,46%.

Tabla 12

Porcentaje de formación de embriones en fase torpedo (Encalada, 2014).

Tratamientos	Embrión en fase torpedo
M1	7,46%
M2	30,82%
M3	26,34%
M4	23,51%

De acuerdo al análisis de varianza no paramétrico para el efecto de la concentración del ácido giberélico, se encontró un valor ($p < 0,0001\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de las medias de los tratamientos (tabla 13).

Tabla 13

Análisis de varianza no paramétrica de la fase torpedo (Encalada, 2014).

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Embriones torpedo	M1	10	2,60	0,52	3,00	22,87	<0,0001
Embriones torpedo	M2	10	11,90	1,10	12,00		
Embriones torpedo	M3	10	11,30	0,95	11,00		
Embriones torpedo	M4	10	11,40	1,17	11,50		

Con respecto a la prueba de Kruskal-Wallis (tabla 14), se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que la concentración de 1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco pertenecen al grupo A, y las concentraciones de 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco junto a las concentraciones de 1.5 y 3 mg L⁻¹ con caseína hidrolizada, están en el grupo B, por lo tanto se evidencia que las

suspensiones dos, tres y cuatro, presentan la media más alta con respecto a la formación de embriones en fase torpedo.

Tabla 14

Prueba de Kruskal-Wallis de la fase torpedo (Encalada, 2014).

Trat.	Ranks	
M1	5,50	A
M3	23,65	B
M4	24,50	B
M2	28,35	B

En la figura 34, se identifica los diferentes porcentajes de embriones formados en fase cotiledonar en las cuatro suspensiones empleadas, y en la figura 35, se observa un embrión en fase cotiledonar.

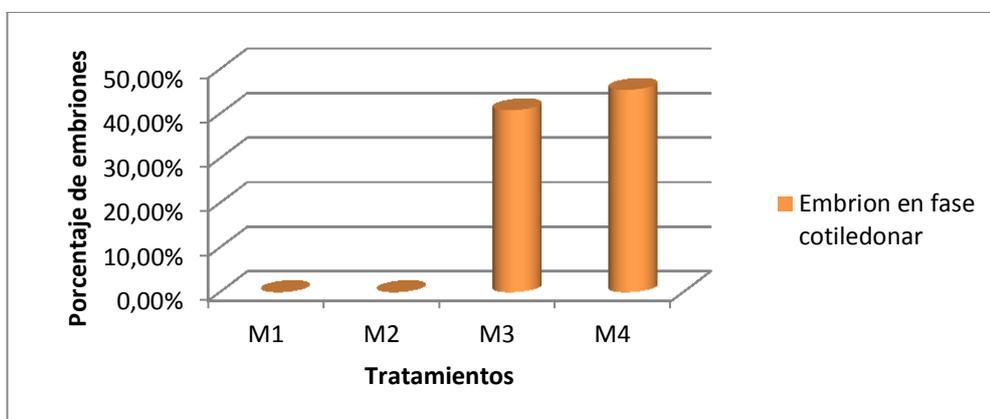


Figura 34. Porcentaje de embriones en fase cotiledonar en los cuatro tratamientos (Encalada, 2014).

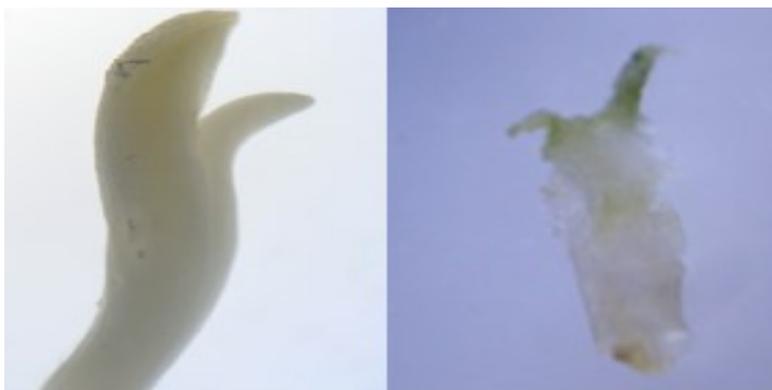


Figura 35. Embriones en fase cotiledonar (Encalada, 2014).

En la tabla 15, se identificó, que la mayor formación de embriones en fase cotiledonar se da en la suspensión cuatro (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), con un 45,36%, y no existieron embriones cotiledonares tanto para las suspensiones (1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada).

Tabla 15

Porcentaje de formación de embriones en fase cotiledonar (Encalada, 2014).

Tratamientos	Embrión en fase cotiledonar
M1	0,00%
M2	0,00%
M3	40,79%
M4	45,36%

De acuerdo al análisis de varianza no paramétrico para el efecto de la concentración del ácido giberélico, se encontró un valor ($p < 0,0001\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha = 5\%$), por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de las medias de los tratamientos (tabla 16).

Tabla 16

Análisis de varianza no paramétrica de la fase cotiledonar (Encalada, 2014).

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Embriones cotiledonares	M1	10	0,00	0,00	0,00	32,78	<0,0001
Embriones cotiledonares	M2	10	0,00	0,00	0,00		
Embriones cotiledonares	M3	10	17,50	1,35	17,50		
Embriones cotiledonares	M4	10	22,00	1,49	22,00		

Con respecto a la prueba de Kruskal-Wallis (tabla 17), se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que las concentraciones de 1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco pertenece al grupo A, y las concentraciones de 1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada, están ubicadas en el grupo B, por lo tanto se evidencia que la suspensión cuatro, presenta la media más alta con respecto a la formación de embriones en fase cotiledonar.

Tabla 17

Prueba de Kruskal-Wallis de la fase cotiledonar (Encalada, 2014).

Trat.	Ranks	
M2	10,50	A
M1	10,50	A
M3	25,60	B
M4	35,40	B

Se observó mayor presencia de embriones en fase globular en la suspensión uno (1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), seguido de la suspensión dos (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), y porcentajes menores en las suspensiones (1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada). El porcentaje de embriones en fase corazón fue mayor en la suspensión tres (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), seguido de la suspensión cuatro (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), y en menor porcentaje en las suspensiones (1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), mientras que en fase torpedo, el mayor porcentaje de formación se dio en la suspensión dos (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), seguido de las suspensiones (1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), finalmente se obtuvo porcentajes de formación de embriones en fase cotiledonar solo en las suspensiones (1.5 y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada) (figura 36).

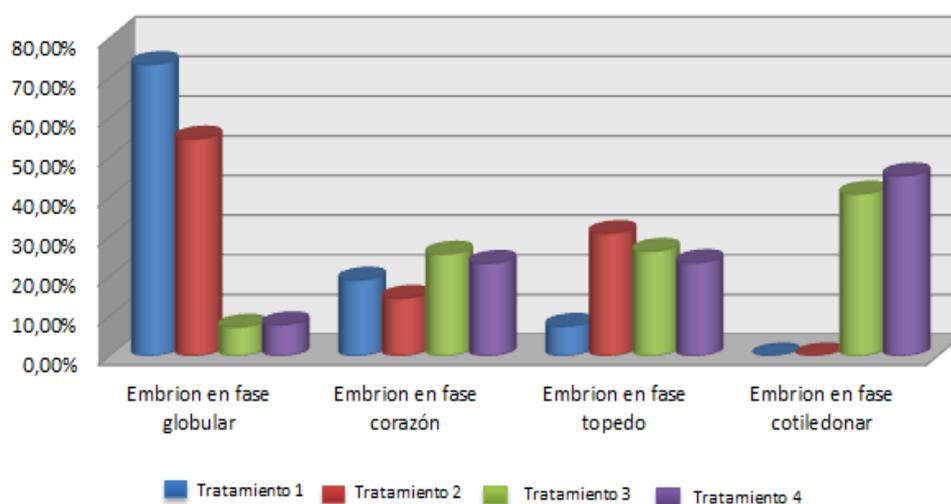


Figura 36. Porcentajes de embriones en sus distintas fases en la maduración (Encalada, 2014).

Se realizó el conteo de embriones en todas las fases encontradas a las 12 semanas (tablas 18, 19, 20 y 21), en los cuatro tratamientos.

Tabla 18

Conteo de embriones en todas las fases encontradas en la suspensión uno (Encalada, 2014).

Estado embrionario	# de embriones	Porcentaje
Globular	246	73.43%
Corazón	64	19.10 %
Torpedo	25	7.46%
Cotiledonar	0	-
TOTAL	335	

Tabla 19

Conteo de embriones en todas las fases encontradas en la suspensión dos (Encalada, 2014).

Estado embrionario	# de embriones	Porcentaje
Globular	211	54.66 %
Corazón	56	14.50 %
Torpedo	119	30.82%
Cotiledonar	0	-
TOTAL	386	

Tabla 20

Conteo de embriones en todas las fases encontradas en la suspensión tres (Encalada, 2014).

Estado embrionario	# de embriones	Porcentaje
Globular	31	7.22%
Corazón	110	25.64%
Torpedo	113	26.34%
Cotiledonar	175	40.79%
TOTAL	429	

Tabla 21

Conteo de embriones en todas las fases encontradas en la suspensión cuatro (Encalada, 2014).

Estado embrionario	# de embriones	Porcentaje
Globular	38	7.83%
Corazón	113	23.29%
Torpedo	114	23.50%
Cotiledonar	220	45.36%
TOTAL	485	

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

La capacidad embriogénica a las 12 semanas fue del 40.79% al utilizar (1.5 mg L⁻¹ de GA₃), y al utilizar (3 mg L⁻¹ de GA₃), se obtuvo una capacidad embriogénica del 45.36 % (tabla 20 y 21).

De acuerdo al análisis de varianza no paramétrico para el efecto mayor número total de embriones, se encontró un valor ($p < 0,0001\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de las medias de los tratamientos (tabla 22).

Tabla 22

Análisis de varianza no paramétrica de las cuatro suspensiones (Encalada, 2014).

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Embriones totales M1		10	33,60	2,84	33,00	35,19	<0,0001
Embriones totales M2		10	38,60	2,22	38,50		
Embriones totales M3		10	44,20	2,04	45,00		
Embriones totales M4		10	52,50	2,22	52,50		

Con respecto a la prueba de Kruskal-Wallis (tabla 23), se encontró tres grupos estadísticos, donde se observa que la suspensión uno (1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), y la suspensión dos (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), pertenece al grupo A, la suspensión tres (1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con

caseína hidrolizada), pertenece al grupo B, y la suspensión cuatro (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), está ubicado en el grupo C, por lo tanto se evidencia que la suspensión cuatro presenta la media más alta con respecto al tratamiento con mayor número de embriones.

Tabla 23

Prueba de Kruskal-Wallis de las cuatro suspensiones (Encalada, 2014).

Trat.	Ranks	
M1	6,25	A
M2	15,00	A
M3	25,25	B
M4	35,50	C

Finalmente, se obtuvo como resultado total 335 embriones en la suspensión uno (1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), 386 en la suspensión dos (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con agua de coco), 429 en la suspensión tres (1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), y 485 en la suspensión cuatro (3 mg L⁻¹ de ácido giberélico con caseína hidrolizada), es decir el mayor número de embriones se formaron en la suspensión cuatro (figura 37).

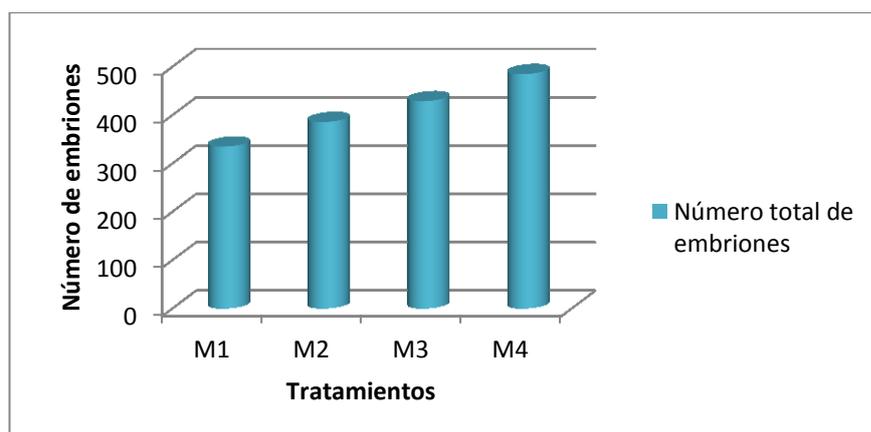


Figura 37. Número total de embriones formados en las cuatro suspensiones (Encalada, 2014).

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

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1. Desinfección

La fase de desinfección conlleva un conjunto de pasos que se realizan para el establecimiento adecuado de un determinado cultivo. Se utilizó el protocolo de desinfección ya establecido por Sánchez (2013), el mismo que es simple, y así no se desperdició recursos. En este procedimiento no fue necesario aplicar un diseño experimental, en razón de que se obtuvo un alto porcentaje de sobrevivencia de los explantes, pues de los 90 embriones sembrados solo se contaminó el 1.11%, que si lo analizamos es sumamente bajo.

Según Roca & Mroginski (1993), los tejidos son asépticos internamente, por lo que la desinfección del material vegetal, tiene como objetivo eliminar toda clase de microorganismos que se encuentren en la superficie del explante, con ayuda de una amplia variedad de compuestos químicos.

Inicialmente, se hizo uso de agua con jabón ya que Dodds & Lorin (1995), exponen que ayuda a reducir las impurezas y la contaminación externa. Adicionalmente se hizo uso de NaClO, teniendo en cuenta que debe causar la muerte de los microorganismos contaminantes y a su vez causar el menor daño posible al explante como lo señala López & Valencia (2010).

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

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

4.2. Establecimiento e inducción de callos embriogénicos

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

Según Samson, Campa, Le Gal, Noirot Thomas, Lokeswari & Kochko (2006), la concentración de los reguladores de crecimiento y especialmente el balance entre las auxinas y citocininas en combinación con carbón activado, parece ser un factor clave en la inducción de callo y la iniciación de la embriogénesis somática.

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

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

Por todo lo señalado anteriormente, en la inducción de la embriogénesis somática, intervienen varios factores como la etapa fisiológica del explante y las concentraciones adecuadas de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, estos factores deben ser controlados rigurosamente para obtener callos embriogénicos friables.

4.3. Suspensiones celulares

El establecimiento de una suspensión celular, se logra optimizando diferentes factores que influyen directamente en dicho establecimiento. Pérez (2010), indica que la cantidad de callo a utilizar puede ser desde 1 g a 20 g en 50 ml de medio de cultivo, recalando que mientras mayor cantidad de inóculo inicial se utilice más rápidamente se podrá establecer el cultivo en suspensión.

La utilización de frascos de 200 ml con 40 ml de medio de cultivo fresco para las suspensiones celulares de (*Parajubaea cocoides* Burret), generó excelentes resultados reafirmando lo indicado por Roca & Mroginski (1993), en donde se especifica que se debe utilizar el 1/5 de volumen del frasco, con medio fresco para que el resto de volumen sirva para el intercambio gaseoso de las células.

Las suspensiones se mantuvieron a una agitación de 110 rpm, ya que según Pérez (2010), a las suspensiones celulares se las puede mantener en un rango de revoluciones de 60 rpm a 150 rpm.

Durante la multiplicación celular de las suspensiones de *Parajubaea cocoides* Burret, se identificó las cuatro fases de crecimiento celular como se muestra en las figuras (19, 21, 23, 25). Si bien Roca & Mroginski (1993), indican que en un cultivo de células, hay cinco fases de crecimiento, en la curva de crecimiento celular para *Parajubaea cocoides* Burret, no se logró identificar claramente la fase lineal, la cual se encuentra entre la fase de crecimiento celular en forma exponencial y la etapa de desaceleración progresiva.

En las suspensiones celulares, la primera etapa según Roca & Mroginski (1993), abarca los primeros días, después de haber realizado el subcultivo, por tanto se puede catalogar como una fase de retraso o latencia, ya que a pesar de que existe una división celular esta es baja. En la investigación esta etapa se caracterizó por un período de crecimiento moderado.

Según Chawla (2002), tener evidencia de división celular inmediatamente da indicios de que el establecimiento de la suspensión celular es exitoso, y que las

células han superado la fase de adaptación, y ya son células libres en forma de suspensión. En esta fase la multiplicación celular es casi nula, pues las células se están preparando para dividirse.

Roca & Mroginski (1993), afirman que la segunda etapa se caracteriza por un crecimiento exponencial, donde la tasa de división es la mayor en todo el proceso, y se extiende hasta el día 15. En esta etapa aumenta la velocidad de división celular donde las células son jóvenes y biológicamente activas (Dodds & Lorin, 1995).

La tercera etapa según Roca & Mroginski (1993), se caracteriza por un crecimiento logarítmico que representa una desaceleración progresiva del crecimiento celular hasta el día 24. En esta fase se produce una disminución progresiva, ya que el número de células van agotando uno o varios nutrientes del medio, generando residuos tóxicos para las células, y que las células se obstaculicen mutuamente (Gómez, 1998).

Finalmente, se observa una cuarta etapa donde según Roca & Mroginski (1993), las células empiezan una fase estacionaria, la cual aparece en el momento que los nutrientes del medio se han agotado, y señalando que la suspensión ha alcanzado su máxima densidad celular, estabilizando el número de células y por tanto la concentración celular permanece constante.

La densidad celular inicial de las suspensiones, se encontraban en el rango de 0.5×10^4 - 1×10^5 cel/ml, que se la puede considerar como adecuada, ya que se pudo evidenciar rápidamente la fase exponencial bien definida, corroborando lo indicado por Barranco *et al.* (2009), que afirma que cuando no hay una buena densidad celular inicial la multiplicación suele ser pobre y no se puede mantener un crecimiento celular constante.

Torres (1989), señala que el establecimiento celular se puede realizar con una densidad inicial de 0.5×10^4 - 2.5×10^5 cel/ml, mientras tanto Navila (2003), considera que la utilización de densidades iniciales de $9 - 10 \times 10^3$ cel/ml se las puede catalogar como densidades bajas o críticas.

De las curvas de cinética celular de *Parajubaea cocoides* Burret, se determinó que en la suspensión uno (1.5 mg L^{-1} de ácido giberélico con 35 ml de agua de coco), y la suspensión dos (3 mg L^{-1} de ácido giberélico con 35 ml de agua de coco), el día 16 es óptimo para el subcultivo (figuras 19 y 21), mientras que para la suspensión tres (1.5 mg L^{-1} de ácido giberélico con 200 mg L^{-1} de caseína hidrolizada), y la suspensión cuatro (3 mg L^{-1} de ácido giberélico con 200 mg L^{-1} de caseína hidrolizada), el día 22 es óptimo para realizar el subcultivo (figuras 23 y 25), ya que las curvas presenta una inflexión, señalando el fin de la última fase de crecimiento exponencial del cultivo celular.

Según Barranco *et al.* (2009), este punto es el adecuado para mantener una multiplicación celular continua, de lo contrario las células alcanzan su máxima densidad y permanecerán viables, pero sin división para más tarde morir.

Gómez (1998), señala que si se realiza un subcultivo en este punto, la cinética celular continúa a velocidades logarítmicas sin pasar la fase estacionaria o de disminución progresiva.

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

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

Para el establecimiento de suspensiones celulares en (*Theobroma Cacao* L.), se combinó agua de coco (40 ml), con ácido giberélico ($1-4 \text{ mg L}^{-1}$), obteniendo como resultado un efecto positivo en el desarrollo de la suspensión, ya que permitió estimular el crecimiento celular (Steward *et al.*, 1958).

Existen varios componentes que se deben adicionar en los medios de cultivo, para el establecimiento de las suspensiones, como fuentes de nitrógeno, factores de crecimiento y carbohidratos; entre ellos el agua de coco, jugo de tomate y extracto de levadura (Jiménez, 1990).

La presencia de agua de coco, posiblemente influye en la iniciación de una suspensión celular, y en el futuro establecimiento de suspensiones celulares de muy buena calidad para la regeneración de pino gigante (Lorin, 1995). Esto corrobora, que en las suspensiones que contenían agua de coco como fuente de nitrógeno, se llegó a la densidad celular máxima en menor tiempo.

Por otro lado, en las suspensiones que se adicionó caseína hidrolizada, se obtuvo mayor número de células a los 22 días. La adición de caseína hidrolizada (200 mg L^{-1}), probablemente completa los requerimientos en aminoácidos para la síntesis de proteínas y el metabolismo hormonal, dando como resultado un aumento en la cantidad de células dentro de una suspensión (Frenando & Gamage, 2000).

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

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

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

Según Barranco *et al.* (2009), la presencia de GA_3 junto a la caseína hidrolizada en el medio, aparentemente permite la expresión de genes involucrados

en el proceso de crecimiento celular, en el establecimiento de suspensiones de banano.

4.4. Maduración e identificación embrionaria

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

Por consiguiente, el estudio del proceso de maduración, puede servir para definir un modelo que sea aplicable a la embriogénesis somática, principalmente para establecer un medio de cultivo adecuado (Celestino, Hernández, Careros, López & Toribio, 2005).

En esta investigación, se observó, luego de la realización de la Prueba de Kruskal-Wallis (tabla 17), una mejor respuesta de maduración de embriones somáticos en los tratamientos que poseían 200 mg L^{-1} de caseína hidrolizada como fuente de nitrógeno y la concentración de 3 mg L^{-1} de ácido giberélico, ya que se obtuvo embriones en todas las fases, principalmente embriones cotiledonares, a comparación de los tratamientos en los que se utilizó 35 ml agua de coco y 1.5 mg L^{-1} de ácido giberélico. Estos tratamientos presentaron mejores resultados en lo que se refiere al incremento del número de estructuras embrionarias globulares, respuesta semejante obtuvo (Márquez *et al.*, 2003), en estudios de embriogénesis somática en aguacate.

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

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

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

La caseína y otras proteínas hidrolizadas son menos costosas, aunque debido a su origen y procesos de obtención, son de naturaleza menos definida que los aminoácidos, lo cual origina que se deba probar su eficiencia en cada sistema embriogénico en particular, constituye una fuente de calcio, fosfato, diversos microelementos, vitaminas y una mezcla de al menos 18 aminoácidos, entre ellos la glutamina (George & Klerk, 2008).

Se ha probado el efecto estimulador de la caseína hidrolizada, en procesos morfogénicos *in vitro*, en un rango de concentración de ($100\text{-}200 \text{ mg L}^{-1}$), tanto en el cultivo de suspensiones celulares y en embriogénesis somática de (*Nothofagus alpina*), obteniéndose un nivel de proliferación superior en presencia de esta fuente adicional de nitrógeno orgánico (Castellanos *et al.*, 2011).

Por su parte, Robichaud, Veronica & Merkle (2004), utilizaron caseína hidrolizada ($200\text{-}300 \text{ mg L}^{-1}$), como componente adicional en un medio base, en un estudio sobre el efecto de la adición de los aminoácidos L-Glutamina y L-Asparagina, además de agentes modificadores del potencial osmótico del medio, sobre la maduración de ES de *Castanea dentata*, encontrándose a diferencia de este estudio, que hubo un efecto positivo en el tamaño de los ES respecto al testigo, aunque también se evidenciaron anomalías morfológicas y germinación precoz.

Según George & Klerk (2008), la caseína hidrolizada es más efectiva que la adición individual de aminoácidos en el medio de cultivo, ya que promueve el desarrollo de embriones en fase cotiledonar en cultivos de banano, debido a la presencia de algún factor del crecimiento desconocido, aún presente en esa sustancia.

Se considera que el mayor efecto de estas fuentes de nitrógeno, se manifiesta en soluciones minerales con baja dotación de iones NH_4^+ , pero según George & Klerk (2008), quienes afirman que estas sustancias son efectivas en medios ricos en iones amonio, debido a la conservación de la molécula de ATP, compensando así la deficiencia de fosfato, su capacidad para actuar como agentes quelantes, favorecer la capacidad de asimilación de nitrógeno, sustitución de posibles iones NH_4^+ tóxicos y el ajuste del pH intracelular.

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

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

Verpoorte *et al.*, (2002), indujo la producción de embriones somáticos a partir de callos friables formados de los cormos internos de la parte basal de los bulbos de (*Crinum x powellii*), en los medios MS suplementados con 1, 1.5 y 3 mg L^{-1} de ácido giberélico, se observó mayor desarrollo de los embriones somáticos alcanzando estructuras más definidas, mientras que en los medios MS suplementados con 0.5 y 0.75 mg L^{-1} de ácido giberélico, se observaron masas proembriónicas de color verde que solo aumentaron de tamaño.

La presencia de caseína hidrolizada y ácido giberélico, son factores importantes en la formación de embriones somáticos de semillas aplanadas de cacao. Novak (1985), obtuvo estructuras embriogénicas en todas sus etapas a partir de cotiledones de semillas inmaduras de cacao en un medio MS suplementado con 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico y 2 g L⁻¹ de caseína hidrolizada, el efecto de estos componentes son importantes, debido a que no se observó embriones en un medio libre de ácido giberélico y caseína hidrolizada. Datos similares se observó en la palma coco cumbé, ya que la suspensión que contenía caseína hidrolizada y ácido giberélico, presentó mayor formación de embriones.

Al referirnos a la utilización de 35 ml de agua de coco en la maduración de los embriones, se debe indicar que no se obtuvo embriones en fase cotiledonar, pero si embriones globulares, torpedos y corazón. Al respecto, Steward *et al.* (1958), considera que en la etapa de maduración de embriones es esencial la presencia de agua de coco; sin embargo, Claret *et al.*, (2001), realizó estudios posteriores en (*Bixa orellana* L.), demostrando que el agua de coco presentaba beneficios en la formación de embriones en estadios tempranos, pero su utilización no era necesaria para la maduración de los embriones somáticos.

Es complicado establecer cultivos de embriones somáticos que mantengan una uniformidad de sus células en el desarrollo de nuevos clones o individuos, ya que el desarrollo de los embriones se produce independientemente uno del otro, por lo que en un mismo tejido podemos tener embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo (figura 36) (Moncada *et al*, 1997; Muñoz, 2003).

También, no todas las células responden a la formación de embriones somáticos de igual manera, aunque tengan un mismo genotipo, debido a que solamente ciertas células parecen estar aptas a responder a la embriogénesis somática, dado la influencia de los reguladores del crecimiento, ya que no todas están simultáneamente listas desde el punto de vista fisiológico para expresar su totipotencia, aún en un medio favorable para su desarrollo (González, Morejón, Hernández, Coronado & Silva, 2008).

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

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

La fuente de nitrógeno, es un factor que modifica la respuesta embriogénica, en el caso de (*Coffea canephora*), se ha determinado que una concentración de nitrógeno entre 3.75 y 15 mM en el medio de cultivo y una relación de nitrato/amonio de 2:1, presentan mejores respuestas embriogénicas (Dixon & Gonzales, 1994).

Márquez *et al.*, (2003), indicó que la falta y exceso de fuentes de nitrógeno orgánico en cultivos de (*Citrus sinensi*), causa estrés fisiológico, presentando necrosis, por lo cual en la maduración de los embriones somáticos, debe existir una adecuada concentración de los reguladores de crecimiento y fuentes de nitrógeno.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

Para el proceso de maduración, se debería probar con la adición de 150 mg L⁻¹ glutamina, que según varios autores incrementa los niveles de aminoácidos libres, y el porcentaje de proteínas; además de mejorar el tamaño de los embriones y su frecuencia de conversión.

Para alcanzar un alto grado de sincronización en el crecimiento de los embriones somáticos en un mismo tejido o en suspensión celular, se debería utilizar ácido abscísico (ABA).

Realizar un estudio histológico en cada etapa de la embriogénesis somática, para así, determinar los cambios estructurales y morfológicos de los embriones.

Es necesario continuar con el proceso de germinación de los embriones y aclimatación de las plántulas, para de esta forma determinar la efectividad del protocolo.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Solis, M. (1944). *La tagua*. Quito: Editorial Ecuador.
- Acosta-Solis, M. (1971). Palmas económicas del noroccidente ecuatoriano. *Naturaleza Ecuatoriana*, 80-163.
- Aguirre, Z., Madsen, J., Cotton, E. (2002). *Botánica Austro Ecuatoriana* (Primera edición ed.). Quito, Ecuador: Editorial Ecuador .
- Balslev, H. M. (2013). *Palmas Ecuatorianas: biología y uso sostenible* (Primera ed.). Quito, Ecuador: Publicaciones del Herbario QCA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Balslev, H., Montúfar, R., Navarrete, H., Valencia, R. (2013). *Palmas Ecuatorianas: biología y uso sostenible*. Quito: Publicaciones del Herbario QCA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Baran, T., Ghosh, J. (2005). Plant Tissue Culture: Basic and Applied. *Orion*, 45-50.
- Barranco, I., Gómez, R., Reyes, M., Pérez, L., Freire, M., Herrera, I. (2009). Efecto de la densidad de inóculo en la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar híbrido de banano. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 40-47.
- Barreto. (2003). *Evaluación de tres densidades de siembra y dos frecuencias de inmersión en biorreactor tipo RITA sobre la calidad morfológica de embriones somáticos de café*. Centro Afronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Costa Rica: Editorial Turraiba.
- Berthouly. (1989). Micropropagación de café. *Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera*, 17-22.
- Borchsenius, F., Bernal, R. (1996). *Flora Neotropicana*. Costa Rica: Monographs.
- Borchsenius, F., Pedersen, H., Balslev, H. (1998). *Manual to the palms of Ecuador*. AAU Reports.
- Borchsenius, F., Skov, F. (1999). Conservation status of palms in Ecuador . *Acta Botánica Venezuelica*, 221-236.

- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., Lopez, D., Torbio, M. (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal . *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos* , 345-357.
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López, D., Toribio, m. (2005). *La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal*. Recuperado el 22 de Febrero de 2014, de http://www.inia.es/gcontrec/pub/CELESTINOHERNANDEZCARNEROS_116282779875.pdf
- Colunga, P. (1998). Origen, variación y tendencias evolutivas del (*Agave Fourcroydes*). *Biología*, 62.
- Dixon, R., Gonzales, R. (1994). *Plant cell . USA*, 112.
- Dodds J. & Lorin R. (1995). *Experiments in Plants Tissue Culture*. Estados Unidos : Cambridge University Press.
- Dodds, J., Lorin, R. (1995). *Experiments in plants tissue cultura. Cambridge University Press*.
- Dodds, J., Lorin, R. (1995). *Experiments in Plants Tissue Culture . Cambridge University Press*.
- Fernandez, C., Gramage, C. (2000). Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut. *Plant Science*, 193-198.
- Fernandez, D., Trovant, B., Lopez, J. (2009). *Reintegración ecológica y económica de uan aldera interandina del noreste de Gualaceo*. Azuay: Universidad Internacional Menendez Pelayo y Universidad Central del Ecuador .
- George, E., Klerk, J. . (2008). The components of plant tissue . *Tissue Culture*, 501.
- Giron. (1998). Desarrollo y maduración de embrioes somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica* para una producción en el Centro Agronómico Tropical de Investigación . *Master thesis* , 23-30.
- Gonzales, J., Gómez R. (1998). Propagacion y mejora genética de plantas por Biotecnología. *Biotecnología de plantas , I*.
- Gonzales, O. M. (2008). *Estudio histologico de la embriogénesis somática*. Recuperado el 12 de Febrero de 2014, de <http://www.ua.es/es/imformacion/biodiversida/cuabiod27.pdf>
- Guerra, T. (1999). Embriogenese somática . *Cultura de tejidos y transformaciones genéticas de plantas* , 533-568.

- H., C. (2002). Induction to plant biotechnology . *Science Publisher*.
- Hussein, S., Ibrahim, R. (2006). Somatic embryogenesis. *IRIAN Journal of Biotechnology*, 162-165.
- Illán, M., Oraes, L., Oblick, F., Ahn, F. (2008). Las palmeras de América del Sur. *Diversidad e historia evolutiva*, 7-29.
- Ipomoea, L. (2009). *Centro Ibeoamericano de la biodiversida (CIBIO)*. Recuperado el 20 de Marzo de 2014, de <http://www.ua.es/es/informacion/biodiversidad/cuasbio27.pdf>
- Jiménez, F. (1990). Evaluación de las características morfológicas en desarrollo vegetativo de (*Vanilla sp*). Costa Rica : Alajuela.
- Kim, W., Moon, K. (2007). Embriogenesis somática en plantas en Japón . *Plant cell*, 241-245.
- Kyte, L., Kleyn, J. (1996). Plants from test tubes . *Timber press*, 109.
- López, R., Murcia, C., López, P., Valencia, J. (2010). Estandarización del protocolo de desinfección de discos de hojas en la induccion de callogénesis . *Revista de investigaciones de la Universidad de Quindio*, 120-125.
- Lugo, A. (2004). Cámara thoma y neubauer. *GabLaboratory*.
- M, A.-S. (1944). *La tagua* . Quito: Ecuador.
- McKersie, B., Browley, D. (1996). Somatic embryogenesis and artificial seed in forage legumes. *Seed Science Research*, 109-126.
- Moraes, M., Henderson, A. (1990). The genun Parajubaea. *Brittonia*, 42-99.
- Moraes, R. (1993). Guía de árboles de Bolivia. *Herbario Nacional de Bolivia-Missouri Botanica Graden* .
- Moraes, R. (1996). Novelties of the Parajubaea and Syangrus from interandean valleys of Bolivia. *Novon*, 85-92.
- Nabila, A., Tasneem, M., Hassan, A. (1992). Secondary metabolites of chenopodium species. *Journal of the Chemical Society*, 70-82.
- Nakamura. (1997). Análisis numérico y visulaización gráfica con MATLAB. *Prentice Hall*, 78.
- Nomura, K., Komamine, A. (1995). Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. *In vitro embryogenesis in plants*, 249-265.

- Parrott, W. (1993). Cell culture the biotechnology applications for banana and plantain improvement. *INBAP*, 183-191.
- Perera, P., Vidhannarachi, V., Gunathilake, T., Yakandawala, D., Hocher, V. (2009). Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut. En *Plant Cell* (págs. 73-81).
- Pérez, J. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Cuba : Ediciones GEO.
- Pérez, J. (2010). Evaluación de la producción e fitoquímicos a partir de cultivo de células en suspensión . *Olander*.
- Pérez, J., Alvarado, Y., Gómez, R., Jimenez, E., Orellana, P. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. En *Instituto de biotecnología de las plantas* (Vol. I). Santa Clara, Cuba .
- Pintaud, J., Aleano, H., Alsley, B., Ernal, R., Orchsenius, F. (2008). Las palmera de América del Sur. En *Diversidad e historia evolutiva* (págs. 7-29). Peru: Rev.Peru.
- Quito, D. M. (16 de Agosto de 2002). *Agencia pública de noticias de Quito*. Recuperado el 22 de Enero de 2014, de <http://www.noticiasquito.gob.ec>
- Reinert, J. (1958). Biotecnología de Palmeras. *Botánica* , 15-24.
- Robichard, R., Veronica, I., Merkle, S. (2004). Treatments affecting maturation and germination . *California* , 102.
- Roca, W., Mroginski. (1993). *Cultivo de tejidos en l Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones* . Cali, colombia : Centro Internacional de la Agricultura Tropical.
- Samson, P., Campa, C., Noiro, M., Thomas, G. (2006). Effect of primary culture medium composition . *Plant cell*, 37-45.
- Sánchez, V. (2013). Establecimiento de un protocolo para la obtención de embriones somáticos tanto en medio sólido como en suspensión celular, a partir de embriones cigóticos inmaduros de Palma coco cumbe (*Parajubaea coccoide*). *Tesis*.
- Sotiropoulos, T., Dimassi, N., Therios, N. (2005). Effects of L-cysteine on growth, and mineral contents of shoots of the apple. *Biologia Platarum*, 443-445.
- Steward, F., Mapes, M., Mears, K. (1958). Growth and organized of cultured cells . *Merican Journal of Botany* , 705-708.

- Tisserat, B., Esan E., Murashige, T. (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.*, 1-78.
- Torres, K. (1989). Tissue culture techniques. *Horticultural Crops*.
- Trejo, G., Rodriguez, M. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro.
- Yeung, E., Rahman, H., Thorpe, T. (1996). Comparative development of zygotic and microspore derived embryos in brassica napus . *Plant Sci.*, 27-39.

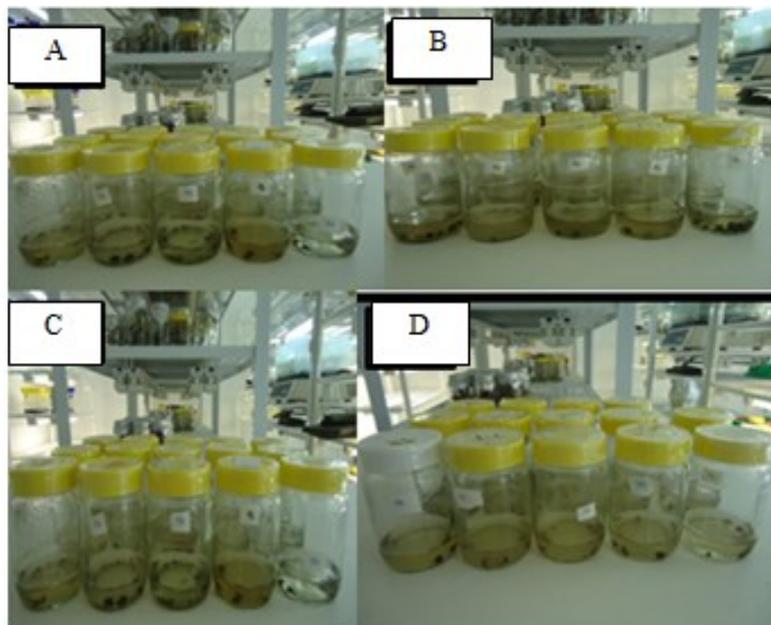
CAPÍTULO 8

ANEXOS

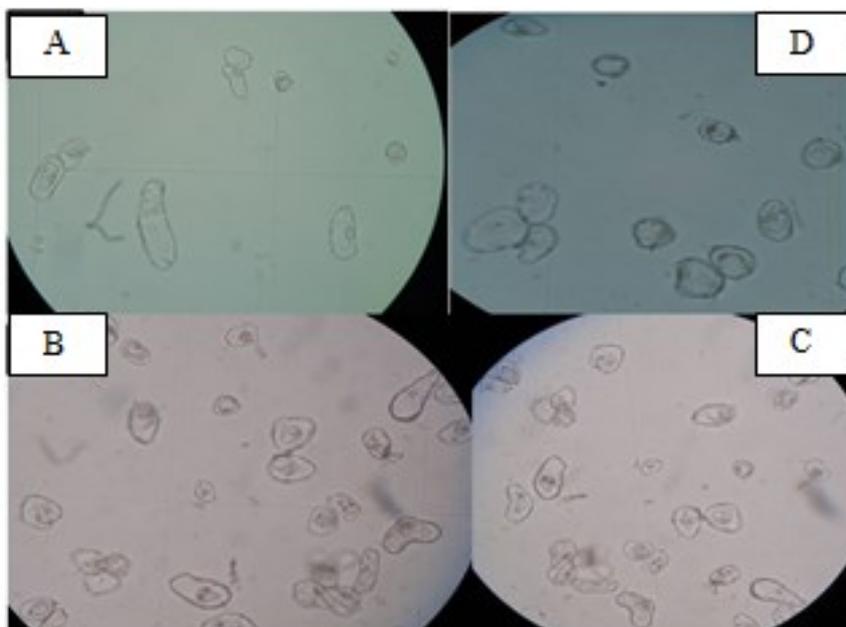
Anexo A. Composición del medio basal de Murashige y Skoog (1962) modificado (PhytoTechnology Laboratories, 2009).

Componentes	Formula	Cantidad mg L⁻¹	
Macro elementos	Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1650
	Cloruro de calcio anhidro	CaCl ₂	332.2
	Sulfato de magnesio anhidro	MgSO ₄	180.7
	Nitrato de potasio	KNO ₃	1900
	Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	170
Micro elementos	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6.2
	Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
	Sulfato cúprico pentahidratado	CuSO ₄ .H ₂ O	0.025
	Sulfato de manganeso monohidratado	MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
	Molibdato sódico dihidratado	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
	Yoduro de potasio	KI	0.83
	Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Sales de hierro	Ácido etilendiamino Tetraacético disódico dihidratado	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.26
	Sulfato ferroso heptahidratado	FrSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Vitaminas	Glicina	-	2
	Myo-inositol	-	100
	Acido nicotínico	-	0.5
	Piridoxina HCl	-	0.5
	Tiamina HCl	-	1

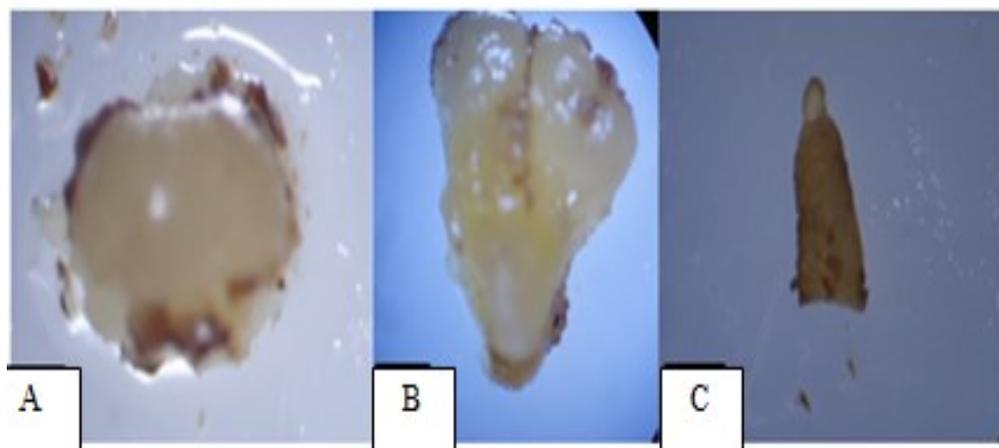
Anexo B. Tratamientos de maduración (A) MS con agua de coco y 1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico, (B) MS con agua de coco y 3 mg L⁻¹ de ácido giberélico, (C) MS con caseína hidrolizada y 1.5 mg L⁻¹ de ácido giberélico, (D) MS con caseína hidrolizada y 3 mg L⁻¹ (Encalada, 2014).



Anexo C. Conteo celular en *Parajubaea cocoides* Burret (A) fase de retraso, (B) fase exponencial, (C) fase logarítmica, (D) fase estacionaria (Encalada, 2014).



Anexo D. Embriones observados en los tratamientos uno y dos (A) Globular, (B) Corazón, (C) Torpedo (Encalada, 2014).



Anexo E. Comercialización nacional de *Parajubaea cocoides* Burret para uso ornamental (Balslev et al., 2013).

Producto	Procesamiento	Precio consumidor (USD)
Palmas de 60 cm de altura	Germinación y cuidados en bolsas plásticas con sustrato	25
Palmas con tronco de 1 m de altura	Germinación y cuidados en bolsas plásticas con sustrato	150-180
Palmas con tronco de 6 m de altura	Banqueo (se trasplanta con tierra, grúa y camión)	1800
Palmas con tronco de 8 m de altura	Banqueo (se trasplanta con tierra, grúa y camión)	2500

