



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

“Evaluación de medios de cultivo para la germinación *in vitro* de embriones de  
*Ceroxylon* sp. (Palma de cera).”

Tesis previa a la obtención del  
título de Ingeniera Agrónoma

**Autora:**

**María José Berrezueta Berrezueta**

**DIRECTORA: Blga. Denisse Fabiola Peña Tapia M. Sc.**

**CO DIRECTOR: Ing. Eduardo José Chica Martínez Ph.D.**

**CUENCA - ECUADOR**

**2015**



## RESUMEN.

*Ceroxylon vogelianum* (Engel) H.Wendl es una palma andina que reviste una gran importancia en la elaboración de artesanías religiosas asociadas a la festividad católica de Semana Santa, lo que ha causado la sobre explotación de las poblaciones silvestres. El objetivo de esta investigación fue establecer una metodología para la germinación *in vitro* de embriones de *C. vogelianum*, a través de la evaluación de cuatro medios de cultivos y un control: Murashige & Skoog (MS), MS + agua de coco (AC) al 25% /L, MS + ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) a (0,2 mg/L), MS + AG<sub>3</sub> (0,2 mg/L) + benzilaminopurina (BAP) a (2mg/L) el control fue sembrado en tierra de acuerdo a las prácticas tradicionales de los viveristas.

Los resultados obtenidos, dentro de la duración del ensayo (133 días), indican que en todos los tratamientos hubo germinación excepto por el control tradicional sembrado en bocashi. El tratamiento MS + ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) a (0,2 mg/L) mostró los mejores resultados obteniendo un 22% de germinación. El costo de producción por planta en los cuatro tratamientos *in vitro* fueron de 0,87 a 0,89 dólares.

El cultivo *in vitro* de embriones de *Ceroxylon vogelianum* incrementó el porcentaje de germinación y redujo el tiempo de germinación en comparación con el sistema de siembra convencional.

**PALABRAS CLAVES:** *IN VITRO*, PALMA DE CERA, CULTIVO DE EMBRIONES.



## ABSTRACT

*Ceroxylon vogelianum* is an Andean palm of great importance in the elaboration of religious crafts associated with the Catholic feast of Easter. This practice has caused the overexploitation of wild populations. The objective of this research was to establish a methodology for the *in vitro* germination of *C. vogelianum*, through the evaluation of four culture media: Murashige & Skoog (MS), MS + coconut water (AC) 25% / L, MS + gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) to (0.2mg / L), MS + GA<sub>3</sub> (0.2 mg / L) + benzylaminopurine (BAP) to (2mg / L), and a control sown following traditional practices of nurserymen.

The results indicate that embryos germinated in all treatments except for the traditional control sown on the ground. Highest germination was recorded in the MS + gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) to (0.2 mg / L) with a 22% germination. The production costs per plant for the four *in vitro* culture media evaluated ranged from 0.87 to 0.89 dollars.

*In vitro* culture of embryos *Ceroxylon vogelianum* increased the percentage of germination and reduced the time of germination compared to the conventional propagation system.

**KEYWORDS:** *IN VITRO*, PALM OF WAX, CULTIVATION OF EMBRYOS



## TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo general: .....	22
3.2 Objetivos específicos: .....	22
3.3 Hipótesis.....	22
4. REVISION DE LITERATURA.....	23
4.1 Palma de Cera ( <i>Ceroxylon</i> sp).....	23
4.1.1 Clasificación botánica y ecología .....	23
4.1.2 Problemas de conservación y propagación.....	24
4.2 Métodos alternativos de propagación .....	25
4.2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	25
4.2.3 Efectos de los reguladores de crecimiento en sistemas de propagación <i>in vitro</i> .....	27
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1 Área de estudio.....	29
5.2 Área de ejecución del proyecto.....	30
5.3 Recolección de la semilla.....	30
5.4 Recolección de la muestra botánica.....	30
5.5 Prueba de viabilidad de la semilla.....	30
5.6 Cultivo de embriones .....	30
5.7 Análisis de germinación de embriones.....	32
5.8 Análisis de biomasa .....	34
5.9 Análisis de biomasa fresca y seca.....	34
5.10 Diseño experimental y análisis estadístico.....	34
5.11 Análisis económico .....	35
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
6.1 Identificación taxonómica de la palma de cera.....	36
6.2 Viabilidad de la semilla.....	36
6.3 Germinación .....	37
6.4 Biomasa .....	39
6.4.1 Número de hojas .....	39



6.4.2	Número de raíces. ....	40
6.4.3	Altura de la planta .....	40
6.4.4	Peso fresco y seco del tallo. ....	41
6.4.5	Peso fresco y seco de la raíz: .....	42
6.5	Análisis económico. ....	42
7	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	44
7.1	Conclusiones. ....	44
7.2	Recomendaciones. ....	45
	<b>Bibliografía</b> .....	46
	<b>ANEXOS</b> .....	50



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tratamientos utilizados para la germinación <i>in vitro</i> de embriones de <i>Ceroxylon vogelianum</i> .....	31
Tabla 2: Número de embriones por tratamiento.....	34
Tabla 3: Viabilidad de la semilla.....	36
Tabla 4: Embriones germinados <i>in vitro</i> de <i>Ceroxylon vogelianum</i> a 133 días.....	37
Tabla 5: Costo unitario para la obtención de plántulas de <i>Ceroxylon vogelianum in vitro</i> . ....	43



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1: Ubicación a nivel provincia y parroquial del área de estudio. ...</b>	<b>29</b>
<b>Figura 2: Días a germinación de embriones de <i>Ceroxylon vogelianum</i>....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 3: Número de hojas. ....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 4: Altura de las plantas. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 5: Peso fresco del tallo. ....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 6: Peso seco del tallo. ....</b>	<b>42</b>



## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>Imagen 1. Embrión hidratado de <i>Ceroxylon vogelianum</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>Imagen 2. Presencia de color verde en la plúmula del embrión .....</b>	<b>33</b>
<b><i>Imagen 3. Desarrollo inicial de las primeras hojas Ceroxylon vogelianum. ....</i></b>	<b>33</b>



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1. Recolección de la semilla en Huertas- Shaglli- Santa Isabel.....</b>	<b>50</b>
<b>Anexo 2. Prueba de tetrazolium.....</b>	<b>50</b>
<b>Anexo 3. Composición y preparación del medio murashige y skoog (MS). .....</b>	<b>51</b>
<b>Anexo 4. Siembra de embriones en laboratorio de biotecnología.....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo 5. Planta obtenida con medio MS, enriquecido con AG<sub>3</sub>+ BAP.....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo 6. Planta obtenida con medio MS enriquecido con AG<sub>3</sub> .....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo 7. Planta obtenida con medio MS.....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo 8. Planta obtenida con medio MS enriquecido con Agua de coco. 54</b>	
<b>Anexo 9. Peso de plántula para determinar la biomasa fresca. ....</b>	<b>54</b>
<b>Anexo 10. Tabla de operacionalización de variables.....</b>	<b>55</b>
<b>Anexo 11. Datos generales de los tratamientos. ....</b>	<b>56</b>



Yo, María Jose Berrezueta Berrezueta autora de la tesis “Evaluación de medios de cultivo para la germinación *in vitro* de embriones de *Ceroxylon* sp. (Palma de cera)”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, Diciembre del 2015

A handwritten signature in blue ink, consisting of several large, overlapping loops.

María José Berrezueta Berrezueta  
C.I: 0105930598



Yo, María José Berrezueta Berrezueta autora de la tesis “Evaluación de medios de cultivo para la germinación *in vitro* de embriones de *Ceroxylon* sp. (Palma de cera)”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniera Agrónoma. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, Diciembre del 2015.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several large, stylized loops and curves.

María José Berrezueta Berrezueta  
C.I: 0105930598



**CERTIFICADO**

El tribunal de tesis de grado, certifica que fue aprobada la presente investigación titulada "Evaluación de medios de cultivo para la germinación *in vitro* de embriones de *Ceroxylon* sp. (Palma de cera)", realizado por la egresada María José Berrezueta Berrezueta.

Ing. Ángel Oswaldo Jadán Maza M. Sc  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

Ing. Eduardo José Chica Martínez Ph.D.  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Ing. Luis Andrés Yarzabal Rodríguez Ph.D.  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



**CERTIFICADO**

Yo Blga. Denisse Peña, certifico que la presente investigación titulada "Evaluación de medios de cultivo para la germinación *in vitro* de embriones de *Ceroxylon* sp. (Palma de cera)", realizado por la egresada María José Berrezueta Berrezueta, ha sido elaborada correctamente.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several fluid, overlapping strokes.

**Blga. Denisse Peña  
DIRECTORA DE TESIS**



**CERTIFICADO**

Yo Ing. Eduardo Chica certifico que la presente investigación titulada "Evaluación de medios de cultivo para la germinación *in vitro* de embriones de *Ceroxylon* sp. (Palma de cera)", realizado por la egresada María José Berrezueta Berrezueta, ha sido elaborada correctamente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Eduardo José Chica Martínez".

Ing. Eduardo José Chica Martínez Ph.D.  
**CO DIRECTOR DE TESIS**



**CERTIFICADO**

El delegado del Departamento de Estadística de la Facultad de Ciencias Agropecuarias certifica que, el análisis estadístico de la tesis, titulada: "Evaluación de medios de cultivo para la germinación *in vitro* de embriones de *Ceroxylon* sp. (Palma de cera)", ha sido correctamente elaborado por la señorita María José Berrezueta Berrezueta.

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a large, loopy oval. The signature appears to be 'Eco. Carlos Torres'.

Eco. Carlos Torres  
**DELEGADO DEL DEPARTAMENTO DE ESTADÍSTICA**



***Dedicatoria***

*A mis padres José y Rosario, que han sido instrumento de fortaleza y sabiduría para seguir en cada paso que doy en mi vida.*

*María José*



## **Agradecimientos**

*A mis padres, quienes han sido un apoyo fundamental en mi carrera.*

*Mis gratos agradecimientos a la Universidad de Cuenca por recibirme durante todos estos años de aprendizaje.*

*A mi directora de tesis Blga. Denisse Peña, por dedicar su tiempo y contribuir con sus conocimientos durante el desarrollo de este trabajo.*

*A mi codirector de tesis Dr. Eduardo Chica, por dedicar su tiempo, brindar sus conocimientos y sobre todo por su apoyo y consejos.*

*A Blga. Jazmin Salazar, por brindarme su apoyo y tiempo en la elaboración de este trabajo.*

*A los Ingenieros, Oswaldo Jadán y Andrés Yarzábal, quienes dedicaron su tiempo y conocimientos durante la elaboración de este trabajo*

*A los docentes de la Universidad de Cuenca por trabajar constantemente para formar profesionales capacitados y con valores.*

*A, Freddy, Adrián, Elizabeth, Jaqueline, Fernanda, Gabriela, Erika y Michael, mis hermanos y hermanas por todo su apoyo, paciencia y cariño.*

*A Galo Cordero un gran amigo y confidente, por todo su apoyo durante mi vida universitaria.*

*A mis amigos, compañeros quienes estuvieron presentes durante todo este tiempo de vida universitaria.*

*María José*



## 1. INTRODUCCIÓN.

Los bosques andinos poseen una alta diversidad florística (Bussmann R. , 2004). En estos ecosistemas existen árboles, arbustos, palmas, hierbas, helechos etc. (Bussmann R. , 2006). Lamentablemente esta alta diversidad se ve amenazada por un problema evidente que es la deforestación (Myers *et al.*, 2000). Anualmente por deforestación y cambio de uso del suelo y otras actividades humanas se pierden aproximadamente 20 mil has de bosque andino (Galeas, 2010). Una de las consecuencia de este fenómeno es la perdida de hábitat natural para muchas especies y por ende su capacidad de regenerarse naturalmente en especial especies de sucesión avanzada como la palma de cera (*Ceroxylon sp*) (Anthelme *et al.*, 2011).

La palma de cera, está distribuida desde el sur de Bolivia hasta el occidente de Venezuela (Pintaud *et al.*, 2008). En Ecuador la encontramos en zonas de bosque nublado en la sierra y el oriente ecuatoriano (Pichincha Universal, 2013).

Esta especie ha sido utilizada para la elaboración de artesanías religiosas asociadas a la festividad de Semana Santa (Borchsenius & Morales, 2006; Araujo-Murakami & Zenteno Ruiz, 2006; Paniagua *et al.*, 2014). Este uso ha causado la reducción de las poblaciones silvestres de palma de cera en Ecuador debido a su aprovechamiento no sostenible (Borchsenius & Moraes, 2006). Actualmente tres de las seis especies de palma de cera en Ecuador se encuentran en estado de conservación amenazado o vulnerable (Valencia *et al.*, 2011).

Actualmente, la palma se encuentra entre las especies de uso restringido por el Ministerio de Ambiente del Ecuador (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2012), debido a su baja capacidad y lento proceso de germinación (Sanchez-Olate *et al.*, 2004).

Para mejorar la sostenibilidad de palma de cera y su aprovechamiento tradicional es importante emprender investigaciones que ayuden a la reducción del tiempo e incremento de la tasa de germinación para apoyar programas de reintroducción



o enriquecimiento de poblaciones silvestres a través del desarrollo de plantaciones en zonas donde su uso se ha vinculado con prácticas tradicionales que se mantienen aún vigentes.



## 2. JUSTIFICACIÓN.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales tiene una aplicación en la clonación, conservación y manipulación de material vegetal (Pérez *et al.*, 1999). El cultivo de embriones particularmente puede ayudar a la producción de plantas que tienen un periodo de latencia prolongado o una baja viabilidad de las semillas (George & Hall, 2008). Con esta técnica se ha logrado eliminar la dificultad que presentan algunas especies de propagarse por métodos tradicionales (Marinucci, Ruscitti, & Abedeni, 2004).

Especies de la familia Arecaceae y particularmente del género *Ceroxylon*, presentan muy baja y lenta tasa de germinación (Orozco-Segovia *et al.*, 2003). La técnica de cultivo de embriones ha sido utilizada con éxito para reducir el tiempo e incrementar la tasa de germinación de al menos 17 especies de palmas (Broschat & Elliott, 2014).

De forma general, las especies del género *Ceroxylon*, son principalmente usadas para actividades ceremoniales durante la procesión católica de Domingo de Ramos (Borchsenius & Morales, 2006; Araujo-Murakami & Zenteno Ruiz, 2006; Paniagua *et al.*, 2014). El mal manejo en la extracción de sus hojas junto con la fragmentación de hábitat por deforestación y conversión de tierras la han llevado a una situación de mayor atención (Borchsenius & Morales, 2006), según las experiencias de los pobladores en la localidad de Shaglli, provincia del Azuay, de miles de semillas sembradas, en dos años no se ha conseguido ni el 10% de germinación en vivero (M.Cabrera, com. pers. 2015). Con éstos antecedentes y considerando la lenta regeneración que naturalmente tienen las palmas (Orozco-Segovia *et al.*, 2003) vemos en el rescate de embriones una herramienta que ofrece la posibilidad de mejorar, en condiciones *in vitro*, tanto el tiempo como el porcentaje de germinación.

La aplicación de una tecnología de germinación mejorada se enfoca principalmente en programas de reintroducción y enriquecimiento de poblaciones silvestres con fines de conservación (Ministerio del Ambiente, 2015) También es de importancia para mejorar la sostenibilidad del aprovechamiento



tradicional de esta palma a través del desarrollo de plantaciones de la especie en zonas donde su uso ha estado vinculado con prácticas rituales tradicionales que se mantienen vigentes en la actualidad.

La parroquia de Shaglli (Santa Isabel, Azuay) actualmente está vinculada a un programa de producción de plantas de palma de cera (*Ceroxylon* sp) en coordinación con autoridades provinciales; sin embargo la falta de información sobre el proceso de germinación y las experiencias negativas, los ha llevado a una actividad de extracción de plántulas en campo, resultando ésta práctica aún más perjudicial para la especie en esta zona.

Con estos antecedentes y a fin de brindar alternativas a la comunidad y apoyar los esfuerzos de conservación de la palma de cera, se ha planteado esta investigación en la que proponemos la evaluación de diferentes medios de cultivo para la germinación *in vitro* de embriones de *Ceroxylon* sp. y la identificación botánica de la especie presente en dicha localidad a fin aportar con información que permita conocer más sobre su distribución, con ello su grado de conservación y posibles estrategias de manejo.



### 3. OBJETIVOS.

#### 3.1 Objetivo general:

- Evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo en la germinación *in vitro* de embriones de *Ceroxylon* sp. (Palma de cera) y el desarrollo inicial de la planta.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Identificar taxonómicamente la especie de *Ceroxylon* que se utilizará en el estudio.
- Determinar porcentaje, tiempo de germinación y biomasa de los embriones de *Ceroxylon* sp. cultivados *in vitro* y de semillas germinadas en sustrato.
- Estimar los costos de producción de plántulas de *Ceroxylon* sp. producidas a partir de embriones cultivados *in vitro*.

#### 3.3 Hipótesis.

La técnica de cultivo *in vitro* de embriones de *Ceroxylon* sp., incrementa el porcentaje de germinación y la biomasa además de reducir tiempo y costos de producción en comparación con el sistema de siembra convencional.



## 4. REVISIÓN DE LITERATURA.

### 4.1 Palma de Cera (*Ceroxylon* sp)

#### 4.1.1 Clasificación botánica y ecología

El género *Ceroxylon* pertenecientes a la división Magnoliophyta, clase Liliopsida, familia botánica Arecaceae. Son conocidas vernáculamente como palmas. Las palmas de *Ceroxylon* se encuentran entre los arboles más grandes del mundo poseen tallos que pueden medir hasta 60 m de altura (Borchsenius & Morales, 2006). Estas especies son de crecimiento lento hasta formar la base del tallo y medianamente lentas durante su desarrollo (Pichincha Universal, 2013).

A este género, endémico de las montañas andinas y que incluye 11 especies distribuidas en un rango altitudinal de 600 a 3500m de altitud (Borchsenius & Morales, 2006; Sanin & Galeano, 2011), lo podemos encontrar en las zonas de bosque nublado en la sierra y el oriente ecuatoriano (Pichincha Universal, 2013) como árboles dominantes del dosel en estrechos rangos geográficos en donde sus poblaciones son sometidas a un alto grado de fragmentación principalmente debido a actividades antrópicas (Borchsenius & Morales, 2006).

La palma de cera es el hábitat de aves como el loro orejiamarillo y el perico cachetidorado los cuales se encuentran en peligro de extinción (Salaman, Quevedo, & Verhelst, 2006). Así también atraen una gran diversidad de polinizadores, principalmente coleópteros, proveen de alimentos para algunos mamíferos y aves, los cuales a su vez favorecen a la dispersión de semillas (Borchsenius *et al.*, 1998; Van den Eynynden *et al.*, 2004).

#### 4.1.2 Morfología y taxonomía

La palma de cera, es una planta dioica que posee un tallo solitario, se encuentra cubierto por una capa de cera. Presenta cicatrices foliares que forman anillos de color oscuro (marrón o negro) (Galeano *et al.*, 2008). Las cicatrices muestran las inserciones antiguas de las hojas lo que nos permite tener un estimado de la edad basando en la tasa de crecimiento foliar (Espinoza, 2010).



El género *Ceroxylon* (Arecaceae) está compuesto por cerca de 12 especies nativas de los Andes de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia que crecen entre los 600 y 3500 m.s.n.m (Sanin & Galeano, 2011; Borchsenius & Morales, 2006). En el Ecuador se han reportado 6 especies de *Ceroxylon*, de las cuales dos especies (*C. amazonicum* y *C. parvum*) son endémicas, otras dos son andinas (*C. parvifrons* y *C. vogelianum*) (Paniagua-Zambrana, 2005), y dos especies más (*C. echinulatum* y *C. ventricosum*) son subendémicas de Perú y Colombia respectivamente (Montúfar, 2010). De estas especies, *C. echinulatum* y *C. ventricosum* se encuentran en estado de conservación vulnerable, mientras que *C. amazonicum* se encuentra amenazada (Valencia *et al.*, 2011).

Luego de la identificación botánica de una muestra citamos la morfología de nuestra especie de estudio como es *Ceroxylon vogelianum*.

*C. vogelianum* posee un tallo de color verde oscuro, con una capa de cera muy tenue, puede llegar a medir hasta 13 m alto con un diámetro de 12-20 cm, presentan cicatrices de las hojas oblicuas y notorias sus hojas son pinnadas, dispuestas en grupos densos de 2-7, e insertas en ángulos fuertemente divergentes, formando una corona casi esférica, pueden medir de 1-3 m de largo cada hoja puede tener entre 70-110 pinnas a cada lado (Paniagua *et al.*, 2014)

La inflorescencia en racimos de 2-3 m de largo, los frutos son esféricos de color rojo anaranjado de 1.6-2 cm de diámetro (Paniagua *et al.*, 2014).

#### 4.1.2 Problemas de conservación y propagación.

Las principales amenazas para la conservación de género *Ceroxylon*, incluida la especie *C. vogelianum* son la pérdida de su hábitat por la tala de bosques, su baja capacidad de regeneración y la extracción de sus hojas para la elaboración artesanal de ramos durante la festividad católica de Semana Santa (Galeano & Bernal, 2004; Araujo-Murakami & Zenteno Ruiz, 2006).

Por otra parte, las Arecaceas contienen embriones pequeños en relación al tamaño de sus semillas y una cantidad grande de endospermo; en muchos



casos, sus componentes no son completamente desarrollados al momento de la diseminación provocando una baja germinación (Orozco-Segovia *et al.*, 2003). En general los mecanismos de germinación de la semilla y el letargo son procesos pobremente entendidos para la mayoría de Arecaceas; la baja y errática germinación de sus semillas, puede tomar más de un año (Orozco-Segovia *et al.*, 2003) dificultándose con esto el éxito de programas de reintroducción.

Las palmas tienen en general un crecimiento lento y muchas de las especies pueden tardar más de 25 años en alcanzar la edad reproductiva; además, las especies dioicas necesitan de un mayor número de plantas adultas para mantener estable su población (Galeano & Bernal, 2004).

## **4.2 Métodos alternativos de propagación**

### **4.2.1 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales**

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es una herramienta biotecnológica que puede ser empleada, entre otras cosas, para apoyar la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción. Esta herramienta permite, obtener grandes cantidades de individuos en menor tiempo comparado con los procesos naturales sin perder las características genéticas y morfológicas de la planta donante (Agvik, 2011).

El establecimiento de los cultivos *in vitro* dependerá del objetivo del trabajo y con ello se considerará el tipo de explante, el sistema de cultivo y las condiciones de incubación (Agvik, 2011; Roca & Mroginski, 1991). El cultivo *in vitro* comprende varias técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de la planta) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones controladas de luminosidad, humedad y temperatura (Ordoñez, 2003).

Para establecer el cultivo de células, tejidos u órganos *in vitro* hay una serie de principios básicos que se deben considerar. Es necesario seleccionar y separar



el material que se desea cultivar. Posteriormente se deben eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal. Por último se debe proporcionar al explante un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuadas. (Ordoñez, 2003)

Tanto la asepsia como la inoculación del material vegetal se llevan a cabo en un ambiente estéril. Las principales variables que determinan el éxito de la propagación las características del explante son la asepsia durante el proceso, las características del medio de cultivo y las condiciones ambientales de incubación (Ordoñez, 2003).

#### **4.2.2 Cultivo de embriones**

El cultivo de embriones implica el aislamiento, germinación y crecimiento *in vitro*, en condiciones estériles, con el fin de obtener una planta viable, presentando ventajas como reducción del tiempo de germinación, prevención de aborto embrionario, superación de la incompatibilidad, producción de haploides, entre otros; además, esta técnica es útil para inducir la germinación de semillas maduras en letargo, superando las restricciones ocasionadas por la cubierta de la semilla o del endospermo (Sanchez-Olate *et al.*, 2004)

El estado de desarrollo en que se encuentren los embriones es de vital importancia, ya que determina los requerimientos necesarios del medio de cultivo a utilizar. Así, el cultivo de embriones inmaduros normalmente da paso a un proceso de embriogénesis somática continua, en vez de una germinación precoz; en cambio, los embriones maduros son más competentes para dar origen a procesos organogénicos (Sanchez-Olate *et al.*, 2004)

En Arecaceas, el cultivo de embriones *in vitro* usando medios de cultivo relativamente simples ha permitido aumentar la germinación y reducir el tiempo de propagación notablemente en al menos 17 de las 38 especies de palmas evaluadas por Zaid & Tisserat (citado por Broschat & Elliott, 2014).



Mohan, (2015) reporta éxito en la regeneración de palma datilera mediante rescate de embriones. Sin embargo no se han registrado trabajos sobre este tema en *Ceroxylon vogeliamun*, especie de interés para nuestro estudio.

#### 4.2.3 Efectos de los reguladores de crecimiento en sistemas de propagación *in vitro*

Las hormonas vegetales son productos químicos que tienen un papel regulador en el crecimiento, éstas se encuentran naturalmente en las plantas, también puede ser producidas de forma sintética. Cuando se añaden generalmente en concentraciones muy bajas a un medio de cultivo se denominan reguladores de crecimiento vegetal, para indicar que se han aplicado desde el exterior (George & Hall, 2008)

Entre las hormonas, las citoquininas son muy eficaces en la promoción de la iniciación de brotes; generalmente se usan combinadas con auxinas para inducir organogénesis. Las citoquininas sintéticas más usadas en micropropagación son kinetina y bencilaminopurina (George & Hall, 2008)

En las especies de la familia Arecaceae, como en otras especies, el aspecto más importante para combatir la recalcitrancia durante el cultivo *in vitro* es la selección adecuada de los reguladores de crecimiento incorporados en el medio de cultivo (Viñas & Jiménez, 2011).

Thin Lan (1999) reporta que adicionando solamente benzilaminopurina (BAP) al medio se inhibió por completo el desarrollo de los embriones de *Phoenix canariensis*, en contradicción a lo observado por Yussita (2011) quien utiliza BAP para la germinación de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq) logrando un buen desarrollo de los embriones.

Perera et al., (2009) utilizaron 5  $\mu$ M BAP y 5  $\mu$ M 6- $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilaminopurina (2ip), en el medio de cultivo, logrando aproximadamente un 85% de conversión en embriones de *Cocos nucifera*, además la inclusión de 0,45  $\mu$ M ácido giberélico



(AG<sub>3</sub>) al medio de cultivo fomentó la maduración de éstos embriones, mientras que la adición de ácido abscísico (ABA) no favoreció la maduración.

Por otra parte Montero-Córtes *et al.*, (2010), observaron también efectos positivos del ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) en la formación y germinación de embriones somáticos en esta misma especie. Las giberelinas (AG<sub>3</sub>) también son hormonas vegetales y pese a que existen más de 100 miembros en éste grupo, muy pocas están disponibles comercialmente, siendo AG<sub>3</sub> una de las más utilizadas en cultivo de tejidos vegetales; están involucradas en la elongación de los tallos y hojas de hierba, en la inducción de enzimas que facilitan la movilización del endospermo y en algunas plantas promueven la germinación de las semillas (George & Hall, 2008).

#### 4.3.2.1 Suplementos Orgánicos

El agua de coco es un suplemento indefinido cuya composición puede variar considerablemente (George & Hall, 2008). Sin embargo, añadida al medio de cultivo puede inducir división celular y crecimiento en las células de las plantas, o una forma sencilla de obtener crecimiento y morfogénesis (George & Hall, 2008). Van Overbeek *et al.* (1941, 1942), utilizaron por primera vez el agua de coco en cultivo de tejidos, encontrando que su adición era necesaria para el desarrollo de embriones muy pequeños de *Datura stramonium*.

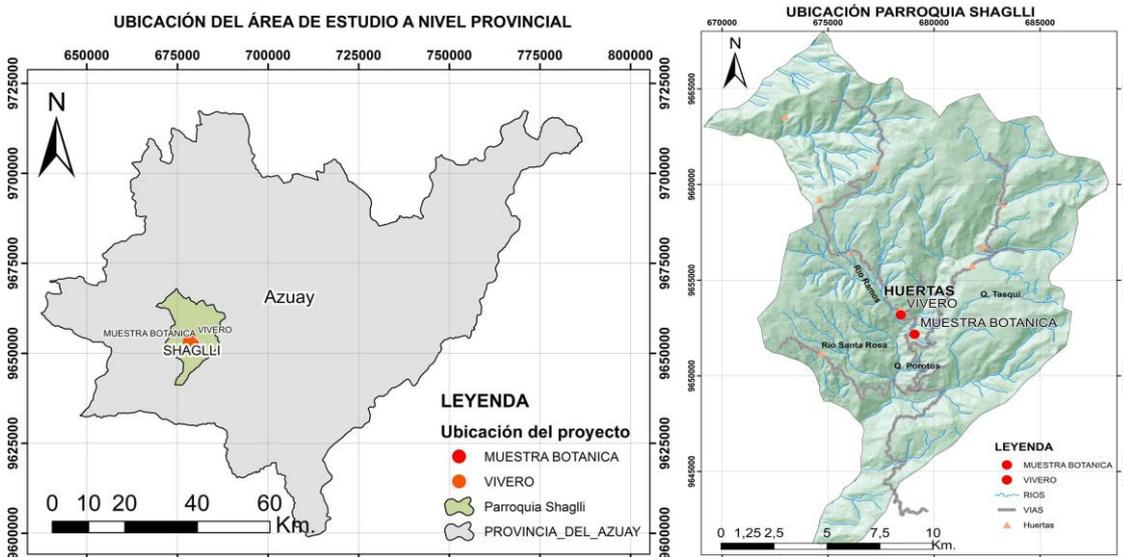
El agua de coco contiene hormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, entre otras, siendo éstas componentes importantes en el cultivo de tejidos (Young *et al.*, 2009). El enriquecimiento del medio de cultivo con agua de coco, ha demostrado la estimulación del crecimiento del callo y regeneración de brotes en *Spinacia oleracea* (espinaca) (Al-Khayri *et al.*, 1992), en *Theobroma cacao* (cacao) se reportó un efecto estimulante en la germinación de embriones somáticos (Pence, Hasagawa, & Janick, 1980). También Abbas *et al.*, (2011) y Nongrum *et al.*, (2007) reportaron un efecto positivo en la germinación y formación de plántulas de orquideas *Coelogyne ovalis* y *Grammatophyllum scriptum* al adicionar agua de coco al medio de cultivo.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Área de estudio.

El área de estudio está ubicado en la comunidad de Huertas en la parroquia Shaglli, cantón Santa Isabel, Provincia del Azuay.

Huertas se encuentra en la zona Sur Oriental de la parroquia en las siguientes coordenadas UTM: 678329 N 9653232E. Datum WGS84 a una altitud de 2900 msnm, se localiza en el piso altitudinal montano con temperaturas entre 10 y 12° C, con una precipitación anual de 750- 1000 mm (GAD parroquial Shaglli, 2012).



**Figura 1:** Ubicación a nivel provincia y parroquial del área de estudio.

**Elaborado por:** Berrezueta, M.J – Universidad de Cuenca 2015

**Fuente:** IGM



## **5.2 Área de ejecución del proyecto.**

El experimento se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, durante los meses de febrero a agosto del 2015.

## **5.3 Recolección de la semilla.**

Las semillas fueron recolectadas del vivero comunitario del área de estudio. Es importante mencionar que estas semillas se encontraban por alrededor de dos años sin germinar según el señor Manuel Cabrera Cedillo encargado del vivero. Posteriormente, las semillas se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca, donde se almacenaron a temperatura ambiente para la ejecución del proyecto.

## **5.4 Recolección de la muestra botánica.**

La muestra botánica se tomó de ejemplares silvestres de la comunidad de huertas y constó de una hoja, frutos verdes. Posteriormente estas muestras se enviaron al herbario botánico de la Universidad Nacional de Loja, para su identificación.

## **5.5 Prueba de viabilidad de la semilla.**

Del total de semillas dispuestas para la extracción de embriones, se escogieron 50 semillas para la prueba de viabilidad con sales de tetrazolio a una concentración del 1%, incubadas en estufa a 46°C durante 12 horas.

## **5.6 Cultivo de embriones**

El cultivo de los embriones se realizó en las siguientes fases:

- a) **Tratamientos.-** Se prepararon cuatro medios de cultivo en el laboratorio más un sustrato para el testigo (tabla 1):



**Tabla 1:** Tratamientos utilizados para la germinación *in vitro* de embriones de *Ceroxylon vogelianum*.

Tratamientos.	Descripción. Concentración / litro
A Murashige-Skoog (MS)	MS (Olivo & Vielma, 2010)
B. MS + agua de coco (AC)	MS + 25 % agua de coco
C. MS + ácido giberélico (AG <sub>3</sub> )	MS + 0,2 mg GA <sub>3</sub> (Olivo & Vielma, 2010)
D. MS + AG <sub>3</sub> + bencilaminopurina (BAP)	MS + 0,2 mg GA <sub>3</sub> + 2mg de BAP (Olivo & Vielma, 2010)
E. Control Semillas de Ceroxylon sp.	Sembradas en sustrato (bocashi) de acuerdo a la práctica tradicional de viveristas (Quezada, 2014, versión verbal)

**Elaborado por:** Berrezueta, M.J – Universidad de Cuenca 2015

Para la germinación de *Ceroxylon vogelianum* se utilizaron 4 tratamientos más un control; en cada unidad experimental se aplicaron 5 ml de cada solución, y para el control se utilizó sustrato.

b) **Desinfección.**- La desinfección de las semillas se llevó a cabo en condiciones de asepsia dentro de la cabina de flujo laminar, para evitar proliferaciones de hongos y bacterias en la etapa de introducción. Constó de los siguientes pasos:

- Lavado con agua y jabón (3 veces)
- Inmersión en etanol al 96% durante un minuto,
- Esterilización con hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% durante 20 minutos.
- Enjuagues sucesivos con agua esterilizada, para eliminar el exceso de las soluciones anteriores.



- c) **Extracción de embriones.**- La extracción de los embriones se realizó bajo condiciones asépticas, en la cabina de flujo laminar. Para ello, las semillas desinfectadas fueron partidas por la mitad y luego se separaron los embriones del endospermo con la ayuda de un bisturí sin dañarlos.
- d) **Introducción de embriones.**- En esta fase los embriones son sembrados en tubos de ensayo con el medio estéril para cada tratamiento y luego fueron incubados a 20°C en un cuarto de crecimiento bajo un fotoperiodo de 16h luz / 8 h oscuridad por 133 días.
- e) **Etiquetado.** El etiquetado consta de:
- Nombre de la especie de estudio.
  - Nombre del medio de cultivo.
  - Fecha de siembra.
- f) **Siembra de semillas.**- Las semillas fueron sembradas en un recipiente de plástico que contenía bocashi y permanecieron los 133 días en el invernadero de la Facultad.
- g) **Repique.**- Se realizó un repique de los embriones a los 33 días posteriores a la siembra, en tubos de ensayo con el medio de cultivo respectivo para cada tratamiento.

### **5.7 Análisis de germinación de embriones**

Se consideraron 3 niveles de evaluación de la germinación.

- **Nivel 1: embrión hidratado.**- aumento de tamaño del embrión (Pérez F. , s.f.) ver imagen (1).



**Imagen 1.** Embrión hidratado de *Ceroxylon vogelianum*

Fuente: Chica. E, 2015

- **Nivel 2: brote de primer estadio.**- Es el ensanchamiento del embrión y aparición de color verde en la plúmula (Gómez , 2006) ver imagen (2)



**Imagen 2.** Presencia de color verde en la plúmula del embrión

Fuente: Chica. E, 2015.

- **Nivel 3: desarrollo de la plúmula.**- Es el rudimento inicial de las hojas verdaderas de la palma (Gómez , 2006) como se observa en la siguiente imagen.



**Imagen 3.** Desarrollo inicial de las primeras hojas *Ceroxylon vogelianum*.

Fuente: Chica. E, 2015



## 5.8 Análisis de biomasa

Para determinar la biomasa se tomó en cuenta el número de hojas, raíces y la altura de las plantas. El número de embriones utilizados para el análisis se detalla en la siguiente tabla.

**Tabla 2:** Número de embriones por tratamiento.

Tratamiento	Embriones germinados
Murashige-Skoog	3
Agua de Coco	3
AG <sub>3</sub>	7
AG <sub>3</sub> +BAP	6
Control	0

**Elaborado por:** Berrezueta, M.J – Universidad de Cuenca 2015

## 5.9 Análisis de biomasa fresca y seca.

Este proceso se llevó acabo a los 133 días posteriores a su siembra:

- a) **Biomasa fresca.**- Para determinar la biomasa fresca se realizó lo siguiente:
  - Extracción de las plántulas del medio con una pinza.
  - Las muestras de pesaron en una balanza gramera.
- b) **Biomasa seca.**- Para determinar la biomasa seca se realizó los siguientes pasos:
  - La biomasa fresca se colocó en una estufa a 80° C durante 24 horas.
  - Las muestras de pesaron en una balanza gramera.

## 5.10 Diseño experimental y análisis estadístico.

En el experimento se utilizó un diseño completo al azar (DCA) con 5 tratamientos y 50 repeticiones.



Las variables evaluadas al cabo de 133 días fueron: número de hojas, número de raíces y altura de planta. Adicionalmente se determinó la biomasa fresca y seca de todos los tratamientos y el número de días en que inicia la germinación.

Los datos fueron analizados usando el programa estadístico R; no obstante el set de datos para algunas variables no cumplieron con las condiciones de normalidad de residuos o heterocedasticidad, por lo que no se pudo correr el ANOVA, excepto para la variable días a la germinación ( $p < 0,05$ ).

### **5.11 Análisis económico**

El análisis económico se lo realizó en base a los costos variables en la producción de plántulas *in vitro*, considerando los gastos de, medios de cultivo (MS, Agar, Sucrosa, AG<sub>3</sub>, BAP, Agua de coco), mano de obra y servicios básicos.



## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Identificación taxonómica de la palma de cera

La palma de cera, utilizada en nuestra investigación presentó las siguientes características morfológicas y anatómicas que nos permitió identificar la especie de estudio: las hojas pinnadas están dispuestas en grupos de 2-7, e insertas en ángulos formando una corona casi esférica, el tamaño de la vaina es de alrededor de 55 cm, el peciolo oscila entre los 28 cm, cada hoja contiene de 56 a 110 pinnas por lado, las pinnas basales alcanzan 42 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro y las pinnas apicales entre 40 cm de largo y 2.5 cm de diámetro. La inflorescencia se presenta en racimos de 2 a 3 m de largo, los frutos son esféricos de color rojo anaranjado de 1,2 a 2 cm de diámetro, cada fruto posee una semilla (Paniagua, *et. al.* 2014; Tropicos.org, 2015)

Mediante estas características se determinó que los individuos en estudio pertenece a la especie *Ceroxylon vogelianum* (Bolívar Merino y Celso Yaguana de la- Universidad Nacional de Loja).

### 6.2 Viabilidad de la semilla.

Para determinar la viabilidad de las semillas se escogieron 50 semillas al azar (Tabla 3)

**Tabla 3:** Viabilidad de la semilla

Numero de semilla	Semillas viables	Semillas no viables	Porcentaje (%)
50 semillas	31	19	60 %

**Elaborado por:** Berrezueta, M.J – Universidad de Cuenca 2015

Realizado la prueba sal de tetrazolium en las semillas de *Ceroxylon vogelianum*, se estableció el 60% de viabilidad.



### 6.3 Germinación

Para determinar la germinación de *Ceroxylon vogelianum* se emplearon distintos medios de cultivo como se puede apreciar en la siguiente tabla:

**Tabla 4:** Embriones germinados *in vitro* de *Ceroxylon vogelianum* a 133 días.

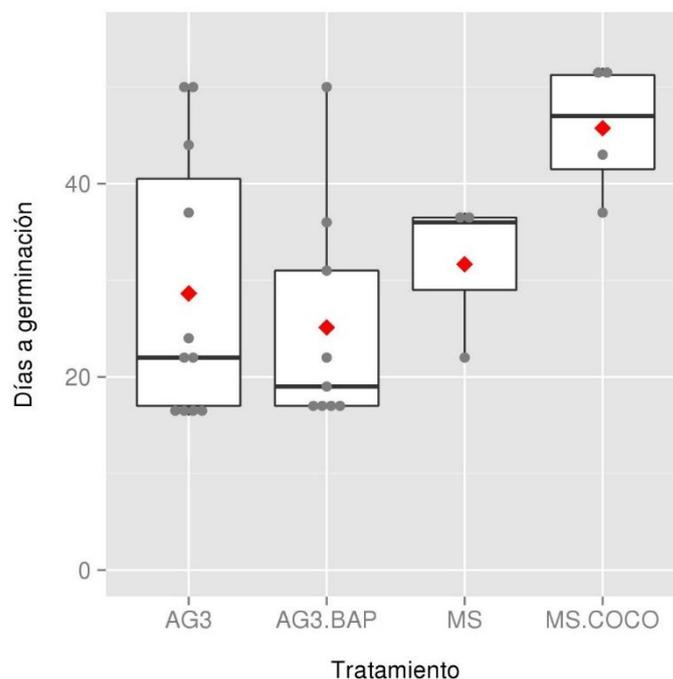
Tratamiento	Embriones germinados	% Germinación	Embriones que sobrevivieron hasta los 133 días
Murashige-Skoog	3	6%	3
Agua de Coco	4	8%	3
AG <sub>3</sub>	11	22%	7
AG <sub>3</sub> +BAP	9	18%	6
Control	0	0%	0
Vivero Shaglli	2	4%	2

**Elaborado por:** Berrezueta, M.J – Universidad de Cuenca 2015

A partir de los resultados obtenidos: el mejor tratamiento es AG<sub>3</sub> con 22% de germinación; seguido por el tratamiento AG<sub>3</sub>+ BAP con 18%, y Agua de Coco y MS alcanzan un 8% y 6% respectivamente, en el control no existió germinación. Según los registros obtenidos en el vivero Shaglli se observó un 4% de germinación en sustrato tipo bocashi.

#### 6.3.1 Días a germinación.

Se consideraron los registros desde la siembra del embrión hasta el desarrollo inicial de las primeras hojas.



**Figura 2:** Días a germinación de embriones de *Ceroxylon vogelianum*. (El diamante rojo representa la media).

**Elaborado por:** Berrezueta, M.J – Universidad de Cuenca 2015

Como se indica en la Figura 2, los embriones germinaron en los tratamientos AG<sub>3</sub> y AG<sub>3</sub>+BAP a partir de los 18 hasta los 50 días, en el tratamiento MS la germinación fue entre 22 a 38 días y en el tratamiento Agua de Coco de 38 a 50 días. Los datos obtenidos revelan que se obtiene una germinación más homogénea en el tratamiento MS al germinar en un rango menor de días; no obstante el número de embriones germinados fue notablemente menor al tratamiento con AG<sub>3</sub>.

El Análisis de Variancia (ANOVA) no mostró diferencias significativas entre tratamientos al evaluar el tiempo de germinación ( $p < 0.05$ ). Sin embargo el mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el tratamiento AG<sub>3</sub> con un 22%, seguido del tratamiento AG<sub>3</sub> + BAP con el 18% en comparación con los tratamientos MS y Agua de Coco en donde la germinación fue inferior al 10%.



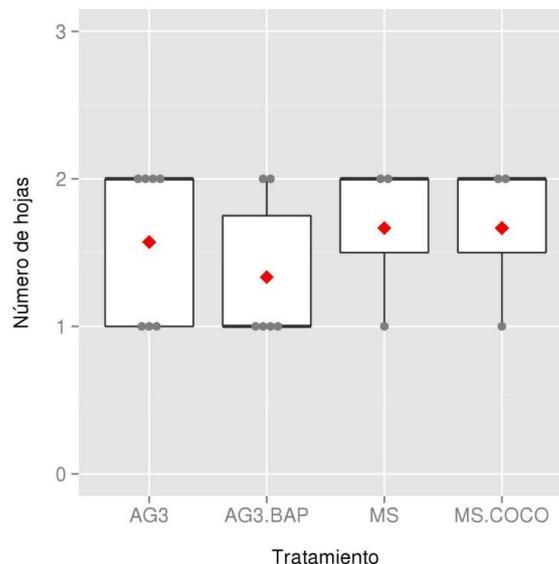
En nuestros resultados la adición de AG<sub>3</sub> al medio de cultivo fomentó la germinación de embriones, encontrándose un efecto similar al reportado por Perera *et al.*, (2009) y Montero-Córtes *et al.*, (2010), quienes al adicionar 0,45 µM AG<sub>3</sub> lograron promover la formación, maduración y germinación de embriones somáticos de coco.

En el caso de la hormona BAP nuestros resultados no indican un efecto favorable de su adición en combinación con AG<sub>3</sub>, ni inhibitorio como reporta Thin Lan, (1999) en su estudio, donde la presencia de BAP en el medio de cultivo inhibió por completo el desarrollo de los embriones. Sin embargo, Yussita, (2011) al utilizar BAP en palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq) logró un buen desarrollo de los embriones.

## 6.4 Biomasa

### 6.4.1 Número de hojas

El número de hojas de las plantas obtenidas durante los 133 días, varió entre 1 a 2 hojas en todos los tratamientos, lo cual no permitió determinar el mejor medio de cultivo para el desarrollo foliar.



**Figura 3:** Número de hojas.  
(El diamante rojo representa la media).

Elaborado por: Berrezueta, M.J – Universidad de Cuenca 2015



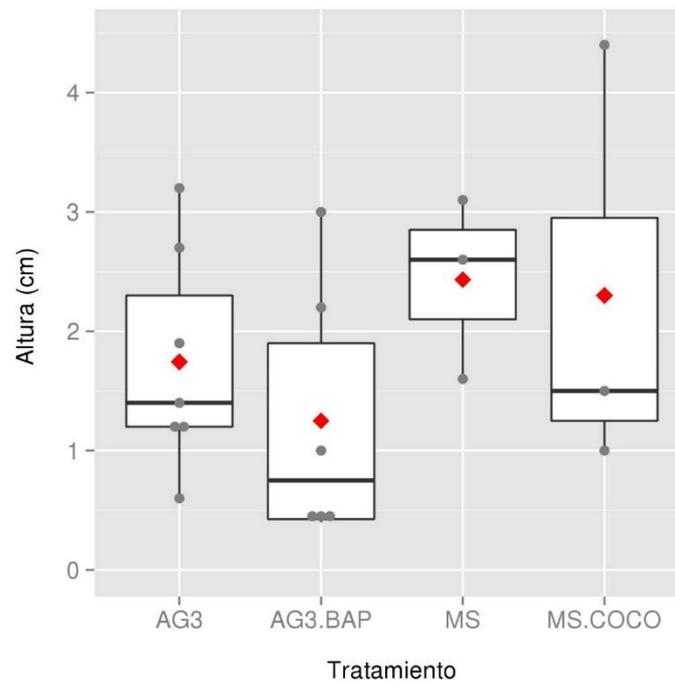
Como se observa en la figura 3 en el tratamiento con AG<sub>3</sub> 4 de 7 plantas presentan dos hojas, en el medio con AG<sub>3</sub>+BAP 2 de 6 plantas desarrollaron 2 hojas y en los medios con MS y agua de coco en 2 de 3 plantas se observó la formación de 2 hojas.

#### 6.4.2 Número de raíces.

En las plantas evaluadas durante 133 días en todos los tratamientos solo una planta desarrolló raíz; por lo tanto, ignorando este dato atípico, se concluye que no existen diferencias aparentes entre los diferentes tratamientos ya que ninguno logró inducir la formación de raíces en forma consistente.

#### 6.4.3 Altura de la planta

La altura de las plantas se evaluó a los 133 días del experimento (Figura 4)



**Figura 4:** Altura de las plantas.  
(El diamante rojo representa la media).

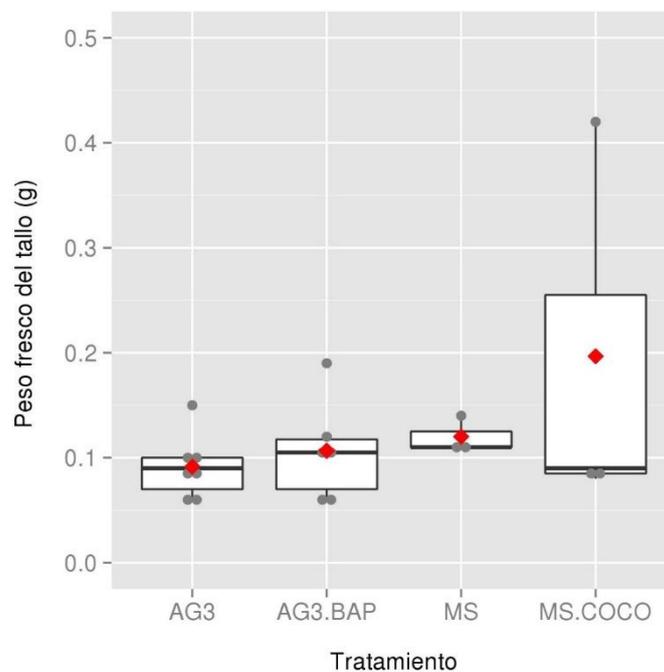
**Elaborado por:** Berrezueta, M.J – Universidad de Cuenca 2015



Las plantas que se desarrollaron en los tratamientos Agua de Coco y MS presentaron una altura de 2.3 a 2.5 cm respectivamente, a diferencia de los tratamientos AG<sub>3</sub> y AG<sub>3</sub>+ BAP donde se reportan los menores valores.

#### 6.4.4 Peso fresco y seco del tallo.

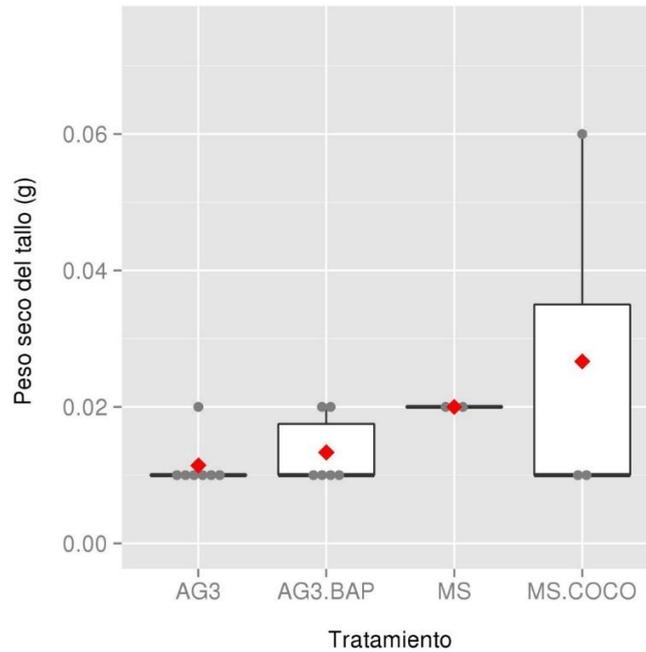
El peso fresco del tallo para los tratamientos AG<sub>3</sub>, AG<sub>3</sub>+BAP y MS, varió entre 0,06 a 0,19 gr. (Figura 5), mientras que el peso seco se registró entre 0,01 a 0,02 gr (Figura 6), lo que demuestra que no existe diferencias entre los tratamientos con respecto a los valores registrados. En el caso del tratamiento Agua de Coco se observa un valor alto atípico que estuvo asociado a un embrión que no presentó las mismas características del resto de muestras.



**Figura 5:** Peso fresco del tallo.

(El diamante rojo representa la media).

**Elaborado por:** Berrezueta, M.J – Universidad de Cuenca 2015



**Figura 6:** Peso seco del tallo.  
(El diamante rojo representa la media).

Elaborado por: Berrezueta, M.J – Universidad de Cuenca 2015

#### 6.4.5 Peso fresco y seco de la raíz:

En las plantas evaluadas durante 133 días en todos los tratamientos solo una planta desarrolló raíz, por lo tanto ignorando este dato atípico se concluye que no existen diferencias aparentes entre los diferentes tratamientos.

#### 6.5 Análisis económico.

El análisis del costo unitario para la obtención de plántulas de *Ceroxylon vogelianum*, en un ciclo de 133 días de cultivo se detalla en la siguiente tabla (5)



**Tabla 5:** Costo unitario para la obtención de plántulas de *Ceroxylon vogelianum* *in vitro*.

MEDIOS								
Reactivos	MS		AG <sub>3</sub>		AG <sub>3</sub> +BAP		Agua de Coco	
	Valor/ Litro	Valor/ unid	Valor/ Litro	Valor/ unid	Valor/ Litro	Valor/ unid	Valor/ Litro	Valor/ unid
MS	3	0,021	3	0,021	3	0,021	3	0,021
Agar	5,56	0,039	5,56	0,039	5,56	0,039	5,56	0,039
Sucrosa	2,95	0,021	2,95	0,021	2,95	0,021	2,95	0,021
AG <sub>3</sub>			2,44	0,017	2,44	0,017		
BAP					0,068	0,0005		
Agua de coco							0,5	0,004
Mano de obra		0,670		0,670		0,670		0,670
Luz		0,120		0,120		0,120		0,120
<b>Precio/planta</b>		<b>0,871</b>		<b>0,888</b>		<b>0,8885</b>		<b>0,875</b>

**Elaborado por:** Berrezueta, M.J – Universidad de Cuenca 2015

Para determinar el costo unitario, se consideraron los gastos de, medios de cultivo (MS, Agar, Sucrosa, AG<sub>3</sub>, BAP, Agua de Coco), mano de obra y servicios básicos, dando como resultado: MS \$ 0.87, Agua de Coco \$ 0.88 y los tratamiento de AG<sub>3</sub> y AG<sub>3</sub>+BAP con un costo similar de \$0,89. El margen de variación en los costos entre los tratamientos *in vitro* fue mínimo, sin poder ser comparables con el tratamiento control en el que no se obtuvo germinación.



## 7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1 Conclusiones.

- La especie de palma de cera presente en la parroquia de Shaglli fue identificada como *Ceroxylon vogelianum*, siendo ésta una especie andina de valor para la conservación de la diversidad, ecología y usos tradicionales.
- La técnica de cultivo *in vitro* en embriones de *Ceroxylon vogelianum* incrementó el porcentaje de germinación y redujo el tiempo de germinación en comparación con el tratamiento control. El tratamiento con AG<sub>3</sub> resultó el más efectivo frente al resto de tratamientos ya que permitió obtener un 22% de germinación.
- La biomasa obtenida en los tratamientos *in vitro* no pudo ser comparada con el tratamiento control, siembra en sustrato, ya que en éste último no se obtuvieron plántulas.
- El desarrollo radicular en los embriones germinados fue mínimo o inexistente en la mayoría de los tratamientos estudiados sin existir ventaja entre tratamientos en el desarrollo aéreo de las plántulas germinadas.
- El costo de producción *in vitro* por plántulas de *Ceroxylon vogelianum* con el tratamiento AG<sub>3</sub> fue de 0,89 dólares considerando 133 días de cultivo, siendo éste sistema el más efectivo y seguro para la obtención de plántulas ya que con la siembra convencional, en sustrato, no se registró germinación durante el tiempo evaluado



## **7.2 Recomendaciones.**

- El rescate de embriones para la germinación y desarrollo *in vitro* de *Ceroxylon vogelianum* puede ser considerado como una alternativa para la producción de plántulas de esta especie en la localidad de Shaglli ya que el sistema utilizado presenta un alto costo ecológico y ambiental al ser las plántulas extraídas y aclimatizadas en viveros para su comercialización.
- Los resultados obtenidos en ensayos posteriores (datos no publicados) muestran que las semillas jóvenes permiten obtener un mayor porcentaje de germinación por lo que se recomienda su utilización.
- Realizar investigaciones sobre el enraizamiento y aclimatación de las plántulas en sustrato.
- Desarrollar talleres en la parroquilla de Shaglli, para dar a conocer la importancia de la Palma de Cera.



## Bibliografía

- Abbas, B., Heningtyas, F., & Amriati, B. (2011). *in vitro* seeds germination and plantlets development of *Grammatophyllum scriptum* Lindl. (Orchidaceae). *International Research Journal of Plant Science*, 2(5):154-159.
- Agvik, E. (2011). Enraizamiento y Aclimatacion de plantulas de Vanilla planifolia Andrews, provenientes de cultivos de tejido con fines de conservacion. Guatemala.
- Al-Khayri, J., Huang, F., Morelock, T., & Busharar, T. (1992). Spinach Tissue Culture Improved with Coconut Water. *Hortscience*, 357-358.
- Anthelme, F., Lincago, J., Gully, C., et al. (2011). How anthropogenic disturbances affect the resilience of a keystone palm tree in the threatened Andean cloud forest? *Biological Conservation*, 1059-1067.
- Araujo-Murakami, A., & Zenteno Ruiz, F. (2006). Bosques de los Andes orientales de Bolivia y sus especies útiles. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 146-161.
- Borchsenius, F., & Morales, M. (2006). Diversidad y usos de palmeras andinas (Arecaceae) . *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 412-433.
- Borchsenius, F., Borgtoft, H., & Balslev, H. (1998). Manual to the palms Ecuador. *AAU reports*.
- Broschat, T. K., & Elliott, M. L. (2014). Ornamental Palms: Biology and Horticulture. *Horticultural*, 1-120.
- Bussmann, R. (2004). Regeneration and succession patterns in African, Andean and Pacific tropical mountain forests: the role of natural and antropogenic disturbance. *Lyonia*, 6(1):93-111.
- Bussmann, R. (2006). Andean floristic diversity and its importance for cultural diversity - examples from Northern Peru and Southern Ecuador. *Lyonia*, 19-36.
- Cabrera Cedillo, M. (febrero de 2015). (M. Berrezueta, Entrevistador)
- GAD parroquial Shalli. (2012). *Plan territorial*. Cuenca.
- Galeano, G., & Bernal, R. (2004). *Las palmas (familia Arecaceae o Palmae)*.



- Galeano, G., Sanin, M., Mejia, K., Pintaud, J., & Millán, B. (2008). Novelty in the genus *Ceroxylon* (Arecaceae) from Peru, with description of a new species. *Peru. biol*, 65-72.
- Galeas, C. J. (2010). Propuesta Metodológica para la representación cartográfica de los ecosistemas del Ecuador continental.
- George, E., & Hall, M. (2008). *Plant propagation by tissue culture* .
- Gómez , P. (2006). Avances en el rescate de embriones en palma de aceite: una herramienta eficiente en material genético de difícil germinación. *Cenipalma*, 1-4.
- Ministerio del Ambiente. (2015). *MAE impulsa el uso de ramos alternativos*. Obtenido de ambiente.gob.ec: <http://www.ambiente.gob.ec/mae-impulsa-el-uso-de-ramos-alternativo/#>
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2012). Sistema de clasificación de los ecosistemas del Ecuador continental. Subsecretaría de Patrimonio Natural. Quito.
- Mohan, S. (2015). Date palm biotechnology: Current status and prospective - an overview. *Food Agric*, 386-399.
- Montero-Córtés, M., Sáenz, L., Córdova, L., Quiroz, A., Verdell, J., & Oropeza, C. (2010). Montero-Córtés, M., Sáenz, L., Córdova, I., Quiroz, a, Verdeil, J.-L., & Oropeza, C. (2010). GA3 stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Cell Reports*, 1049-1059.
- Montúfar, R. (25 de Marzo de 2010). El género *Ceroxylon* en el Ecuador. Herbario QCA.
- Myers, N., Mittermeier, R., Mittermeier, C., et al. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 853-858.
- Nongrum, L., Kumaria, S., & Tandon, P. (2007). The influence of in vitro media on asymbiotic germination, plantlet development and ex vitro establishment of *Coelogyne ovalis* Lindl. And *Coelogyne nitida* (Wall. Ex Don) Lindl. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 73(4):205-207.
- Olivo, A., & Vielma, M. (2010). La palma Datilera: obtención de plantas por germinación de semilla *in vitro*. *Pittiera*, 133-139.



- Ordoñez, M. (noviembre de 2003). Propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactaceae). 63. Guatemala, Guatemala.
- Orozco-Segovia, A., et al. (2003). Seeds are a very important component of the life cycle of plants. *Seed Biology*, 79-94.
- Paniagua, N., Bussmann, R., Vega, C., & Téllez, C. &. (2014). Nuestro conocimiento y uso de las palmeras: Una herencia para nuestros hijo. Comunidades Llaquash, San Martín, Peru. *Ethnobotany Research and Applications*, 1-105.
- Paniagua-Zambrana, N. (2005). Diversidad, densidad, distribución y uso de las palmas en la región del Madidi, noreste del departamento de La Paz (Bolivia). *Ecología en Bolivia*, 265-280.
- Pence, V., Hasagawa, P., & Janick, J. (1980). Initiation and development of asexual embryos of *Theobroma cacao* L. *in vitro*. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 1-14.
- Perera, P., & et al. (2009). Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L). *Plan Cell Tiss Organ Cult*, 73-81.
- Pérez, E., Pérez, M., Villalobos, E., & et al. (1999). Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell Biol-Plant*, 131-135.
- Pérez, F. (s.f.). *Germinación y Dormición de semillas*. Obtenido de [http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacione\\_sdigitales/80-402\\_MATERIAL\\_VEGETAL\\_DE\\_REPRODUCCION\\_\\_MANEJO\\_CONSERVACION\\_Y\\_TRATAMIENTO/80-402/7\\_GERMINACION\\_Y\\_DORMICION\\_DE\\_SEMILLAS.PDF](http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacione_sdigitales/80-402_MATERIAL_VEGETAL_DE_REPRODUCCION__MANEJO_CONSERVACION_Y_TRATAMIENTO/80-402/7_GERMINACION_Y_DORMICION_DE_SEMILLAS.PDF): [http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacione\\_sdigitales/80-402\\_MATERIAL\\_VEGETAL\\_DE\\_REPRODUCCION\\_\\_MANEJO\\_CONSERVACION\\_Y\\_TRATAMIENTO/80-402/7\\_GERMINACION\\_Y\\_DORMICION\\_DE\\_SEMILLAS.PDF](http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacione_sdigitales/80-402_MATERIAL_VEGETAL_DE_REPRODUCCION__MANEJO_CONSERVACION_Y_TRATAMIENTO/80-402/7_GERMINACION_Y_DORMICION_DE_SEMILLAS.PDF)
- Pichincha Universal. (22 de Marzo de 2013). *Ministerio del Ambiente busca evitar venta de ramos de palma de cera*. Obtenido de <http://www.pichinchauniversal.com.ec/index.php/features/typography/item/18299-ministerio-del-ambiente-busca-evitar-venta-de-ramos-de-palma-de-cera>



- Pintaud, J.-C., Galeano, G., Balslev, H., & et al. (2008). Las palmeras de América del Sur: diversidad, distribución e historia evolutiva. *UNMSM*, 7-29.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En W. Roca, & L. Mroginski, *Principios Básicos, Metodología y Técnicas del Cultivos de Tejidos Vegetales* (págs. 2-17).
- Salaman, P., Quevedo, A., & Verhelst, J. (2006). *Proyecto Loro Orejiamarillo: una iniciativa de conservación*. Bogotá, Colombia: Fundación ProAves.
- Sanchez-Olate, M., & et al. (2004). Propagación in vitro de *Nothofagus procera* ((Poepp.et Endl.) a partir de embriones aislados. *Bosques*, 123-128.
- Sanin, M., & Galeano, G. (2011). A revision of the Adean wax palms, *Ceroxylon* (Arecaceae). *Phytotaxa* 34, 1- 64.
- Thin Lan, H. (1999). Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 1-7.
- Tropicos.org. (10 de diciembre de 2015). *Ceroxylon vogelianum* (Engel) H. Wendl. Obtenido de Missouri Botanical Garden: <http://www.tropicos.org/Name/2401749?tab=images>
- Valencia, R., León, S., & et al. (2011). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador 2º edición*. Quito, Ecuador: Publicaciones del herbario QCA.
- Van den Enynden, V., Cueva, E., & Cabrera, O. (2004). Edible Palms of southern Ecuador. *Palms*, 141-147.
- Viñas, M., & Jiménez, V. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). *Colomb. Biotecnol*, 229-242.
- Young, J., Ge, L., Fei, Y., & Ngin, S. (2009). The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. *Molecules*, 5144-5164.
- Yussita. (2011). In Vitro Callus Induction and Embryogenesis of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from Leaf Explants. *HAYATI*, 61-65.

## ANEXOS

### Anexo 1. Recolección de la semilla en Huertas- Shaglli- Santa Isabel.



Fuente: Anguisaca. W

### Anexo 2. Prueba de tetrazolium.



Fuente: Chica. E



**Anexo 3.** Composición y preparación del medio murashige y skoog (MS).

Constituyente	Concentración de la solución madre (g/L)	Volumen de la solución madre por litro de medio
<b>Macros</b>		<b>100 ml</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,5	
KNO <sub>3</sub>	19	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4,4	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,7	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7	
<b>Micros</b>		<b>10 ml</b>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,69	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,86	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62	
KI	0.083	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.025	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 10 ml de solución 25 mg/100ml		
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 10 ml de solución 25 mg/100ml		
<b>Fuente de hierro</b>		<b>10 ml</b>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.00556	
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	0.00746	
<b>Vitaminas</b>		<b>10 ml</b>
Inositol	10	
Nicotínico	0,05	
HCl-Piridoxina	0,05	
Glicina	0,2	
HCl-Tiamina	0,01	

Fuente: <http://farmacia.udea.edu.co/~biotecnolab/ms.pdf>.

**Anexo 4.** Siembra de embriones en laboratorio de biotecnología.



Fuente: Chica. E

**Anexo 5.** Planta obtenida con medio MS, enriquecido con AG<sub>3</sub>+ BAP



Fuente: Chica. E

**Anexo 6.** Planta obtenida con medio MS enriquecido con AG<sub>3</sub>



Fuente: Chica. E

**Anexo 7.** Planta obtenida con medio MS



Fuente: Chica. E

**Anexo 8.** Planta obtenida con medio MS enriquecido con Agua de coco



Fuente: Chica. E

**Anexo 9.** Peso de plántula para determinar la biomasa fresca.



Fuente: Chica. E



**Anexo 10.** Tabla de operacionalización de Variables.

Variable	Tipo de variable	Escala	Frecuencia de medición	Unidad de medición	fuelle
Días a inicio de la germinación,	Cuantitativas	Discreta	Semanal	Días	Registro de laboratorio
Número de hojas a los 133 días,	Cuantitativas	Discreta	Una vez a los 133 días	Hojas	Registro de laboratorio
Número de raíces a los 133 días	Cuantitativas	Discreta	Una vez a los 133 días	Raíces	Registro de laboratorio
Altura de planta a los 133 días.	Cuantitativas	Continua	Una vez a los 133 días	Cm	Registro de laboratorio
Acumulación de biomasa fresca y seca en raíces y órganos aéreos a las 133 días	Cuantitativas	Continua	Una vez a los 133 días	g	Registro de laboratorio

Elaborado por: Berrezueta, M. J.



**Anexo 11. Datos generales de los tratamientos.**

Tratamiento	Rep	Días a							
		Germinación	Hojas	Raíces	Altura	FW.shoot	FW.root	DW.shoot	DW.root
AG3.BAP	2	17							
AG3.BAP	3	17	1,00	0,00	2,20	0,12	0,00	0,02	0,00
AG3.BAP	4	36	2	0	0,4	0,11	0	0,01	0
AG3.BAP	5	17	2	0	1	0,06	0	0,01	0
AG3.BAP	6	17	1,00	0,00	3,00	0,19	0,00	0,02	0,00
AG3.BAP	7	19							
AG3.BAP	11	22	1,00	0,00	0,50	0,06	0,00	0,01	0,00
AG3.BAP	12	31							
AG3.BAP	14	50	1	0	0,4	0,1	0	0,01	0
AG3	1	22							
AG3	2	22	2,00	0,00	2,70	0,08	0,00	0,01	0,00
AG3	4	16	2,00	0,00	1,40	0,10	0,00	0,01	0,00
AG3	8	16	2,00	0,00	1,90	0,10	0,00	0,01	0,00
AG3	12	17	2,00	0,00	3,20	0,15	0,00	0,02	0,00
AG3	13	24	1,00	0,00	1,20	0,06	0,00	0,01	0,00
AG3	24	17	1	0	1,2	0,06	0	0,01	0
AG3	26	50							
AG3	35	50							
AG3	40	44	1	0	0,6	0,09	0	0,01	0
AG3	45	37							
MS	1	37	2	0	2,6	0,14	0	0,02	0
MS	2	22	1	0	3,1	0,11	0	0,02	0
MS	49	36	2	0	1,6	0,11	0	0,02	0
MS	50								
MS.COCO	1	43	2	0	1	0,09	0	0,01	0
MS.COCO	2	51	1	1	4,4	0,42	0,11	0,06	0,01
MS.COCO	4	37	2	0	1,5	0,08	0	0,01	0
MS.COCO	25	52							

Elaborado por: Berrezueta, M. J.