



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA  
MULTIPLICACIÓN MASIVA DE PLANTAS DE *Bactris gasipaes*

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniería en Biotecnología

Profesor Guía

MBA Pierre Ezequiel Landázuri Wiets

Autora

Nicole Stephanía Pesantes Sáenz

Año

2015

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

---

Pierre Ezequiel Landázuri Wiets

Master in Business Administration

CI.: 040057055-2

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Nicole Stephanía Pesantes Sáenz

CI.: 171755106-1

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser un ejemplo de esfuerzo y perseverancia.

A mis hermanos por su cariño incondicional.

A mis abuelos por ser ejemplo de amor incondicional y de paciencia.

A mi familia por ser mi soporte.

A Alberto por su paciencia y apoyo.

A Pierre y Javier por su apoyo y confianza.

A Fernando por su ayuda y guía.

A todos los que forman parte de Orange.

Y sobre todo a Dios.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos.

## RESUMEN

El palmito o chontaduro (*Bactris gasipaes*) es una palma cuyo corazón es considerado a nivel mundial como un producto gourmet. El crecimiento de este es lento y actualmente su reproducción se da únicamente por semillas haciendo que la producción se reduzca. Ya que en el Ecuador no se realiza una selección de semillas existe una alta variabilidad del material en las plantaciones lo que disminuye la productividad de las mismas. Con el uso de nuevas técnicas biotecnológicas, tales como el cultivo *in vitro* se puede lograr una multiplicación acelerada de la planta evitando la variabilidad genética y por ende los cambios fenotípicos en el cultivo, obteniendo así una plantación homogénea y de alta productividad.

La presente investigación tiene como objetivo desarrollar un protocolo para la multiplicación masiva de un clon de *Bactris gasipaes* mediante la utilización de un sistema de inmersión temporal.

Para lograr dicho objetivo, se realizó una selección del clon deseado en la Finca San Eduardo situada en Pedro Vicente Maldonado, Ecuador. Este material fue desinfectado e introducido a condiciones *in vitro*. Se indujo a la formación de callo utilizando 2,4-D, BAP, picloram y L-glutamina como fitoreguladores concluyendo que los medios más adecuados tuvieron 2,4-D 1.5mg/L y 2.5mg/L, BAP 1.6mg/L y 3mg/L, picloram 10µM y L-glutamina 500mg/L. Posteriormente se procedió a la inducción de la embriogénesis suplementando los medios de cultivo con BAP 1.6mg/L o picloram 10µM y L-glutamina 500mg/L. Los pro-embriones obtenidos fueron madurados en un medio de cultivo con carbón activado, 2,4-D 40µM, 2-iP 10µM y L-glutamina 1g/L. Una vez obtenidos los embriones se los maduró con 2-iP 20µM y ANA 0.5µM. La germinación de los embriones no fue posible por el tiempo que esto requiere.

La investigación abre las puertas a un nuevo tipo de propagación de palmito que podrá aumentar la productividad del mismo en condiciones de campo.

## ABSTRACT

Peach palm's (*Bactris gasipaes*) heart is considered worldwide as a gourmet product. Its growth and development is slow and can only be reproduced by seeds reducing its production. In Ecuador no seed selection is done, which causes a high variability of the material, lowering the productivity of the cultivated area. With the use of new biotechnological techniques such as plant *in vitro* tissue culture a rapid multiplication of the plant can be achieved, avoiding genetic variability and hence phenotypic changes, thus obtaining a homogeneous and highly productive plantation.

The objective of this research is to develop a protocol for mass propagation of a clone of *Bactris gasipaes* using a temporary immersion system.

To achieve this, a selection of the desired palms was performed in Finca San Eduardo, located in Pedro Vicente Maldonado, Ecuador. This material was disinfected and introduced to *in vitro* conditions. Callus induction using 2,4-D, BAP, picloram and L-glutamine as phytohormones was achieved, concluding that the most appropriate media use the following concentrations: 2,4-D 1.5mg/L and 2.5mg/L, BAP 1.6mg/L and 3 mg/L picloram 10µM and L-glutamine 500 mg/L. Afterwards somatic embryogenesis was induced supplementing the culture media with BAP 1.6mg/L or picloram 10µM and L-glutamine 500 mg/L. Pro-embryos were matured in a culture media with activated charcoal, 2,4-D 40µM, 2-iP 10µM and L-glutamine 1g/L. The obtained embryos were matured with 2-iP 20 µM and ANA 0.5µM. Germination of the embryos was not possible because of the time that it requires.

This research contributes to the development of new ways of peach palm reproduction that can increase the production yield in field conditions.

# ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Objetivo general.....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
1.3 Justificación.....	4
1.4 Alcance.....	5
2. Marco teórico.....	6
2.1. <i>Bactris gasipaes</i> .....	6
2.1.1. Origen.....	6
2.1.2. Taxonomía.....	7
2.1.3. <i>Morfología</i> .....	8
2.1.4. Importancia del palmito en el Ecuador.....	10
2.1.5. Manejo del cultivo.....	14
2.1.6. Variedades de palmito.....	15
2.1.7. Propagación.....	16
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> .....	17
2.2.1. Requisitos para el cultivo <i>in vitro</i> .....	18
2.2.2. Micropropagación.....	28
2.2.3. Embriogénesis somática.....	30
2.2.4. Biorreactores.....	37
3. Metodología.....	41
3.1. Selección de material vegetal.....	41



3.2. Desinfección e introducción de explantes.....	41
3.3. Obtención de callos pro-embriogénicos .....	46
3.4. Embriogénesis somática .....	47
3.4.1. Desarrollo de pro- embriones .....	47
3.4.2. Maduración de pro-embriones.....	47
3.5. Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal.....	48
3.5.1. Sistema BIT cubano .....	48
3.5.2. Sistema por gravedad.....	50
3.6. Desarrollo de embriones en el SIT .....	51
4. Resultados y Discusión .....	53
4.1. Selección del material vegetal .....	53
4.2. Desinfección e introducción de explantes.....	55
4.3. Obtención de callos pro-embriogénicos .....	65
4.4. Embriogénesis somática .....	70
4.4.1. Desarrollo y maduración de pro-embriones.....	70
4.5. Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal .....	76
4.5.1. Sistema de inmersión de frascos gemelos .....	76
4.5.2. Sistema de inmersión por gravedad .....	76
4.6. Desarrollo de embriones .....	77
5. Conclusiones y recomendaciones .....	78
5.1. Conclusiones.....	78
5.2. Recomendaciones .....	79

REFERENCIAS .....	80
ANEXOS .....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alcance de la investigación. ....	5
Figura 2: Planta de <i>Bactris gasipaes</i> . ....	8
Figura 3: Fruta de <i>Bactris gasipaes</i> . ....	9
Figura 4. Distribución de las exportaciones de palmito procesado en el primer semestre del 2014. ....	13
Figura 5. Posibles explantes en una planta madre. ....	20
Figura 6. Posibles explantes de órganos reproductivos ....	20
Figura 7. Posibles explantes en semillas ....	21
Figura 8. Principales tipos de cultivo in vitro. ....	30
Figura 9. Desarrollo embriogénico en la angiosperma <i>Arabidopsis</i> ....	31
Figura 10. Diferenciación de una célula somática a embrión somático. ....	32
Figura 11. Funcionamiento del sistema de inmersión RITA® ....	38
Figura 12. Funcionamiento de un sistema BIT ....	39
Figura 13. Filtros HEPA utilizados para el SIT de frascos gemelos. ....	49
Figura 14: Esquema del diseño del sistema BIT ....	50
Figura 15: Esquema del diseño del sistema por gravedad. ....	51
Figura 16. Planta de <i>Bactris gasipaes</i> con 7 tallos laterales y un tallo principal. ....	53
Figura 17. Secciones de la planta tomadas como explante. ....	54
Figura 18. Porcentajes de contaminación de los protocolos de desinfección 4, 5 y 6 en relación con el medio de cultivo utilizado. ....	58
Figura 19. Relación del porcentaje de establecimiento y el porcentaje de no contaminación en el protocolo de desinfección 4. ....	59
Figura 20. Relación del porcentaje de establecimiento y el porcentaje de no contaminación en el protocolo de desinfección 5. ....	59
Figura 21. Relación del porcentaje de establecimiento y el porcentaje de no contaminación en el protocolo de desinfección 6. ....	60
Figura 22. Porcentaje de contaminación en meristemos y hojas según el protocolo de desinfección 6. ....	61
Figura 23. Porcentaje de establecimiento versus porcentaje de	

no contaminación en meristemo utilizando el protocolo de desinfección 6. ....	62
Figura 24. Porcentaje de establecimiento versus porcentaje de no contaminación en hoja utilizando el protocolo de desinfección 6.....	62
Figura 25. Callo pro-embriogénico. ....	66
Figura 26. Callo no pro-embriogénico .....	67
Figura 27. Porcentajes de presencia de callo pro-embriogénico y no embriogénico en frascos establecidos .....	68
Figura 28. Callo con presencia de estructuras globulares posiblemente .....	71
Figura 29. Aislamiento y siembra de embriones.....	72
Figura 30. Porcentajes de contaminación, necrosis y paso a desarrollo de embriones.....	72
Figura 31. Pro-embryones obtenidos en medio negro .....	73
Figura 32. Estructura radicular formada en medio negro .....	74
Figura 33. Porcentajes de pro-embryones y radículas obtenidas.....	75
Figura 34. Porcentaje de contaminación, necrosis y germinación en los SIT. .	77

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Total de exportaciones de palmito procesado y conservado para el primer semestre del 2014 .....	12
<i>Tabla 2.</i> Exportadores ecuatorianos de palmito en conserva.....	14
<i>Tabla 3.</i> Condiciones agroecológicas del cultivo de palmito .....	15
<i>Tabla 4.</i> Principales variedades de <i>Bactris gasipaes</i> . .....	16
<i>Tabla 5.</i> Comparación de las concentraciones promedio de elementos considerados suficientes para el desarrollo vegetal.....	25
<i>Tabla 6.</i> Criterios de selección del material vegetal. ....	41
<i>Tabla 7.</i> Desinfecciones utilizadas. ....	43
<i>Tabla 8.</i> Medios de cultivo utilizados para la introducción de explantes .....	45
<i>Tabla 9.</i> Medios de cultivo utilizados para la obtención de callo. ....	46
<i>Tabla 10.</i> Medio de cultivo utilizado para la maduración de pro-embriones.....	48
<i>Tabla 11.</i> Composición medio de cultivo blanco. ....	51
<i>Tabla 12.</i> Condiciones de cultivo para el desarrollo de embriones en SIT.....	52
<i>Tabla 13.</i> Características deseadas para la multiplicación.....	53
<i>Tabla 14.</i> Escala tomada en cuenta para la medición de oxidación, dureza del explante y de la zona radicular, necrosis y coloración.....	56
<i>Tabla 15.</i> Observaciones después del último enjuague en cada uno de los métodos de desinfección. ....	57
<i>Tabla 16.</i> Porcentajes de establecimiento en los protocolos de desinfección 4, 5 y 6.....	60
<i>Tabla 17.</i> Porcentajes de contaminación, establecimiento y establecimiento global en hojas y meristemos utilizando la desinfección 6. ....	61
<i>Tabla 18.</i> Porcentajes de contaminación y establecimiento, etapa de obtención de callo. ....	67

## 1. Introducción

### 1.1 Antecedentes

La planta de *Bactris gasipaes*, comúnmente llamada chontaduro, pejibaye, pijuayo o palmito fue utilizada por culturas indígenas de la Amazonía como fuente de alimentación, desde antes de la época colonial (Mora Urpí & Gainza Echeverría, 1999). El uso de esta planta disminuyó en la colonia y actualmente se la considera como un producto gourmet a nivel mundial; sin embargo existen poblaciones amazónicas que siguen basando completamente su alimentación en plantas, sobre todo en las arecáceas Palmáceas. El consumo de palmito disminuyó en la época de la colonia debido a distintos factores, entre los que se encuentran la introducción de nuevos cultivos alimenticios, la formación de nuevas ciudades alejadas de la Amazonía y la falta de tecnología para procesarlo (Mora Urpí & Gainza Echeverría, 1999). Actualmente han aparecido nuevos mercados que permiten que plantas como esta vuelvan a ser comercializadas y consumidas.

*Bactris gasipaes* es una monocotiledónea de la familia de las arecáceas palmáceas que crece naturalmente en las zonas Amazónicas de Colombia, Ecuador, Brasil y Perú; se ha naturalizado en toda Centro América, siendo Costa Rica el mayor productor a nivel mundial (Crane, 2013). El palmito ha sido cultivado en diferentes países, tanto de América del Norte como de Europa; sin embargo, debido a que estos países tienen 4 estaciones, la calidad del producto varía según la precipitación de la época. En países como el Ecuador la precipitación es casi constante durante todo el año y la calidad del producto no varía significativamente. El cultivo de palmito es ideal en zonas tropicales húmedas con una temperatura de 23-29°C y una humedad de 7000 mm-año (Crane, 2013). La semilla tarda 60-90 días en germinar y su árbol mide de 20 a 31m, este tiene varias ramas de 10 a 31cm de diámetro de donde se obtiene el meristemo o "palmito" de *Bactris gasipaes* para su consumo (Crane, 2013). El árbol puede tener espinas o no. Una palmera sin espinas es más apetecible para el agricultor que una palmera con espinas debido a su fácil manejo, sin

embargo al tomar en cuenta a roedores que se alimentan de la misma el control de plagas se facilita en plantas con espinas haciendo de esta variedad la más cultivada en el país (Crane, 2013). En lugares como Costa Rica y Colombia se aprovecha la fruta para su consumo, la cual es realmente nutritiva; se la encuentra en racimos de 50 a 300 frutas y se cosechan cada 8 meses con un máximo de 2 cosechas por año (Crane, 2013).

El Ecuador ha cultivado palmito comercialmente desde inicios de 1987 y empezó a procesarlo en el año 1991. En el país existen alrededor de 15.500Ha de cultivo, que están distribuidos en las siguientes zonas: Lago Agrio, Coca, Tena, Macas, Zamora, Esmeraldas, San Lorenzo, Muisne, Santo Domingo de los Tsáchilas , La Concordia, Nanegalito - Puerto Quito, Bucay. Entre las principales formas de preparación del palmito en el Ecuador se encuentran ensaladas, ceviches, cocteles o fritos. En el periodo 2004-2008 las exportaciones de palmito representaron el 1% de las exportaciones no petroleras. (Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones, 2009)

Se ha reconocido la necesidad del país de ampliar la producción de palmito a nivel nacional para poder competir con los volúmenes producidos por otros países, especialmente de Brasil y Costa Rica; por esta razón se ha creado la Asociación de Palmitocultores del Ecuador; también debemos observar El Incipiente Clúster del Palmito en la provincia de Pichincha, que es una organización de agricultores que están decididos a hacer del palmito uno de los productos más importantes del país (Cepal, s.f.).

La palma de palmito, al igual que otras palmas similares, solo se reproduce con semillas. Actualmente los palmitocultores recolectan semillas de la selva tropical donde la planta crece en su estado natural. El problema de esta forma de multiplicación es la alta variabilidad y la cantidad de subespecies existentes de palmito (Viñas & Jimenez, 2011). Existen palmas precoces y otras con bajos niveles reproductivos, plantas con o sin espinas, variación en el tamaño y la cantidad de la fruta y una productividad que difiere entre plantas que pueden estar una al lado de la otra. Este tipo de variabilidad hace que la producción de palmito sea inconstante y no sea óptima (Viñas & Jimenez, 2011).

El palmito, al ser un árbol, tiene un crecimiento lento, cuya reproducción, como se había mencionado, solo se da por semillas, lo que hace que su producción sea más lenta (Crane, 2013). Con el uso de nuevas técnicas biotecnológicas, tales como el cultivo *in vitro* se puede lograr una multiplicación acelerada de la palma evitando la variabilidad genética y por ende los cambios fenotípicos en el cultivo, obteniendo una plantación homogénea y de alta productividad (Crane, 2013).

El cultivo de tejidos o células vegetales se define como el crecimiento *in vitro* de plantas. Durante los últimos 55 años se ha comprobado que el crecimiento vegetal es más preciso y rápido si se da mediante células simples que si se da de la forma tradicional (Purohit, 2013). En el año 1838 se postuló la capacidad totipotente de las células vegetales, este principio es la base del cultivo *in vitro* (Purohit, 2013). El cultivo de tejidos se ha modificado para ser un método biotecnológico para la multiplicación vegetal. A partir de la descripción de la totipotencialidad de las células vegetales, los fisiólogos se dedicaron a la multiplicación *in vitro* utilizando diferentes enfoques y reguladores. Esta variabilidad ha causado que el cultivo de tejidos se ramifique. La embriogénesis somática es una de las ramas del cultivo *in vitro* en la que se obtienen embriones a partir de células somáticas, estos embriones se germinan y se multiplican (Purohit, 2013).

El sistema de inmersión temporal (SIT) es un sistema utilizado en el cultivo *in vitro* de plantas para acelerar y optimizar la multiplicación (Maldonado, Rodríguez, Gómez y Cárdenas, 2003). Este se basa en sumergir los explantes vegetales en medio de cultivo líquido, por intervalos cortos de tiempo, asegurándose que todas las partes de la planta estén en contacto tanto con nutrientes como con oxígeno. Se han realizado con éxito estudios de palmas similares a *Bactris gasipaes*, pero existen pocas investigaciones por la dificultad de obtener una multiplicación clonal (Maldonado *et al.*, 2003).



## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo general

Desarrollar un protocolo para la multiplicación masiva de un clon de *Bactris gasipaes* mediante la utilización de un sistema de inmersión temporal.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Establecer un procedimiento de selección de material vegetal en campo.
- Determinar un protocolo de desinfección para el establecimiento de explantes de *Bactris gasipaes*.
- Definir el medio de cultivo óptimo para promover la formación de callos en el material introducido mediante el uso de reguladores de crecimiento.
- Definir el medio de cultivo óptimo para la inducción de embriones somáticos.
- Diseñar un sistema de inmersión temporal para el desarrollo de los embriones somáticos obtenidos.

## 1.3 Justificación

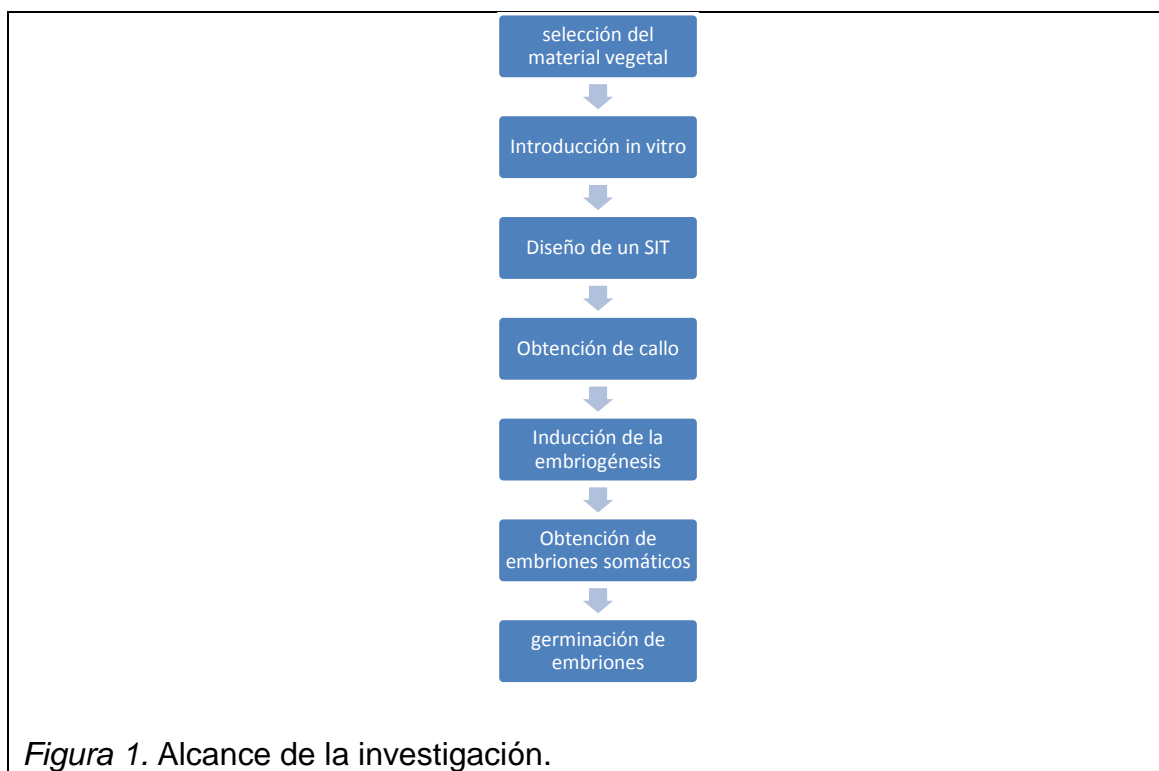
La planta de *Bactris gasipaes* actualmente se puede reproducir únicamente por semillas, ya sea en el campo o en cultivo *in vitro*; por lo que no se ha logrado la producción masiva de un clon específico de la planta. El palmito tiene una alta variabilidad genética, lo que ocasiona que existan varios tipos de plantas, unas más apetecibles para los agricultores que otras. Al ser esta una planta que se reproduce por semillas, éstas son elegidas masalmente; es decir, la selección de semillas se da según el fenotipo de la planta madre esperando obtener una progenie con las mismas características. Sin embargo, esta forma de selección no es eficiente y en las plantaciones se puede encontrar una alta variedad de plantas.

La propuesta de un protocolo para la multiplicación vegetativa de palmito a través diseño de un sistema de inmersión temporal para la multiplicación masiva de palmito podría solucionar el problema de la gran variabilidad

existente en las plantas de palmito; consiguiendo un clon con características apetecidas por los agricultores, garantizando así una plantación homogénea y una alta producción.

#### 1.4 Alcance

El alcance de esta investigación es la multiplicación vegetativa de *Bactris gasipaes* mediante el diseño de un sistema de inmersión temporal siguiendo las siguientes etapas (figura 1):



Una vez seleccionado e introducido el material vegetal, se diseñó de un sistema de inmersión temporal, en el cual se realizaron pruebas con diferentes variantes de medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) líquido (diferentes concentraciones de nutrientes y de fitoreguladores), y se analizó la respuesta de la planta a las distintas variantes. Se determinó el medio de cultivo más efectivo para el crecimiento de la planta de *Bactris gasipaes* y en este se realizaron una multiplicación masiva de la misma.

Esta investigación, y su seguimiento, se realizarán en el laboratorio OrangeLab de Orangetruck Agroindustrias S.A. en Quito, Ecuador, en el valle de Puembo.

## 2. Marco teórico

### 2.1. *Bactris gasipaes*

*Bactris gasipaes* es el nombre científico de la palma que en el Ecuador se conoce como palmito y cuyo tallo se procesa y se vende como alimento enlatado; también es conocido como chontaduro, papunha, bobi, entre otros. Es nativo de la región amazónica del Ecuador, Colombia, Perú y Brasil y ha sido naturalizado alrededor de toda América Central (Crane, 2013).

La planta de *Bactris gasipaes* tiene dos productos de interés comercial el palmito o tallo y la fruta. La fruta puede ser procesada de distintas maneras para producir harina, pulpa de consumo directo, aceite, entre otras, mientras que el tallo se procesa y se vende en conserva para el consumo (Mora-Urpí, Weber y Clement, 1997).

#### 2.1.1. Origen

Existen varias teorías sobre el origen del palmito. Algunos autores dicen que el palmito es procedente de la parte oeste de la cuenca amazónica mientras que otros autores dicen que esta palma no tiene un solo sitio de origen sino que estuvo presente en la zona oeste de la cuenca amazónica, en la parte oeste y noroeste de la cordillera de los Andes y en la parte baja de Centro América (Mora-Urpí *et al.*, 1997). La teoría más conocida entre todas estas dice que *Bactris gasipaes* es nativo de la región amazónica del Ecuador, Colombia, Perú y Brasil (Crane, 2013).

Igualmente, existen varias teorías sobre la domesticación del palmito. Las plantas de palmito fueron cultivadas en un principio para utilizar la fruta como alimento. Existían palmas similares a la de palmito que sufrieron mutaciones espontáneas lo que causó la formación de frutas más fibrosas y grandes que las que existían anteriormente. Se cree que estas palmas con frutas grandes y fibrosas fueron las primeras en domesticarse y es por estas mutaciones espontáneas que existe una gran variabilidad tanto entre las plantas de cultivo como entre las silvestres (Mora-Urpí *et al.*, 1997).

### 2.1.2. Taxonomía

La taxonomía de *Bactris gasipaes* según el *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) es la siguiente:

Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Viridaeplantae</i>
Infrareino:	<i>Streptophyta</i>
División:	<i>Tracheophyta</i>
Subdivisión:	<i>Spermatophytina</i>
Infradivisión:	<i>Angiospermae</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Superorden:	<i>Lilianaes</i>
Orden:	<i>Arecales</i>
Familia:	<i>Arecaceae</i>
Género:	<i>Bactris</i>
Especie:	<i>Bactris gasipaes</i>

Nombre común: Chonta,  
Pejibaye  
Chontaduro,  
Pijiguao,  
Pirijaho,  
Cachipae, etc.

En 1777 al pejibaye se lo encontraba bajo el género *Bactris*; *sin embargo*, en 1826, gracias a la gran cantidad de variedades de palmito que existen, se le cambió y pasó a ser *Guilielma martius* (Mora-Urpí *et al.*, 1997). En 1991 debido a la probabilidad de hacer análisis de cladística, es decir analizar diferentes variedades vegetales para identificar un ancestro común, se llegó a la conclusión que *Guilielma martius* y todas sus variedades no eran más que una parte del género *Bactris*, dentro del cual se encuentran las diferentes especies de palmito, tanto silvestres como cultivados (Mora-Urpí *et al.*, 1997).

### 2.1.3. Morfología

*Bactris gasipaes* es una palma que presenta uno o más tallos principales, puede medir hasta 20 m de altura y tener un diámetro de 20 a 30 cm. Por lo general presenta espinas que llegan a tener 5 cm de largo tanto en hojas, en entre nudos y en el o los tallos. Las hojas, que miden de 1.5 a 4 m de largo y de 0.6 a 1.6 m de ancho, se encuentran en grupos de 20 en las coronas de la palmera. Son compuestas (pinadas) y están formadas por secciones de hoja que se segmentan a partir del haz vascular principal de cada hoja (Figura 2) (Roeland, 1994).



Figura 2: Planta de *Bactris gasipaes*.  
Tomado de Mora-Urpí, Weber y Clement, 1997

El chontaduro que se cultiva para palmito no llega a la edad reproductiva ya que es cortado entre los 12 y 18 meses. En este estadio, el diámetro del tallo es apenas de 9 cm y además de hojas pinadas, posee hojas bífidas (no segmentadas) que son de menor tamaño (Mora-Urpí *et al.*, 1997).

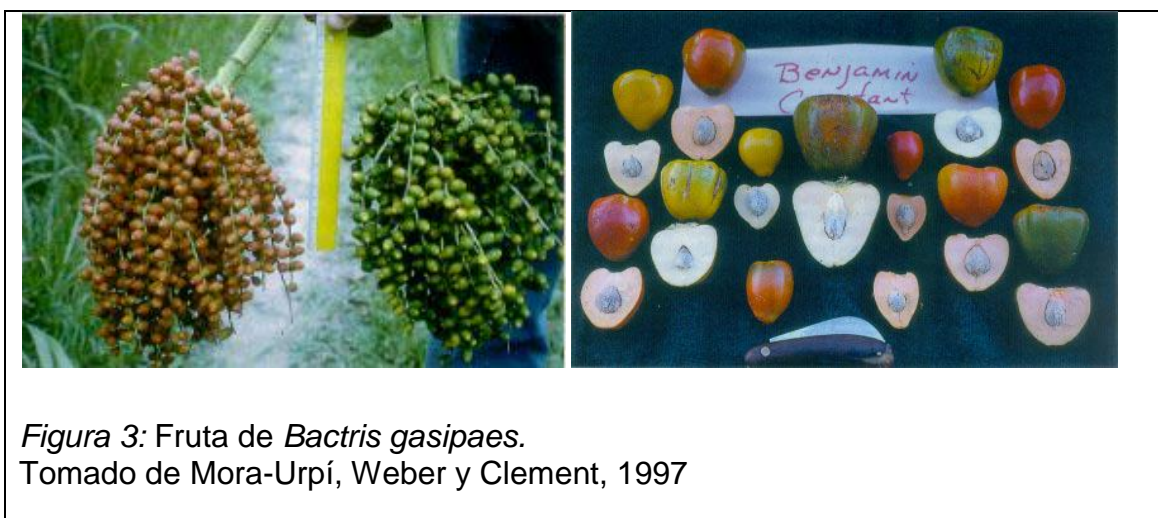
Si la planta es cultivada para la obtención de la fruta o de la semilla, es decir, si se deja que la planta madure a un estado adulto, se encuentra una alta cantidad de espinos perpendiculares en los entrenudos del tallo (en caso de ser una variedad espinada). En plantas de la misma edad aquellas que tienen los entrenudos más largos son las plantas que llegarán a ser más altas. No solo

presenta espinos en los entrenudos sino también en las hojas, aunque en estas la cantidad de espinas es menor (Mora-Urpí et al., 1997).

Existen plantas de *Bactris gasipaes* sin espinas; sin embargo se cree que estas variedades tienen una menor producción de tallos, por lo que la obtención de palmito es menor (Roeland, 1994).

La mayoría de las raíces crecen de la base del tallo y se distribuyen en forma lateral formando una red densa en los primeros 20 cm de la superficie, en los que se encuentran el 60% de las raíces totales de la planta (Roeland, 1994).

Las inflorescencias aparecen 4 o 5 años después de la germinación. Teóricamente la planta puede producir una inflorescencia por cada hoja que posee; sin embargo esto no es lo que sucede en la naturaleza ya que la planta depende de la cantidad de nutrientes disponibles en el suelo para poderlas formar. Las inflorescencias que están protegidas por una hoja suelta llena de espinas están formadas por un eje principal en el cual se encuentran alrededor de 60 ramas, cada una de estas ramas consta de 20.000 flores masculinas y 300 flores femeninas (figura 3). Las flores femeninas tienen que ser polinizadas por otra planta, caso contrario, debido a la caída de frutas sin polinizar o a la presencia de frutas sin semillas, los racimos de fruta serán pequeños. (Roeland, 1994)



#### **2.1.4. Importancia del palmito en el Ecuador**

En el Ecuador el palmito es considerado un cultivo permanente. Existen dos variedades principales de la palma: con espinas, las cuales representan el 80% del cultivo del país, y sin espinas, que son el sobrante 20% y se encuentran monopolizadas por empresas grandes y no por agricultores independientes. El palmito ecuatoriano se consume y se exporta en conserva ya sea como palmito entero o en trozos, la fruta de la palma no es utilizada para el consumo en el país ya que las plantas no llegan a un estado de desarrollo completo sino que se talan antes para obtener el tallo (ProEcuador Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones, 2014).

Según el Censo Nacional Agropecuario CNA en el Ecuador existen 15.358 hectáreas sembradas de palmito, de las cuales solamente 606 hectáreas se encuentran asociadas con otros productos y el restante 14.752 son sembríos de palmito solo (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2012).

El Ecuador ha cultivado palmito en grandes cantidades desde 1987 y lo empezó a fabricar como conserva (enlatado o enfrascado) en 1991 (CORPEI, 2009).

El palmito que se consume en el país es de cultivo; es decir, se respeta el palmito silvestre para que este no sea consumido (Corporación Financiera Nacional, 2007).

##### **2.1.4.1. Exportaciones de palmito – Importancia Económica**

A pesar de que el palmito no es uno de los principales productos ecuatorianos como el petróleo, el banano, el café o las rosas; el Ecuador es el principal exportador de palmito del mundo. El costo por tonelada del palmito Ecuatoriano en conserva, en el 2013, fue de 2.474 dólares (International Trade Centre, 2014). El último censo nacional agropecuario muestra que en el país existen 15.358 hectáreas de cultivo que producen 92.532 toneladas métricas, de las cuales se venden 91.186 (INEC, 2012). Si se consideran estos datos el país obtiene 225.594.164 dólares en promedio por la exportación de este producto,

lo que representa el 0.75% del total de las exportaciones no petroleras del país (ProEcuador Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones, 2014).

Según datos tomados de la División de Estadística de las Naciones Unidas del intercambio internacional UNComtrade (*United Nations Commodity Trade Statistics Database*), en el año 2013 el Ecuador fue el principal exportador de palmito preparado o conservado del mundo, las exportaciones del país con respecto a este producto representaron el 59,67% de las exportaciones globales. La cantidad total de toneladas de este producto exportado por Ecuador en el año 2013 fue de 31.566.997 kilogramos lo que representa un total de 78.083.774 dólares. (Organización de las Naciones Unidas, 2014)

Según el *Trade Map* del *International Trade Centre*, entre los principales países que importaron en el año 2013 conservas de palmito producidas en el Ecuador se encuentran: Francia, con una cantidad de 8.994 toneladas de palmito preparado correspondiente a 24.410 miles de dólares; Chile, que importó 7.408 toneladas lo que corresponde a 16.345 mil dólares; Argentina, con 5.422 toneladas y 10.420 mil dólares y Estados Unidos de América con una importación de 2.153 toneladas lo que equivale a 6.340 miles de dólares. Otros de los países que han importado este producto ecuatoriano son Canadá, Bélgica, Venezuela, Israel, entre otros. (International Trade Centre, 2014)

Según datos del Banco Central del Ecuador (BCE) la exportación de palmito ecuatoriano para el primer semestre del año 2014 alcanza un total de 14.496,20 toneladas equivalentes a USD 37.159,35, que se encuentran distribuidos en los países detallados en la Tabla 1 y figura 4.



Tabla 1. Total de exportaciones de palmito procesado y conservado para el primer semestre del 2014

SUBPARTIDA NANDINA	DESCRIPCION NANDINA	PAIS	TONELADAS	FOB - DOLAR	% / TOTAL FOB - DOLAR
2008910000	PALMITOS	FRANCIA	3,233.34	9,069.96	24.41
		CHILE	3,530.80	7,970.13	21.45
		ARGENTINA	2,421.21	5,086.20	13.69
		ESTADOS UNIDOS	1,510.15	4,474.17	12.05
		VENEZUELA	739.70	2,267.70	6.11
		CANADA	764.94	2,055.70	5.54
		BELGICA	558.53	1,605.43	4.33
		ISRAEL	410.98	1,047.78	2.82
		ESPAÑA	362.52	918.13	2.48
		HOLANDA (PAISES BAJOS)	271.91	779.16	2.10
		URUGUAY	165.05	385.27	1.04
		COLOMBIA	119.80	327.12	0.89
		ITALIA	87.19	307.12	0.83
		MARRUECOS	100.61	258.76	0.70
		MEXICO	82.14	218.62	0.59
		EMIRATOS ARABES UNIDOS	26.88	77.15	0.21
		LIBANO	17.09	53.00	0.15
		AUSTRALIA	17.15	51.73	0.14
		PORTUGAL	17.28	46.08	0.13
		ALEMANIA	17.28	45.72	0.13
		REINO UNIDO	12.27	38.01	0.11
		PANAMA	13.81	31.82	0.09
		INDIA	9.60	26.50	0.08
		JAPON	6.05	18.17	0.05
<b>TOTAL GENERAL:</b>			<b>14,496.20</b>	<b>37,159.35</b>	<b>100.00</b>

Tomado del Banco Central del Ecuador, 2014

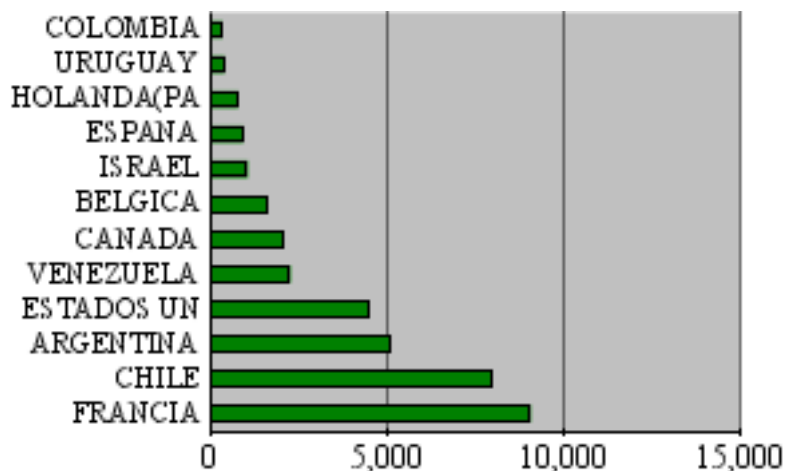


Figura 4. Distribución de las exportaciones de palmito procesado en el primer semestre del 2014.

Tomado del Banco Central del Ecuador, 2014

En el año 2013 el valor promedio por tonelada entre todos los países que importan palmito ecuatoriano fue de 2.474 dólares, siendo el costo de venta más alto el que se alcanza con Argelia en un valor de 3.286 dólares y el menor de 1.500 dólares por tonelada en la venta con Trinidad y Tobago. El Ecuador tuvo entre los años 2009 y 2013 una tasa de crecimiento del 10% en valores exportados (dólares) y del 8% en cantidades exportadas (toneladas). En el periodo 2012-2013, la tasa de crecimiento de los valores exportados fue del 6%. (International Trade Centre, 2014)

Gracias al acuerdo del Sistema General de Preferencias (SGP) en su subpartida 2008.91.00.00, el Ecuador tiene el beneficio de tener un interés arancelario del 0% para el ingreso de palmito procesado y en conserva en el mercado estadounidense y europeo siempre y cuando las empresas procesadoras cumplan con los siguientes requisitos: Contar con certificaciones *International Food Standards* (IFS), ISO 22000, KOSHER y Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (HACCP), además de cumplir distintas exigencias de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y el Codex alimentario de la Organización para la Alimentación y Agricultura (FAO) y la

Organización Mundial del Comercio (OMC). (Cámara de Comercio de Guayaquil, 2013)

Las principales empresas exportadoras de palmito en Ecuador se ven reflejadas en la Tabla 2 (según los datos del BCE):

Tabla 2. Exportadores ecuatorianos de palmito en conserva.

SUBPARTIDA NANDINA	DESCRIPCION NANDINA	NOMBRE EXPORTADOR
2008910000	PALMITOS	<a href="#">ALIMENTOS Y CONSERVAS DEL ECUADOR S.A.</a> <a href="#">ECUACONSERV</a>
		<a href="#">ECUAPALMITO S.A.</a>
		<a href="#">ECUAVEGETAL S.A.</a>
		<a href="#">FUNDACION MAQUITA CUSHUNCHIC MCCH</a>
		<a href="#">INDUSTRIA AGRICOLA EXP. INAEXPO</a>
		<a href="#">INDUSTRIALIZADORA Y COMERCIALIZADORA DE PALMITO</a>
		<a href="#">NATECUA S.A.</a>
		<a href="#">PROCECONSA S.A. PROCESADORA CONTINENTAL DE ALIM</a>
		<a href="#">PROTROPIC CIA. LTDA.</a>
		<a href="#">SERVICIO INTEGRAL PARA LA INDUSTRIA ALIMENTICIA SA</a>
		<a href="#">TECNICA Y COMERCIO DE LA PESCA C.A. TECOPESCA</a>
		<a href="#">TRADINGCORP ECUATORIANA S.A.</a>
		<a href="#">TROPICALFOODS S.A.</a>

Tomado del Banco Central del Ecuador, 2014

## 2.1.5. Manejo del cultivo

### 2.1.5.1. Edafológico

Según Chaimsohn (2006), la planta crece en suelos franco arenosos con cantidades altas de materia orgánica y un pH ligeramente bajo que podría llegar a ser hasta 4. La resistencia a la penetración del suelo indicado para el cultivo de *Bactris gasipaes* para la producción de palmito es de  $12.23 \pm 1.13$  MPa. $10^{-1}$  siendo un valor considerado como moderado. El suelo debe ser no compactado y presentar una densidad de  $0.83 \pm 0.01$  g/cm<sup>3</sup> (densidad normal para suelos con presencia de ceniza volcánica).

### 2.1.5.2. Agroecológico

Las condiciones agroecológicas para el cultivo de *Bactris gasipaes* son las siguientes (tabla 3):

Tabla 3. Condiciones agroecológicas del cultivo de palmito

Clima:	Cálido húmedo
Temperatura max.:	33°C
Temperatura min.:	24 – 28°C
Temperatura óptima:	19°C
Heliofanía:	1000 horas de luz anual.
Humedad:	80 – 90%
Pluviosidad:	2000 - 4000mm (bien distribuidos)
Altitud:	100 - 1000m

Tomado de Santamaría, 2009

### 2.1.6. Variedades de palmito

Las plantas de *Bactris gasipaes* presentan una alta variabilidad no solo entre plantas de producción y plantas silvestres sino también entre plantas del mismo cultivo. Entre las plantas cultivadas se puede encontrar presencia o ausencia de espinas, palmas con uno o varios tallos, plantas precoces y otras lentas, entre otras características variables (Santamaría, 2009). Las principales variedades de palmito se muestran en la Tabla 4

Tabla 4. Principales variedades de *Bactris gasipaes*.

Variedad	Característica
Utilis-Tucurrique.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rústica</li> <li>• Buena productora</li> <li>• Libre de enfermedades</li> <li>• Buena calidad industrial</li> <li>• Presencia de espinas</li> </ul>
Utilis-Guatuso	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nula o baja cantidad de espinas en el tallo</li> <li>• Casi extinta</li> <li>• Investigada para crear una variedad libre de espinas</li> </ul>
Putumayo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vigorosa</li> <li>• Precoz</li> <li>• Pocas espinas o estas están ausentes</li> </ul>
Yurimaguas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heterogénea</li> <li>• Quebradiza al cosechar y en la manipulación industrial</li> <li>• Consistencia crujiente</li> <li>• Mayor rendimiento</li> </ul>
Tuira-Darién	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto vigor</li> <li>• Precoz</li> <li>• Alta producción de palmito</li> </ul>

Adaptado de Santamaría, 2009

De estas variedades Utilis son las más cultivadas en Costa Rica y Panamá, mientras que Putumayo es la variedad presente en Colombia, Ecuador, Brasil y Perú y Yurimaguas es proveniente de Perú (Santamaría, 2009).

### 2.1.7. Propagación

En la actualidad, las plantas de *Bactris gasipaes* se propagan únicamente de forma masal, es decir, la propagación se da únicamente por semillas. Las semillas en el Ecuador no son seleccionadas y en ocasiones, al momento de su compra, estas no están en buen estado, por lo que muchas no se convierten en plantas (Secaira, 2014).

El procedimiento que se debería utilizar para la selección de semillas es el siguiente:

- Identificar un área del cultivo en donde la materia sea alta
- Seleccionar una planta que muestre características fenotípicas deseables

Una vez que la planta seleccionada produzca fruto:

- Recolectar los racimos
- Seleccionar frutas maduras ubicadas en la parte central del racimo para que la semilla sea fisiológicamente apta
- Extraer la semilla de la fruta en el menor tiempo posible después de la cosecha para evitar pérdidas de viabilidad y viveros no uniformes.

No es aconsejable almacenar las semillas; sin embargo, si el caso lo requiere, estas deben ser sembradas hasta 4 meses posteriores de la cosecha (Basurto, 2012)

## **2.2. Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro*, también llamado cultivo de tejidos, se refiere al cultivo y crecimiento de células, órganos o tejidos aislados de la planta madre en condiciones de nutrientes, reguladores, luz, temperatura y humedad artificiales (Ponmurugan y Suresh Kumar, 2012).

De manera general se habla de dos tipos de crecimiento en el cultivo de tejidos: El crecimiento organizado y el crecimiento desorganizado. Al referirse a crecimiento organizado en cultivo *in vitro*, se habla de la formación o la conservación de estructuras definidas de una planta; esto sucede en dos escenarios, el primero cuando la sección de la planta que ha sido sembrada *in vitro* mantiene su crecimiento normal conservando siempre su estructura, lo que ocurre cuando el explante o sección a ser sembrada es un meristemo apical, una hoja, fruta o flor inmadura. En este caso el explante crecerá pero su estructura principal será siempre la misma (Segretín, 2011).

Igualmente se considera crecimiento organizado cuando se ha inducido artificialmente a que un órgano, célula o tejido forme una estructura de una planta mediante el uso de reguladores del crecimiento. En este escenario la formación *de novo* de un órgano o tejido vegetal tiene el nombre de organogénesis o morfogénesis (Segretín, 2011).

Por otro lado, el crecimiento desorganizado *in vitro* se define como la especialización de una célula. Esta es la forma más común de crecimiento en la naturaleza, donde una célula puede llegar a especializarse para formar parte de un tejido y posteriormente de un órgano, cada célula tiene una forma o una función específica. En el cultivo de tejidos también se observa crecimiento desorganizado, las células, tejidos u órganos sembrados pierden su diferenciación formando aglomerados celulares sin, o con poca especialización; posteriormente, y con la ayuda de reguladores de crecimiento, en dicho aglomerado se empieza a ver formación de nuevas estructuras definidas y especializadas (George, Hall y De Klerk, 2008).

En general se utiliza el término “cultivo de tejidos” para todos los tipos de cultivo *in vitro*; sin embargo en el sentido estricto se debería utilizar únicamente para el cultivo de agregados celulares desorganizados. (George et al., 2008)

### **2.2.1. Requisitos para el cultivo *in vitro***

El cultivo de tejidos se caracteriza por la capacidad del investigador de controlar las condiciones en las que se desarrolla la planta o el explante. Entre estas condiciones las más importantes son el explante, la incubación y esterilización, el ambiente de cultivo y el medio o sustrato.

#### **2.2.1.1. Explante**

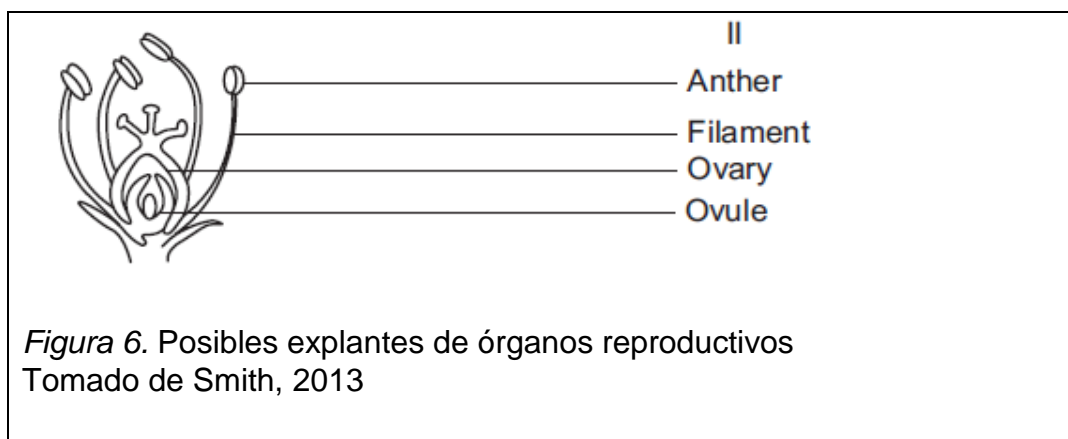
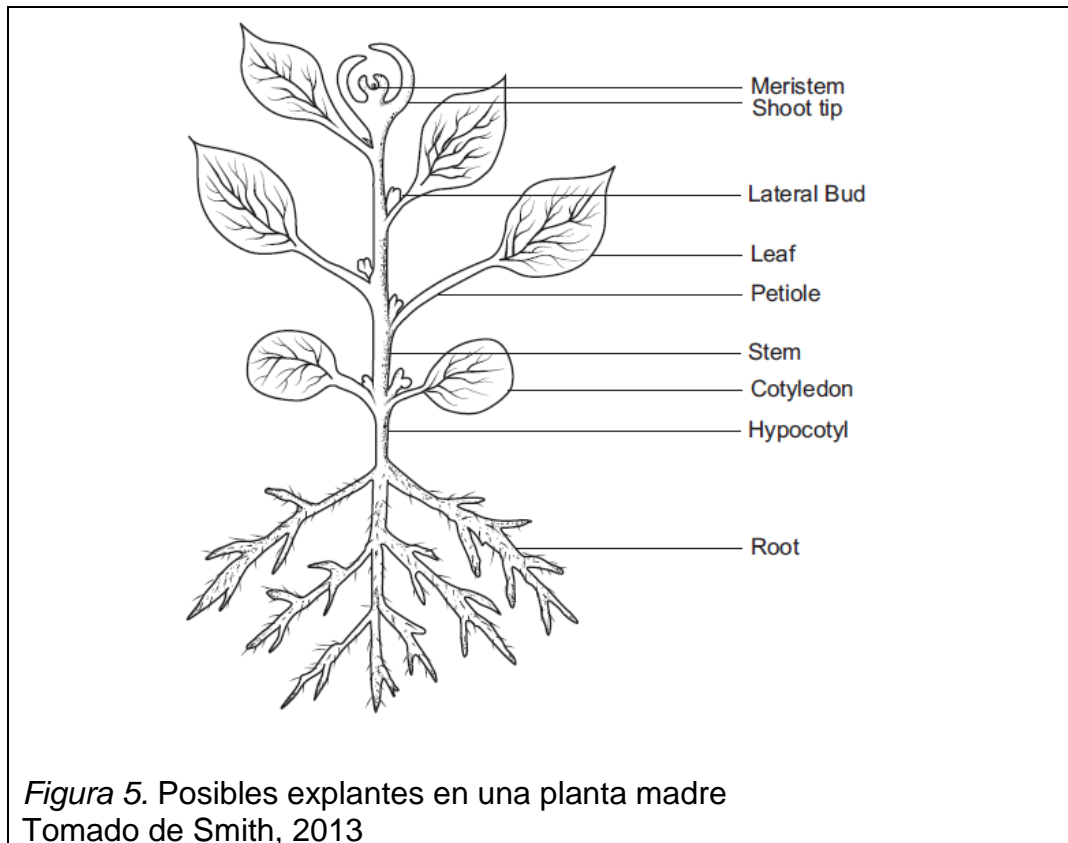
El cultivo *in vitro* parte de fragmentos de plantas completas, estos fragmentos u órganos se los conoce como explante. La selección del mismo depende del objetivo del cultivo, el tipo de cultivo *in vitro* a utilizar y la planta que se quiere cultivar. El éxito del cultivo *in vitro* depende ampliamente de la selección del material vegetal a utilizar (Smith, 2013).

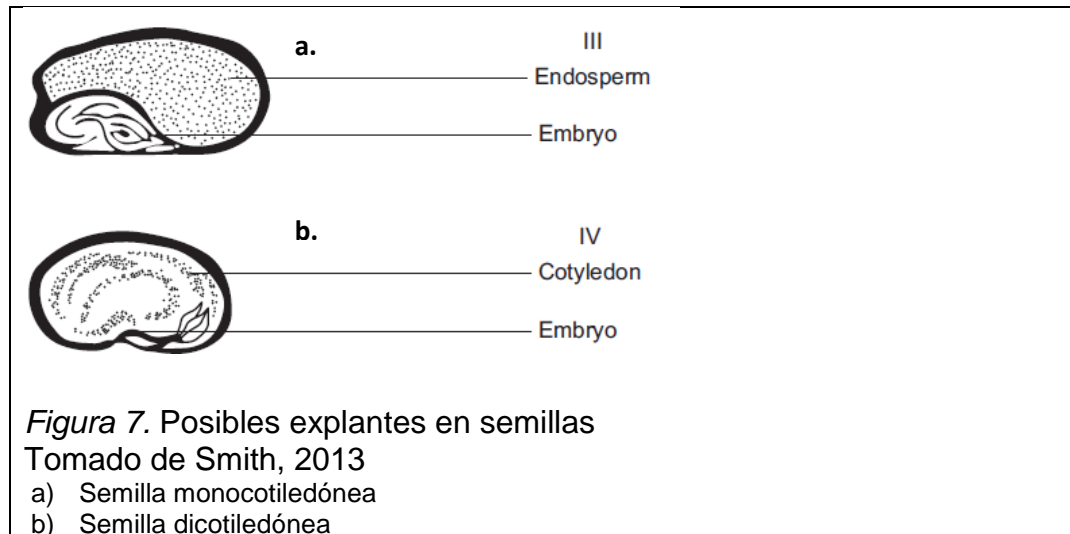
La selección del explante depende de:

- Edad fisiológica u ontogénica del órgano que servirá como fuente de explante. La edad es un factor que debe ser tomado en cuenta para la selección del explante ya que se ha visto que los tejidos jóvenes se adaptan más fácilmente a las condiciones artificiales del cultivo *in vitro* que los tejidos de mayor edad. Por lo general el tejido adulto además de estar más contaminado tanto externa como internamente, pierde la capacidad de formar callos para regeneración (Smith, 2013).
- Estación en la que se obtuvo el explante. En países donde existen cuatro estaciones, la temporada de la obtención del explante afecta su selección. En el paso de estaciones de otoño a invierno ciertas partes de la planta entran a un estado de latencia. Para utilizar una de estas partes de la planta como explante se deberá estimular a la planta para que vuelva a su estado normal. De la misma manera, en la primavera las plantas están, por lo general, en su fase de mayor crecimiento y un explante tomado en esta fecha tiene mejores respuesta al cultivo *in vitro* (Smith, 2013).
- Tamaño y ubicación del explante. A pesar de que la teoría menciona que todas las células vegetales con su material genético completo tienen la capacidad de generar una planta completa, en la práctica se ha observado que explantes de mayor tamaño tienen mayor adaptabilidad a las condiciones artificiales que proporciona el cultivo de tejido; es decir, mientras más pequeño sea el explante más difícil es de cultivar *in vitro*. Se cree que esto se debe a que fragmentos de mayor tamaño tienen más reservas de nutrientes y mayores concentraciones de fitohormonas, lo cual sustenta a la planta hasta que esta se adapte a las nuevas condiciones. La ubicación del explante también es un factor a considerar en la selección del mismo, la presencia y concentración de fitohormonas en cada sección de la planta es distinta, lo que podría afectar la respuesta *in vitro* del explante (Smith, 2013).



Los lugares de una planta madre donde se puede extraer un explante se pueden observar en la Figura 5, aquellos explantes que se obtienen de órganos reproductivos se describen en la Figura 6, y los lugares de una semilla que pueden ser utilizados se visualizan en la Figura 7.





- Calidad de la planta madre. Es aconsejable obtener los explantes de plantas madres que tengan un crecimiento normal y que no presenten enfermedades ni estrés por deficiencia de nutrientes o agua. Para esto es recomendable dar un tratamiento previo a la planta madre con pesticidas, fungicidas y bactericidas para obtener explantes que, en lo posible, estén libres de contaminaciones internas y externas (George et al., 2008).
- Objetivo del cultivo. La elección del material vegetal se basa en lo que se está buscando con el cultivo de tejidos. Si el objetivo del cultivo es la propagación de plantas, por lo general el explante será meristemático; en caso de buscar la inducción de callos, este serán cotiledones, tallos, hojas o embriones; para el aislamiento de protoplastos, la sección ideal serán las hojas (Smith, 2013).
- Genotipo de la planta. El genotipo de la planta es un factor que afecta el cultivo *in vitro*. Existen plantas cuya genética les provee facilidad para la adaptación a condiciones artificiales. Ciertas plantas tienen alta facilidad de inducción de callos y de propagación, mientras que otras plantas son recalcitrantes o no responden a estímulos *in vitro* (Smith, 2013)

Al ser el explante parte de una planta madre que se encuentra en contacto con el ambiente externo, tanto en campo como en invernadero, se contamina con

microorganismos y pestes externamente, y en algunos casos se producen contaminaciones internas (hongos, bacterias y virus endófitos) que deben ser eliminadas al momento de la siembra en medios artificiales.

### **2.2.1.2. Esterilización**

La esterilización es de alta importancia en el cultivo de tejidos. Los explantes, de forma general, se encuentran altamente contaminados tanto externa como internamente y deben ser esterilizados antes de realizar la introducción al cultivo *in vitro*.

El medio de cultivo en el que se siembran las plantas para el cultivo *in vitro* es rico en nutrientes y por lo general tiene como fuente de carbono a la sacarosa o glucosa, lo que lo hace el medio perfecto para el crecimiento tanto de bacterias como de hongos. Dichos contaminantes antagonizan el crecimiento de las plantas y consumen sus nutrientes, además invaden la planta y la matan (Smith, 2013).

Para evitar la contaminación, tanto el explante como el medio de cultivo deben ser previamente esterilizados y la transferencia de los explantes al medio debe realizarse bajo una cámara de flujo laminar y utilizando pinzas y bisturí estériles (Smith, 2013).

Cuando la contaminación es externa, para la esterilización de los explantes se debe utilizar químicos como hipoclorito de calcio o de sodio (cloro comercial), alcohol, detergentes, ácido acético, entre otros; para la contaminación interna se debe utilizar pesticidas en la planta madre y también se podría utilizar antibióticos en el medio de cultivo. Por otro lado, para la esterilización tanto de medios como de pinzas y bisturí se debe utilizar un autoclave donde la alta temperatura y presión lisen las células contaminantes. Para la esterilización de la cámara de flujo es recomendable utilizar tanto químicos (ácido acético o alcohol) como esterilizantes físicos (calor y luz UV) (George et al., 2008).

Una vez que las plantas hayan sido sembradas en el medio de cultivo, el recipiente en el que se encuentran debe estar herméticamente cerrado para evitar contaminación en la incubación.

### **2.2.1.3. Incubación**

Las plantas cultivadas *in vitro* deben estar en cuartos de cultivo con condiciones ambientales controladas. Entre estas condiciones se encuentran:

- Intensidad lumínica,
- Fotoperiodo,
- Humedad y
- Temperatura.

Por lo general, la incubación de las plantas *in vitro* se da en cuartos específicos donde se controlan todas las condiciones ambientales, estos se denominan cuartos de cultivo. Para lograr este control se debe contar con lámparas controladas con *timer*, pues las plantas por lo general necesitan 16 horas de luz indirecta; tener un deshumidificador, ya que la humedad alta colabora a la proliferación de microorganismos contaminantes en el ambiente, y para controlar la temperatura se debe utilizar calefactores o aire acondicionado, según sea el caso (la mayoría de plantas se mantienen en temperaturas que van desde los 25 a los 27°C) (George et al, 2008).

### **2.2.1.4. Medio de cultivo**

Las plantas únicamente crecerán en un ambiente artificial cuando el medio de cultivo o sustrato sea provisto de todos los nutrientes que la planta necesita para su desarrollo, es decir, el medio de cultivo tiene que asemejarse al suelo en el que normalmente se encuentra la planta de interés (Smith, 2013).

Para que un elemento sea considerado esencial para el crecimiento vegetal este debe cumplir cuatro requisitos:

- La planta no puede completar su ciclo vital sin dicho elemento;

- Dicho elemento no puede ser remplazado en su totalidad por otro para cumplir una acción específica;
- El efecto del elemento es directo en el organismo;
- Este es parte de una molécula que es conocida como esencial.

Existen 17 elementos esenciales para el desarrollo adecuado de una planta, estos se dividen en dos grupos: Los macroelementos y los microelementos. Se llama macroelementos a aquellos elementos inorgánicos que son necesarios en mayor cantidad. Entre estos se encuentran los iones de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). Entre aquellos iones que se necesitan en menores concentraciones, pero que también son esenciales para el crecimiento de las plantas, se encuentran el hierro (Fe), níquel (Ni), cloro (Cl), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu) y molibdeno (Mo). Los 3 elementos que no se consideran macro o microelementos, pero que de la misma forma son esenciales para el crecimiento de los organismos vegetales, son el oxígeno (O), carbono (C) e hidrógeno (H) (George et al, 2008).

Existen elementos que a pesar de no ser esenciales para el crecimiento y desarrollo de una planta tienen un efecto benéfico para los procesos de la misma. Entre estos los más comunes son el cobalto (Co), aluminio (Al), sodio (Na) y yodo (I) (George et al., 2008).

Para que un medio de cultivo sea ideal para el cultivo de tejidos vegetales este no solo debe tener los elementos tanto esenciales como no esenciales anteriormente mencionados, sino que estos deben estar en proporciones adecuadas que simulen un sustrato natural; inclusive para evitar reacciones químicas desfavorables el momento de su elaboración, sobre todo de precipitación. Esta proporción por lo general varía según la especie a ser cultivada; sin embargo, existen medios de cultivo que son apropiados para un amplio espectro de especies vegetales. En 1962 Murashige y Skoog desarrollaron un medio de cultivo con elementos en proporciones que permiten el uso del mismo para una gran variedad de plantas. Este medio de cultivo

conocido como MS es el medio de cultivo más utilizado en la actualidad. Las proporciones de elementos en la formulación MS llaman la atención ya que utilizan niveles bajos de calcio, fósforo, magnesio y sobre todo cobre, además de altas concentraciones de cloro y molibdeno (George *et al.*, 2008). Las cantidades de nutrientes que los tejidos vegetales necesitan y aquellas que el medio MS proporciona se encuentran en la tabla 5.

*Tabla 5.* Comparación de las concentraciones promedio de elementos considerados suficientes para el desarrollo vegetal.

	In tissue mmol kg <sup>-1</sup>	In MS mmol l <sup>-1</sup>	In tissue mol%	In MS mol%
N	1000	60	64.4	64.0
K	250	20	16.1	21.3
Ca	125	3	8.0	3.2
Mg	80	1.5	5.1	1.6
P	60	1.25	3.9	1.3
S	30	1.5	1.9	1.6
Cl	3	6	0.19	6.4
Fe	2	0.1	0.13	0.11
Mn	1	0.1	0.06	0.11
B	2	0.1	0.13	0.11
Zn	0.3	0.03	0.02	0.03
Cu	0.1	0.0001	0.0060	0.0001
Mo	0.001	0.001	0.0001	0.0011
Ni	0.001	0	0.0001	0.0000
Na		0.1	0.0000	0.1067

Tomado de George, Hall, De Klerk, 2008

Existen además otros medios de cultivo de uso común como por ejemplo los medios N6, B5 y White. (Roca y Mroginski, 1993)

El medio de cultivo puede ser semisólido o líquido dependiendo del objetivo de la investigación.

#### **2.2.1.4.1. Medio semisólido**

Al usar agentes solidificantes como el agar, phytigel o *gellan gum*, el medio de cultivo se convierte en medio semisólido en el que los explantes se mantienen

estáticos. El medio semisólido se utiliza generalmente para el establecimiento de las plantas *in vitro*. En este tipo de medio únicamente la base del explante o de la planta está en contacto con los nutrientes, esto da como resultado que al pasar el tiempo exista un gradiente de nutrientes y reguladores en el medio de cultivo. Al estar la base del explante en constante contacto con el medio de cultivo, se limita el intercambio gaseoso en este sector de la planta (George *et al.*, 2008).

#### **2.2.1.4.2. Medio líquido**

Es posible realizar medios de cultivo sin agregar agentes solidificantes. En esos casos el medio de cultivo será líquido. Este tipo de medio es ideal para cultivos en suspensión.

#### **2.2.1.5. Fitoreguladores**

En la naturaleza existen sustancias dentro de los tejidos vegetales que, aún sin ser nutrientes, afectan al desarrollo vegetal de una manera regulatoria. Estos compuestos llevan el nombre de fitohormonas u hormonas vegetales y actúan en concentraciones mínimas. Sus homólogos sintéticos son denominados fitoreguladores o reguladores del crecimiento vegetal y son compuestos que se incluyen en el medio de cultivo en el cultivo *in vitro*, y cumplen actividades fisiológicas similares a las fitohormonas en los tejidos vegetales. Lo que diferencia las hormonas vegetales de los fitoreguladores es que las hormonas actúan desde adentro de los tejidos de una manera natural, mientras que los reguladores de crecimiento vegetal son aplicados desde el exterior de los tejidos de una manera artificial; sin embargo, sus efectos son similares (George *et al.*, 2008).

Existen diferentes tipos de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal entre las que se encuentran:

- Auxinas
- Citoquinas
- Giberilinas

- Etileno
- Ácido abscísico.

De estas sustancias las auxinas y las citoquinas son las más importantes reguladoras del crecimiento vegetal y de la morfogénesis, de las que se han encontrado compuestos sintéticos que tienen igual o mayor actividad biológica que las hormonas naturales. Para las giberilinas y el ácido abscísico no se han encontrado aún compuestos sintéticos que tengan la misma actividad biológica; sin embargo, se ha logrado extraer giberilinas naturales de un hongo en cultivo para ser utilizadas de una manera exógena. Al ser el etileno un gas, su uso en el cultivo de tejidos es complicado y raramente utilizado; sin embargo, es posible utilizar etileno o compuestos con actividades similares. Se han inventado compuestos que pueden liberar etileno, los cuales son absorbidos molecularmente por el tejido vegetal dentro del cual se descomponen, liberando etileno (George *et al.*, 2008).

Además de estos cinco grupos importantes de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, se ha encontrado que existen varios otros grupos los cuales han sido totalmente descritos como los brasinoesteroides, ácido jasmónico, oligosacarinas y sisteminas y otros que, aunque se conoce de su existencia, no han sido identificados como los análogos de la fusicocina y las fitotrofinas (George *et al.*, 2008).

Las auxinas, en combinación con citoquinas, promueven el crecimiento de callos y órganos y direccionan la morfogénesis. A nivel celular las auxinas promueven la división y elongación celular. Al ser capaces de iniciar la división celular, estas están involucradas en la formación de meristemos formando tanto tejidos desorganizados como órganos (George *et al.*, 2008).

En el cultivo *in vitro* se utilizan tanto reguladores sintéticos o extraídos, como inhibidores de hormonas.



### **2.2.1.6. pH del medio**

El pH del medio de cultivo afecta tanto al explante como al medio mismo. El potencial de iones hidronios debe ser tal que no perturbe al tejido vegetal. Cuando el pH se encuentra dentro de los límites aceptables es capaz de:

- Definir si las sales se mantienen en forma soluble;
- Influenciar la absorción tanto de nutrientes como de fitoreguladores;
- Afectar reacciones químicas, sobre todo aquellas catalizadas por enzimas;
- Afectar la capacidad gelificante del agente solidificante (agar).

Todas estas condiciones que deben cumplirse restringen el rango efectivo de pH que un medio de cultivo debe tener. Al igual que las concentraciones de nutrientes en el medio, el pH varía con el tiempo de cultivo; sin embargo, el pH inicial del medio debe estar entre 5.5 y 6.0. Por lo general el efecto del pH en el explante no está ligado al daño del tejido vegetal, sino a la disponibilidad de iones y a la absorción de nutrientes (George *et al.*, 2008).

### **2.2.2. Micropropagación**

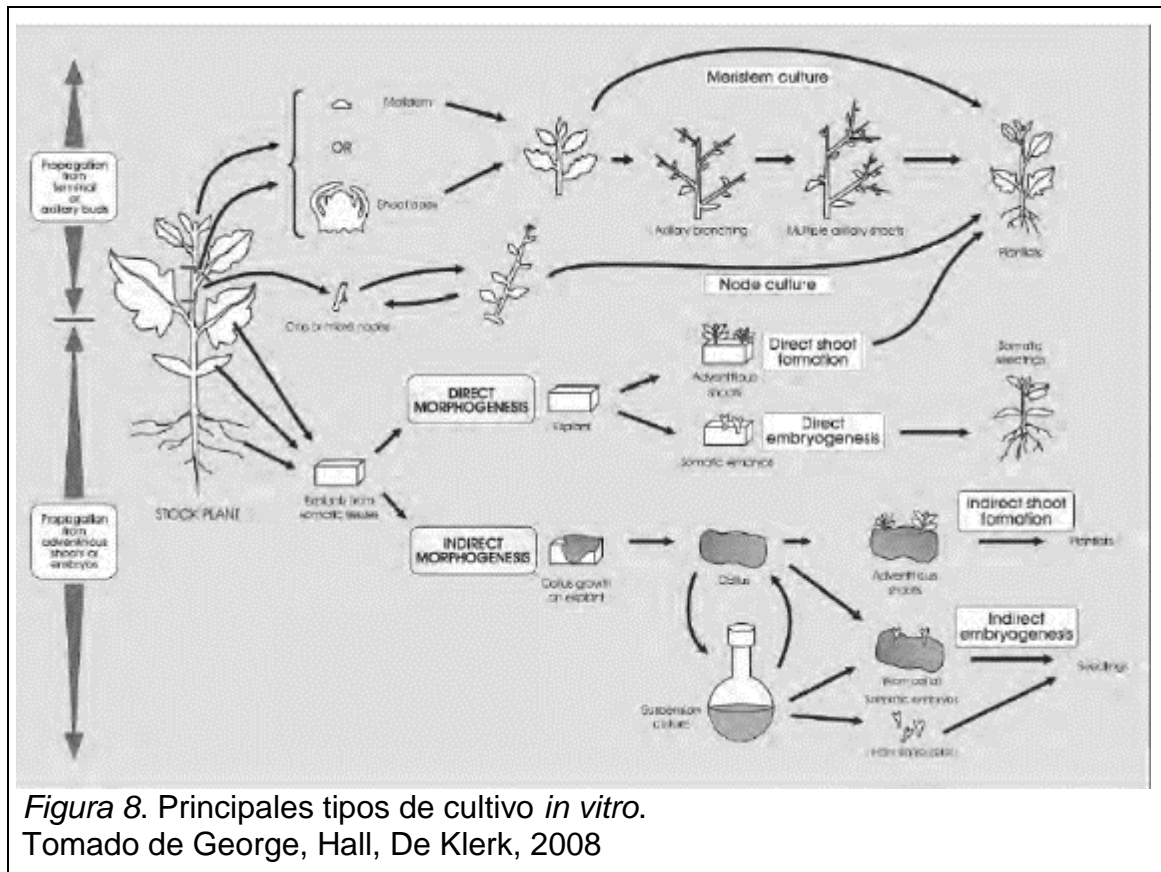
La micropropagación se define como la propagación de plantas mediante el uso de cultivo de tejidos. El objetivo de la propagación *in vitro* es la obtención de plantas con el mismo tipo de la planta original o “planta madre”, es decir, la micropropagación es un sistema de clonación de plantas de manera *in vitro* con el fin de tener una mayor cantidad de plantas con el mismo genotipo y fenotipo que la planta originalmente seleccionada. (George *et al.*, 2008)

La micropropagación se basa en el principio de la totipotencialidad de las células vegetales. El fenómeno de totipotencialidad fue descrito en la década de 1950 por Steward y Reinert y dice que cualquier célula vegetal que posea el material genético completo en su núcleo, sus plásmidos y su mitocondria tiene el potencial de regenerar una planta completa sin importar la especificidad de dicha célula (Steward, Mapes y Mears, 1958; Reinert, 1958). La totipotencialidad de las células se puede observar claramente en la naturaleza, donde las células meristemáticas, que son células desdiferenciadas con alta

capacidad de división, se van especializando para formar tejidos y órganos vegetales. Se creía que todas las células vegetales eran totipotentes; sin embargo se ha comprobado que existen diferenciaciones celulares donde la célula pierde parte de su código genético, lo que hace que se pierda este potencial que en un inicio tenía. En general este fenómeno se observa cuando el ambiente en el que se encuentran plantas, sus células o tejidos es perturbado. En el cultivo *in vitro* esto sucede cuando una sección de una planta es aislada de la planta madre y es llevada a un medio artificial para el cultivo de tejidos. (Atwell, Kreidemann y Turnbull, 1999)

Las plantas obtenidas mediante micropropagación se denominan microplantas y existen tres formas de obtenerlas. La primera de estas maneras de obtención de plantas clonales es utilizando meristemos como explantes, a estos se les debe inducir el crecimiento y la proliferación. La segunda manera de obtener una multiplicación clonal *in vitro* es mediante la morfogénesis, se debe inducir la formación de meristemos a partir de células o tejidos dediferenciados o directamente a partir de tejidos diferenciados obtenidos de la planta madre. En ambos casos es importante emplear reguladores de crecimiento los cuales van a direccionar el crecimiento a los meristemos y a su proliferación. El tercer medio por el cual se puede llegar a la obtención de microplantas es la embriogénesis. (George *et al.*, 2008)

En la figura 8 se pueden observar los diferentes tipos de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.



### 2.2.3. Embriogénesis somática

"La embriogénesis somática es la máxima expresión de la totipotencia celular en células vegetales" (Gutiérrez-Mora, Gonzales-Gutiérrez, Rodríguez-Garay, Ascencio-Cabral y Li-Wei, 2012)

Se conoce como embriogénesis a la formación de embriones en una planta, que puede ser cigótica o somática, es decir, el embrión se puede originar a partir de una célula sexual o asexual. La embriogénesis cigótica conocida únicamente como embriogénesis se da en forma natural en todo tipo de plantas y sus etapas varían en angiospermas y gimnospermas. *Bactris gasipaes* pertenece a la infradivisión angiospermae, por lo que su embriogénesis es similar a la que se produce en la *Arabidopsis* descrita en la figura 9 (George *et al.*, 2008).

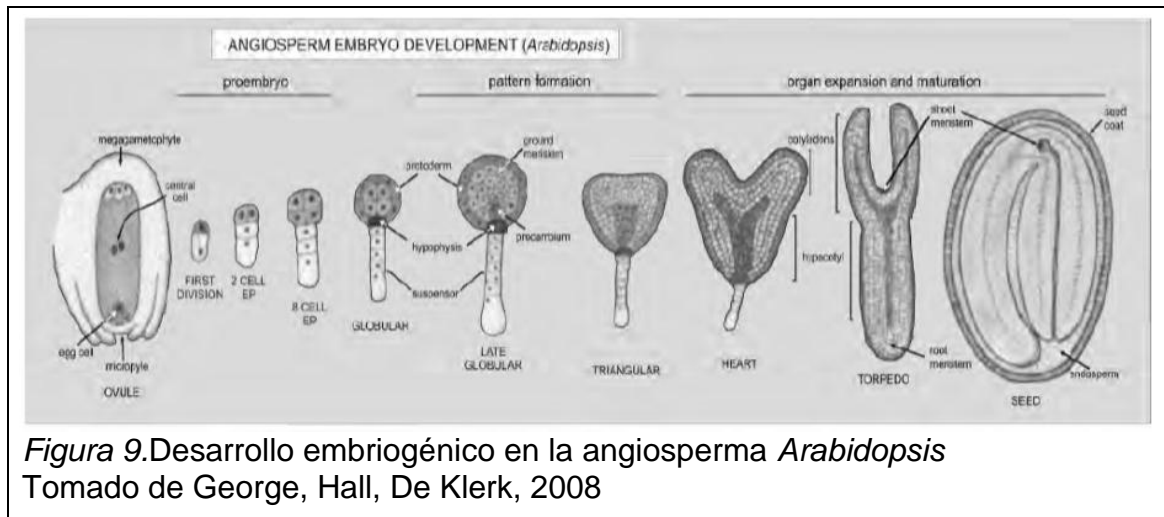
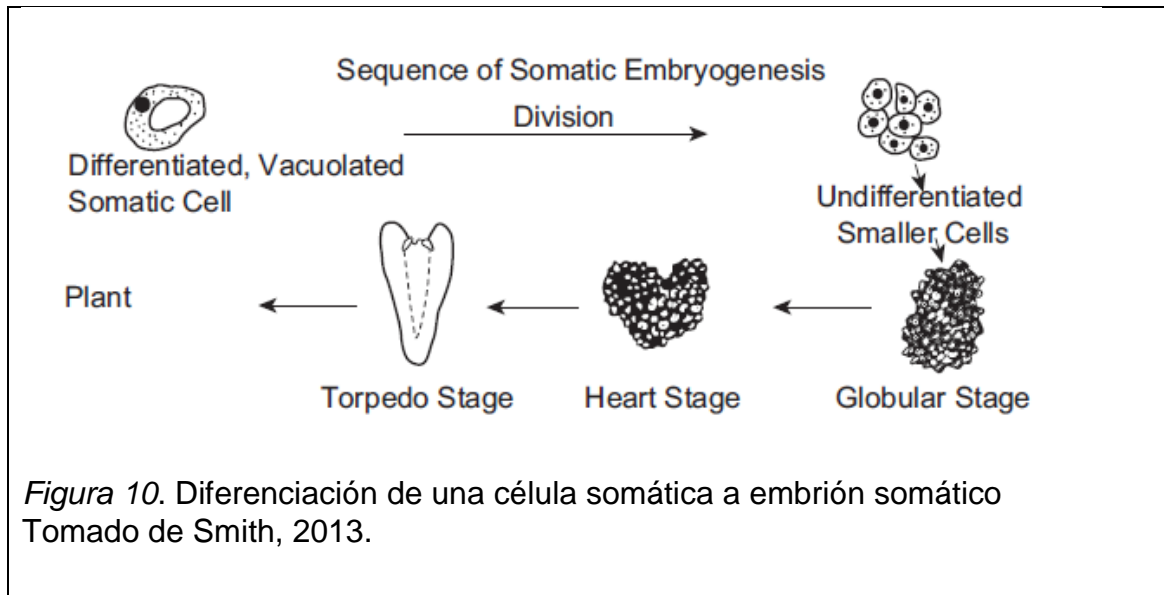


Figura 9. Desarrollo embriónico en la angiosperma *Arabidopsis*  
Tomado de George, Hall, De Klerk, 2008

La embriogénesis es un tipo de morfogénesis en el cual la estructura formada *de novo* son embriones (Figura 10). Cuando la embriogénesis se da de manera natural se la conoce como embrionía adventicia y es una forma de apomixis (reproducción asexual por medio de semillas) (Freire, 2003); la embriogénesis se puede inducir artificialmente en cualquier tejido mediante fitoreguladores. Los embriones obtenidos son estructuralmente similares a los embriones encontrados en las semillas de forma natural, es decir, tienen una estructura bipolar que contiene un eje apical y uno radicular (George *et al.*, 2008). Para poder diferenciar los embriones cigóticos (embriones de semilla) de los embriones obtenidos a partir de la embriogénesis se les llama embriones somáticos o embrioides (en caso de que no esté claro si la estructura obtenida es el equivalente somático de un embrión de semilla). La formación de embriones somáticos de forma artificial es interesante para una multiplicación masiva de plantas, criopreservación en bancos de germoplasma y transformación genética. (George *et al.*, 2008)



Según Deo, Tyagi, Taylor, Harding y Becker (2010), la embriogénesis somática tiene varias ventajas sobre otros tipos de multiplicación *in vitro* entre los que se encuentran:

- Permite el cultivo de grandes cantidades de embriones somáticos capaces de regenerar plantas,
- Se elimina la etapa de enraizamiento necesaria en otros tipos de cultivo *in vitro* ya que el crecimiento apical y el radicular se dan simultáneamente,
- Se permite llevar un cultivo a gran escala sin necesidad de alto incremento laboral,
- Se pueden sincronizar la formación embrionaria y la germinación evitando costos laborales,
- Es posible almacenar embriones somáticos por largos periodos de tiempo ya que, al igual que en sus contrapartes cigóticas la dormancia puede ser inducida.

A pesar de los beneficios anteriormente mencionados que tiene la embriogénesis somática, esta tiene desventajas entre las que se encuentran (Deo *et al.*, 2010):

- El desarrollo embrionario no es sincronizado causando que en un solo cultivo se encuentren embriones en diferentes etapas embrionarias. Se han descrito métodos con los cuales se puede llegar a sincronizar las etapas de un cultivo pero esto puede disminuir la capacidad regenerativa de los mismos, es importante destacar que aun que la regeneración sea menor, la tasa de multiplicación sigue siendo mayor que en cultivos *in vitro* tradicionales.
- El cultivo prolongado puede causar una acumulación de mutaciones ya que se tiene una baja estabilidad de líneas celulares por lo que se dan variaciones fisiológicas en las plantas multiplicadas perdiendo así las características deseadas. Después de algunos ciclos de multiplicación las células pierden su capacidad embriogénica por lo que es necesario reanudar el material continuamente, lo que puede ser considerado una ventaja en el momento de evitar mutaciones.

La embriogénesis somática se puede dar de una manera directa, sin pasar por un estado de callo, o de una manera indirecta cuando los embriones se obtienen de callos previamente formados (George *et al.*, 2008).

#### **2.2.3.1. Embriogénesis directa**

La embriogénesis directa es el término utilizado para la formación de embriones somáticos directamente a partir de un explante de origen somático. La mayor ocurrencia de embriogénesis directa se da cuando el explante está asociado o es un derivado de gametofitos femeninos. En este tipo de embriogénesis el explante no forma callo antes de formar los embriones. (George *et al.*, 2008)

### **2.2.3.2. Embriogénesis indirecta**

La embriogénesis indirecta se da cuando el explante pasa por una etapa de callo antes de llegar a formar embriones somáticos. Las células deben pasar por una etapa de desdiferenciación celular (fase de callo) para después empezar la inducción de la embriogénesis asistida con fitoreguladores en células no diferenciadas (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012).

La embriogénesis somática indirecta, en su etapa de callo, puede favorecer técnicas de transferencia de genes para el mejoramiento genético de especies (Deo *et al.*, 2010).

### **2.2.3.3. Factores que afectan la embriogénesis**

Existen varios factores que afectan la embriogénesis somática en plantas entre las que se encuentran:

- Genotipo de la planta donante
- Explante
- Componentes del medio de cultivo
  - Reguladores del crecimiento (sección 2.2.3.4)
- Luz
- Temperatura

El genotipo de la planta donante afecta a la embriogénesis ya que se ha visto que ciertas variedades de la misma planta no forman embriones mientras que otras sí. Los niveles hormonales sobre todo de citoquinas en ciertos genotipos pueden favorecer o inhibir la embriogénesis (Deo *et al.*, 2010).

Se pueden utilizar diferentes tipos de explantes para obtener embriones somáticos entre los que se encuentran anteras, ovarios, polen, hojas, peciolo, tallos, embriones, cotiledones, entre otros. En plantas de *Bactris gasipaes* los explantes más utilizados para este proceso son los embriones cigóticos (Steinmacher, Guerra, Saare-Surminski y Lieberei, 2011).

Se ha demostrado que mientras la planta donante y el explante son más jóvenes la inducción de embriones se da de una manera más fácil y se obtienen más embriones. De la misma manera se ha demostrado que los niveles hormonales presentes en los explantes afectan las concentraciones de reguladores exógenos para la formación de embriones somáticos; por este motivo las plantas jóvenes que se encuentran en división originan mejores explantes (Deo *et al.*, 2010).

El medio de cultivo tiene un gran efecto en la inducción de la embriogénesis somática. Esta se ve afectada por la composición del medio de cultivo de la misma manera que fue descrita en el punto **2.2.1.4 Medio de cultivo** donde se describe que cada tipo de planta y cada tipo de explante tiene la necesidad de un medio de cultivo específico y que el medio de inducción de la embriogénesis utilizado para una planta no es el mismo que se debe utilizar para otra (Gutierrez-Mora *et al.*, 2012).

La presencia de carbón activado en el medio de cultivo es también de gran importancia sobre todo en plantas ricas en compuestos fenólicos, es decir plantas susceptibles a la oxidación como *Bactris gasipaes*. Después de una herida en el tejido de este tipo de plantas los compuestos fenólicos se oxidan por acción de las fenol oxidasas, lo que produce una coloración café en el sitio de la herida. Esto no causa solamente un cambio en la coloración de los tejidos vegetales sino que también se inhiben la actividad de proteínas inhibidoras de la embriogénesis somática. El carbón activado remueve los inhibidores de la embriogénesis tales como el ácido fenilacético, los derivados del ácido benzóico y otros compuestos tóxicos. Se conoce también que el carbón activado es capaz de absorber el 5-hidroximetilfurfural, un inhibidor resultante de la degradación de la sucrosa en el autoclave, además de una alta cantidad de auxinas y citoquinas lo que demuestra que este no solamente remueve inhibidores sino también reguladores que estimularían la formación de callo, el crecimiento y la proliferación (Deo *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que la embriogénesis somática es sensible a la variación de la temperatura. En plantas de *Avena sativa* se observó que un shock de calor



estimuló la formación de embriones. En el cultivo de maíz se demostró que un pre-tratamiento frío dobló la respuesta embriogénica en el cultivo *in vitro*. De la misma manera se ha demostrado en una variedad de plantas que la temperatura tiene un efecto importante en el desarrollo de embriones (Zavattieri, Frederico, Lima, Sabino y Arnholdt-Schimtt, 2010)

La luz es otro de los factores que afectan la embriogénesis. Se ha demostrado que en la etapa de callo en la embriogénesis somática indirecta las plantas de palmito deben estar en obscuridad para inducir la formación de callo. Una vez obtenido el callo este debe ser conservado en condiciones con luz para inducir embriones somáticos (Steinmacher *et al.*, 2011).

#### **2.2.3.4. Reguladores del crecimiento**

Los reguladores del crecimiento o fitoreguladores tienen un papel importante en la inducción de embriones somáticos. Los protocolos de embriogénesis más comúnmente utilizados utilizan un medio de cultivo suplementado con auxinas para la formación de callo como paso previo a la embriogénesis y posteriormente utiliza un medio con bajas o nulas concentraciones de reguladores. En general la presencia de auxinas promueve la formación y proliferación de callo además inhibe la diferenciación celular, cuando se elimina la auxina del medio de cultivo o sus concentraciones bajan se estimula la diferenciación y se induce a la formación de embriones (Deo *et al.*, 2010). Se pueden observar diferencias morfológicas en el explante en el momento de cambiar de un medio de cultivo con auxinas a uno sin o con bajas concentraciones de las mismas. Aparentemente la eliminación de estos fitoreguladores da una señal a las células para que estas comiencen un crecimiento organizado (Deo *et al.*, 2010). El hecho de que la embriogénesis se pueda dar en un medio de cultivo libre de reguladores sugiere que en el momento de la formación de callo las masas pro-embriogénicas se encuentran ya predeterminadas para cumplir con la etapa globular de la embriogénesis y que además están sintetizando inhibidores de la embriogénesis. Una vez eliminadas las auxinas estas masas pre-embriogénicas dejan de producir dichos inhibidores iniciando así la ruta embriogénica (Deo *et al.*, 2010). Se conoce que

las auxinas son las principales reguladoras de la polaridad celular siendo de alta importancia para la simetría bilateral de los embriones (Deo *et al.*, 2010).

A pesar de que las auxinas son los reguladores más importantes en la embriogénesis somática otras sustancias como las citoquinas son también utilizadas. Las citoquinas, al igual que las auxinas, tienen la capacidad de estimular las células y por lo tanto son utilizadas también para la embriogénesis (Deo *et al.*, 2010).

#### **2.2.4. Biorreactores**

En todas las áreas de la biotecnología se utilizan biorreactores para la automatización de procesos biológicos. El diccionario de Oxford define un biorreactor como "Aparato en el que se da una reacción o proceso biológico, especialmente a escala industrial" (Oxford Dictionaries, 2010). La definición aceptada de un biorreactor es "Un tanque en el que células, extractos celulares o enzimas llevan a cabo una reacción biológica" (Jaureguí Rincón y Chávez Vela, 2006)

En el área de multiplicación *in vitro* de plantas los biorreactores utilizados llevan el nombre de sistema de inmersión temporal (SIT) los cuales están descritos a continuación.

##### **2.2.4.1. Sistema de inmersión temporal (SIT)**

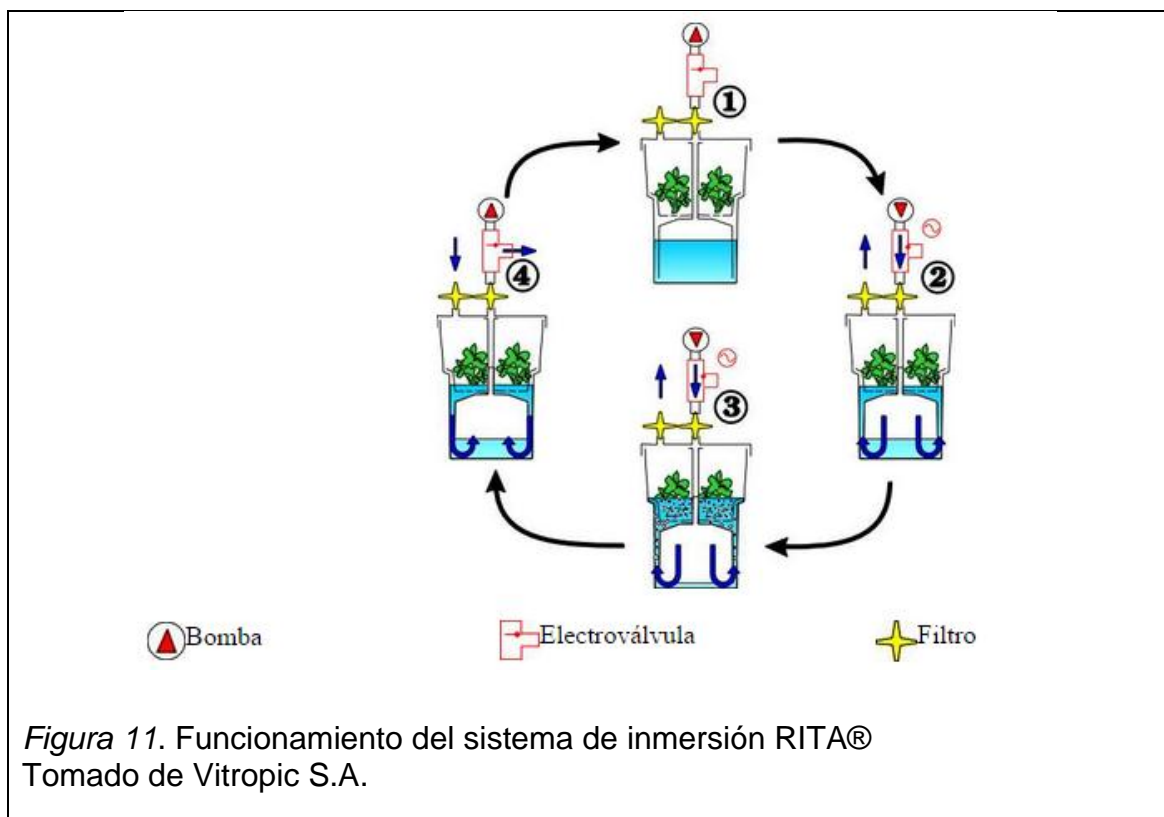
Se definen los sistemas de inmersión temporal como:

"Los SIT consisten en el cultivo de células, tejidos u órganos expuestos de manera temporal a medio de cultivo líquido en biorreactores semiautomatizados bajo condiciones asépticas y controladas; es decir, son recipientes diseñados específicamente para la producción a gran escala de células, tejidos u órganos" (Bello-Bello y Iglesias- Andreu, 2012)

### 2.2.4.1.1. Sistema de inmersión temporal RITA®

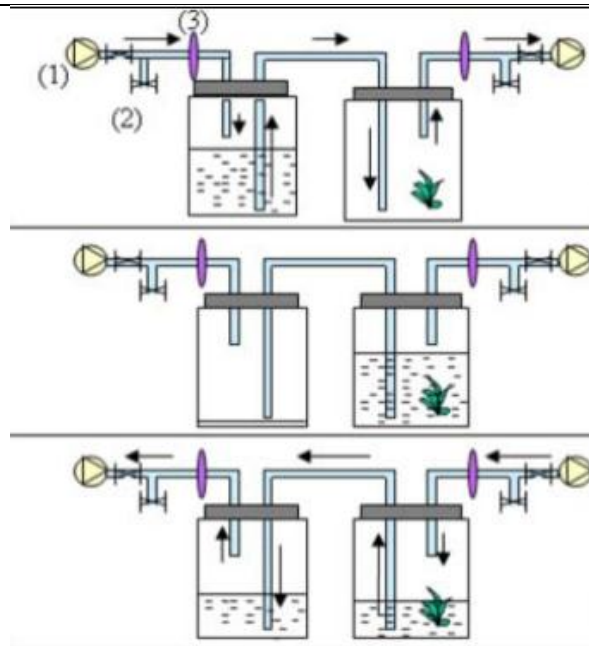
El envase para el sistema de inmersión temporal RITA fue desarrollado en Francia en el año 1993 por Alvard y sus colaboradores quienes en 1995 utilizaron medio de cultivo líquido en el mismo (Ángel-Molina, J.X., González-Cabrera, J.J., Orellana-Núñez, M.A. y Arévalo-Alvarado, 2013).

El sistema RITA® es un envase de 1 litro de volumen con dos compartimientos uno (que contiene el material vegetal) sobre el otro (que contiene el medio de cultivo). Se ejerce presión sobre el compartimiento inferior causando que el medio de cultivo líquido suba hacia el compartimiento superior sumergiendo a los explantes. Una vez que se libera la presión el medio de cultivo vuelve a bajar dejando a las plantas en contacto con el aire nuevamente (figura 11). Tanto el tiempo de inmersión como el intervalo entre inmersiones son controlado por *timers* conectados al compresor de aire que provee la presión necesaria (Muñoz, 2006).



### 2.2.4.1.2. Sistema de inmersión temporal cubano (BIT)

Debido a los costos del sistema RITA® y a su reducido volumen se desarrollo el sistema BIT cubano también conocido como sistema de frascos gemelos. En este se utilizan dos frascos, uno que contiene los explantes y otro utilizado como reservorio para el medio de cultivo líquido. Ambos recipientes se conectan entre sí con una manguera que va desde el fondo del primero hasta el fondo del segundo. El sistema funciona cuando aire filtrado entra a presión al frasco que contiene el medio de cultivo, esto hace que el medio pase de este frasco al que contiene las plantas y las sumerja. Una vez que ha pasado el tiempo de inmersión entra presión al frasco con explantes lo que hace que el medio de cultivo regrese a su frasco y las plantas vuelvan a tener contacto con el aire como se muestra en la figura 12 (Muñoz, 2006).



*Figura 12.* Funcionamiento de un sistema BIT  
Tomado de Muñoz, 2006.

### **2.2.4.1.3. Ventajas del SIT**

- Al utilizar medios de cultivo líquidos los nutrientes son más fácilmente absorbidos por los explantes. Además ya que la inmersión no es permanente se evitan problemas de hiperhidricidad y vitrificación del material vegetal.
- La atmosfera interna esta en renovación constante permitiendo el intercambio gaseoso, lo que permite la eliminación del etileno y del CO<sub>2</sub> y la entrada de oxígeno al sistema.
- Después de la inmersión los explantes retienen una capa de medio de cultivo lo que evita la desecación de los mismos.
- Se mantiene una humedad relativa del 98 al 100% ya que los filtros utilizados son hidrofóbicos.
- Ya que la presión utilizada para el movimiento del medio de cultivo se da por un compresor de aire el medio de cultivo tiene una alta concentración de oxígeno disuelto.
- Al ser un sistema semiautomatizado se reduce la mano de obra y el tiempo de corte (Muñoz, 2006)

### 3. Metodología

#### 3.1. Selección de material vegetal

La selección del material vegetal se realizó en la hacienda del Ing. Cristian Secaira ubicada en el Recinto Progreso, Finca San Eduardo situada en Pedro Vicente Maldonado, Ecuador. Esta se basó en las necesidades de los palmitocultores según las entrevistas realizadas a 5 de ellos: Cristian Secaira (presidente de la Asociación de Palmitocultores del Ecuador), Jorge Burneo (director I&D agrícola, Pronaca), José Miguel Vinueza (Jefe de Investigación y Desarrollo Sierra, Pronaca), Andrés Muirragui (agricultor) y Santiago Pérez (agricultor).

Los criterios de selección fueron (tabla6):

*Tabla 6.* Criterios de selección del material vegetal.

Presencia de espinas	Grosor de la espina	Edad de la planta madre	Precocidad (tallos por planta)	Altura
+	Alto	Joven	≥2 tallos/ planta	≤2m

Las plantas seleccionadas como “Planta madre” o planta donante de explantes fueron aquellas plantas jóvenes que presentaban una abundante cantidad de espinas gruesas, que presentaban precocidad, es decir que presenten dos o más tallos y que no superaran los dos metros de altura.

#### 3.2. Desinfección e introducción de explantes

Se utilizaron 6 protocolos de desinfección.

Como paso previo para todos los protocolos se realizó un pelado manual de las capas externas de la planta, dejando únicamente las 3 capas internas y el meristemo apical; posteriormente se procedió a la extracción de espinas por raspado, para lo cual se utilizó un estilete. Una vez libre de espinas los explantes fueron lavados con agua corriente durante 5 minutos, se procedió a

eliminar suciedades externas utilizando jabón en barra y finalmente se enjuagaron con agua destilada.

Los siguientes pasos de cada protocolo de desinfección son los siguientes (Tabla 7):

Tabla 7. Desinfecciones utilizadas.

Identificador	Paso 1: Desinfección inicial					Paso 2: Lavado inicial				Paso 3: Desinfección intermedia		
	Desinfectantes			Tiempo (min)	Flujo	Agua estéril	Tiempo (min)	Observaciones	Flujo	NaClO	Tiempo (min)	Flujo
	NaClO	Tween 20	Tachigaren									
D1	4%	Si		1	No	Si	3		No	4%	10	Si
D2	4%	Si		1	No	Si	3		No	2%	10	Si
D3	4%	No		5	No	No	-	Pelado externo	Si	2%	5	Si
D4	4%	Si	1ml/L	1	No	Si	3		No	1%	60	Si
D5	4%	Si	1ml/L	1	No	Si	3		No	1.5%	60	Si
D6	4%	Si	1ml/L	1	No	Si	3		No	2%	60	Si

Identificador	Paso 4: Lavado intermedio				Paso 5: Desinfección final				Paso 6: Lavado final	
	Agua estéril	Tiempo (min)	Observaciones	Flujo	Desinfectantes		Tiempo (min)	Flujo	Agua esteril	Tiempo (min)
					NaClO	Etanol				
D1	Si	3		Si	-	70%	1	Si	Si	3
D2	Si	3		Si	-	70%	1	Si	Si	3
D3	No	-	Pelado externo	Si	1%	No	5	Si	Si	3
D4	Si	3		Si	-	-	-	Si		
D5	Si	3		Si	-	-	-	Si		
D6	Si	3		Si	-	-	-	Si		



Una vez realizados los últimos pasos de la desinfección se procedió a la introducción *in vitro*.

Como explante se extrajeron de la planta madre hojas jóvenes.

Para la introducción se utilizaron 24 medios de cultivo. Todos los medios utilizados fueron Murashige y Skoog (MS) modificados, la diferencia entre ellos fueron los fitoreguladores utilizados y sus concentraciones (Tabla 8).

Tabla 8. Medios de cultivo utilizados para la introducción de explantes

<b>MS + 30 g/L sucrosa + 2.13 g/L Gellan Gum Powder (Culture Gel™ type 1) + fitoregulador (mg/L) pH5.8</b>			
<b>Identificador</b>	<b>BAP</b>	<b>2,4-D</b>	<b>2-iP</b>
T1	3 mg/L	5 mg/L	-
T2	3 mg/L	10 mg/L	-
T3	3 mg/L	20 mg/L	-
T4	4 mg/L	5 mg/L	-
T5	4 mg/L	10 mg/L	-
T6	4 mg/L	20 mg/L	-
T7	5 mg/L	5 mg/L	-
T8	5 mg/L	10 mg/L	-
T9	5 mg/L	20 mg/L	-
T10	6 mg/L	5 mg/L	-
T11	6 mg/L	10 mg/L	-
T12	6 mg/L	20 mg/L	-
T13	3 mg/L	-	5 mg/L
T14	3 mg/L	-	10 mg/L
T15	3 mg/L	-	20 mg/L
T16	4 mg/L	-	5 mg/L
T17	4 mg/L	-	10 mg/L
T18	4 mg/L	-	20 mg/L
T19	5 mg/L	-	5 mg/L
T20	5 mg/L	-	10 mg/L
T21	5 mg/L	-	20 mg/L
T22	6 mg/L	-	5 mg/L
T23	6 mg/L	-	10 mg/L
T24	6 mg/L	-	20 mg/L

La formulación del medio MS se encuentra en el Anexo 1.

Para la introducción de los explantes, con la ayuda de pinzas de disección y de bisturí, se realizó el pelado de las últimas tres capas externas del material seleccionado en campo. Una vez aisladas las hojas jóvenes se inició el corte, estas se segmentaron en pedazos de alrededor de 5mm por 10mm. Los fragmentos obtenidos fueron sembrados de forma estéril en los medios anteriormente descritos contenidos en frascos sellados con tapa y film de PVC

(Resinite). Se sembraron 5 secciones de hoja por frasco. Se mantuvieron estas condiciones por un ciclo de 5 semanas.

Como variables se evaluaron el porcentaje de contaminación y porcentaje establecimiento de los explantes en cada medio de cultivo. El material establecido se utilizó en los experimentos posteriores

Las plantas introducidas fueron mantenidas en oscuridad en cuartos de cultivo con una temperatura de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. Obtención de callos pro-embriogénicos

A partir del material introducido se procedió a la obtención de callos. Luego de un ciclo de introducción, y una vez evaluados y eliminados los contaminados y aquellas plantas que presentaron necrosis, se procedió al cambio de medio de cultivo cuya formulación es la siguiente (Tabla 9):

Tabla 9. Medios de cultivo utilizados para la obtención de callo.

<b>MS + 30 g/L sucrosa + 2.13 g/L Gellan Gum Powder (Culture Gel™ type 1) + fitoregulador (mg/L) pH5.8</b>				
<b>Identificador</b>	<b>BAP</b>	<b>2,4-D</b>	<b>Picloram</b>	<b>L-Glutamina</b>
<b>B01</b>	-	0.5 mg/L	-	-
<b>B02</b>	-	1 mg/L	-	-
<b>B03</b>	-	1.5 mg/L	-	-
<b>B04</b>	-	2 mg/L	-	-
<b>B05</b>	-	2.5 mg/L	-	-
<b>B06</b>	-	3 mg/L	-	-
<b>B07</b>	3 mg/L	0.5 mg/L	-	-
<b>B08</b>	3 mg/L	1 mg/L	-	-
<b>B09</b>	3 mg/L	1.5 mg/L	-	-
<b>B10</b>	3 mg/L	2 mg/L	-	-
<b>B11</b>	3 mg/L	2.5 mg/L	-	-
<b>B12</b>	3 mg/L	3 mg/L	-	-
<b>B13</b>	1.6 mg/L	-	-	-
<b>PG</b>	-	-	10 $\mu\text{M}$	500 mg/L

Las condiciones de cultivo para la obtención de callos pro-embriogénicos fueron similares a aquellas controladas en la introducción. El medio de cultivo fue renovado en ciclos de 5 semanas. Después de un ciclo, se evaluó la presencia o ausencia de callos en los diferentes tipos de explantes utilizando un estereoscopio. Con los explantes que presentaron callos se prosiguió a la etapa de embriogénesis somática, específicamente al desarrollo de pro-embriones.

### **3.4. Embriogénesis somática**

#### **3.4.1. Desarrollo de pro- embriones**

Para el desarrollo pro-embriogénico se utilizaron dos medios de cultivo, el medio B13 y el medio PG. Las formulaciones de los mismos se observan en la tabla 9). Se mantuvieron las mismas condiciones de cultivo que en la introducción; es decir, los frascos se mantuvieron en completa oscuridad, en cuartos de cultivo con una temperatura de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Después de un ciclo se evaluó la presencia de estructuras globulares en los callos las cuales fueron aisladas, y se las pasó a medio de maduración de embriones; mientras que aquellos en los que no se encontraron este tipo de estructuras se mantuvieron un ciclo más en medio de desarrollo de pro-embriones. Después de este ciclo adicional se volvió a evaluar la presencia de este tipo de estructuras y se repitió el proceso.

#### **3.4.2. Maduración de pro-embriones**

Una vez que los callos formaron estructuras globulares pro-embriogénicas estos fueron aislados y trasladados a medio de maduración de embriones (Steinmacher et al., 2011), identificado de aquí en adelante como medio negro, cuya formulación se encuentra en la tabla 10.

Tabla 10. Medio de cultivo utilizado para la maduración de pro-embriones.

<b>MS + 30 g/L sucrosa + 2.13 g/L Gellan Gum Powder (Culture Gel™ type 1) + fitoregulador (mg/L) pH5.8</b>					
<b>Identificador</b>	<b>2,4-D</b>	<b>2-iP</b>	<b>Carbón activado</b>	<b>L-Glutamina</b>	<b>Caseína Hidrolisada</b>
<b>Negro</b>	40 µM	10 µM	1.5 g/L	1 g/L	500 mg/L

Los pro-embriones se mantuvieron bajo las mismas condiciones de luz y temperatura anteriormente descritas, luego del cual se evaluó el crecimiento y se procedió al ciclo de desarrollo de embriones en el sistema de inmersión temporal.

### **3.5. Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal**

Se diseñaron y construyeron dos tipos de sistemas de inmersión temporal (SIT). El primero de ellos basado en el diseño del BIT cubano y el segundo un sistema de inmersión por gravedad.

#### **3.5.1. Sistema BIT cubano**

Para el diseño del sistema de BIT cubano se aplicó el principio de frascos gemelos donde se utilizan dos frascos, uno de los cuales contenía los explantes y el otro el medio de cultivo líquido, y un compresor de aire utilizado para impulsar el medio de cultivo de un compartimiento al otro (Maldonado, Rodríguez, Gómez, & Cárdenas, 2003).

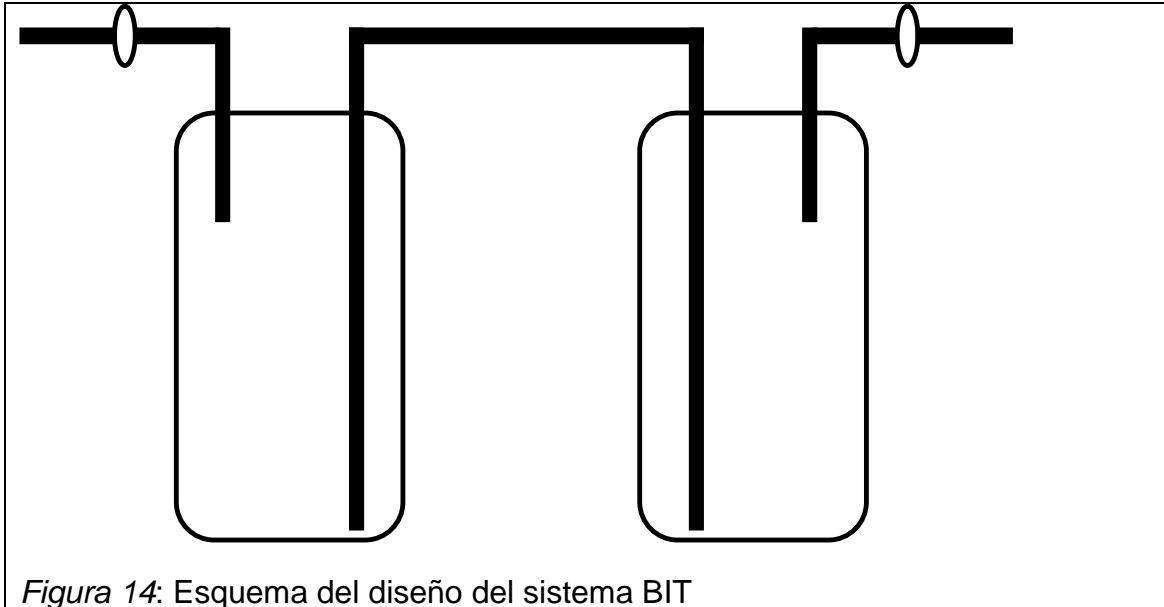
Para evitar la entrada de contaminantes con el aire comprimido se utilizaron filtros HEPA (figura 13).



Los materiales utilizados para dicho sistema fueron los siguientes:

- Bomboneras de vidrio
- Tapones de caucho
- Mangueras de silicón
- Teflón resistente a la temperatura
- Silicón termorresistente
- Compresor de aire
- Controladores de tiempo (*timer*)
- Filtros HEPA

Para la construcción de cada sistema se utilizaron dos bomboneras con sus tapas, 4 tapones de caucho, dos filtros HEPA, 1.5m de manguera de silicón, teflón de acuerdo al siguiente esquema (figura 14):



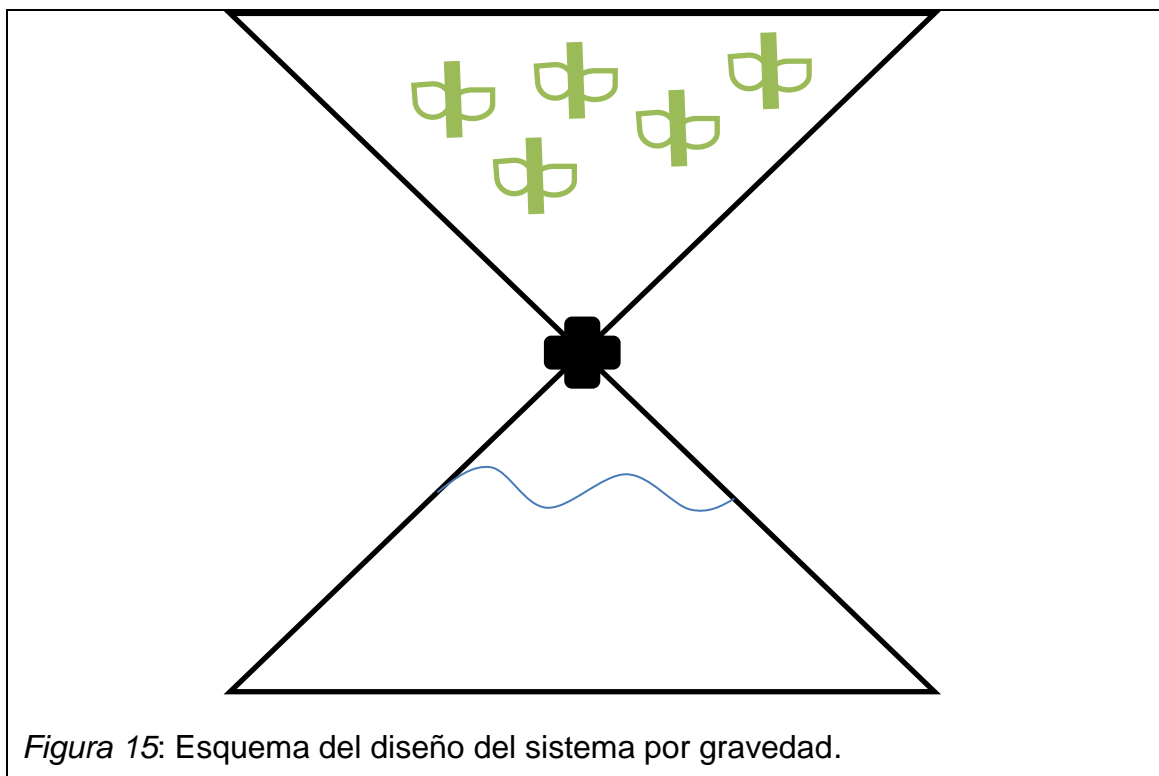
Para el uso de este SIT se autoclavó el sistema completo con el medio de cultivo a utilizar y los filtros HEPA, y posteriormente se realizó la siembra de explantes al frasco que no contiene medio de cultivo dentro de una cámara de flujo horizontal en condiciones estériles. Una vez autoclavados se colocaron los filtros en los extremos de las mangueras cortas y estos fueron conectados al compresor de aire controlado con *timer*, que se encarga de aumentar la presión a uno de los frascos para que así el medio de cultivo se mueva de un frasco al otro en intervalos de tiempo controlados.

### 3.5.2. Sistema por gravedad

El diseño del segundo sistema de inmersión temporal (SIT) se basó en la gravedad.

Para la construcción del mismo se utilizaron dos frascos plásticos similares y un tapón de caucho que fue hecho bajo pedido

El tapón utilizado tiene un diámetro similar al de la boca del frasco a utilizar, tiene una pestaña de medio centímetro que bordea al tapón en el centro y que lo atraviesa. La construcción del sistema se basó en el siguiente esquema (Figura 15):



### 3.6. Desarrollo de embriones en el SIT

Una vez madurados, los pro-embriones fueron trasladados de manera estéril en cámara de flujo horizontal a medio de conversión de embriones líquido, identificado en adelante como medio blanco. Dicho medio fue adaptado de Steinmacher *et al*, 2011 y su composición se encuentra en la tabla 11.

Tabla 11. Composición medio de cultivo blanco.

<b>MS + 30 g/L sucrosa + fitoregulador (mg/L) pH5.8</b>		
<b>Identificador</b>	<b>2-iP</b>	<b>ANA</b>
<b>Blanco</b>	20 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M

Los embriones somáticos se mantuvieron durante un ciclo de 4 semanas para los dos diseños, en medio blanco en las siguientes condiciones (Tabla 12):



Tabla 12. Condiciones de cultivo para el desarrollo de embriones en SIT.

<b>Parámetro</b>	<b>Necesidad</b>
Temperatura	28±2°C
Fotoperiodo	16-8
Intensidad lumínica	2960-4440 lux
Tiempo de inmersión	4 min-12 h

Se evaluó los porcentajes de contaminación, establecimiento y germinación en los sistemas utilizados.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1. Selección del material vegetal

En campo se observó variedad en los fenotipos de las plantas de *Bactris gasipaes*, se seleccionaron las plantas con las siguientes características (Tabla 13):

Tabla 13. Características deseadas para la multiplicación.

Presencia de espinas	Grosor de la espina	Edad de la planta madre	Precocidad (tallos por planta)	Altura
+	Alto	Joven	≥2 tallos/ planta	≤2m

En la figura 16 se observa una planta con las características deseables.



Figura 16. Planta de *Bactris gasipaes* con 7 tallos laterales y un tallo principal.

- Las flechas de color rojo muestran los tallos laterales o secundarios mientras que la flecha azul muestra el tallo principal.
- El diámetro del tallo principal en su base era de alrededor de 20 cm.
- El diámetro de la base de las espinas tanto en las hojas como en los tallos estaba entre 5 y 10mm.

De las plantas seleccionadas se tomaron como explantes los 5cm de hojas jóvenes adyacentes al área meristemática que aún se encontraban dentro del tallo (figura 17).



*Figura 17.* Secciones de la planta tomadas como explante.

a) El color rojo muestra el área meristemática mientras que el color azul muestra las hojas jóvenes.

Para la selección del material vegetal se tomó en cuenta que únicamente el 20% de las plantas de palmito sembradas a nivel país son plantas sin espinas (Burneo, 2014) y que la totalidad de las plantaciones que forman parte de la asociación de palmitocultores corresponden a plantas con espinas.

El momento de la selección se observó que las plantas más vigorosas y con mayor diámetro en su tallo principal presentan espinas más anchas y largas que otras con menor vigor y tamaño. Esto es consistente con la publicación del Instituto de la Potasa y el Fósforo donde se estipula que la ausencia de espinas (en variedades espinadas) se debe a una deficiencia de calcio en la planta (Molina, 2000). En 1999 Mora Urpí y Gainza Echeverría describen el papel de

las espinas recalcando el uso de las mismas como defensa contra animales e insectos dañinos además de la protección contra plantas epifitas mediante el drenaje de agua lluvia

Debido a la alta variabilidad de la planta y a opiniones de los agricultores no es posible describir la planta "ideal" de palmito, sin embargo en esta investigación se pudo determinar un protocolo para la selección de una planta que cumpla con la mayor cantidad de características deseables. En 2003 Correa y colaboradores analizaron las características deseables para el palmito de producción, concluyendo que la identificación de plantas productivas cuya progenie presente el mismo fenotipo es complicado ya que las características de producción no están descritas por un solo gen y son fácilmente influenciadas por el medio ambiente (Correa Padilha, Padilha de Oliveira y da Costa Mota, 2003). Exponen que la longitud del tallo y la distancia entre entrenudos son las características más influenciadas por el ambiente mientras que la longitud de la hoja y el número de hojas son las características que presentan mayor independencia con el medio ambiente. Aparte del número de tallos presentes esta investigación demostró que los caracteres productivos mostraron una alta influencia del medio mientras que las características morfológicas presentaron alta influencia genética siendo estos caracteres heredables (Correa Padilha *et al.*, 2003). Sin embargo, ya que el tallo está compuesto plenamente de hojas jóvenes se podría seleccionar, de manera indirecta, plantas con tallos de mayor diámetro mediante la selección de plantas con mayor número de hojas y con hojas de mayor longitud.

#### **4.2. Desinfección e introducción de explantes**

Posterior a la selección del material vegetal se realizó la desinfección de los explantes.

Una vez pelados los explantes y eliminadas sus espinas, estos medían alrededor de 6 cm de largo y 1.5 cm de ancho.

Se pueden observar los resultados de las diferentes desinfecciones en la tabla 14 según la escala de los parámetros dada en la tabla 15.

*Tabla 14.* Escala tomada en cuenta para la medición de oxidación, dureza del explante y de la zona radicular, necrosis y coloración

<b>Parámetro</b>	<b>Escala</b>
Oxidación	0: Alta 1: Media 2: Baja 3: Ausencia
Dureza del explante	0: Suave 1: Ligeramente suave 2: Ligeramente duro 3: Duro
Necrosis	0: Presencia 1: Ausencia
Coloración	Amarilla Blanca Sin cambio

*Tabla 15.* Observaciones después del último enjuague en cada uno de los métodos de desinfección.

<b>Identificador</b>	<b>Oxidación</b>	<b>Dureza del explante</b>	<b>Necrosis</b>	<b>Total</b>	<b>Coloración</b>
<b>D1</b>	0	3	0	3	Amarilla
<b>D2</b>	3	3	1	7	Sin cambio
<b>D3</b>	0	0	1	1	Blanca
<b>D4</b>	3	3	1	7	Sin cambio
<b>D5</b>	2	1	1	4	Blanca
<b>D6</b>	0	0	0	0	Amarilla

Posteriormente se realizó una introducción de un total 4320 secciones de hoja cada una de aproximadamente 1cm de largo. Se colocaron 5 secciones por frasco obteniendo un total de 864 frascos. Se probaron 6 protocolos de desinfección cada uno con 144 frascos.

Una vez introducidos los explanes se realizaron chequeos dos veces a la semana, luego de los cuales se eliminaron los frascos que presentaban contaminación.

En el caso de los protocolos de desinfección 1, 2 y 3 todo el material fue contaminado por lo que se descartaron del experimento, mientras que en los protocolos de desinfección 4, 5 y 6 se obtuvieron porcentajes globales de contaminación de 69.44%, 63.89% y 55.56% respectivamente. La figura 18. muestra los porcentajes globales de contaminación de los protocolos de desinfección 4, 5 y 6 en relación con el medio de cultivo utilizado

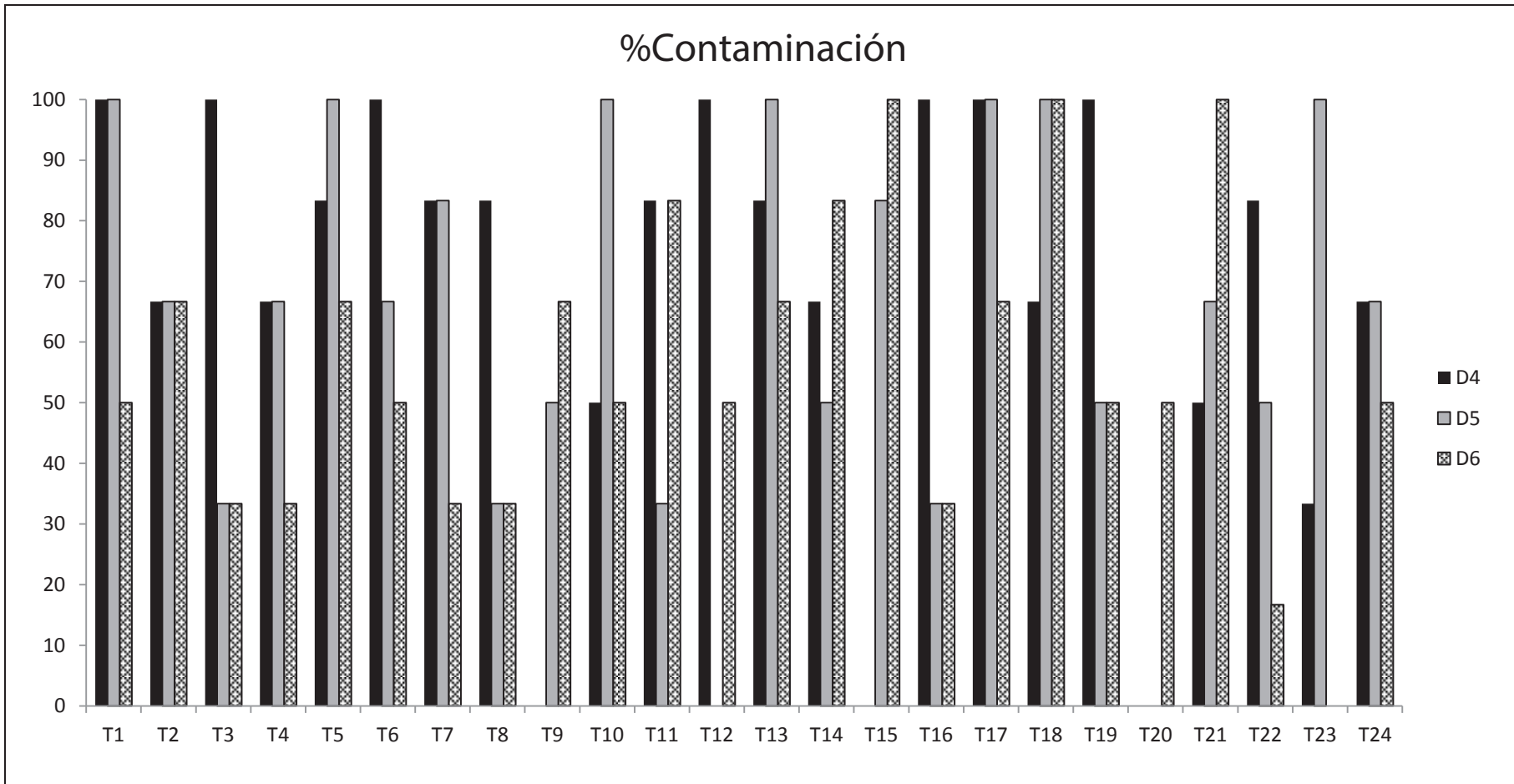
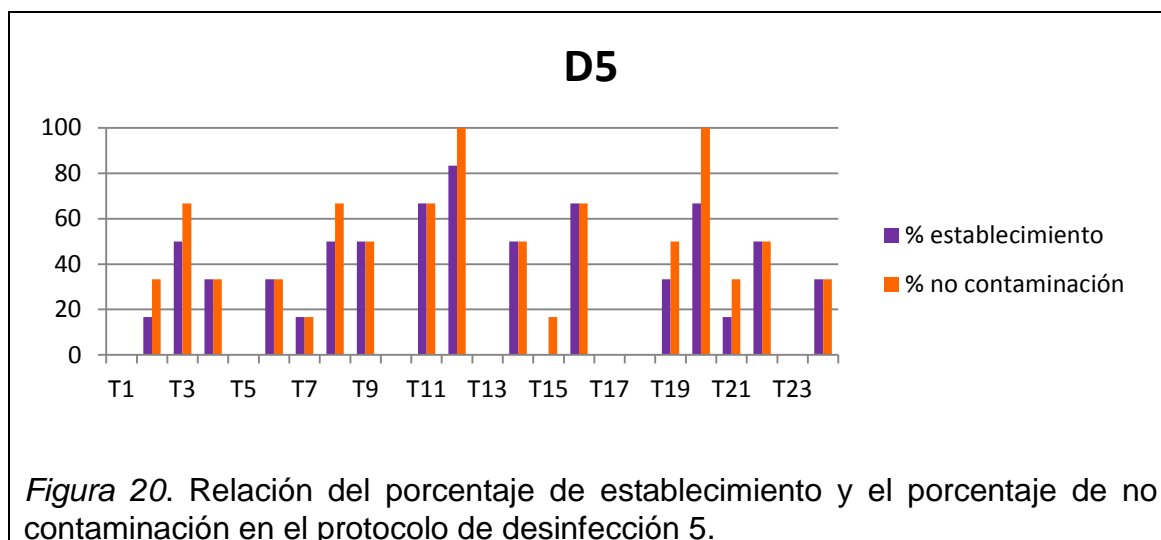
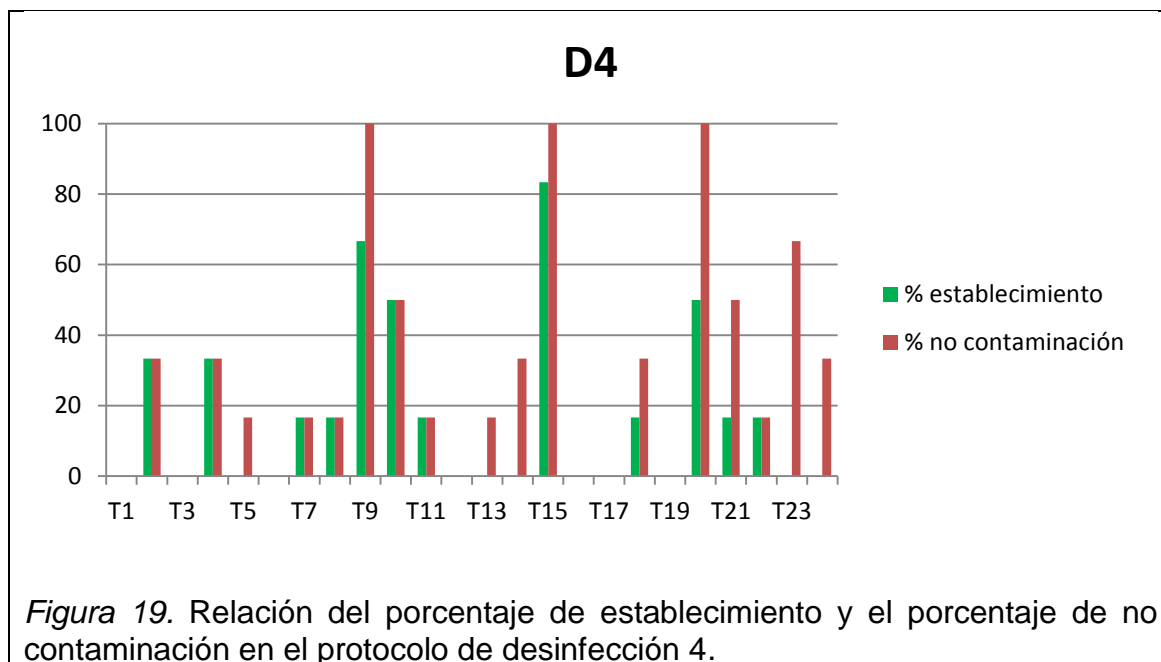
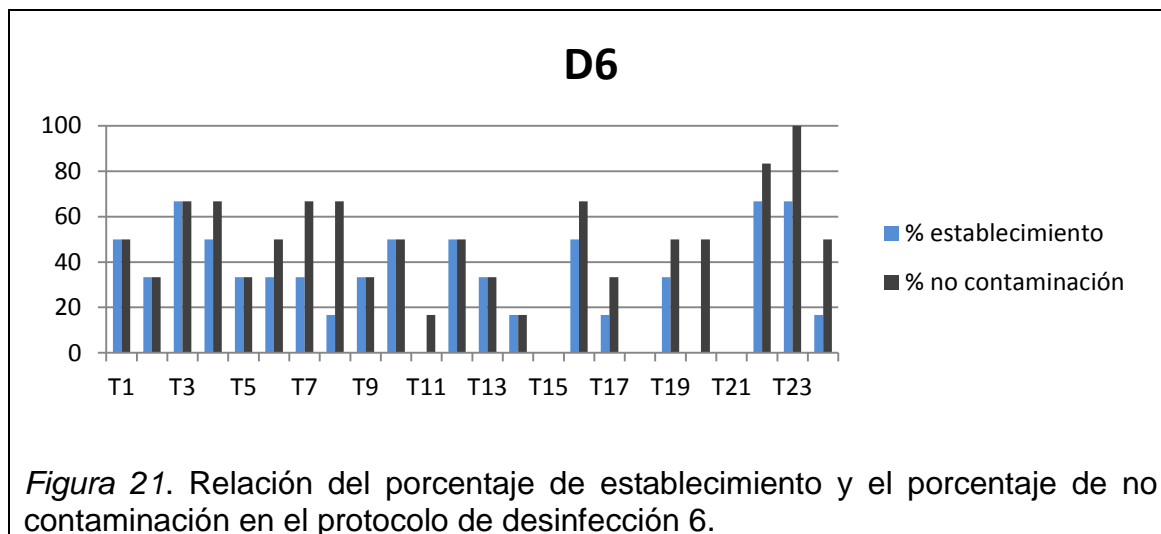


Figura 18. Porcentajes de contaminación de los protocolos de desinfección 4, 5 y 6 en relación con el medio de cultivo utilizado.

Los datos de contaminación obtenida según el medio de cultivo se observan en el Anexo 6. La relación entre el porcentaje de no contaminación y el porcentaje de establecimiento de los métodos de desinfección 4,5 y 6 se encuentra en las figuras 19, 20 y 21.





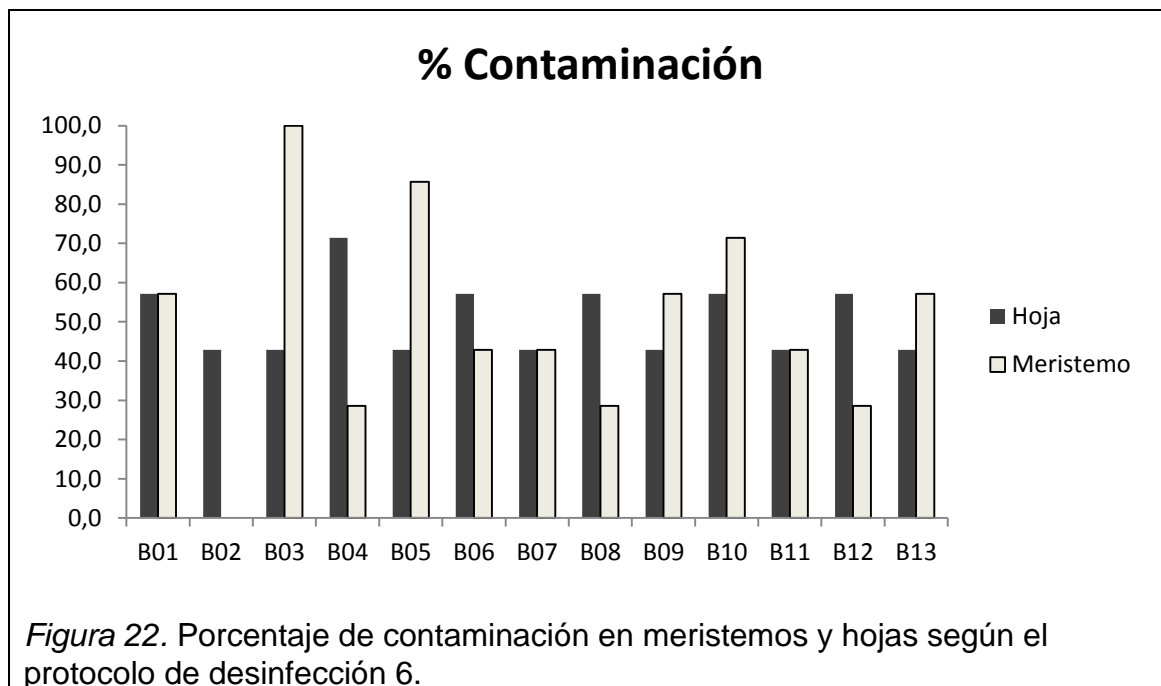


Los porcentajes de contaminación, establecimiento en función de los frascos no contaminados y de establecimiento global se encuentran en la tabla 16.

*Tabla 16. Porcentajes de establecimiento en los protocolos de desinfección 4, 5 y 6.*

	% Contaminación	% Establecimiento	% Establecimiento global
<b>D4</b>	69.44%	56.81%	17.36%
<b>D5</b>	63.86%	82.69%	29.86%
<b>D6</b>	55.56%	70.31%	31.25%

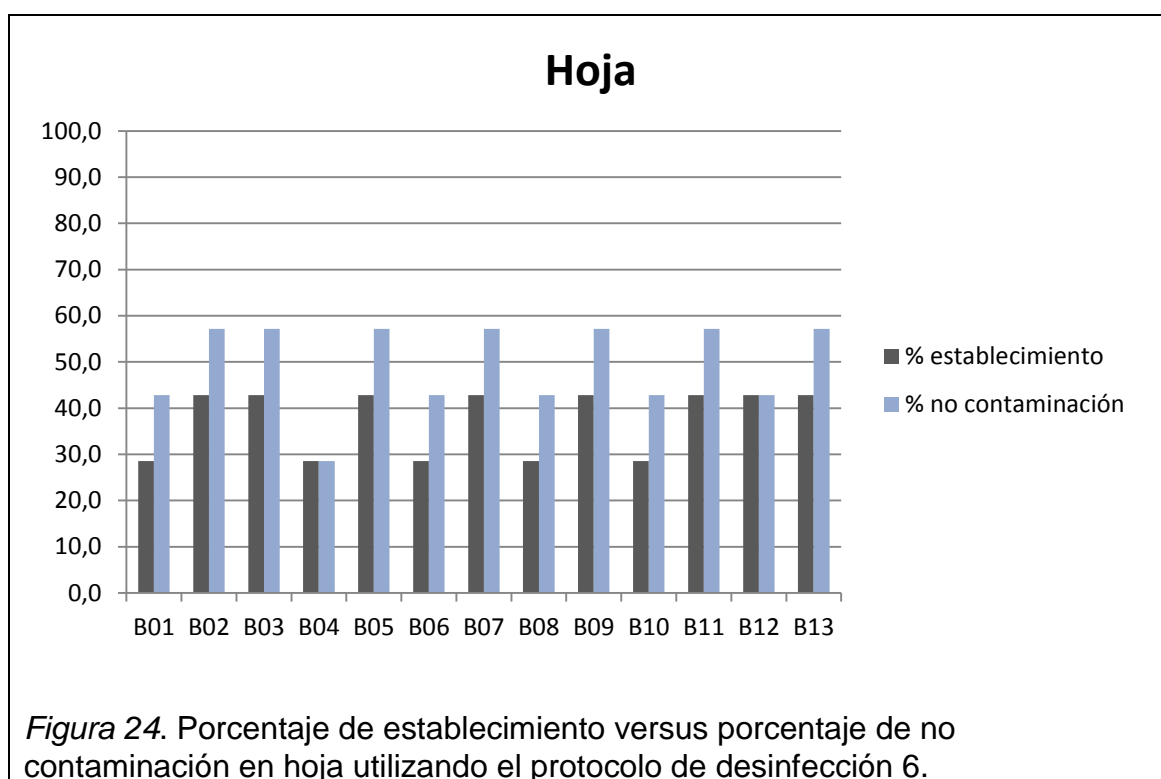
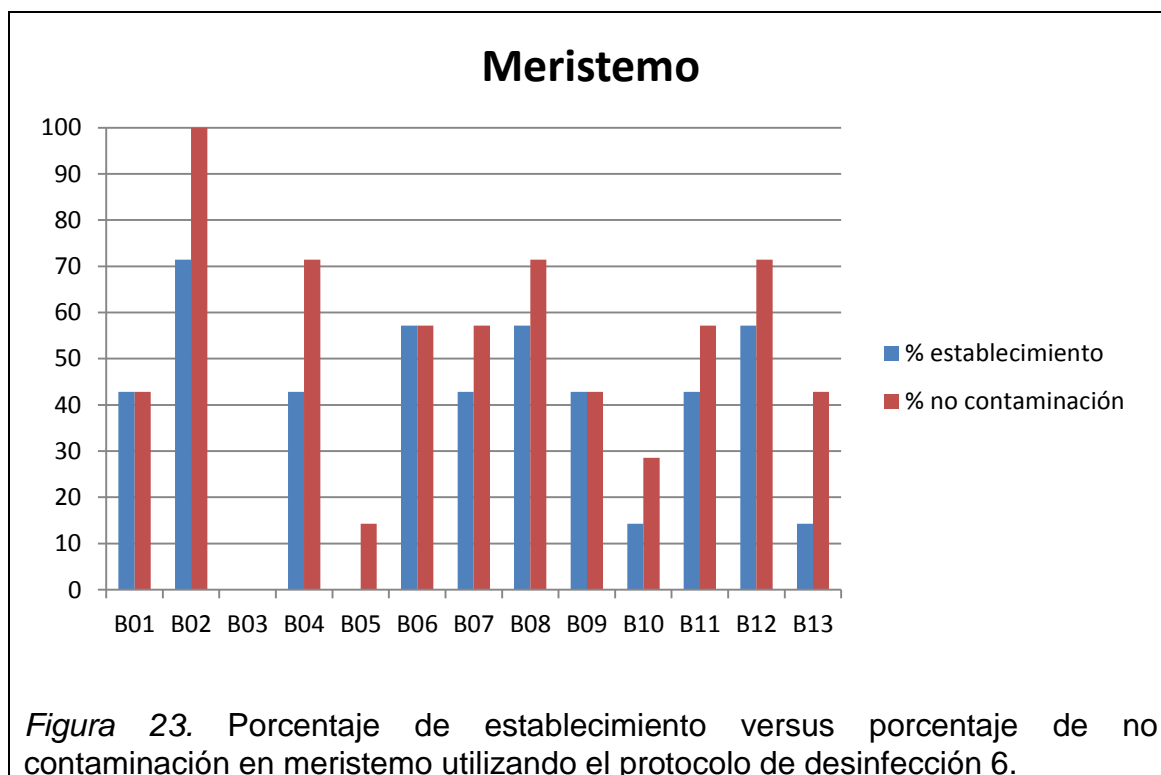
Los mejores resultados tanto de porcentaje de contaminación como de porcentaje de establecimiento global, los obtuvo el protocolo de desinfección 6, por lo que se realizaron pruebas con meristemas y hojas como explantes y los medios de cultivo de inducción de callo, como medios de establecimiento obteniendo los siguientes resultados de contaminación (figura 22, 23 y 24):



Los porcentajes de contaminación, establecimiento en frascos no contaminados y establecimiento global se encuentran en la tabla 17.

*Tabla 17. Porcentajes de contaminación, establecimiento y establecimiento global en hojas y meristemos utilizando la desinfección 6.*

	<b>% Contaminación</b>	<b>% Establecimiento</b>	<b>% Establecimiento global</b>
<b>Meristemo</b>	49.50%	75.56%	37.36%
<b>Hoja</b>	50.55%	73.91%	37.36%



Las altas concentraciones de cloro y los tiempos de inmersión de los explantes en los protocolos de desinfección 1, 3 y 6 causaron altos niveles de oxidación y necrosis en el material vegetal. Esto es consistente con lo presentado por Roca y Mroginski en 1993 donde se expone que el hipoclorito de sodio además de ser el desinfectante más utilizado en el cultivo de tejidos es también un fuerte agente oxidante y debe ser utilizado en concentraciones de 1 a 3% (Roca y Mroginski, 1993). El protocolo de desinfección 1 utilizó hipoclorito de sodio en una concentración del 4%, 1% sobre el rango sugerido por Roca para la desinfección y se obtuvieron altos niveles de oxidación. En el caso de la desinfección 3 los pelados y las altas concentraciones de esta sustancia causaron su oxidación y en el caso de la desinfección 6 no fue solamente la concentración de cloro utilizada la que causó altos niveles de oxidación sino también el largo tiempo de inmersión en el mismo. Debido a su acción blanqueadora el uso de hipoclorito de sodio causa un cambio en la coloración de los explantes (Roca y Mroginski, 1993). Se observó que cuando la concentración de cloro es alta (desinfección 1) y cuando el tiempo de inmersión del explante en esta sustancia es largo (desinfección 6) los explantes presentaban un cambio de color a amarillo, mientras que aquellos explantes que fueron expuestos a bajas concentraciones de cloro (desinfección 4) o que el tiempo de inmersión en el mismo fue corto (desinfección 2) no presentaron cambio de color.

Basándose en características físicas del explante como oxidación, dureza, necrosis y coloración se planteó una escala con el fin de realizar una preselección del método de desinfección adecuado. Se observó que el protocolo que cumplía con todas las características deseables fue la desinfección 2 mientras que el protocolo menos eficiente con respecto a estos parámetros fue el protocolo 6. Sin embargo, estos datos se contraponen a los resultados obtenidos en la etapa de establecimiento ya que al evaluar los porcentajes de contaminación en se detectó que el menor porcentaje de contaminación lo obtuvo el protocolo de desinfección 6 y que el protocolo de desinfección 2 tuvo el 100% de contaminación en sus explantes.

Una vez introducido el material se determinó la presencia de dos distintos contaminantes, hongos y bacterias. La contaminación fúngica se encontró en mayor cantidad de frascos y su exposición fue temprana es decir a pocos días de haber realizado la introducción, mientras que la contaminación bacteriana se observó en una menor cantidad de frascos y esta se desarrolló en un tiempo mayor o igual a dos semanas después de la introducción. Estos resultados coinciden con lo descrito por Ponmurugan y Suresh, quienes dicen que los hongos son patógenos constantemente presentes en el suelo y que estos son llevados al material vegetal principalmente por corrientes de aire que los ubican en la parte externa de los explantes mientras que las bacterias son los contaminantes más comunes y pueden ser encontradas dentro de los tejidos vegetales dificultando su eliminación en la desinfección y haciéndose presente tiempo después de haber empezado el cultivo (Ponmurugan y Suresh Kumar, 2012).

Para disminuir los niveles de contaminación es recomendable utilizar material vegetal proveniente de invernaderos o cuartos climatizados ya que este está, por lo general, menos contaminado que aquel material seleccionado en campo, por esto es recomendable una aplicación previa (en campo) de fungicidas o bactericidas para disminuir y controlar la contaminación (Roca y Mroginski, 1993). Se utilizó el fungicida sistémico Tachigaren (Hymexazol) como parte de los protocolos de desinfección 4, 5 y 6, los explantes utilizados en estas desinfecciones presentaron menor contaminación que aquellos que no tuvieron una desinfección con fungicida. El tachigaren fue utilizado en 2005 para la eliminación de la enfermedad de marchitamiento o *damping-off* en plantas de papa *in vitro* demostrando que tiene una fuerte acción anti fúngica no solo como fungicida sino también como desinfectante en condiciones *in vitro* (Islam, Hashidoko, Deora y Tahara, 2005). Las plantas de palmito utilizadas para esta investigación fueron seleccionadas en campo y no fueron tratadas con ningún tipo de pesticida lo cual puede haber sido un factor contribuyente a los altos niveles de contaminación, sobre todo fúngica, encontrados en la etapa de establecimiento.

Se observó que los protocolos de desinfección 1, 2 y 3 tuvieron un 100% de explantes contaminados mientras que los protocolos 4, 5 y 6 obtuvieron el 69.44, 63.86 y 55.56% respectivamente. Se puede suponer que esta disminución en la contaminación se dio por el aumento en el tiempo de inmersión de los explantes en hipoclorito de sodio y por el uso de tachigaren como fungicida en la desinfección. Los porcentajes de establecimiento con respecto a los frascos no contaminados de las desinfecciones 4, 5 y 6 fueron de 56.81, 82.69 y 70.31% respectivamente y los porcentajes de establecimiento global de 17.36, 29.86 y 31.25 respectivamente lo que determinó que el protocolo de desinfección 6 fue el más apropiado para el cultivo *in vitro* de *Bactris gasipaes*.

Roca expone un rango ideal del uso de la auxina 2,4 D que va de 0.5 $\mu$ M (0.11mg/L) a 27.6 $\mu$ M (6.1mg/L) (Roca y Mroginski, 1993). La auxina sintética 2,4 D induce la elongación de las células en cultivo, favorece la síntesis de ADN y ARN, forma nueva pared celular e induce la división embrionaria lo que causa que al estar presente en mayor concentración las plantas mueran (Ponmurugan y Suresh Kumar, 2012). Una vez determinado el método de desinfección más adecuado se realizó una prueba de confirmación utilizando medios de cultivo con menor cantidad de dicha auxina. Al realizar esta prueba tanto en hojas jóvenes como en meristemas se confirmaron los resultados obtenidos previamente.

#### **4.3. Obtención de callos pro-embriogénicos**

Una vez terminado un ciclo de introducción se cambió el material vegetal establecido a uno de los 14 medios de obtención de callos.

Se evaluó la presencia de callo y los mismos fueron clasificados entre "callos pro-embriogénicos" y "callos no embriogénicos". Se consideraron como callos embriogénicos aquellos que presentaron forma circular u ovoide bien formada y una coloración blanca o amarillenta transparente (Figura 25). Al no tener la posibilidad de realizar estudios histológicos de los callos obtenidos en esta etapa se consideró que aquellos callos que presentaron una estructura de

apariencia lanosa con coloración blanca opaca fueron no embriogénicos (Figura 26).



*Figura 25. Callo pro-embriogénico.*

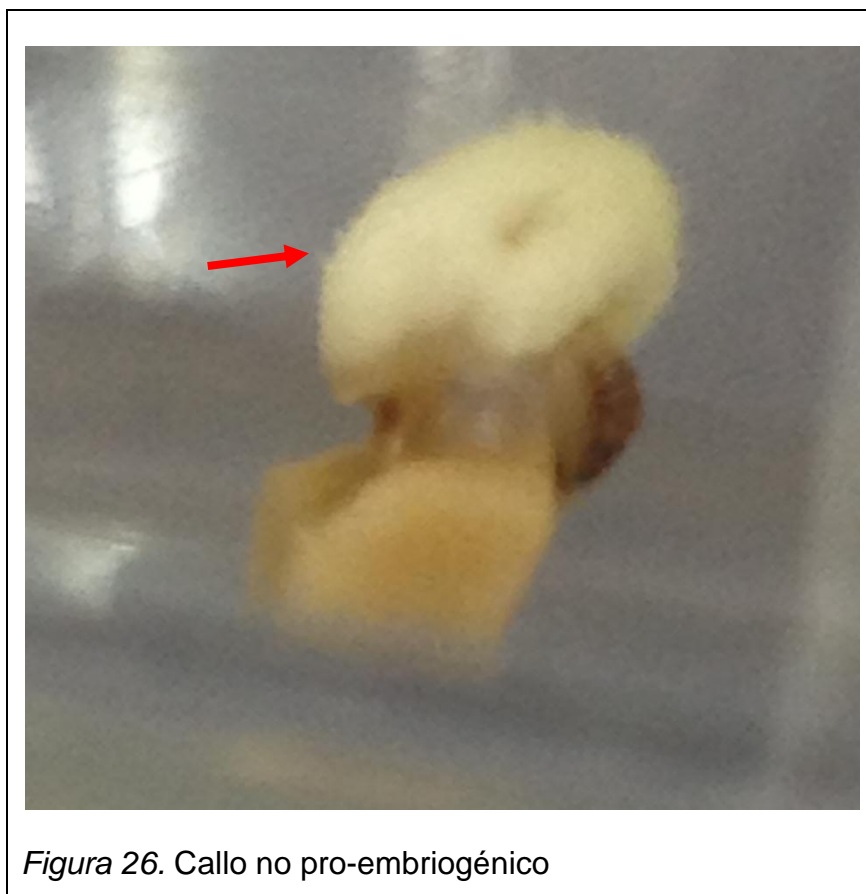


Figura 26. Callo no pro-embriogénico

Una vez que se realizó el cambio de medio a los explantes, se hicieron chequeos dos veces por semana, en los cuales se eliminaron aquellos frascos contaminados y aquellos explantes necrosados obteniendo los siguientes resultados (tabla 18).

Tabla 18. Porcentajes de contaminación y establecimiento, etapa de obtención de callo.

<b>Frascos</b>	<b>Contaminados</b>	<b>% de contaminación</b>	<b>Establecidos</b>	<b>% de establecimiento</b>
84	22	26.19%	43	51.2%

Se evaluó la presencia de callo pro-embriogénico obteniendo los siguientes resultados (figura 27):



### Presencia de callos en frascos establecidos

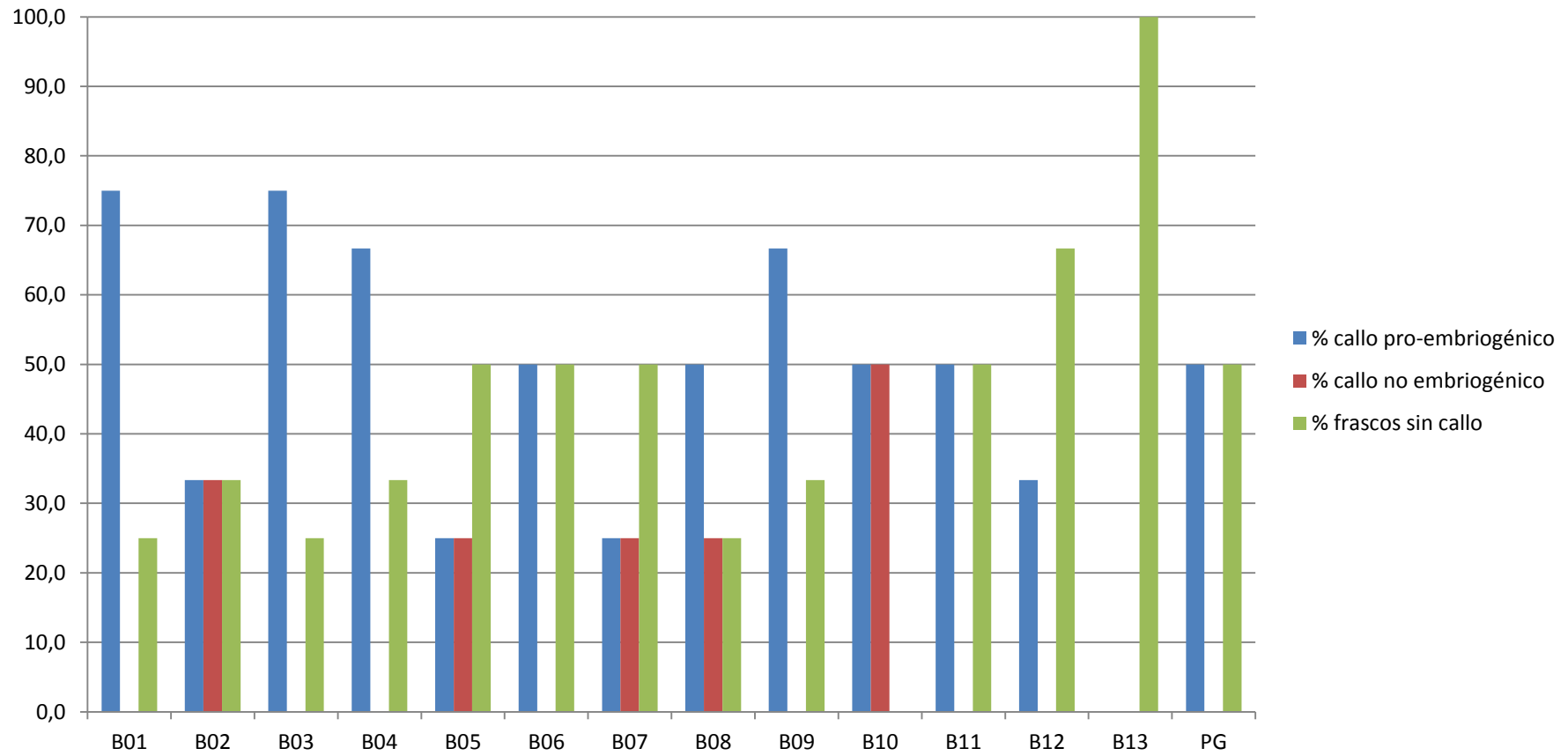


Figura 27. Porcentajes de presencia de callo pro-embriogénico y no embriogénico en frascos establecidos

Los explantes que presentaban callos pro-embriogénicos fueron cambiados a medio de desarrollo de embriones

Aquellos meristemas que fueron desinfectados con el protocolo de desinfección 6 y se introdujeron directamente en medio de inducción de callo no presentaron problema alguno en el momento de cambiar el medio de cultivo.

Ikeuchi, Sugimoto e Iwase presentan que no todos los callos presentes en células vegetales son similares por lo que estos se subdividen en grupos según sus características macroscópicas. Existen dos clases generales de callo, aquellos que no presentan capacidad regenerativa y aquellos que sí lo hacen. Los callos que aparentemente no presentan capacidad regenerativa a su vez se dividen en dos grupos, callos compactos y callos friables, estos últimos presentan una apariencia lanuda y se desmenuzan fácilmente al tacto (Ikeuchi, Sugimoto y Iwase, 2013). Los callos no embriogénicos obtenidos en la investigación fueron callos friables no regenerativos (Figura 22 por lo que no tenían potencial para la posterior obtención de embriones somáticos. Los callos regenerativos se subclasifican según el órgano que estos formarán, estos son los callos embriogénicos, radicales y de brote (Ikeuchi, Sugimoto y Iwase, 2013). Los callos embriogénicos fueron de interés para esta investigación y se logró su obtención en un 48.8%, sobre todo en los medios B01, B03, B04 y B09.

La contaminación en esta etapa fue principalmente contaminación introducida, es decir, contaminación resultante de una mala desinfección del área de trabajo y los materiales como pinzas y bisturí (Ponmurugan y Suresh Kumar, 2012), este tipo de contaminación puede ser evitada y se da por mala manipulación en el momento de cambiar el medio de cultivo. Sin embargo pudo haberse dado también por contaminantes internos del explante; estos contaminantes se encuentran en los tejidos y órganos internos de la planta donante y sobreviven a la desinfección inicial del material y se muestran en etapas posteriores del cultivo (Stewart, 2008)

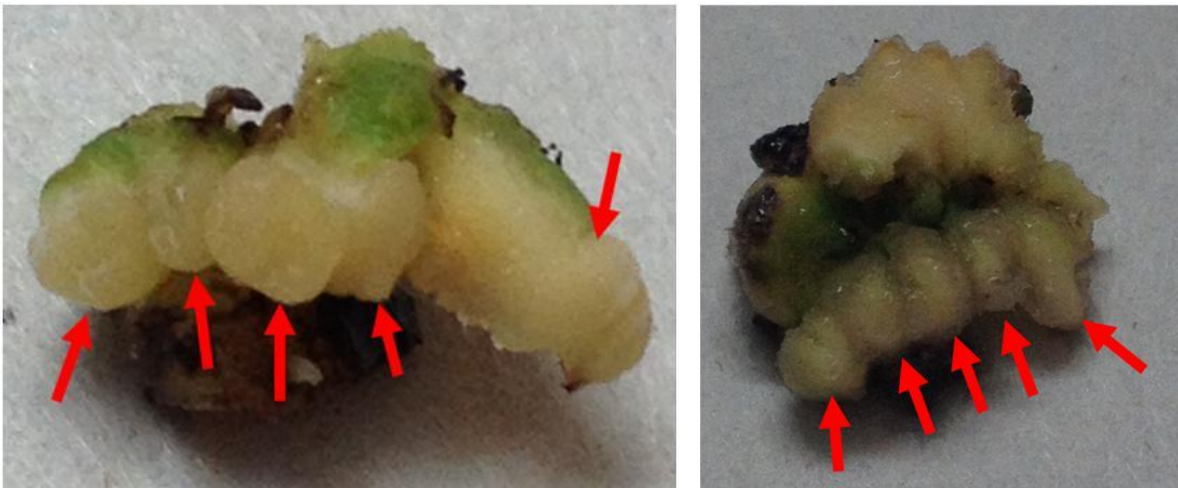
#### **4.4. Embriogénesis somática**

##### **4.4.1. Desarrollo y maduración de pro-embriones**

Los callos pro-embriogénicos fueron trasladados a medio de desarrollo de pro-embriones.

Se obtuvieron las siguientes observaciones (Figura 28).

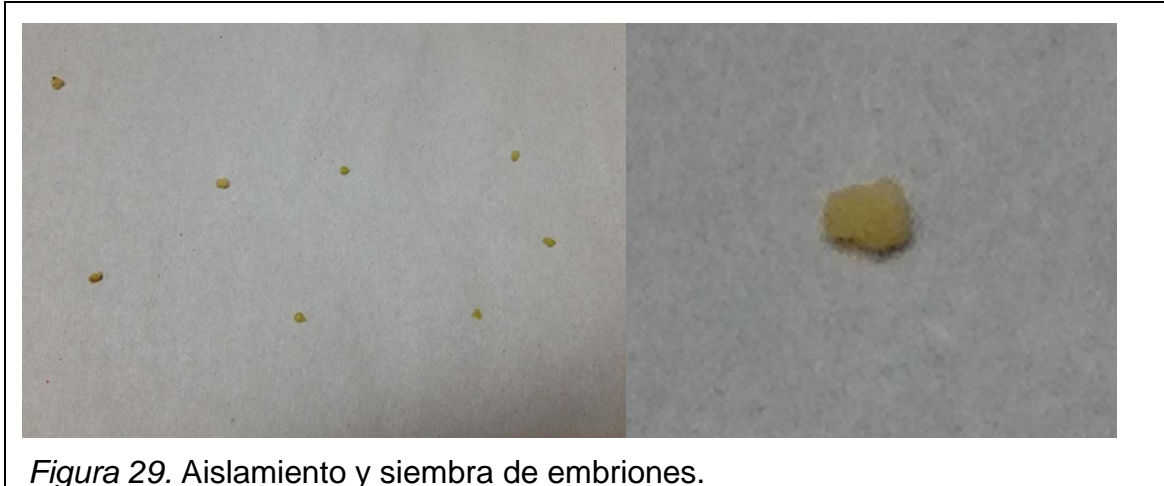
- Alto crecimiento de callo
- Formación de estructuras globulares u ovoides
- Coloración transparente blanca o amarilla



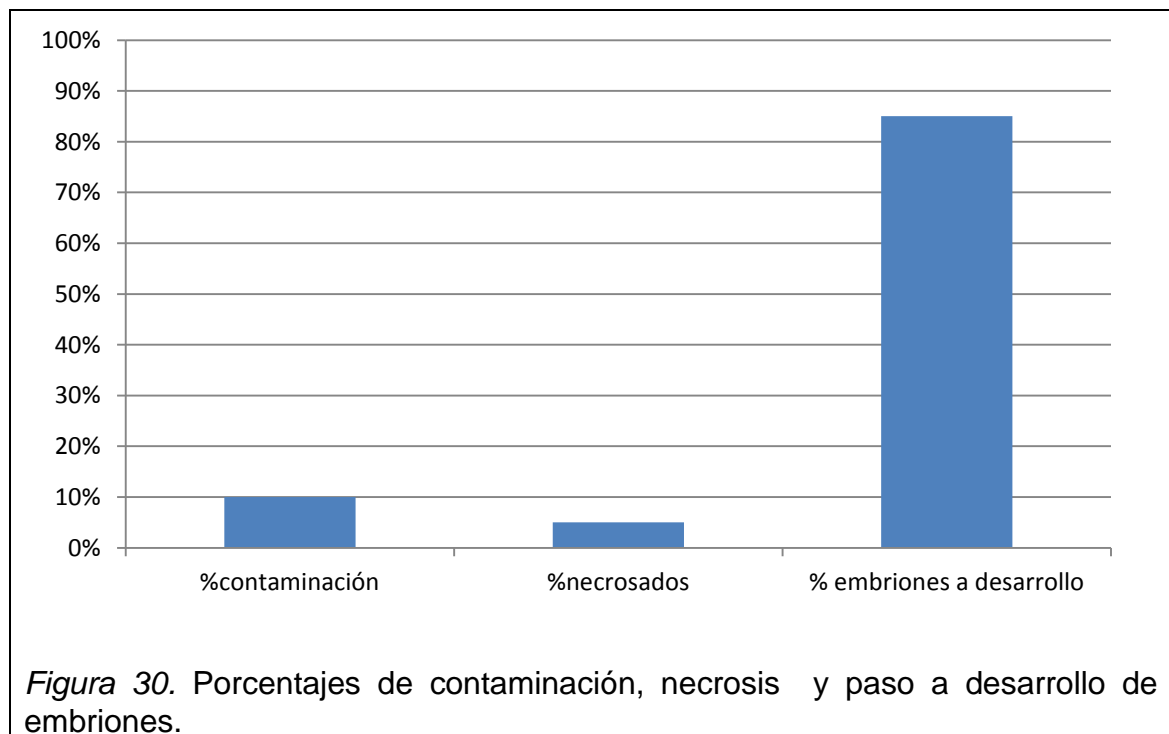
*Figura 28.* Callo con presencia de estructuras globulares posiblemente pro-embriogénicas (marcado por las flechas)

Después de un ciclo de desarrollo se trasladaron los pro-embiones a medio de maduración de pro-embiones.

Una vez que se lograron visualizar las estructuras globulares pro-embriogénicas estas fueron trasladadas a medio de maduración de pro-embiones. Uno de los callos fue seccionado y se aislaron 8 pro-embiones los cuales fueron sembrados individualmente (Figura 29).



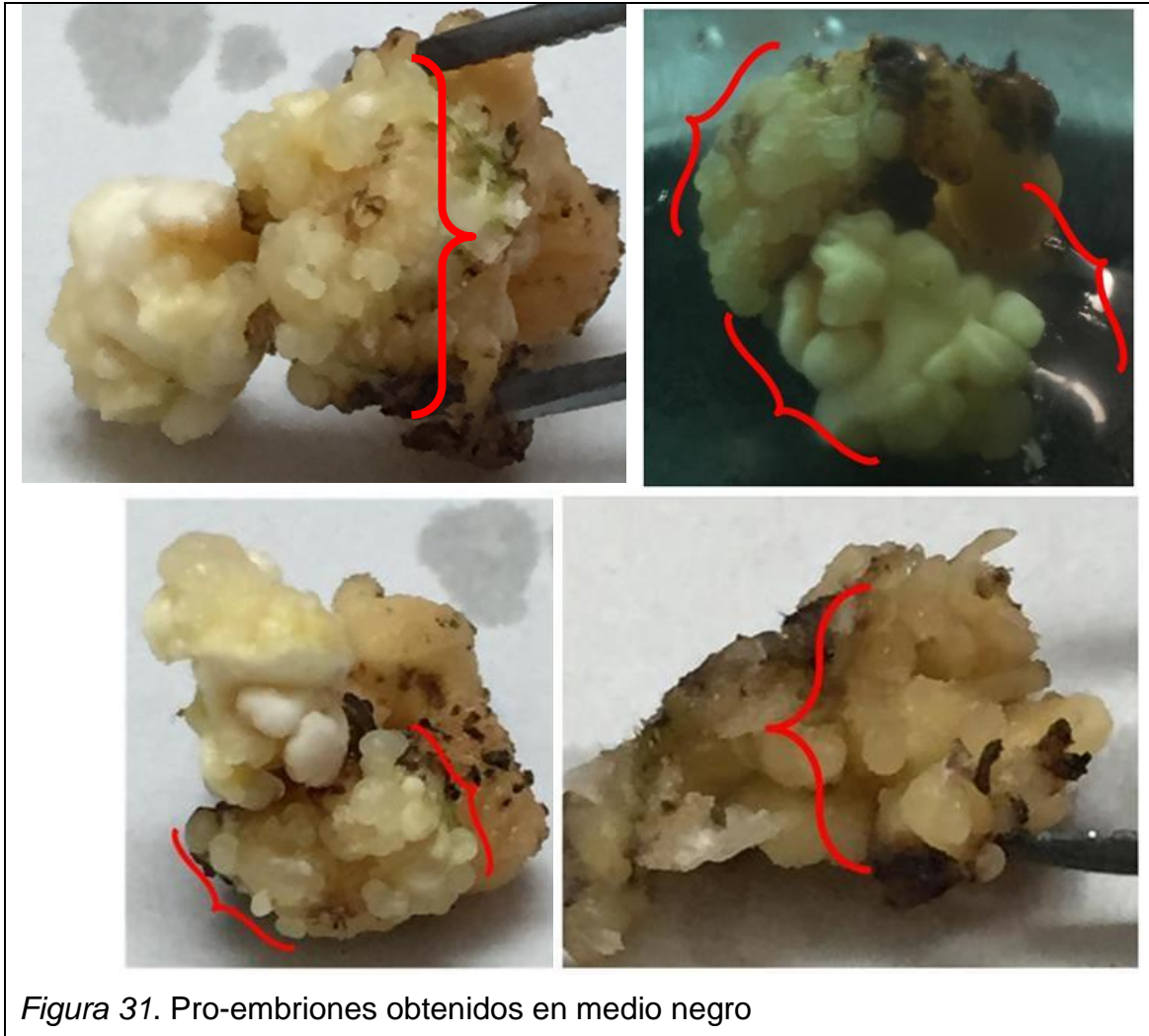
Una vez que se cumplió un ciclo maduración se evaluó la contaminación y la necrosis en los pro-embryones (Figura 30)



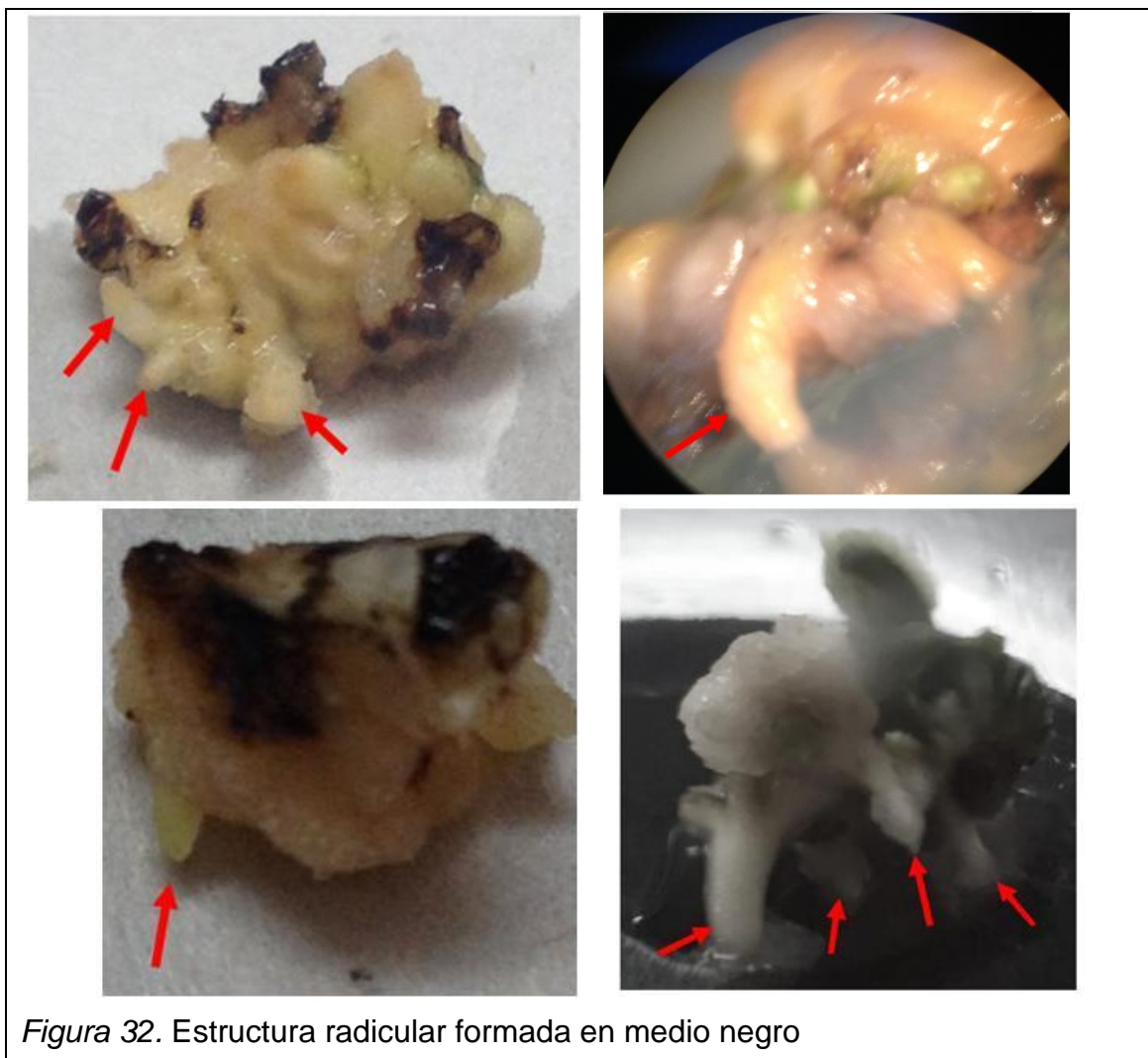
Se observó una completa necrosis de los pro-embryones aislados.

Se encontró que al final del ciclo los explantes no solo habían formado embriones (figura 31) sino que muchas de las estructuras globulares que

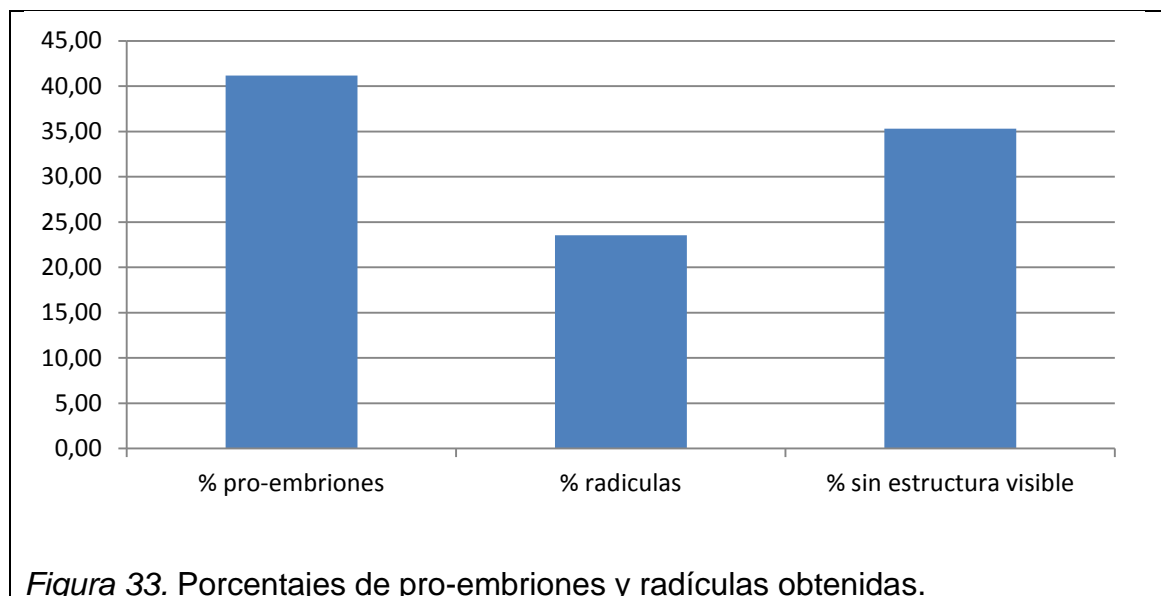
fueron obtenidas en la etapa de desarrollo de pro-embryones formaron estructuras radiculares visibles dos semanas después de la siembra en medio negro (figura 32).



*Figura 31.* Pro-embryones obtenidos en medio negro



Se obtuvieron los siguientes resultados (figura 33)



Aquellos pro-embryones y los explantes con estructuras radiculares que no presentaron ni necrosis ni contaminación fueron trasladados después de un ciclo de cuatro semanas a la etapa de desarrollo de embryones en el sistema de inmersión temporal.

Se ha demostrado que una sobreexpresión ectópica de reguladores embriogénicos producen formación de callo en varias especies de plantas (Ikeuchi, Sugimoto y Iwase, 2013) en el cultivo *in vitro* se utilizan reguladores en el medio de cultivo que produce una sobre expresión de genes reguladores de la embriogénesis.

Los pro-embryones obtenidos presentaron estructuras similares a las descritas en la figura 1 de la investigación de Steinmacher en el 2011. En un principio el embrión está formado de una masa globular de células dediferenciadas que posteriormente madurarán y formarán los tejidos de la nueva planta (George *et al.*, 2008). Las estructuras embriónicas obtenidas en esta etapa de la investigación corresponden a la masa de células descritas por George y colaboradores.

Las estructuras radiculares son similares a las obtenidas por Almeida y colaboradores después de haber germinado los embryones somáticos y



mostradas en la figura 2 del artículo publicado en 2006, por lo que se puede suponer que dichas estructuras se formaron por una germinación temprana de los embriones somáticos conseguidos (Almeida & Vieira de Almeida, 2006). Sin embargo, se ha descrito que para que un explante forme un callo regenerativo las concentraciones de los reguladores utilizados debe tener un balance. De manera general una razón intermedia de auxina y citoquina promueve la callogénesis, una relación en que la citoquina se encuentre en niveles altos promoverá la formación de brotes y una relación donde la auxina se encuentre en exceso sobre la citoquina producirá formación de raíces (Ikeuchi, Sugimoto y Iwase, 2013). Se puede decir que la formación de raíces pudo haberse producido ya sea por la germinación temprana de los embriones o por la falta de equilibrio en los fitoreguladores con un exceso de auxina en el medio de cultivo.

#### **4.5. Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal**

##### **4.5.1. Sistema de inmersión de frascos gemelos**

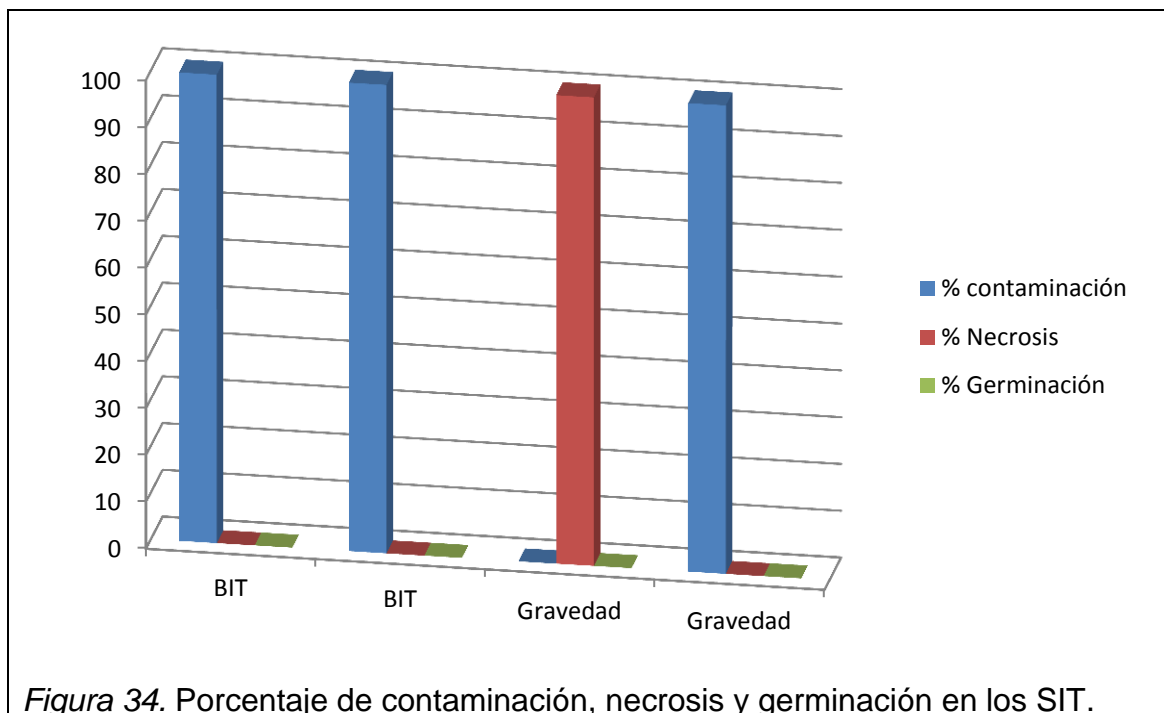
La construcción del sistema de inmersión de frascos gemelos causó problemas debido a la esterilidad que se debe mantener en todo momento. Considerando que el sistema consta de dos frascos, y que cada uno debe tener 2 agujeros sellados con tapones de caucho en sus tapas, y cada tapón de caucho tiene una manguera que lo atraviesa, fue complicado lograr hermeticidad en las uniones de manguera-caucho, caucho-plástico y plástico-vidrio. Para solucionar dicho problema se utilizó teflón y silicón termorresistente; además se selló el sistema con film de pvc para evitar contaminación.

##### **4.5.2. Sistema de inmersión por gravedad**

La construcción del sistema de inmersión temporal por gravedad fue simple. Se mandó a hacer el tapón de caucho en un almacén de empaques para auto y se compraron los frascos plásticos. Al ser de plástico, el sistema no pudo ser autoclavado, por lo que la desinfección se realizó únicamente con alcohol. Para esto se utilizó alcohol de mechero (etanol al 86%).

#### 4.6. Desarrollo de embriones

Una vez acabado el ciclo de maduración de pro-embriões se procedió a cambiar los explantes a los dos sistemas de inmersión temporal con medio de cultivo para el desarrollo de embriones. Se obtuvieron los resultados de la figura 34.



La contaminación fue el mayor problema al realizar las pruebas utilizando los sistemas de inmersión temporal y debido a la falta de tiempo no se realizaron más repeticiones de esta etapa. La contaminación es también uno de los más grandes problemas del uso de biorreactores para la propagación vegetal ya que al estar un explante contaminado este contaminará toda la unidad experimental (Ponmurugan & Suresh Kumar, 2012).

En el sistema que no presentó contaminación todos los explantes presentaron falta de crecimiento y necrosis. Entre las desventajas de los cultivos por sistemas de inmersión temporal se encuentran la hiperhidricidad y la liberación de inhibidores del crecimiento (Ponmurugan y Suresh Kumar, 2012) que son ambas posibles causas de la muerte de los tejidos vegetales.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1. Conclusiones

- Se logró establecer un protocolo de selección de explantes de *Bactris gasipaes* con características deseables para su posterior multiplicación clonal tomando en cuenta que los agricultores prefieren plantas jóvenes con abundantes espinas gruesas, alta precocidad (más de dos tallos por planta) y que presenten una altura menor a dos metros.
- Se desarrollaron tres procedimientos de desinfección adecuados para las plantas de palmito siendo el mejor el protocolo #6, el cual permitió un alto porcentaje de establecimiento. Debido a los altos niveles de contaminación se determinó que es necesario un tratamiento con fungicida previo a la introducción *in vitro* del material vegetal.
- Se formularon medios de cultivo para la inducción de callo partir hojas jóvenes establecidas a condiciones *in vitro*. Los medios que mayor cantidad de callo pro-embriogénico presentaron fueron los medios B01, B03 y B09, demostrando que concentraciones de 2,4-D entre 0.5 y 1.5 mg/L son adecuadas para la obtención de este tipo de callo.
- Se logró inducir, con el uso de fitoreguladores, la embriogénesis somática obteniendo embriones somáticos en plantas de palmito. Se obtuvieron radículas además de embriones en la etapa de maduración de pro-embryones.
- Se diseñaron y construyeron dos sistemas de inmersión temporal (SIT), el primero un sistema de frascos gemelos y el otro un sistema de inmersión por gravedad original. No se logró la germinación de los embriones obtenidos en los sistemas de inmersión temporal debido a altos porcentajes de contaminación y necrosis en los mismos. Los embriones que no se contaminaron en los SIT en su totalidad presentaron necrosis.

## 5.2. Recomendaciones

- Seleccionar plantas previamente tratadas con pesticidas para disminuir contaminaciones tanto de hongos y bacterias como de insectos.
- Establecer un protocolo de desinfección que obtenga bajos porcentajes de contaminación en la introducción sin causar un aumento en la mortalidad del material vegetal.
- Investigar más a fondo el desarrollo de medios de cultivo para la inducción de callo que obtengan mayor número de callos pro-embriogénicos en lugar de callos no pro-embriogénicos o explantes sin callo.
- Confirmar si la presencia de radículas se dio por germinación temprana de embriones somáticos.
- Realizar más pruebas con los sistemas de inmersión temporal (SIT) construidos en las que se utilicen nuevos medios de cultivo para que el uso de los mismos sea viable para el desarrollo de embriones somáticos de las plantas de palmito.
- Optimizar los biorreactores para evitar contaminación dentro de los mismos.
- Determinar tiempos de inmersión adecuados para evitar necrosis y garantizar la germinación de los embriones obtenidos.
- Continuar la investigación hasta la obtención plántulas *in vitro*, aclimatar las mismas y sacarlas al campo para evaluar su comportamiento.

## REFERENCIAS

- Almeida, M., & Vieira de Almeida, C. (2006). Somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration. *Agropec.* 41 (9), (1449-1452).
- Ángel-Molina, J.X., González-Cabrera, J.J., Orellana-Núñez, M.A. y Arévalo-Alvarado, C.R., (2013). *Evaluación de dos métodos de micropropagación masal de piña (Ananas comosus L. Merr.) variedad golden*. San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador .
- Atwell, B., Kreidemann, P. y Turnbull, C. (1999). *Plants in Action, Adaptation in Nature, Performance in Cultivation*. Melbourne, Australia: Macmillan Education.
- Banco Central del Ecuador. (s.f.). *Consulta totales por Nandina-país*. Recuperado el 5 de julio de 2014 de: [http://www.portal.bce.fin.ec/vto\\_bueno/comercio/consultaTotXNandinaPaisConGrafico.jsp?tipo=E&tipoGrafico=bar&codPartida=2008910000&FechaInicial=2014/01&FechaFinal=2014/06](http://www.portal.bce.fin.ec/vto_bueno/comercio/consultaTotXNandinaPaisConGrafico.jsp?tipo=E&tipoGrafico=bar&codPartida=2008910000&FechaInicial=2014/01&FechaFinal=2014/06)
- Bello-Bello, J. J. y Iglesias- Andreu, L. G. (2012). *Desarrolla el INBIOTECA sistemas de biorreactores para la micropropagación de especies vegetales de importancia para el estado de Veracruz*. AGRO Entorno. 7 (7), (7-8).
- Corporación Financiera Nacional. (2007). *Estudio del sector agroindustrial del palmito*. Quito, Ecuador: Burgos, C.
- Cámara de Comercio de Guayaquil. (2013). *Boletín Comercio Exterior*. Departamento de Desarrollo de Comercio y Negocios . 54.
- Chaimsohn, F. (2006). *Aspectos edafológicos y nutricionales del pejibaye para la producción de palmito en función de la densidad, del arreglo de la población y del tipo de fertilización. Producción y calidad del palmito al natural, en función de la población, del arreglo de plantas y del tipo defertilización*. (Tesis de doctorado). Costa Rica: Universidad de Costa Rica.

- Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones. (2009). *Perfil de producto: perfil del palmito*. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Correa Padilha, N., Padilha de Oliveira, M. d. y da Costa Mota, M. G. (2003). Estimativa da repetibilidade em caracteres morfológicos e de produção de palmito em pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth). *Árvore*, 27(4), (435-442)
- Crane, J. (2013). *Pejibaye (Peach Palm) Growing in the Florida Home Landscape*. Recuperado el 14 de agosto de 2014 de: <http://edis.ifas.ufl.edu/hs312>
- Deo, P. C., Tyagi, A., Taylor, M., Harding, R. y Becker, D. (2010). Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 28, (27-40).
- Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología vegetal*, 3 (4), (195-209).
- George, E., Hall, M. y De Klerk, G. J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3ra ed). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Gutiérrez-Mora, A., Gonzales-Gutiérrez, A. G., Rodríguez-Garay, B., Ascencio-Cabral, A. y Li-Wei, L. (2012). *Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations*. Embryogenesis. Croacia: Intech Open science.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K. y Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, 25, (3159–3173).
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2012). *Censo Nacional Agropecuario (CNA)*. Recuperado el 4 de Junio de 2014, de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuario/>
- International Trade Centre. (s.f.). *Trade Map*. Recuperado el 6 de agosto de 2014 de: [http://www.trademap.org/Country\\_SelProductCountry.aspx?nvpm=3|218|||200891|||6|1|1|2|1||2|1|1](http://www.trademap.org/Country_SelProductCountry.aspx?nvpm=3|218|||200891|||6|1|1|2|1||2|1|1)

- Islam, T., Hashidoko, Y., Deora, A. y Tahara, S. (2005). Suppression of Damping-Off Disease in Host Plants by the Rhizoplane Bacterium *Lysobacter* sp. Strain SB-K88 Is Linked to Plant Colonization and Antibiosis against Soilborne Peronosporomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (7), (3786–3796).
- Jaureguí Rincón, J. y Chávez Vela, N. A. (2006). *Glorias de Biotecnología*. Mexico: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Maldonado, Rodríguez, Gómez y Cárdenas. (2003). Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal. *Centro Agrícola*, 30 (1), (69-72).
- Molina, E. (2000). Nutrición y Fertilizante del Pejibaye Para Palmito. *Informaciones Agronómicas*, 38.
- Mora Urpí, J. y Gainza Echeverría, J. (1999). Palmito de Pejibaye, su cultivo e industrialización. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Mora Urpí, J., Weber, J. y Clement, C. (1997). Peach Palm *Bactris gasipaes* Kunth. *Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 20.
- Muñoz, D. (2006). *Estudio de sistemas de cultivo in vitro, aclimatización de plántulas y crecimiento de bulbos en tres especies de Rhodophiala Presl.(Amaryllidaceae)* (Tesis de maestría) Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile .
- Organizacion de las Naciones Unidas. (s.f.). *UNcomtrade*. Recuperado el 15 de junio de 2014 de: <http://comtrade.un.org/db/dqBasicQueryResults.aspx?px=HS&cc=200891&r=218&p=0&rg=2&y=2013,2012,2011,2010,2009&so=8>
- Oxford Dictionaries. (2010). Oxford Dictionary of English. Recuperado el 9 de Marzo de 2015, de <http://www.oxforddictionaries.com/es/definicion/ingles/bioreactor>
- Ponmurugan, P. y Suresh Kumar, K. (2012). *Applications of Plant Tissue Culture*. New Delhi: New Age International Limited Publishers.

- ProEcuador Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. (s.f.). *Boletín de Comercio Exterior*. Recuperado el 23 de agosto de 2014 de: <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2014/01/12-Bolet%C3%ADn-de-Comercio-Exterior-Dic-Ene-2014.pdf>
- Purohit, S. (2013). *Introduction to plant cell, tissue and organ culture*. Delhi: PHI learning.
- Reinert, J. (1958). *Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen*. Berlin, Alemania: Ber Dtsch Bot Ges.
- Roca, W. y Mroginski, L. (Eds). (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Roeland, R. (1994). *Palmito (Bactris gasipaes HBK) Cultivation in the Atlantic and northern zone of Costa Rica*. Recuperado el 7 de octubre de 2014 de: <http://hdl.handle.net/11554/3281>
- Cepal (s.f.). *Gobierno de la Provincia de Pichincha, El Incipiente Cluster del Palmito en la Provincia de Pichincha*. Recuperado el 19 de diciembre de 2013 de: <http://www.cepal.org/ilpes/noticias/paginas/6/10676/Presentaci%C3%B3n%20Palmito%20Seminario.ppt>.
- Santamaría, D. (2009). *Evaluación microbiana, hormonal y nutricional de ocho formulaciones en la preparación de biol y su aplicación en tres dosis en el cultivo del palmito (Bactris gasipaes HBK)*. (Tesis de pregrado) Quito, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejercito.
- Segretín, M. (2011). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales)*. Recuperado el 10 de diciembre de 2014, de: <http://www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>
- Smith, R. H. (2013). *Plant Tissue Culture, Techniques and Experiments*. Texas, Estados Unidos: Elsevier Inc.



- Steinmacher, D., Guerra, M., Saare-Surminski, K. y Lieberei, R. (2011). *A temporary immersion System improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis*. Recuperado el 25 de septiembre de 2014 de: <http://aob.oxfordjournals.org/content/early/2011/02/25/aob.mcr033>
- Steward, F., Mapes, M. y Mears, K. (1958). *Growth and organized development of cultured cells*. Nueva York, Estados Unidos: Am J BOT.
- Stewart, C. N. (Eds) (2008). *Plant Biotechnology and Genetics: Principles Techniques and Applications*. Hoboken, Estados Unidos: Wiley.
- Viñas, M., & Jiménez, V. (2012). Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). Recuperado el 2 de Noviembre de 2013 de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/28028>.
- Vitropic. (s.f.) Funcionamiento del sistema. Recuperado el 6 de Septiembre de 2014 de: <http://vitropic.pagesperso-orange.fr/rita/es/fonction.htm>
- Zavattieri, M. A., Frederico, A. M., Lima, M., Sabino, R. y Arnholdt-Schimtt, B. (2010). *Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions*. Recuperado el 9 de junio de 2014 de: <http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v13n1/a12.pdf>

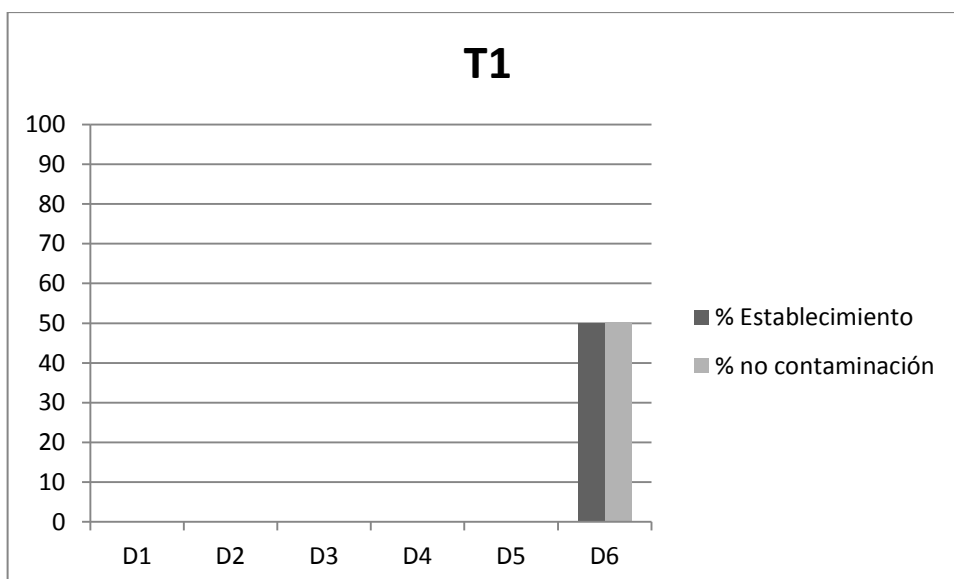
## **ANEXOS**

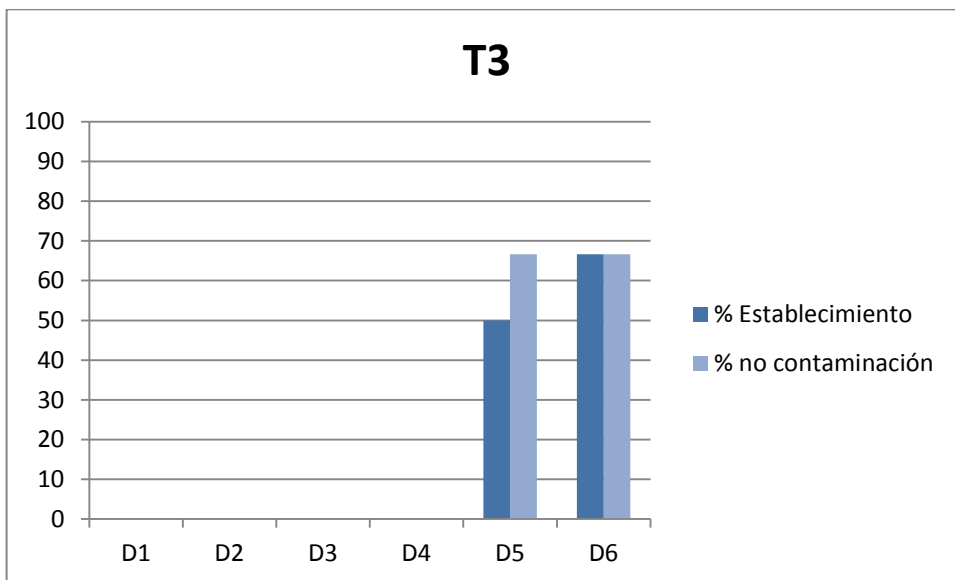
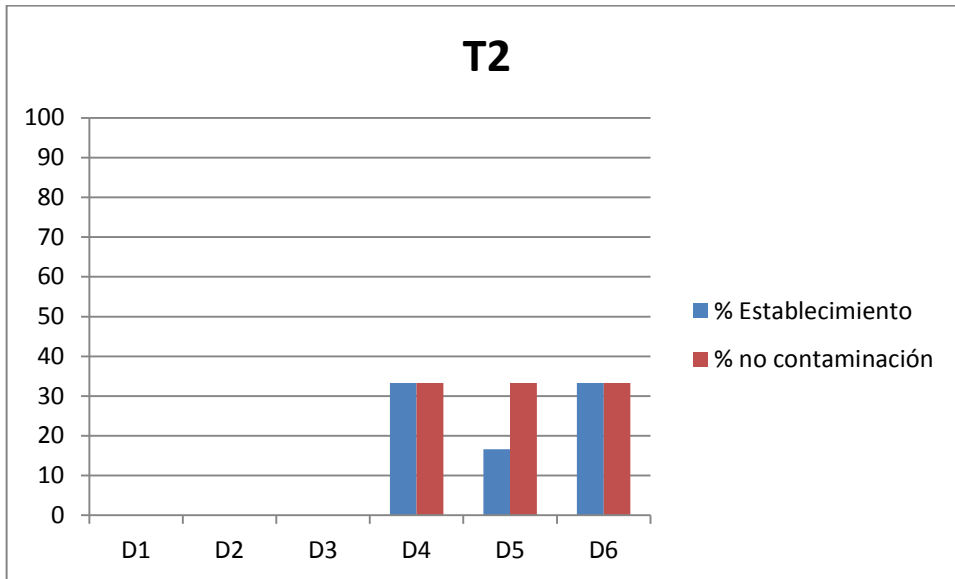


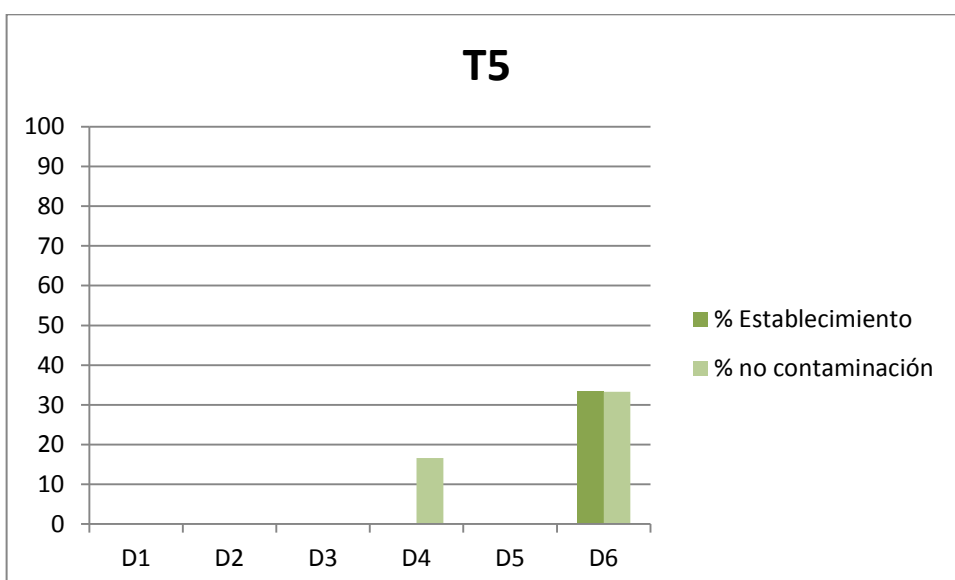
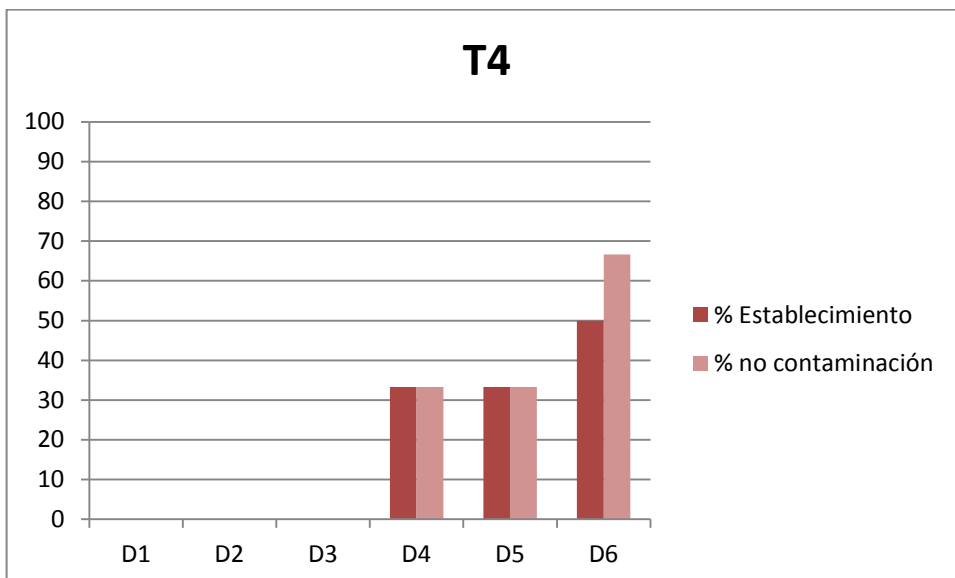
## Anexo 1. Desinfección del material vegetal

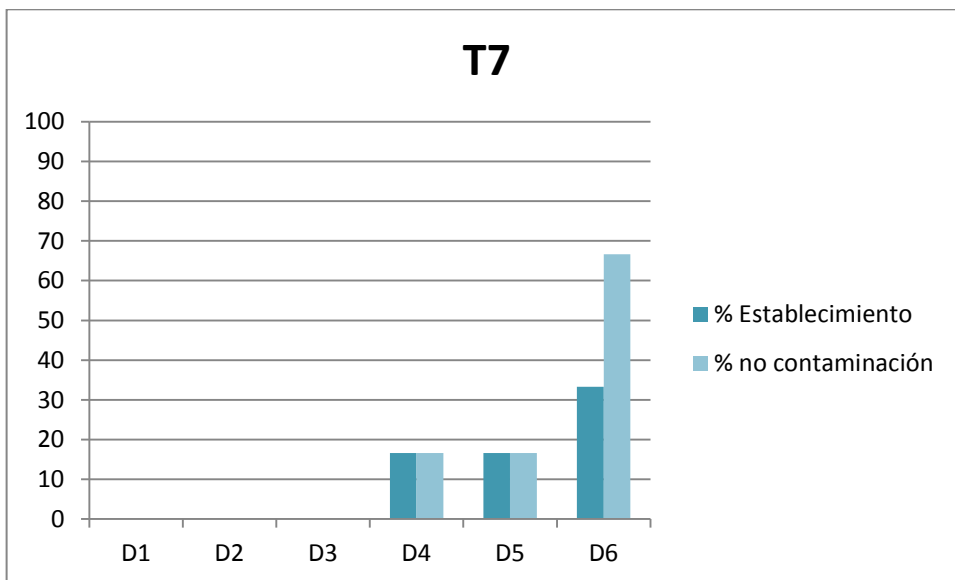
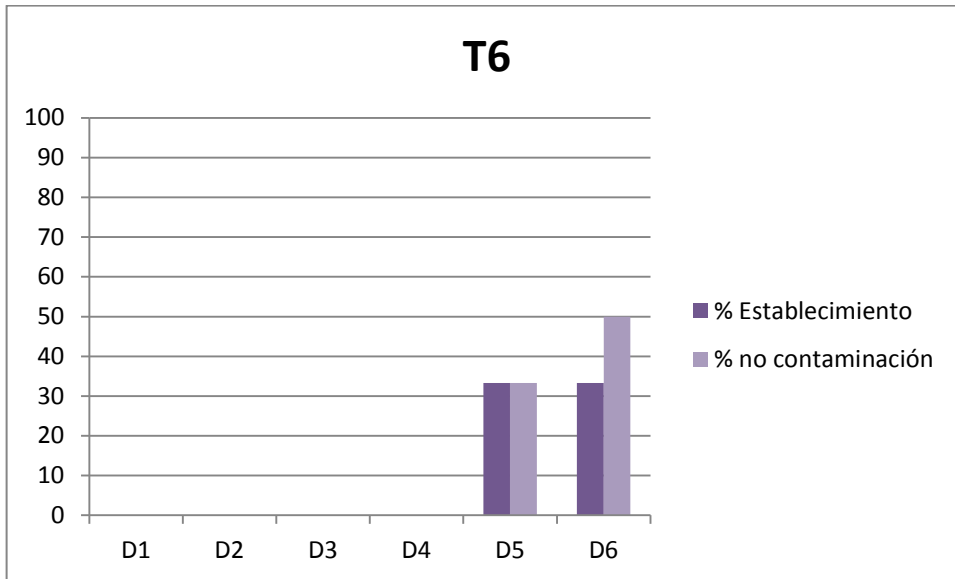


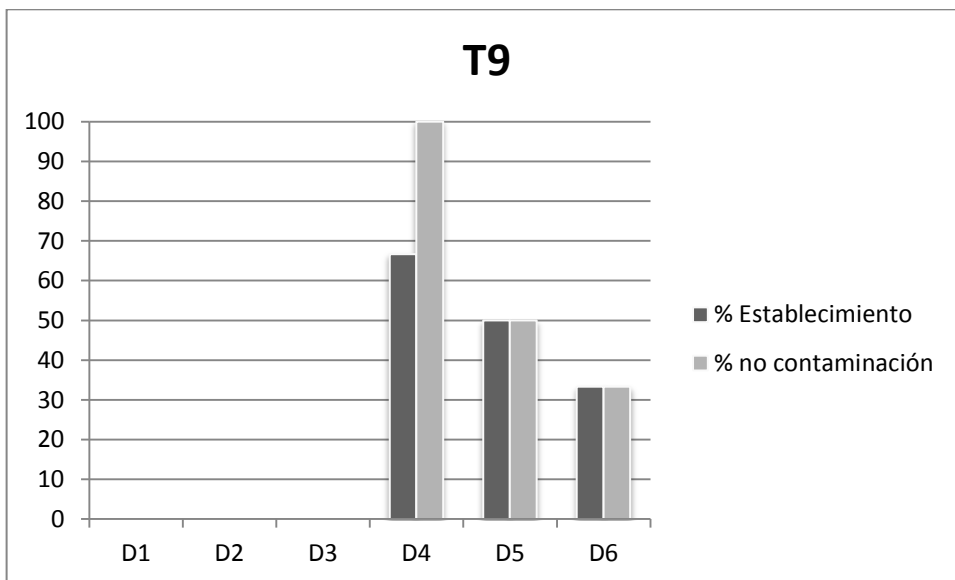
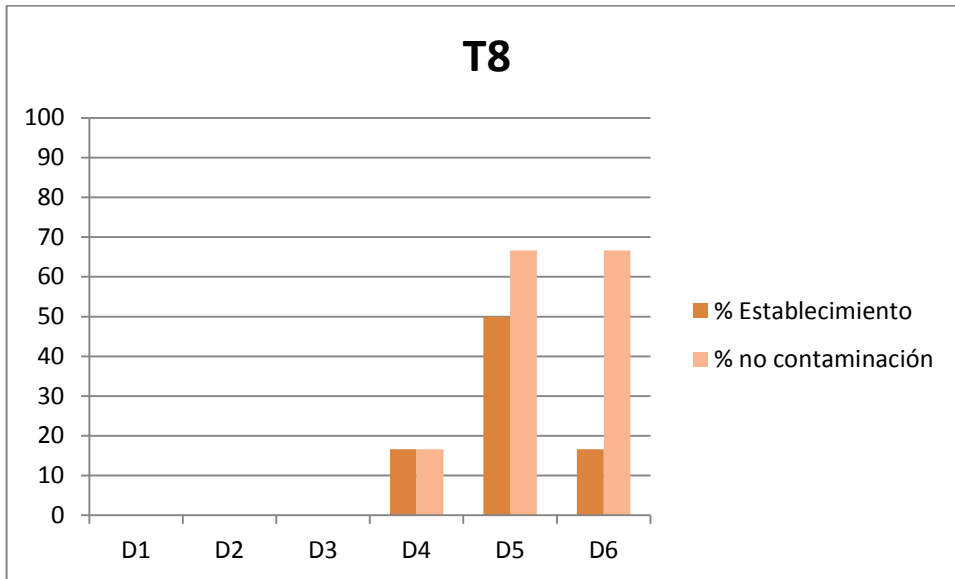
## Anexo 2. Relación del porcentaje de establecimiento y el porcentaje de no contaminación según el medio de cultivo utilizado



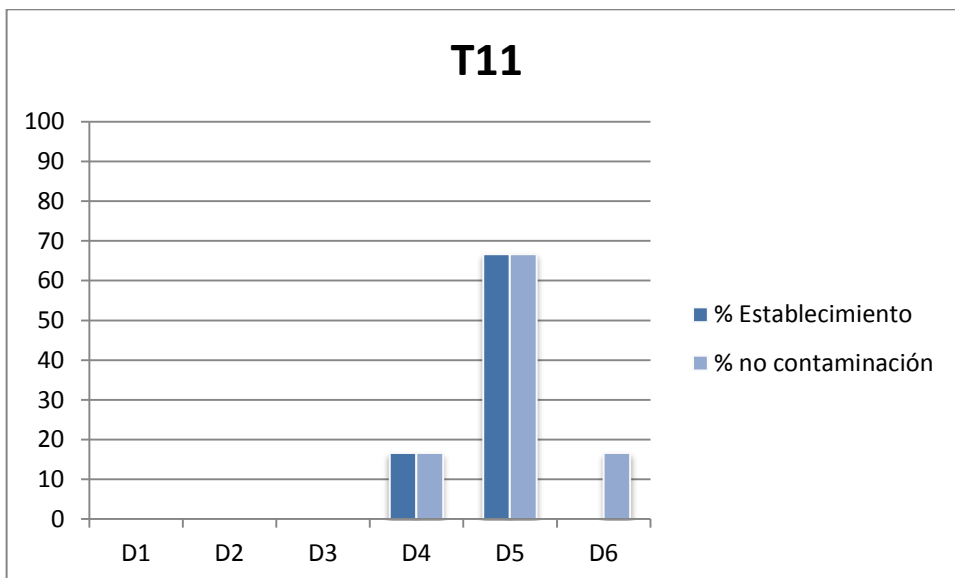
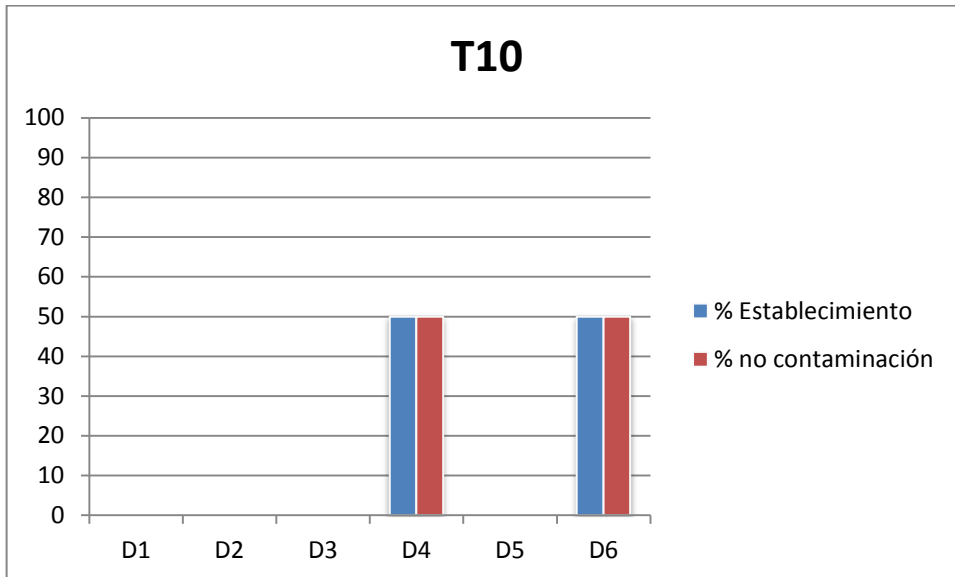


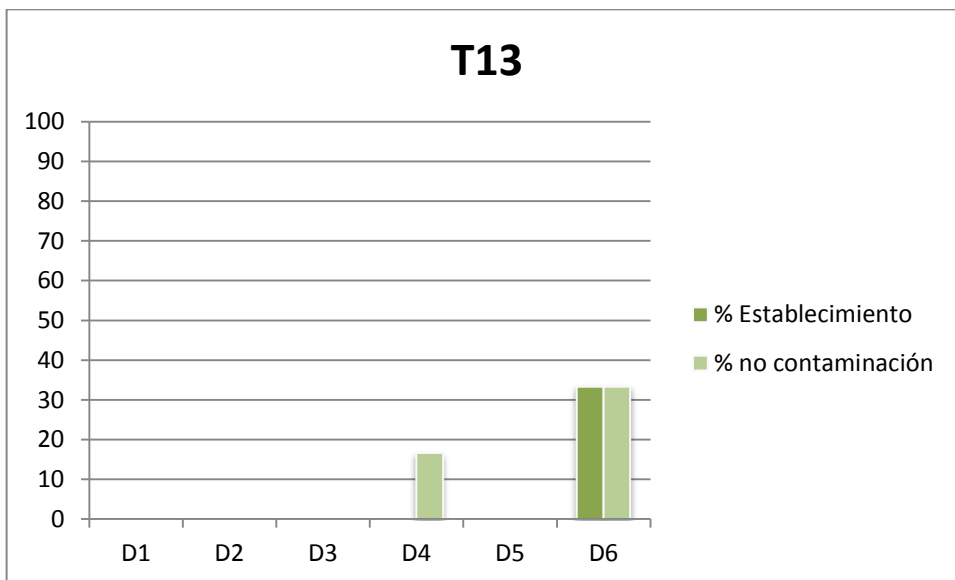
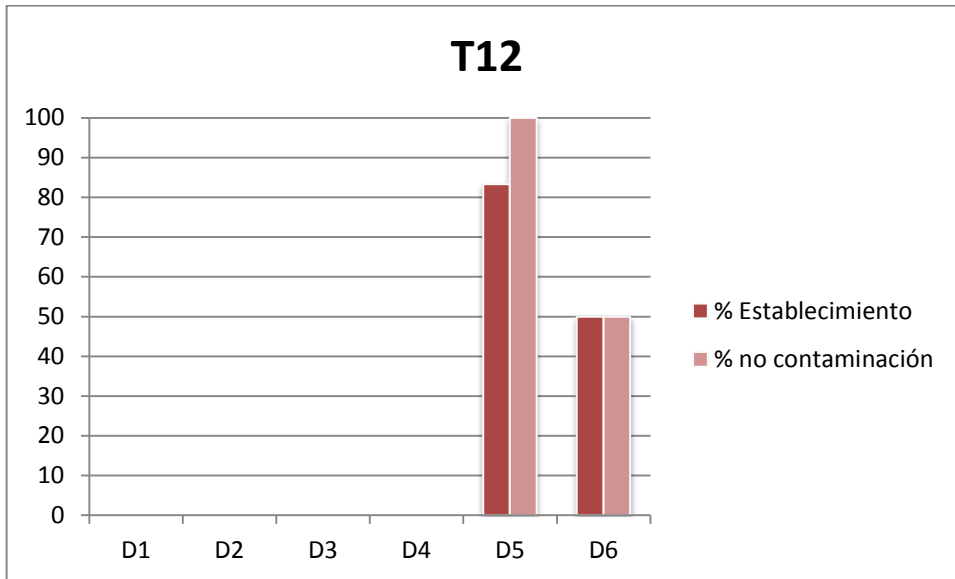


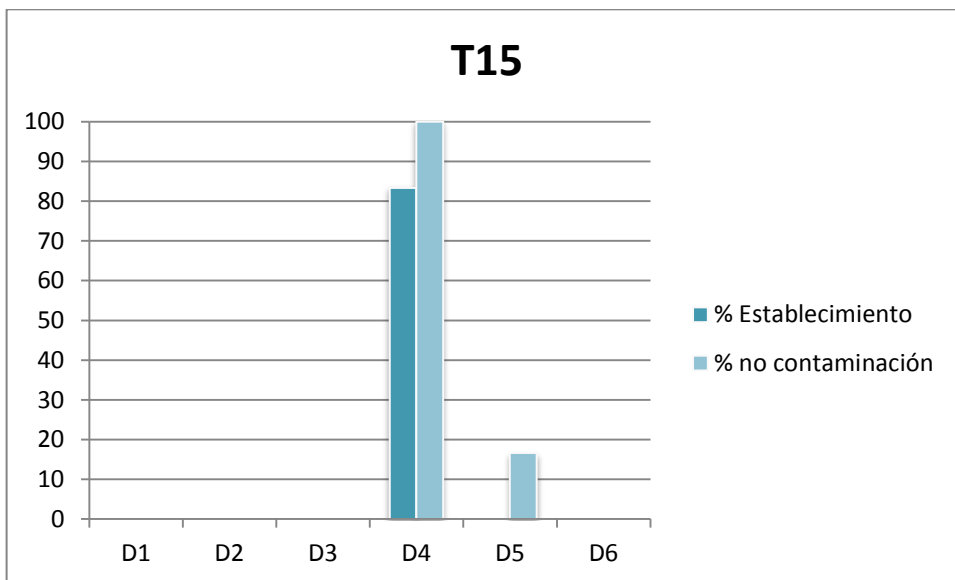
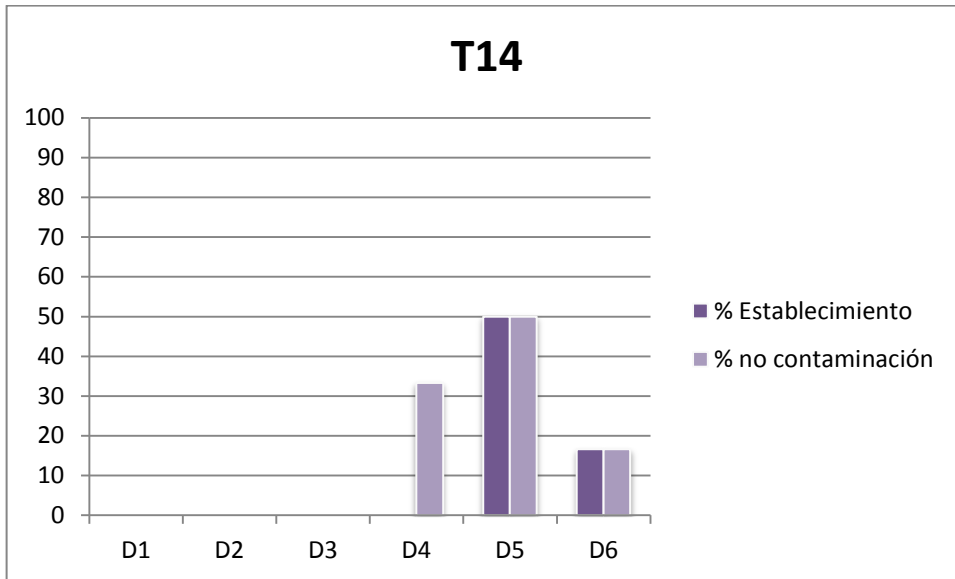


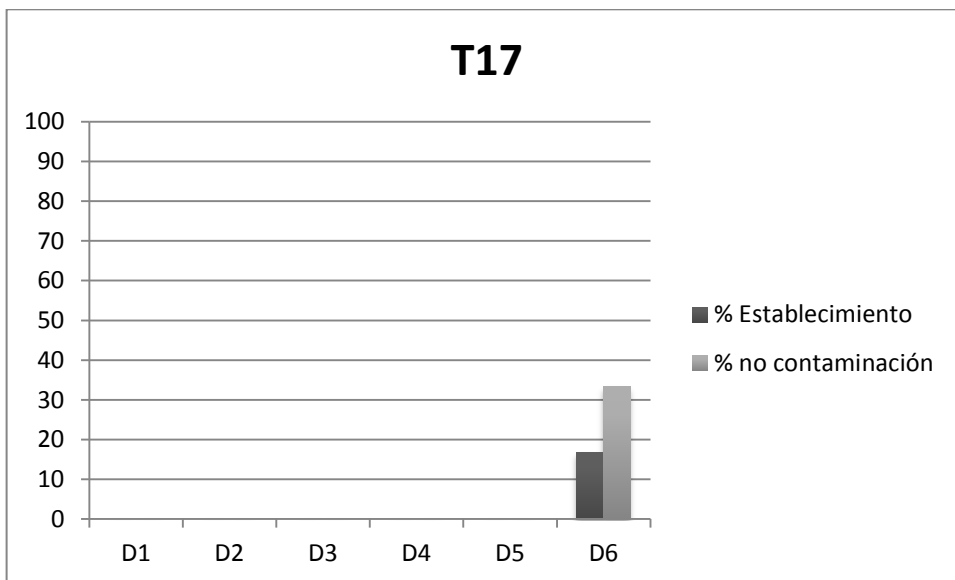
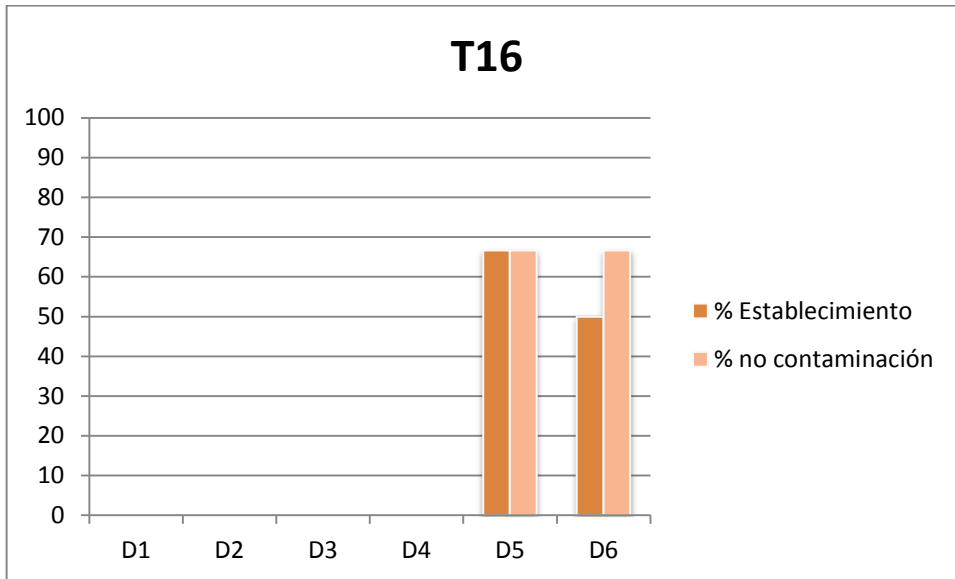


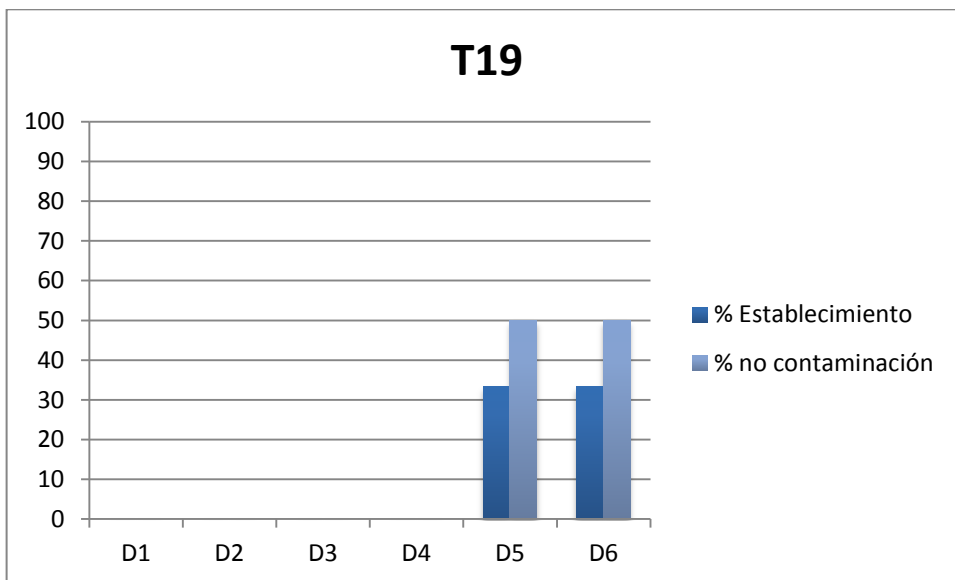
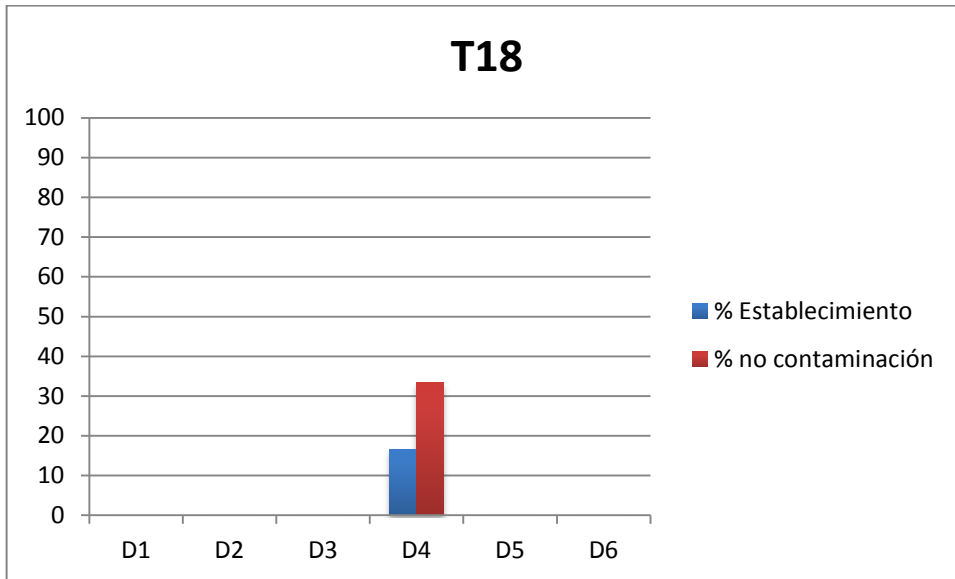


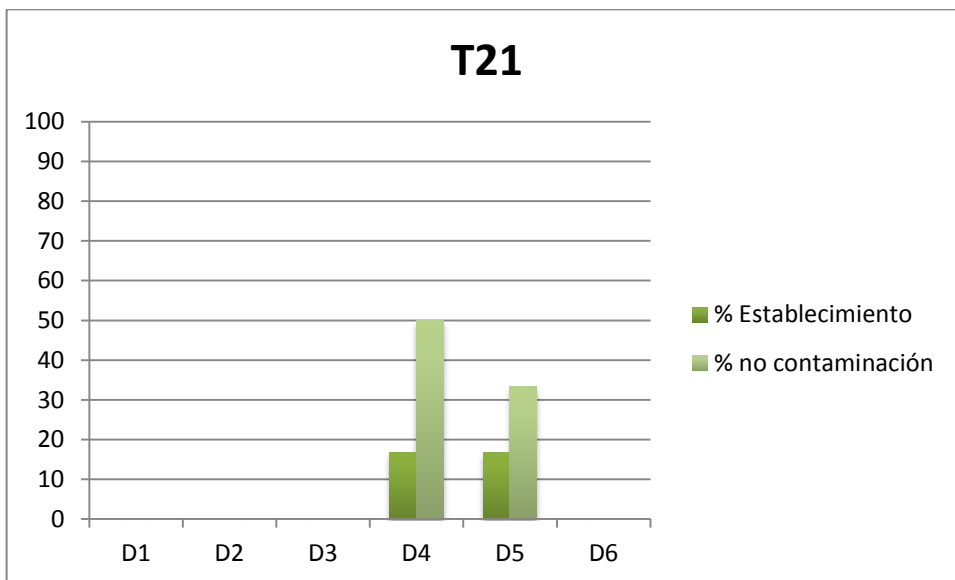
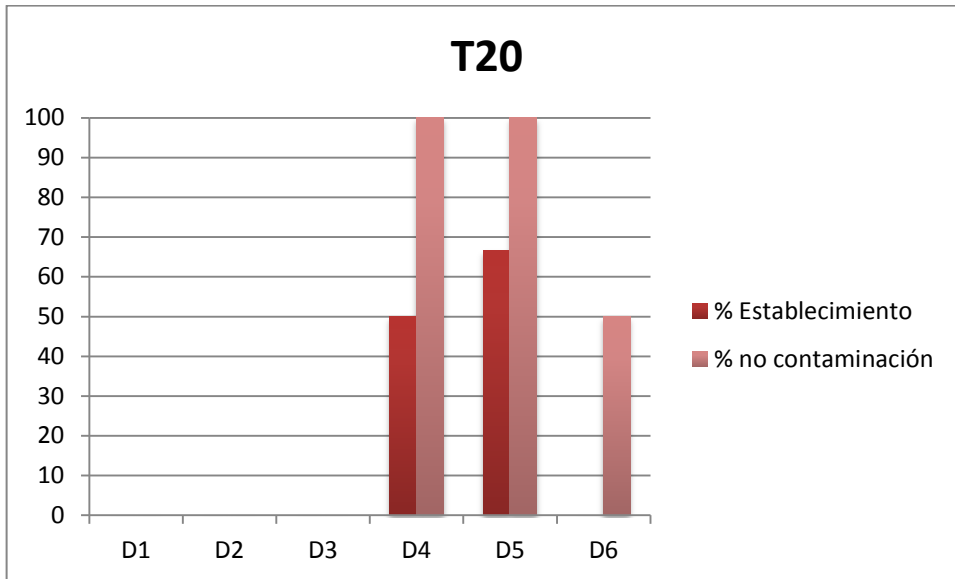


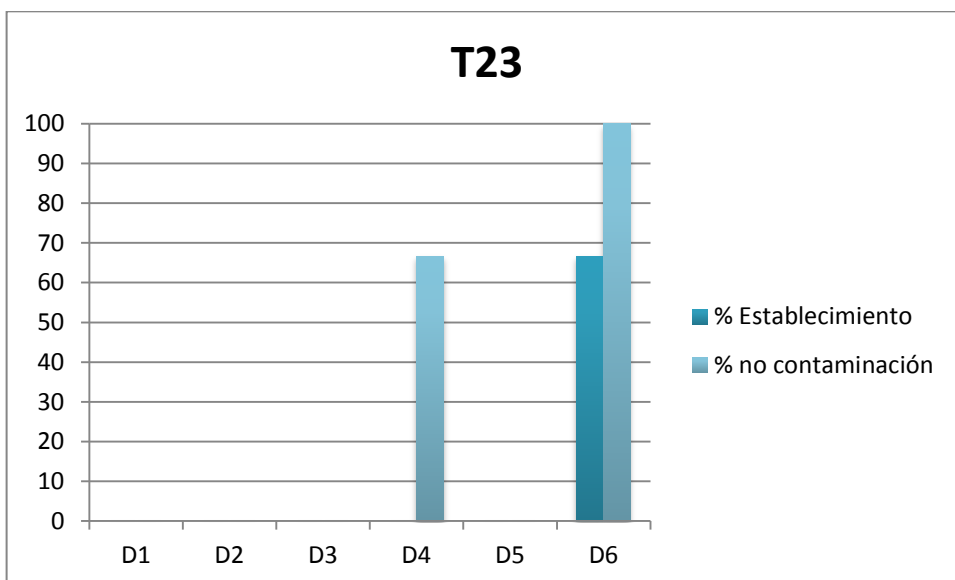
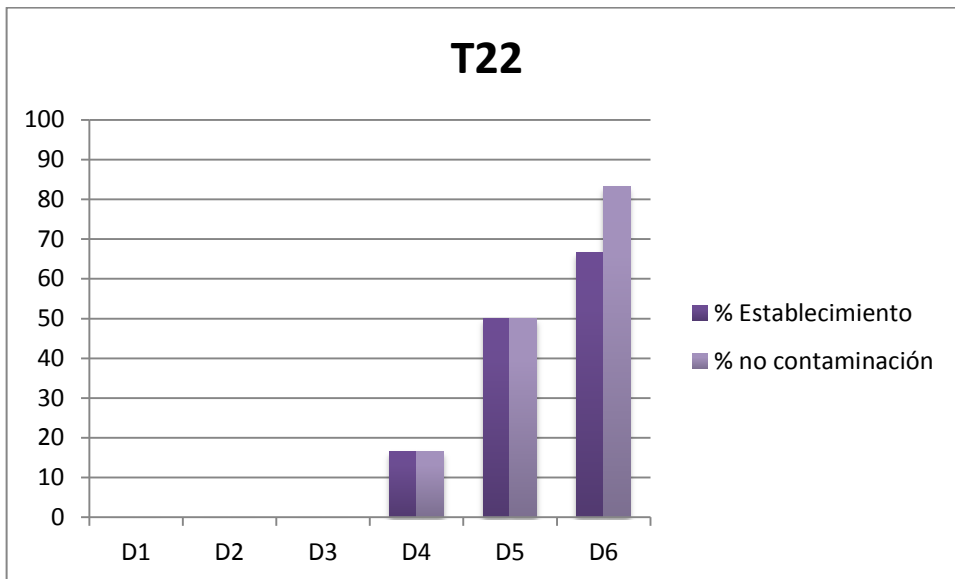


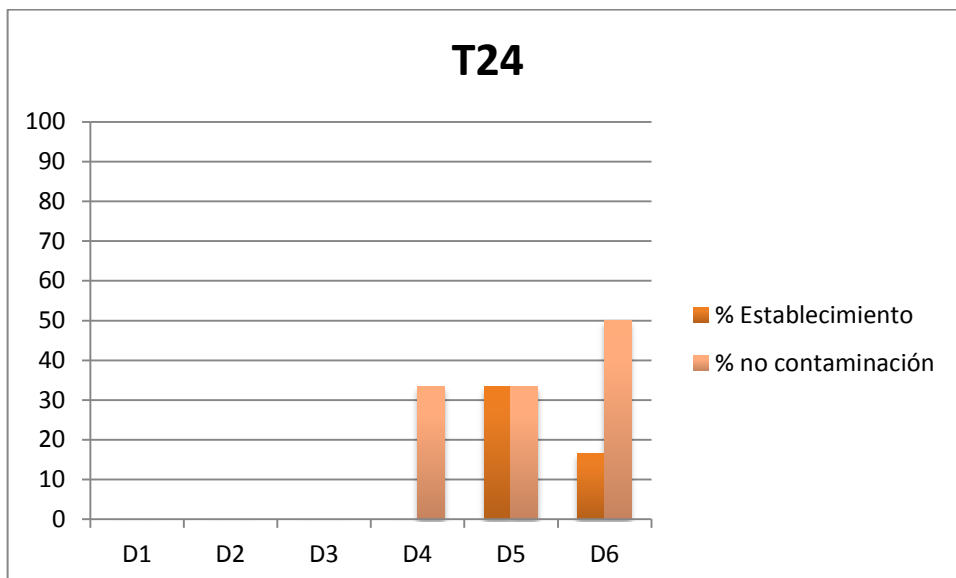






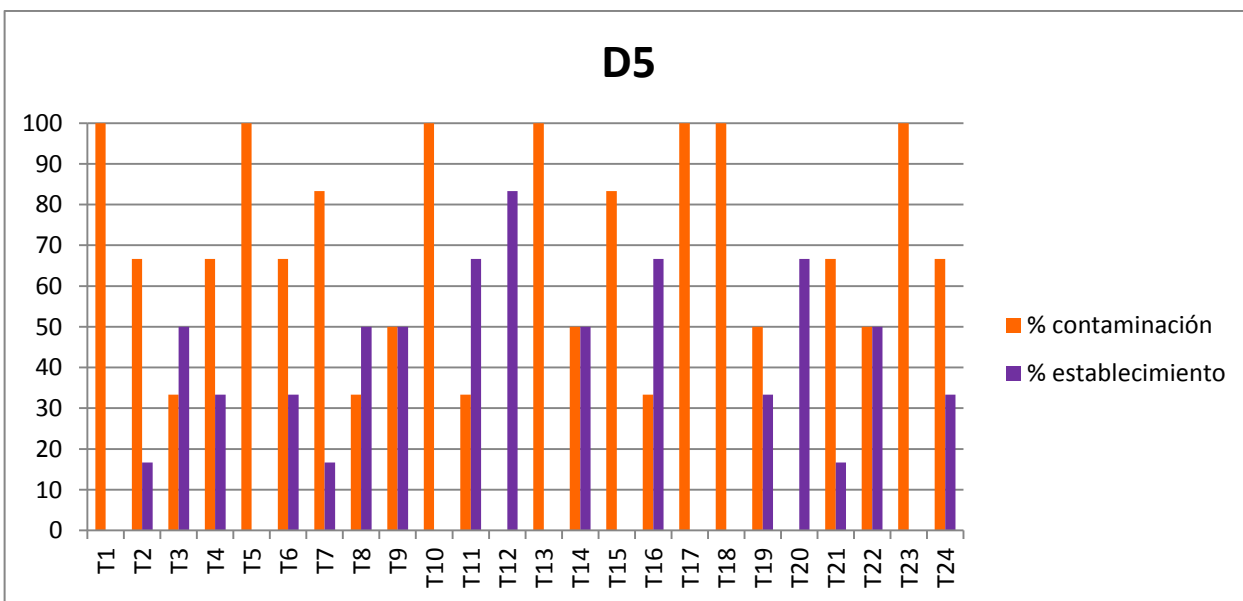
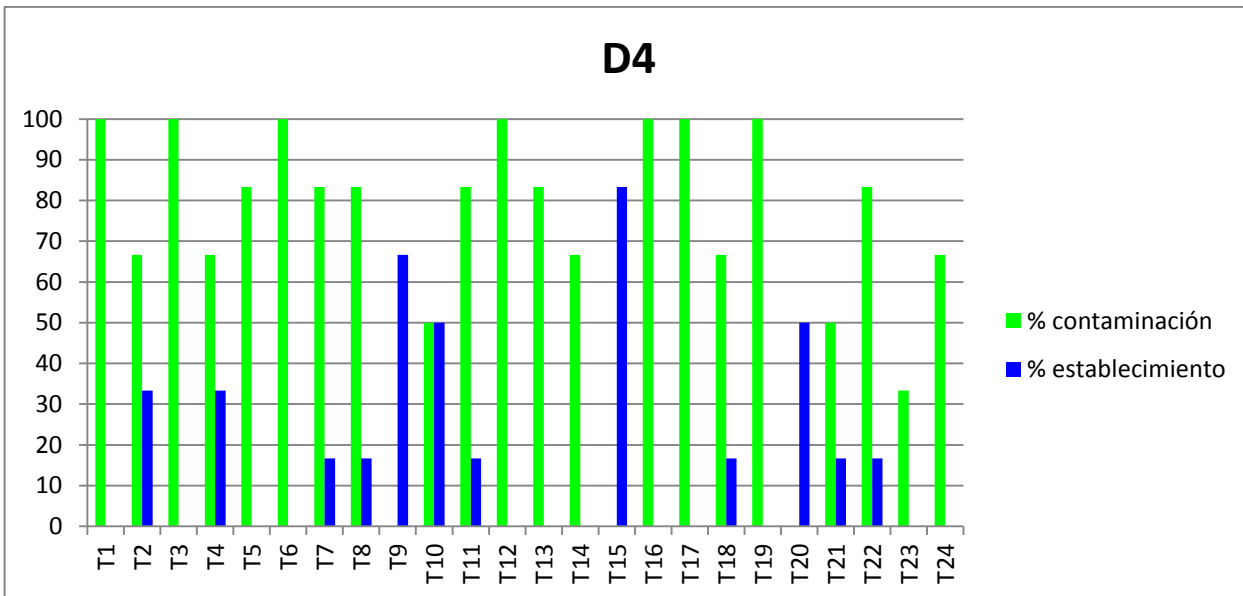


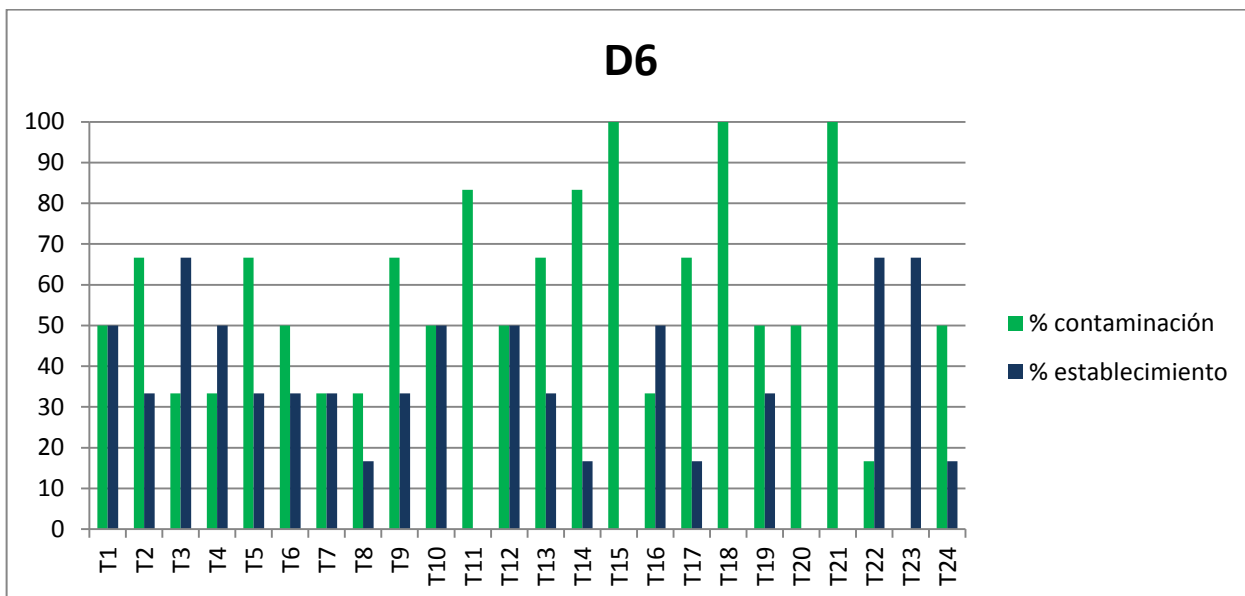




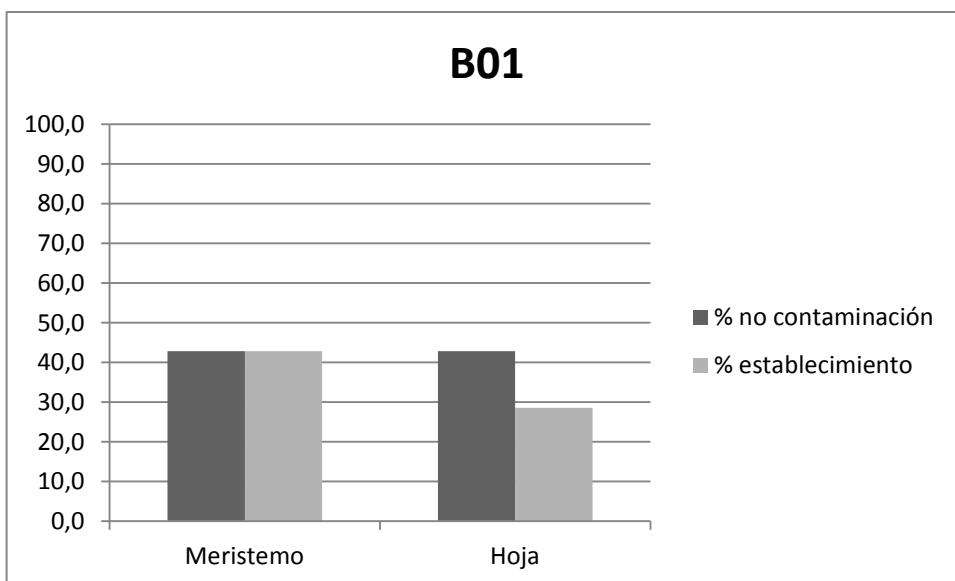


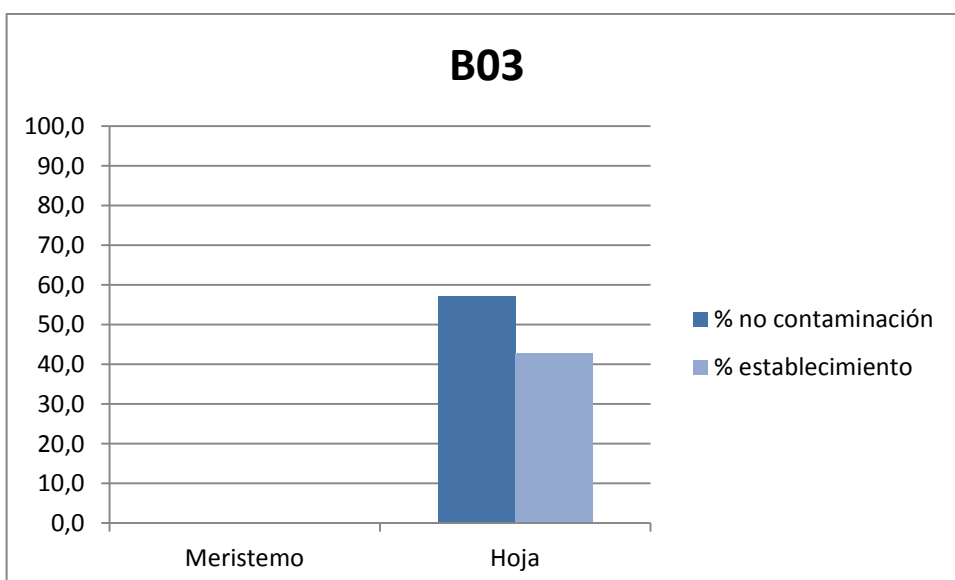
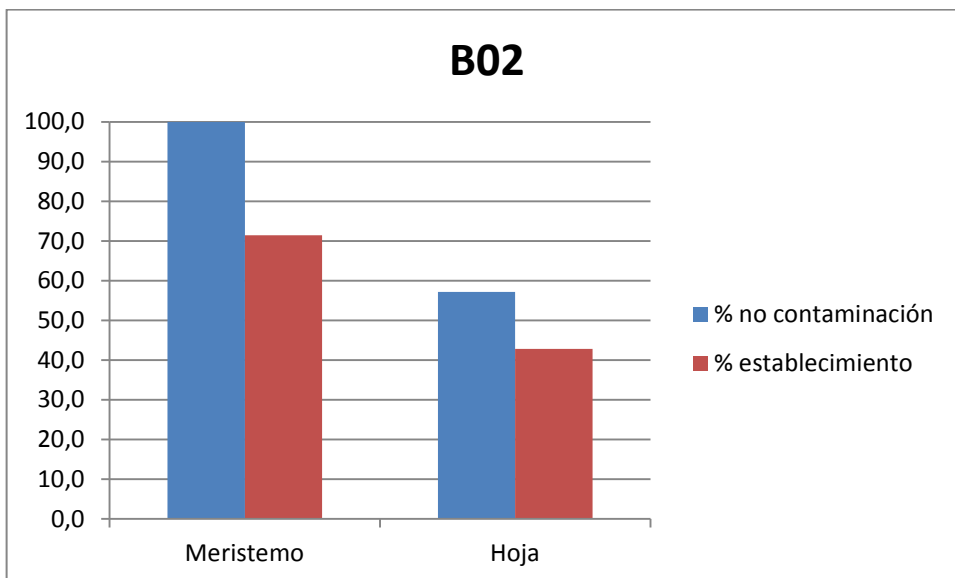
Anexo 3. Porcentaje de establecimiento versus porcentaje de contaminación según el protocolo de desinfección.

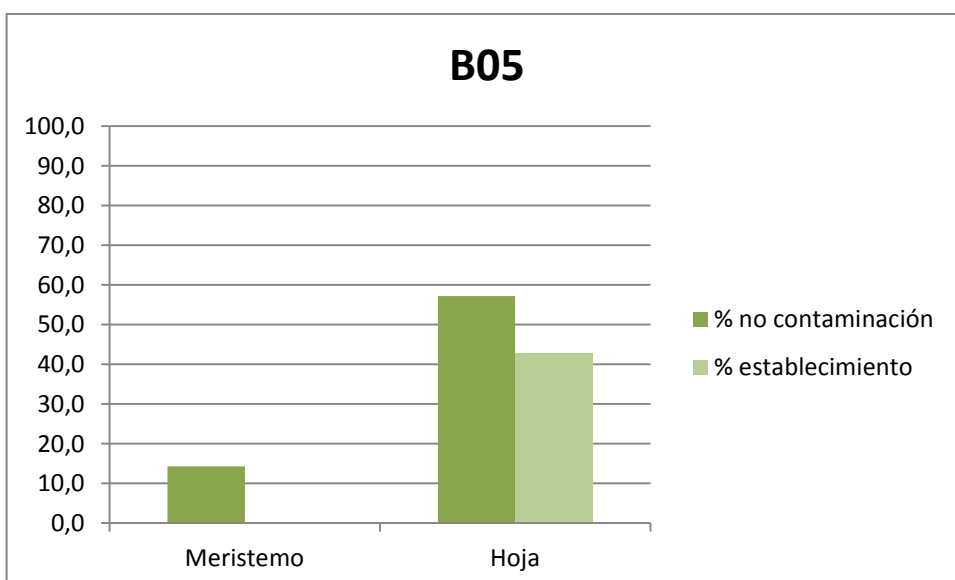
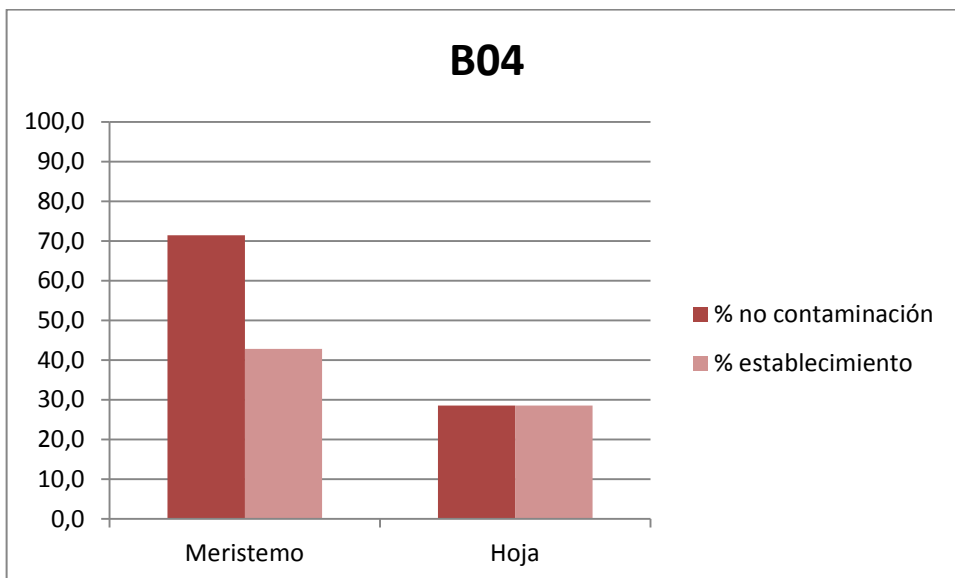


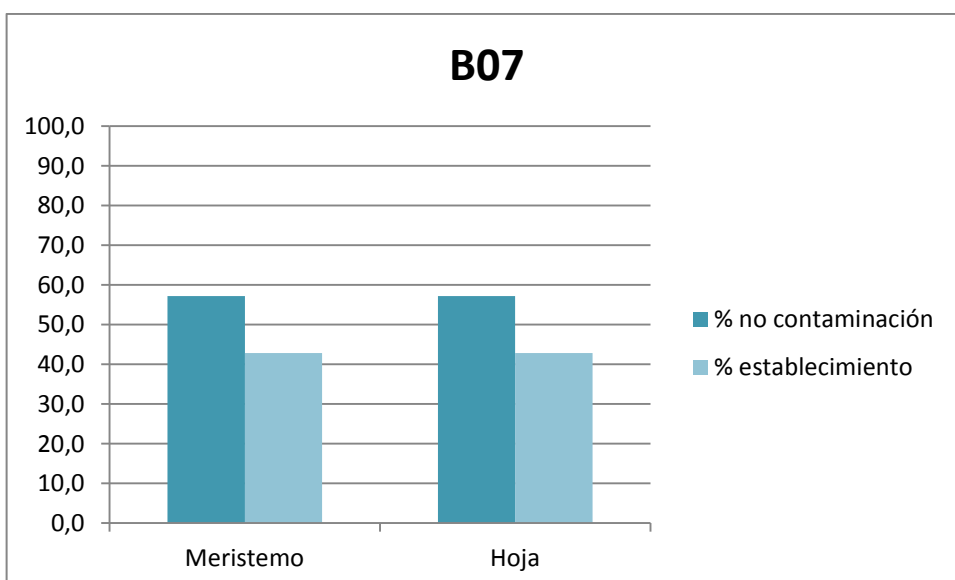
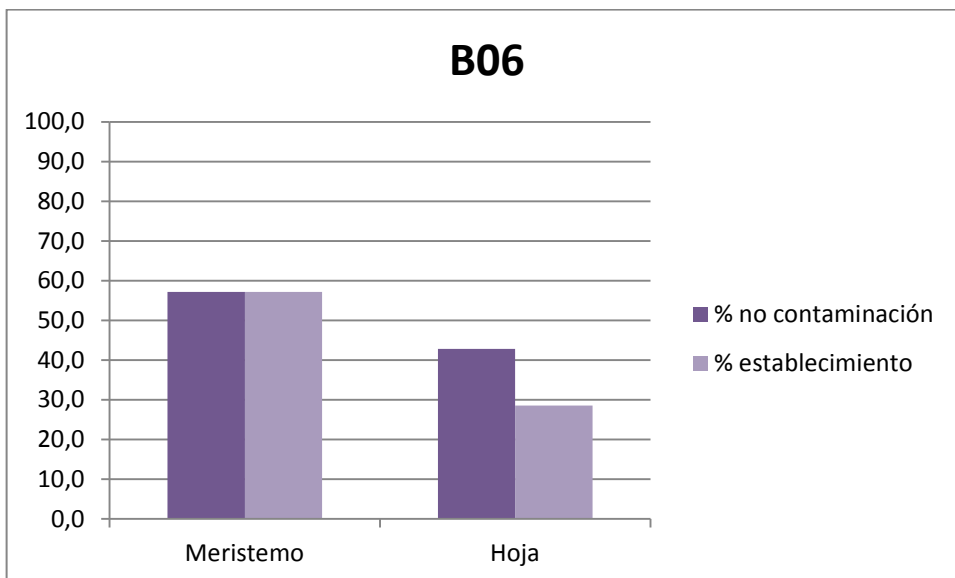


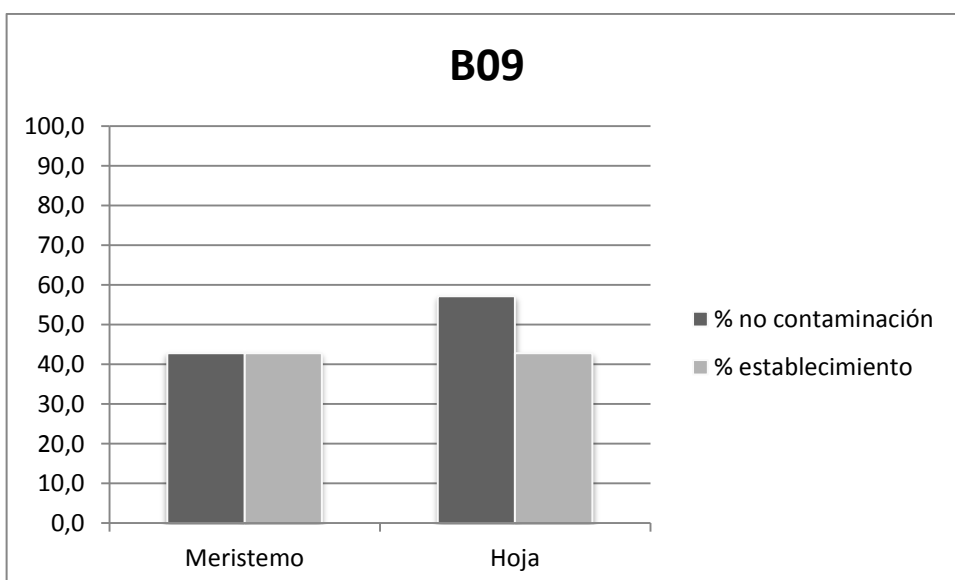
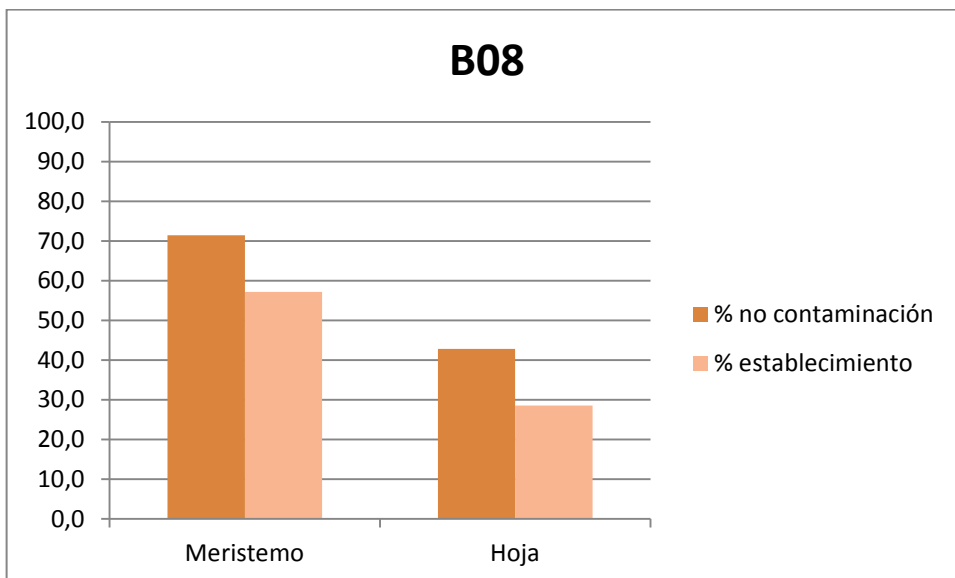
Anexo 4. Porcentaje de establecimiento versus porcentaje de no contaminación según medio de cultivo (desinfección 6).

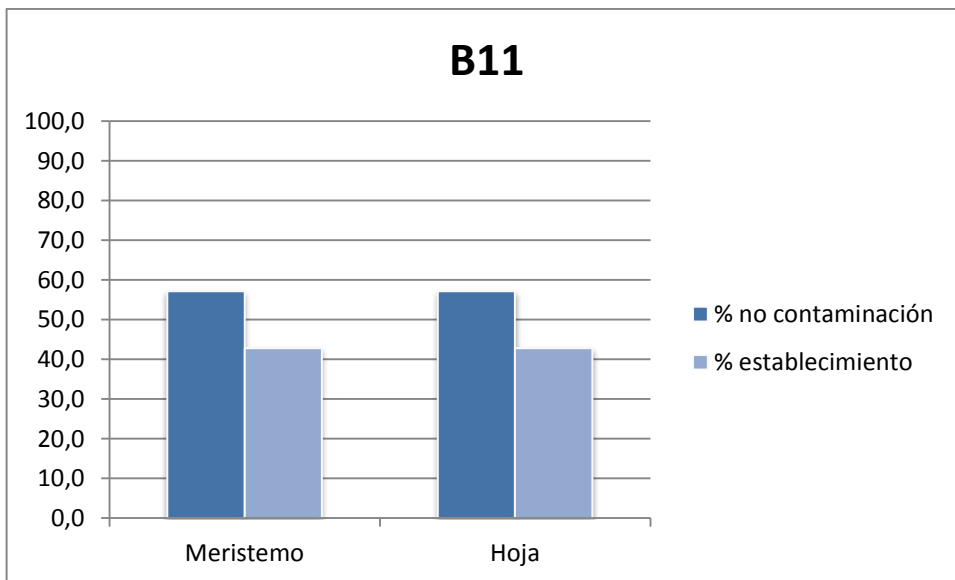
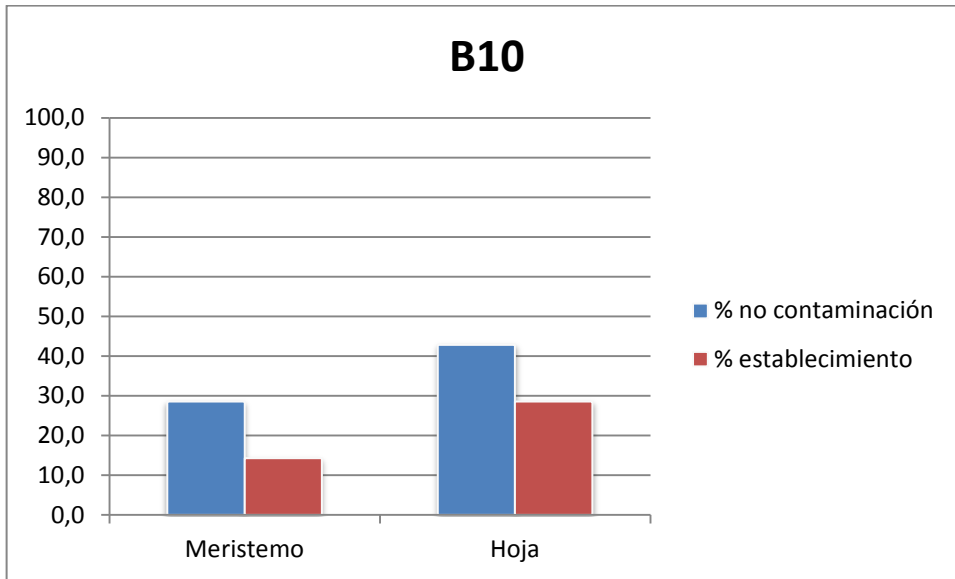


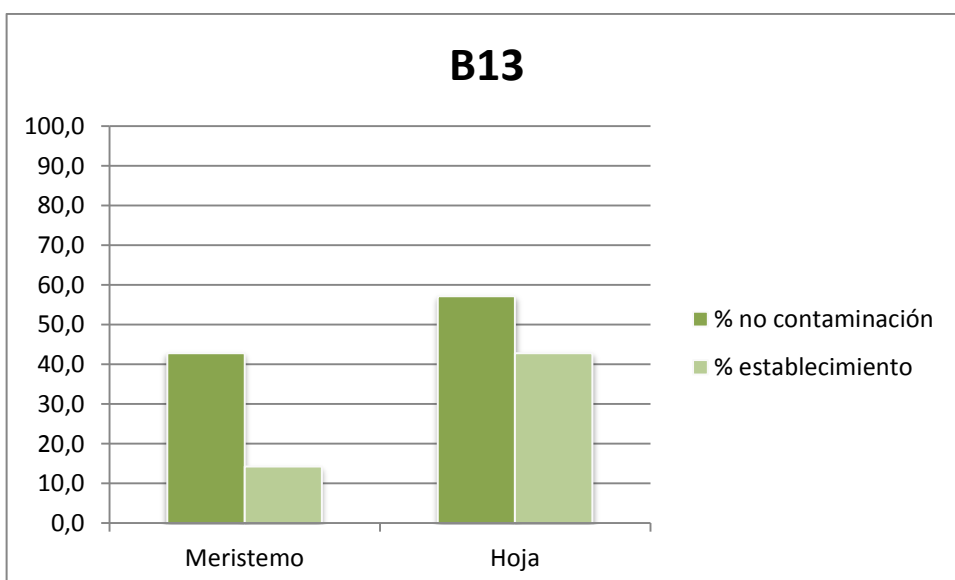
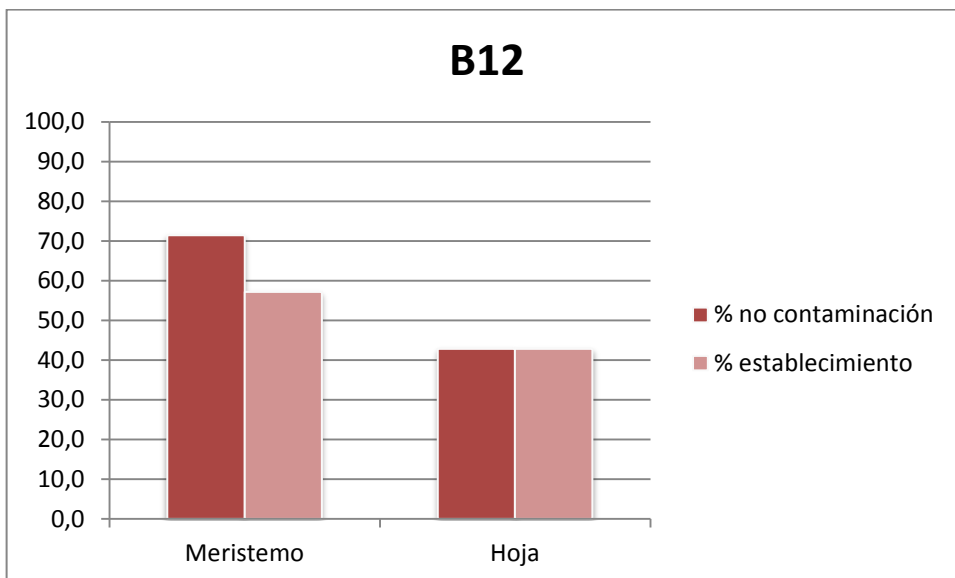






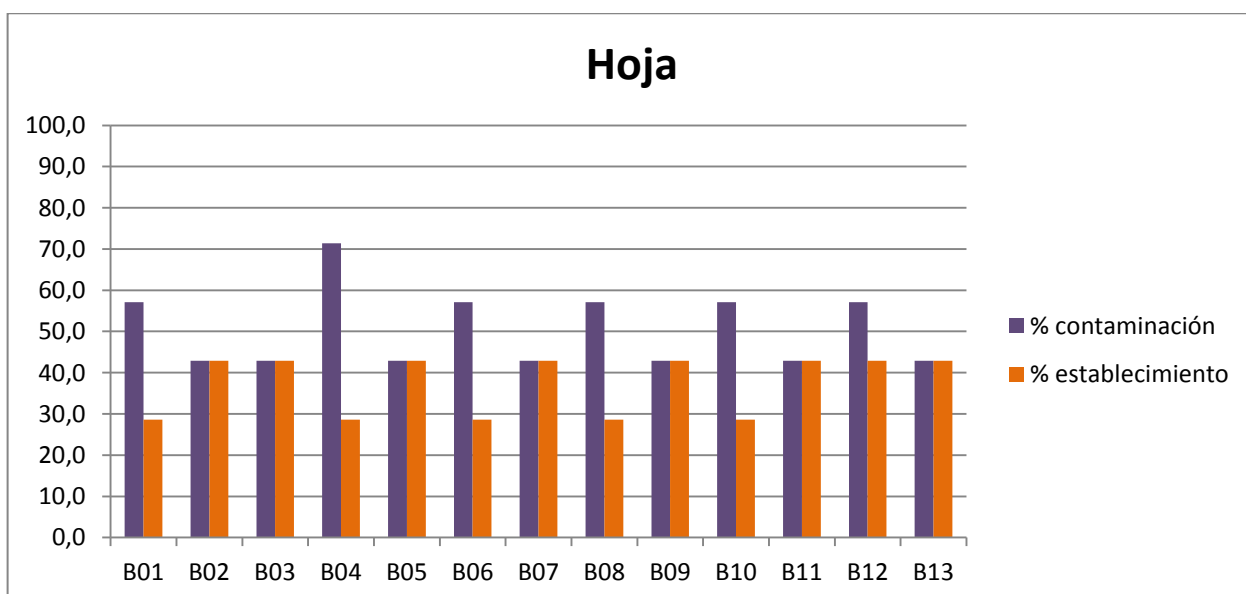
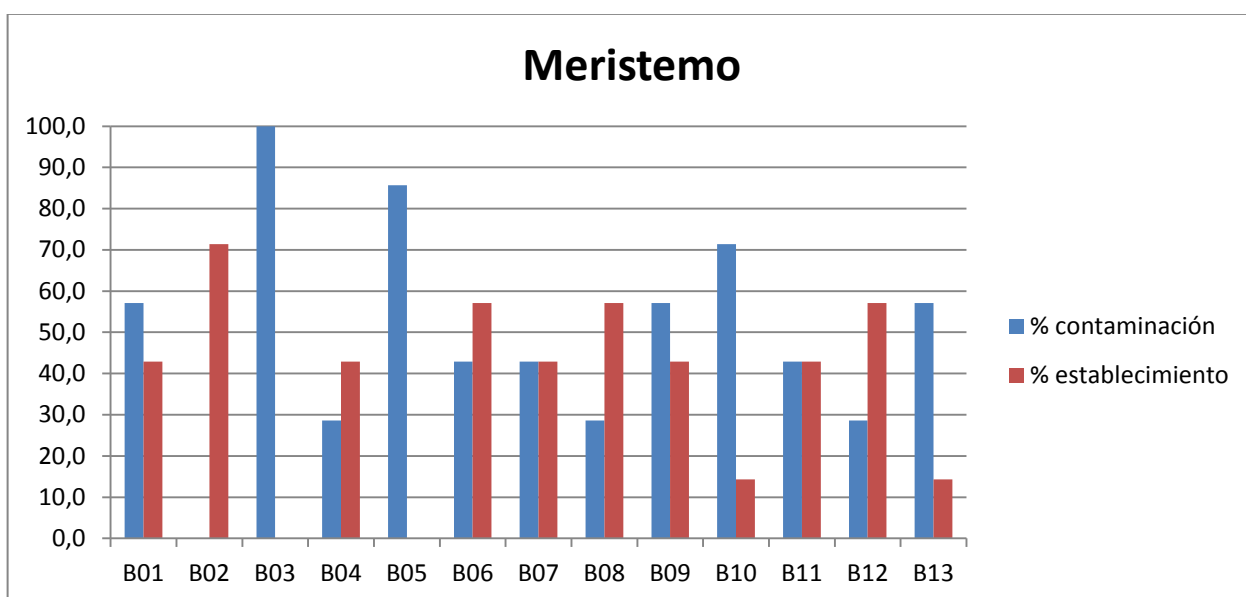








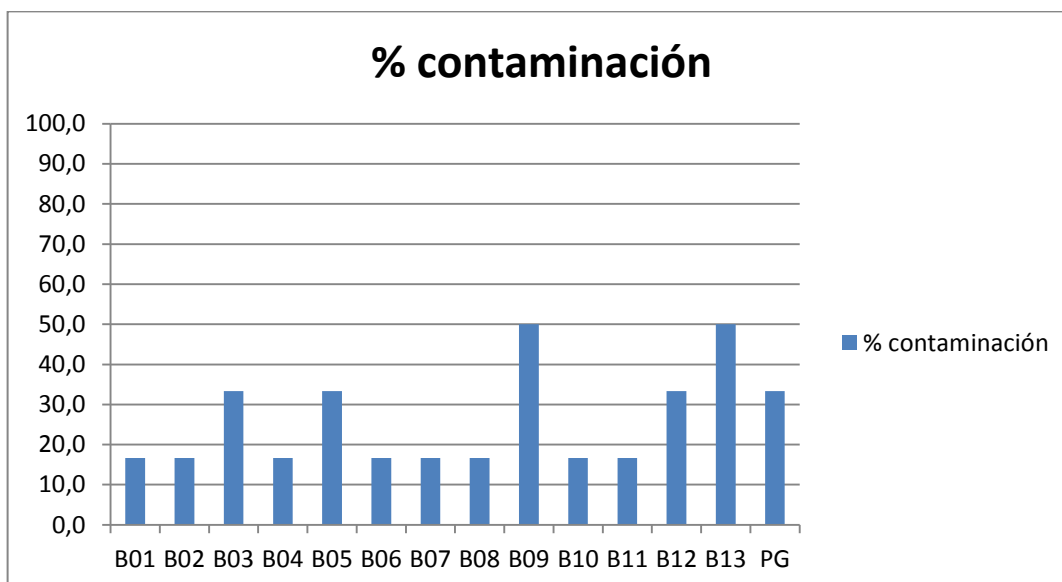
Anexo 5. Porcentaje de establecimiento versus porcentaje de contaminación (desinfección 6).



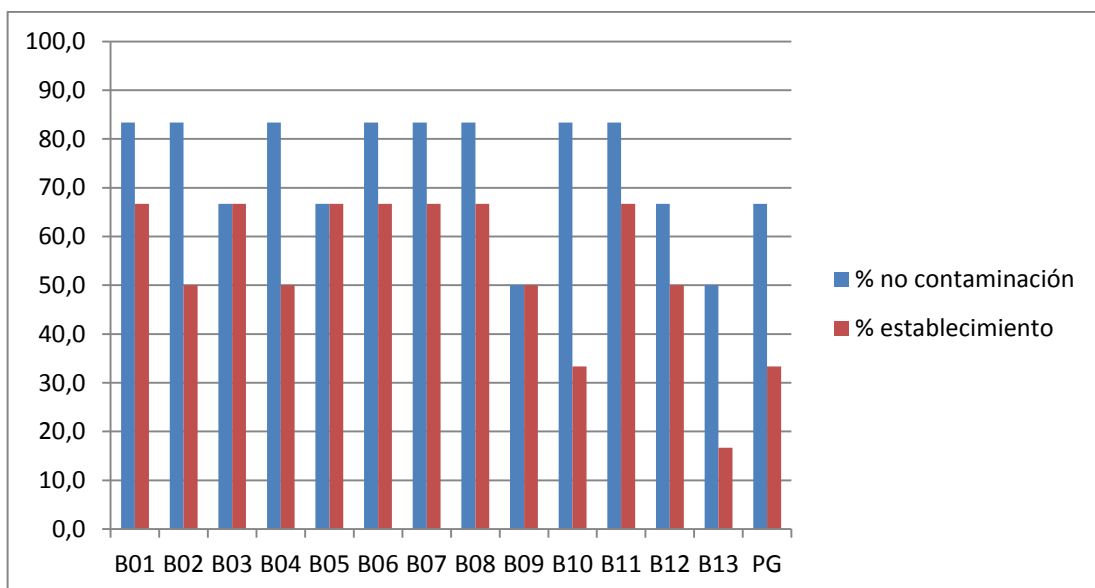
## Anexo 6. Porcentajes de contaminación y establecimiento etapa de callo

MEDIO CALLO	TOTAL FRASCOS	TOTAL CONT.	% CONT.	TOTAL ESTAB.	% ESTAB.
B01	6	1	16.67%	4	66.67%
B02	6	1	16.67%	3	50.00%
B03	6	2	33.33%	4	66.67%
B04	6	1	16.67%	3	50.00%
B05	6	2	33.33%	4	66.67%
B06	6	1	16.67%	4	66.67%
B07	6	1	16.67%	4	66.67%
B08	6	1	16.67%	4	66.67%
B09	6	3	50.00%	3	50.00%
B10	6	1	16.67%	2	33.33%
B11	6	1	16.67%	2	33.33%
B12	6	2	33.33%	3	50.00%
B13	6	3	50.00%	1	16.67%
PG	6	2	33.33%	2	33.33%
<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>22</b>	<b>26.19</b>	<b>43</b>	<b>51.2</b>

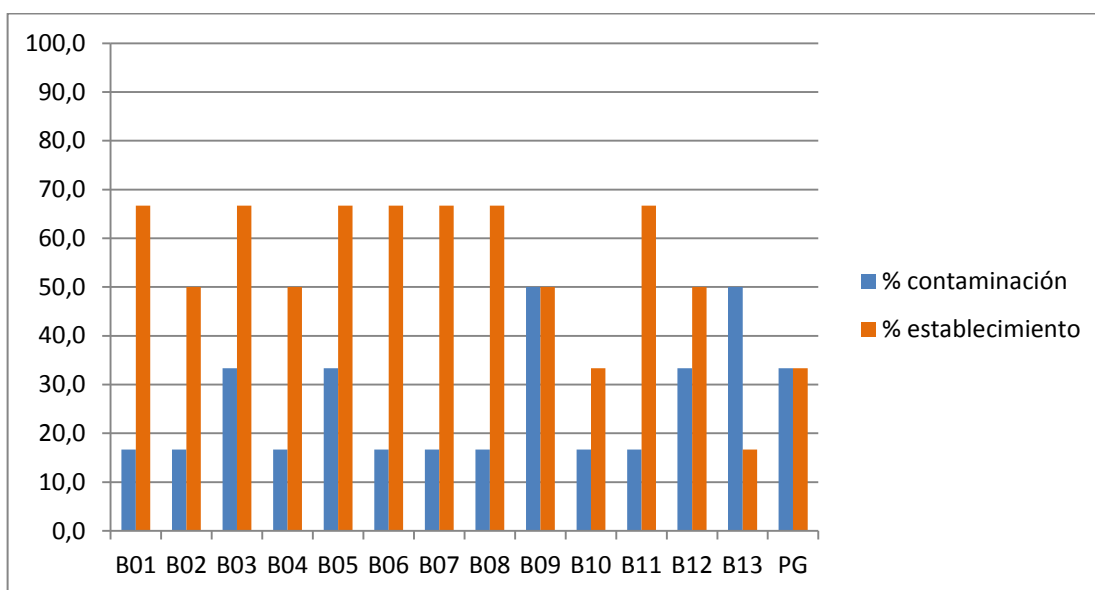
## Anexo 7. Porcentaje de contaminación etapa de callo



Anexo 8. Porcentaje de establecimiento versus porcentaje de no contaminación etapa de callo



Anexo 9. Porcentaje de establecimiento versus porcentaje de contaminación etapa de callo.



Anexo 10. Porcentajes de callo pro-embriogénico y no embriogénico.

medio callo	total frascos	frascos callo pro-embriogénico	% callo pro-embriogénico	% global callo pro-embriogénico	frascos callo no embriogénico	% callo no embriogénico	% global callo no embriogénico	frascos sin callo	% frascos sin callo	% global frascos sin callo
B01	4	3	75.0	50.0	0	0.0	0.0	1	25.0	16.7
B02	3	1	33.3	16.7	1	33.3	16.7	1	33.3	16.7
B03	4	3	75.0	50.0	0	0.0	0.0	1	25.0	16.7
B04	3	2	66.7	33.3	0	0.0	0.0	1	33.3	16.7
B05	4	1	25.0	16.7	1	25.0	16.7	2	50.0	33.3
B06	4	2	50.0	33.3	0	0.0	0.0	2	50.0	33.3
B07	4	1	25.0	16.7	1	25.0	16.7	2	50.0	33.3
B08	4	2	50.0	33.3	1	25.0	16.7	1	25.0	16.7
B09	3	2	66.7	33.3	0	0.0	0.0	1	33.3	16.7
B10	2	1	50.0	16.7	1	50.0	16.7	0	0.0	0.0
B11	2	1	50.0	16.7	0	0.0	0.0	1	50.0	16.7
B12	3	1	33.3	16.7	0	0.0	0.0	2	66.7	33.3
B13	1	0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	1	100.0	16.7
PG	2	1	50.0	16.7	0	0.0	0.0	1	50.0	16.7
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>21</b>	<b>48.8</b>	<b>25.0</b>	<b>5</b>	<b>11.6</b>	<b>6.0</b>	<b>17</b>	<b>39.5</b>	<b>20.2</b>

Anexo 11. Porcentajes de contaminación, necrosis y establecimiento etapa de maduración.

Tipo	# de callos	contaminados	% contaminados	necrosados	% necrosados	callos a desarrollo	% Callos a desarrollo
Completo	20	2	10%	1	5%	17	85%
Aislado	8	1	13%	7	88%	0	0%

Anexo 12. Porcentajes de pro-embryones y radículas obtenidas.

<b># de callos</b>	<b>17</b>
pro-embryones	7
<b>% pro-embryones</b>	<b>41.18</b>
radícula	4
<b>% radículas</b>	<b>23.53</b>
sin estructura visible	6
<b>% sin estructura visible</b>	<b>35.29</b>

Anexo 13. Porcentajes de contaminación, necrosis y germinación en SIT.

Sistema	repetición	# embryones	contaminación	% contaminación	necrosis	% necrosis	Germinación	% Germinación
BIT	1	4	4	100	0	0	0	0
	2	4	4	100	0	0	0	0
Gravedad	1	4	0	0	4	100	0	0
	2	4	4	100	0	0	0	0
total	4	16	12	75	4	25	0	0