

## Obtención de embriones somáticos de *Parajubaea coccoides* Burret a partir de embriones cigóticos inmaduros

Verónica Sánchez<sup>1</sup>, Jaime Hidrobo Luna <sup>2\*</sup>, Norman Soria<sup>1</sup>, Jaime Gía<sup>1</sup> \*Autor para correspondencia

<sup>1</sup>Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). Av. General Enríquez, Sangolquí, Pichincha, Ecuador.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador. Ciudadela Universitaria, Quito, Pichincha, Ecuador. e-mail: hidroboluna@yahoo.es

### RESUMEN

La palma coco cumbé (*Parajubaea coccoides* Burret), es una especie ornamental, endémica del Ecuador. Se encuentra amenazada de extinción por factores ambientales y socioeconómicos. Su propagación sexual mediante semillas, no es eficaz. El cultivo de tejidos puede convertirse en una alternativa y dentro de este, la embriogénesis somática. El objetivo de esta investigación fue obtener embriones somáticos en medios de cultivo semisólido y líquido, a partir de embriones cigóticos inmaduros. Los explantes se colectaron de frutos de plantas adultas y se colocaron a formar callos en medio de cultivo con diferentes concentraciones de 2,4-D y carbón activado. Los callos con estructuras embriogénicas se emplearon para formar embriones en medio de cultivo semisólido con BAP y kinetina y en medio de cultivo líquido con BAP. Los resultados, mostraron que en los tratamientos sin carbón activado o con bajas concentraciones de 2,4-D no se formaron callos. Con 60 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1 g l<sup>-1</sup> de carbón activado se obtuvieron callos friables. Fue posible obtener embriones somáticos tanto en medio de cultivo semisólido como líquido, con mayor número en este último. Los resultados sientan las bases para la propagación de esta especie por embriogénesis somática.

Palabras clave: callos, ornamentales, reguladores del crecimiento, palma

## Obtention of somatic embryos of *Parajubaea coccoides* Burret from immature zygotic embryos

### ABSTRACT

Cumbé coconut palm (*Parajubaea coccoides* Burret) is an ornamental species endemic of Ecuador. It is threatened by environmental and socioeconomic factors. Your sexual propagation by seed, is not effective. Tissue culture can become an alternative and within this, somatic embryogenesis. The objective of this research was to obtain somatic embryos in semi-solid and liquid media culture from immature zygotic embryos. The explants were collected from mature plants and fruits were placed to form calli in culture medium with different concentrations of 2,4-D and activated carbon. Callus with embryogenic structures were used to form embryos in semisolid medium with BAP and kinetin and in liquid culture medium with BAP. The results showed that in treatments without activated carbon or low concentrations of 2,4-D no callus were formed. With 60 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D and 1 g l<sup>-1</sup> activated charcoal, friable callus were obtained. It was possible to obtain somatic embryos in semisolid and liquid culture medium, with higher number in liquid. The results provide the basis for propagating this species by somatic embryogenesis.

Key words: calli, ornamental, growth regulators, palm

### INTRODUCCIÓN

Dentro del grupo de especies arbóreas endémicas de Ecuador, se da gran importancia a las que son utilizadas como ornamentales por todo el beneficio que ellas brindan, como embellecedoras del paisaje urbano, refugio de especies ornitológicas, filtros de aire contaminado, e inclusive como conservadoras del suelo.

La palma coco cumbé (*Parajubaea coccoides* Burret) es una planta ornamental con frutos comestibles, considerada como una especie nativa arbórea de Ecuador (Josse *et al.*, 2000). Esta especie se ha plantado en calles y avenidas de algunas ciudades de Ecuador y del sur de Colombia; no se conoce en estado silvestre (Ulloa y Moller, 1995; Aguirre *et al.*, 2002; Squire, 2008). Debido a su poder

paisajístico y belleza emblemática se ha convertido en un árbol patrimonial ecuatoriano.

Esta palma forma parte de las especies andinas amenazadas de extinción; se conoce que en los últimos años no ha sido cultivada y los individuos existentes son plantas adultas que tienen muchos años de edad (Peña *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2009). Además, su desarrollo vegetativo es lento y requiere un largo periodo de tiempo para crecer.

Una alternativa que se avizora para resolver este problema, es su reproducción asexual mediante cultivo de tejidos y dentro de este, el proceso de embriogénesis somática, como el más eficiente por su alta tasa de conversión y producción masiva de plántulas *in vitro* (Freire, 2003; Celestino *et al.*, 2005).

La mayoría de estudios realizados sobre varias especies de palmas, como por ejemplo, la palma dátil (*Phoenix dactylifera* L.), palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.), palma de betel (*Areca catechu* L.) y palma cocotera (*Cocos nucifera* L.), sugieren el proceso de embriogénesis somática indirecta como una alternativa de preservación y aumento de la producción de estas especies (Viñas y Jiménez, 2011).

Bajo las premisas analizadas anteriormente se propone como objetivo obtener embriones somáticos de palma coco cumbé (*Parajubaea cocooides* Burret) en medios de cultivo semisólido y líquido, a partir de embriones cigóticos inmaduros.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Micropropagación de plantas de la Unidad de Espacio Público (UEP) del Distrito Metropolitano de Quito, localizado en el Vivero Municipal de Cununyacu, vía Intervalles km 2 ½, parroquia Cumbayá, cantón Quito, provincia Pichincha, Ecuador.

### Material vegetal

Se utilizaron frutos colectados de plantas adultas de coco cumbé, con una edad estimada de 15 años, altura de 15 m y el ancho de su corona de 4.5 m, aproximadamente (Fig. 1).

Los frutos recolectados presentaron color verde oscuro y 4 cm de diámetro (Fig. 2). A partir de los frutos cosechados se extrajeron los embriones cigóticos inmaduros que se emplearon como explantes.



Figura 1. Plantas madre adultas de la palma coco cumbé (a y b), racimos con sus frutos (c).

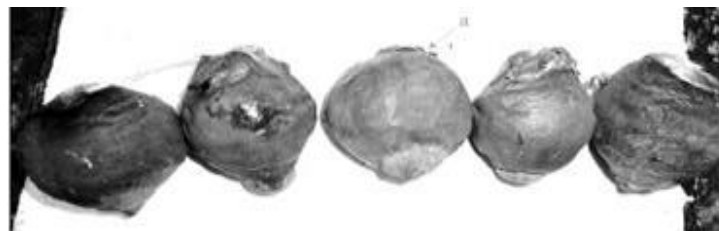


Figura 2. Semillas de la palma coco cumbé recolectadas de plantas adultas de la hacienda Las Magnolias. Semilla seleccionada (a).

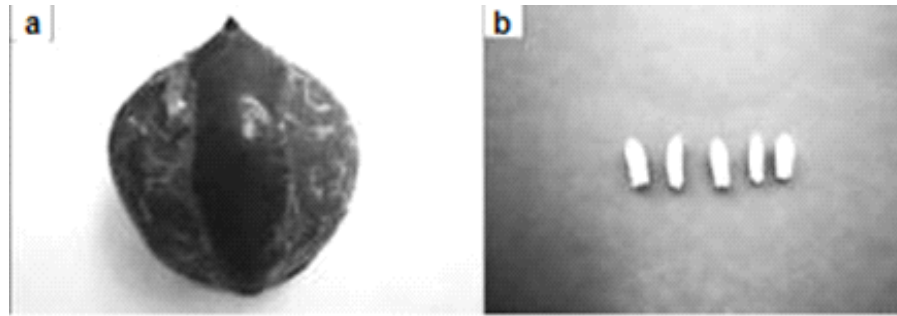


Figura 3. Endospermo de semilla seleccionada (inmadura) (a), embriones cigóticos inmaduros extraídos de los endospermos (explante empleado) (b).

La preparación del explante consistió en separar el mesocarpo del endocarpo, y se extrajo el endospermo con el embrión cigótico inmaduro (Fig. 3). El endospermo se mantuvo refrigerado a 4°C hasta su desinfección y escisión, en las siguientes 24 horas (Steinmacher *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008; Scherwinski *et al.*, 2012).

#### *Desinfección de los explantes*

Los endospermos, se enjuagaron con agua corriente para remover impurezas, se adicionó a continuación una solución de detergente comercial (1/20 m/v) y se agitó durante 10 min a 160 rpm en un agitador orbital, seguido de un enjuague con agua corriente.

Posteriormente, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5% (v/v) por 10 min a 160 rpm (Steinmacher *et al.*, 2007). Finalmente, los explantes se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y fueron seccionados longitudinalmente por la mitad (Ferreira *et al.*, 2008).

#### **Formación de callos con estructuras embriónicas**

Una vez realizada la desinfección de los explantes, los embriones cigóticos inmaduros se colocaron en el medio de cultivo de formación de callos que contenía sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado, con extra tiamina (1 mg l<sup>-1</sup>), 30 g l<sup>-1</sup> sacarosa y 7 g l<sup>-1</sup> agar.

Se estudiaron tres concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (20, 60, 100 mg l<sup>-1</sup>) y dos de carbón activado (CA) 0.5 y 1.0 g l<sup>-1</sup>.

El material vegetal se colocó en un cuarto de incubación a 25 ± 2°C y oscuridad constante por 18 semanas, con subcultivos en el mismo medio de cultivo cada 6 semanas.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3x3, este constó de dos factores con tres niveles cada uno, que correspondían a las concentraciones de 2,4-D y de CA en el medio de cultivo. La interacción de estos dio un total de nueve tratamientos que fueron repetidos 10 veces.

Al final del ensayo se evaluó la viabilidad de los explantes, la formación de callo por tratamiento y si eran friables, se determinó la masa fresca del callo (g), se midió el diámetro del callo (cm) y se describió su coloración (blanquecino amarillento, amarillento, amarillento marrón).

#### **Formación de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido**

Con los callos obtenidos se procedió a la formación de embriones somáticos en un medio de cultivo semisólido que contenía sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado, con extra tiamina (1 mg l<sup>-1</sup>), 30 g l<sup>-1</sup> sacarosa y 6 g l<sup>-1</sup> agar.

Para la formación de embriones somáticos se añadieron al medio de cultivo, por separado, diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y kinetina (Kin) (1.0, 2.0 y 3.0 mg l<sup>-1</sup>). El material vegetal se mantuvo a 25 ± 2°C bajo un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad por 6 semanas. A las cuatro semanas se realizó un subcultivo a la variante de medio de cultivo establecida

para cada tratamiento (Ferreira *et al.*, 2008; Scherwinski *et al.*, 2012).

En este experimento se aplicó un diseño experimental en bloques completos al azar (DBCA), cada bloque constó de un factor (bloque 1: BAP y bloque 2: Kin), con tres tratamientos cada uno, más un tratamiento control, todos con cinco réplicas.

Al término del experimento se cuantificó el número de embriones somáticos obtenidos por callo, como variable de respuesta.

### **Formación de embriones somáticos en medio de cultivo líquido**

Los callos obtenidos del tratamiento seleccionado, se cultivaron en un medio de cultivo líquido que contenía sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad de su concentración, modificado, con extra tiamina ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ),  $30 \text{ g l}^{-1}$  sacarosa y ácido naftalénacético (ANA) ( $0.01 \text{ mg l}^{-1}$ ).

Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de BAP ( $0.2$ ,  $0.3$ ,  $0.4 \text{ mg l}^{-1}$ ) en la formación y diferenciación de embriones somáticos. Como control se empleó el medio de cultivo sin BAP.

El material vegetal se mantuvo por 6 semanas en un agitador orbital a 100 rpm, en las condiciones de temperatura y fotoperiodo descritas para el experimento de formación de embriones somáticos. A las tres semanas se realizó cambio de medio de cultivo (Fki *et al.*, 2003; Abohatem *et al.*, 2011).

Se empleó un diseño experimental completamente al azar (DCA), constó de cuatro tratamientos, cada uno de estos con cinco réplicas.

Transcurrido el periodo de cultivo se cuantificó el número de embriones somáticos formados por callo y se clasificaron en dependencia de su etapa de desarrollo.

### *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos de los experimentos se analizaron estadísticamente previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. En los casos en que

no se cumplieron se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Formación de callos con estructuras embriogénicas**

El protocolo de desinfección aplicado permitió el cultivo del material vegetal en condiciones asépticas con un 98.89% de explantes libres de contaminación microbiana visible. Después de 18 semanas de cultivo se observaron respuestas morfológicas diferentes en los explantes en los nueve tratamientos ensayados. En los medios de cultivo con bajas concentraciones de 2,4-D, la respuesta más común fue la germinación del embrión cigótico inmaduro y en algunos casos la formación de raíces (Fig. 4a, 4b). La viabilidad de los explantes varió con el tratamiento (Figura 5). Independientemente del tratamiento, los explantes que formaron brotes y/o raíces, presentaron oxidación y necrosis se consideraron como no viables y se descartaron para la formación de callos.

Estos resultados coinciden con los referidos por Da Silva *et al.* (2002) en palma de asaí (*Euterpe oleracea* Mart.), donde a bajas concentraciones de 2,4-D se observó la germinación de embriones cigóticos y el desarrollo de plántulas vigorosas.

En cuanto al carbón activado, en los tratamientos que no contenían este componente los explantes no presentaron respuesta y varios de estos se oxidaron y necrosaron (Fig. 4c, 4d). Esto indicó que la adición de carbón activado al medio de cultivo con 2,4-D, contribuye al proceso de inducción de la callogénesis. De igual forma, fue verificado por Perera *et al.* (2007) en *Cocos nucifera* L. En su estudio indican que la adición de auxina y carbón activado combinados mejoraron significativamente el proceso de formación de callos con estructuras embriogénicas.

Todos los explantes pertenecientes a los tratamientos T5 ( $60 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D y  $0.5 \text{ CA g l}^{-1}$ ), T6 ( $60 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D y  $1.0 \text{ CA g l}^{-1}$ ) y T9 ( $100 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D y  $1.0 \text{ CA g l}^{-1}$ ) formaron callos. Sin embargo, los callos friables solo se observaron en el tratamiento T6. En el resto de los tratamientos aunque fueron viables los explantes estos no formaron callos.

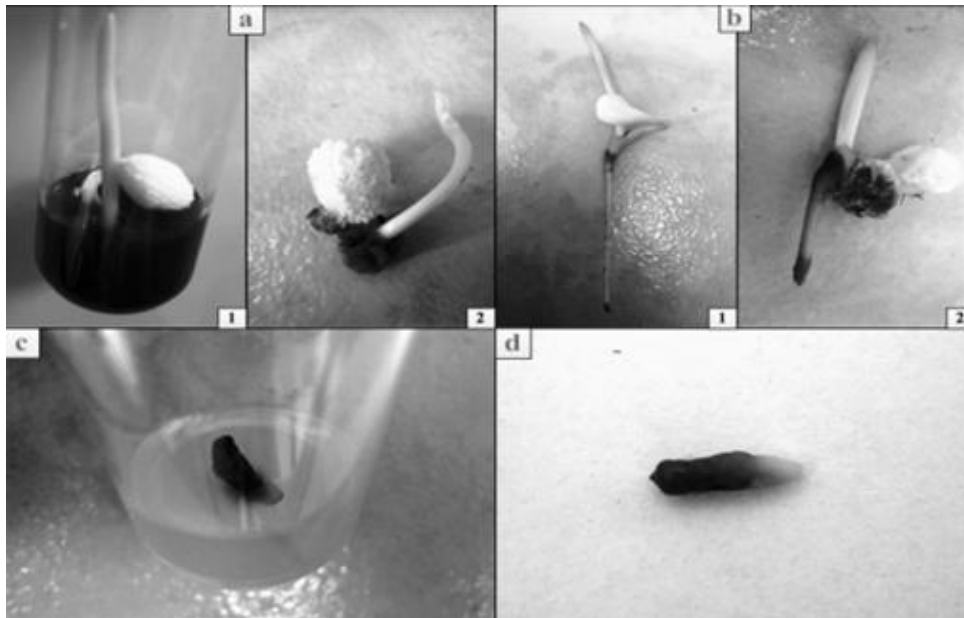


Figura 4. Embriones cigóticos de *Parajubaea cocoides* Burret empleados para la formación de callos. Explantes no viables. Formación de planta (a), planta normal por germinación (a1), planta y callo (a2), formación de raíz (b), raíz de planta germinada (b1), raíz de planta con callo (b2), oxidación (c), necrosis (d).

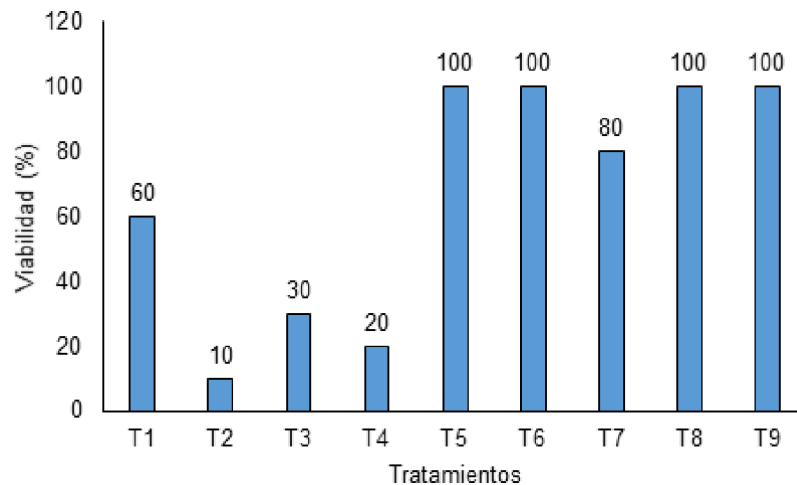


Figura 5. Viabilidad de explantes procedentes de embriones cigóticos inmaduros de *Parajubaea cocoides* Burret empleados para la formación de callos en diferentes medios de cultivo. T1: 20 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0 CA g l<sup>-1</sup>, T2: 20 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0.5 CA g l<sup>-1</sup>, T3: 20 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1.0 CA g l<sup>-1</sup>, T4: 60 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0 CA g l<sup>-1</sup>, T5: 60 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0.5 CA g l<sup>-1</sup>, T6: 60 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1.0 CA g l<sup>-1</sup>, T7: 100 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0 CA g l<sup>-1</sup>, T8: 100 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0.5 CA g l<sup>-1</sup>, T9: 100 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1.0 CA g l<sup>-1</sup>.

Los callos formados presentaron coloración diferente, y esta se relacionó con el tratamiento en el cual se originaron. En el tratamiento T5 fueron amarillentos (30%), blanquecinos amarillentos (30%) y amarillo marrón (40%). Sin embargo, en el tratamiento T9 se observaron callos amarillentos (70%)

y blanquecino amarillentos (30%) pero en el tratamiento T6 todos los callos mostraron el mismo color blanquecino amarillento y fueron friables.

Rajesh *et al.* (2003), en su trabajo sobre la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.)

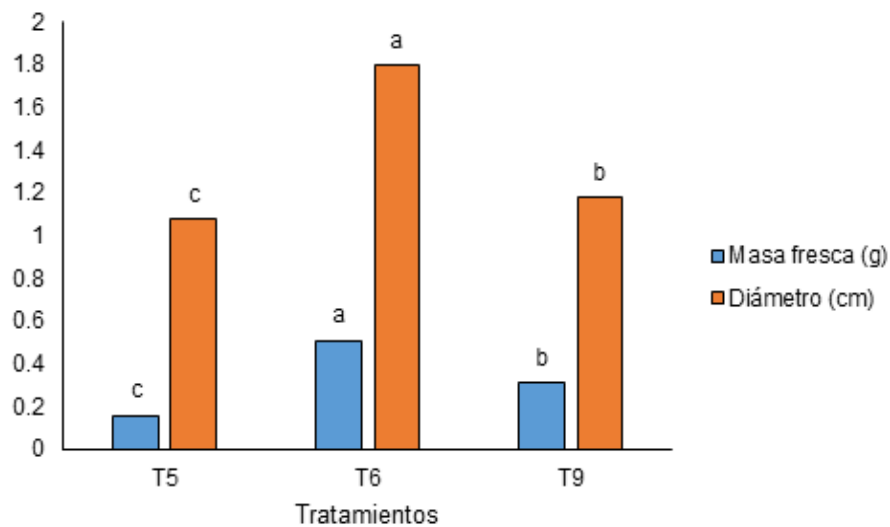
obtuvieron dos tipos de callos claramente distintivos a partir de embriones cigóticos, cuando emplearon  $25 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D y otros aditivos, pero sin la presencia de CA. El primero, un callo con estructuras embriogénicas que era friable, blanquecino amarillento, de rápido crecimiento y el segundo, un callo no embriogénico, translúcido y viscoso después de siete semanas de cultivo.

Los callos formados en el tratamiento T6 ( $60 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D y  $1.0 \text{ CA g l}^{-1}$ ) presentaron mayor masa fresca y diámetro con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Figura 6). Por ello, fue seleccionado este

tratamiento para la formación embriones somáticos.

#### Formación de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido

A las seis semanas de cultivo se observó formación de embriones somáticos en todos los tratamientos. Los embriones somáticos se encontraban en la etapa globular, su forma era redondeada y con coloración blanco opaco (Figura 7). Los embriones somáticos no presentaban conexión con el tejido materno, característica propia de esta estructura embriogénica.



Letras diferentes sobre barras, para cada variable, indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis

Figura 6. Características de callos de *Parajubaea cocoides* Burret formados a partir de embriones cigóticos inmaduros. T5:  $60 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D y  $0.5 \text{ CA g l}^{-1}$ , T6:  $60 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D y  $1.0 \text{ CA g l}^{-1}$ , T9:  $100 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D y  $1.0 \text{ CA g l}^{-1}$ .

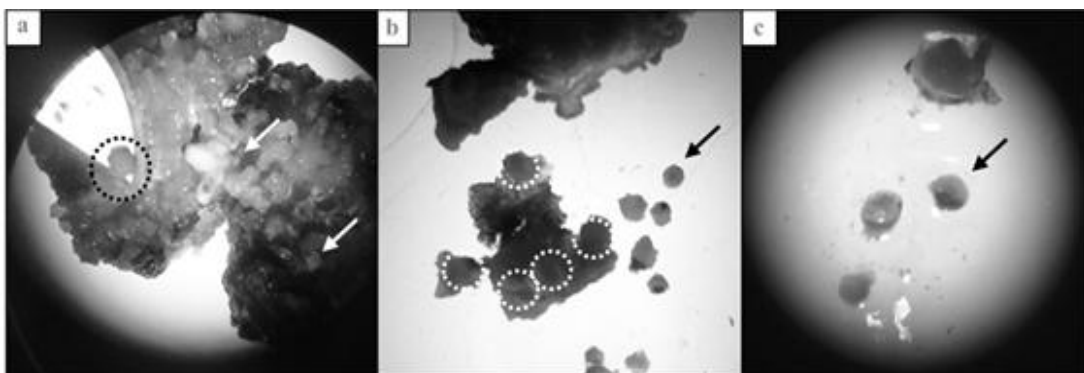


Figura 7. Embriones globulares de *Parajubaea cocoides* Burret vistos al estereoscopio. Separación de los embriones de su callo de origen  $67\times$  (a y b), embriones separados de su tejido materno  $10\times$  (c).



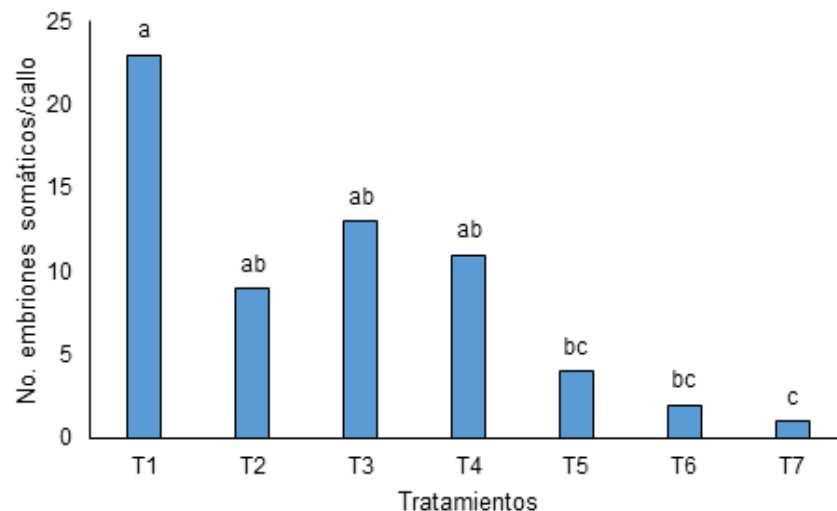
En los tratamientos que se añadió Kinetina al medio de cultivo, la formación de embriones somáticos por callo fue inferior, lo cual indicó que este tipo de citoquinina fue menos efectiva que el BAP en la palma coco cumbé (Figura 8). No obstante, los resultados demostraron que no es necesario la adición de citoquininas al medio de cultivo para que ocurra este proceso morfogénico, pues el mayor número de embriones somáticos por callo se observó en el tratamiento control (Figura 8).

En otros trabajos se indica que la utilización de bajas concentraciones de auxina favorece la formación de embriones somáticos, como en el caso del control de este ensayo (0.01 mg l<sup>-1</sup> ANA). Aslam *et al.* (2011) en su estudio sobre *Phoenix dactylifera* L., describieron que existió un rápido desarrollo de embriones somáticos en un medio de cultivo líquido que contenía 0.5 mg l<sup>-1</sup> ANA, después de 6 semanas de cultivo. También afirmaron que 2,4-D solo ayudó a la formación de callos, pero no a la inducción y proliferación de embriones somáticos.

El hecho de que la adición de citoquininas (BAP o Kin) al medio de cultivo no contribuyó a elevar el número de embriones somáticos con respecto al control pudo estar relacionado con que las concentraciones estudiadas no fueron suficientes para establecer un balance auxina-citoquinina capaz de inducir el estado embriogénico en las células de los callos de palma coco cumbé.

#### Formación de embriones somáticos en medio de cultivo líquido

Después de 6 semanas de cultivo, en todos los tratamientos con BAP se observó la formación de embriones somáticos en etapa globular y en otras etapas de desarrollo más avanzadas, éstos últimos se presentaron en los tratamientos 3 y 4, los cuáles contenían mayor concentración de esta citoquinina. El aspecto de los embriones globulares fue igual a los obtenidos en la formación de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido pero con color blanquecino intenso y distinguible a simple vista, con forma alargada y curva (Fig. 9).



Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis para  $p < 0.05$

Figura 8. Formación de embriones somáticos de *Parajubaea cocoides* Burret en medio de cultivo semisólido. T1: control, T2: 1.0 mg l<sup>-1</sup> de BAP, T3: 2.0 mg l<sup>-1</sup> de BAP, T4: 3.0 mg l<sup>-1</sup> de BAP, T5: 1.0 mg l<sup>-1</sup> de KIN, T6: 2.0 mg l<sup>-1</sup> de KIN, T7: 3.0 mg l<sup>-1</sup> de KIN.

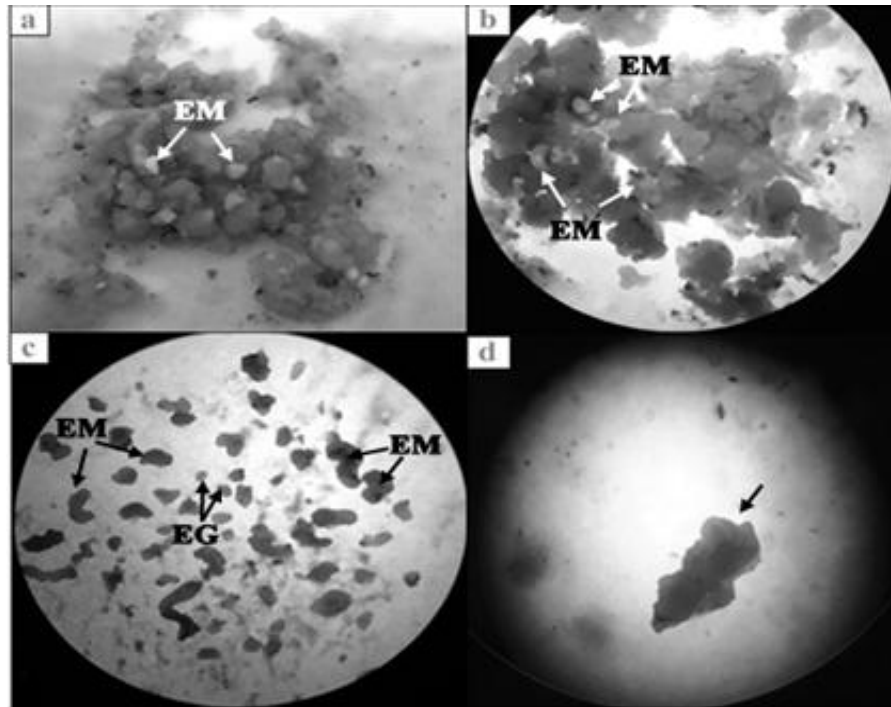


Figura 9. Suspensión celular de *Parajubaea cocoides* Burret con embriones somáticos (a), suspensión celular con embriones somáticos vista al estereoscopio 67x (b), embriones somáticos globulares y maduros 67x (c), embrión somático maduro 10x (d). EM= Embriones somáticos maduros, EG= Embriones somáticos globulares.

La media más alta de embriones somáticos con un número aproximado de 266 embriones somáticos por cada 50 ml de suspensión, se obtuvo en el T4 (0.4 mg l<sup>-1</sup> BAP), aunque sin diferencias significativas con respecto al resto de tratamientos. Las concentraciones de BAP empleadas en medio de cultivo líquido fueron inferiores a las utilizadas en medio de cultivo semisólido. A partir de los resultados se infiere el papel que puede jugar el ANA en la formación de embriones en esta especie. Dicho regulador del crecimiento no se encontraba en el medio de cultivo semisólido y en medio de cultivo líquido el número de embriones somáticos en el tratamiento control sin BAP pero con ANA no se diferenció del resto de los tratamientos. Un aspecto importante a destacar es que los embriones somáticos se desarrollaron más en el medio de cultivo líquido que en el semisólido. El análisis de varianza (ANOVA), por modelos mixtos mediante prueba de LSD de Fisher con 0.05 demostró que en medio de cultivo líquido la media de todos los tratamientos fue de 184 embriones por callo mientras que en medio de cultivo semisólido que fue de 9.03.

Unido a lo anterior, en medio de cultivo líquido se empleó la mitad de la concentración de las sales

MS, aspecto que deben tenerse en cuenta para nuevos estudios.

Este hecho corrobora estudios previos que demuestran la mayor efectividad del medio de cultivo líquido. De esta manera, Fki *et al.* (2003) en *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour, en su estudio desarrollaron dos protocolos para la obtención de embriones somáticos, uno el establecimiento de suspensiones celulares y el otro en el medio de cultivo semisólido. Sus resultados mostraron que por cada 100 mg de callo, obtuvieron 10±2 embriones somáticos en medio de cultivo semisólido, mientras que por la misma cantidad de callo obtuvieron 200±10 embriones en medio de cultivo líquido. Por tanto, la productividad de los cultivos aumentó en 20 veces más, cuando se utilizaron suspensiones celulares.

Por otra parte, Abohatem *et al.* (2011), utilizaron un medio de cultivo líquido MS a la mitad de su concentración con 0.3 mg l<sup>-1</sup> BAP y obtuvieron un alto número de embriones somáticos por frasco a los 45 días de cultivo, con subcultivos cada 7 días. Es así que por cada 25.13 g de masa embriogénica se obtuvieron 537 embriones somáticos.



## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demostraron que es posible obtener embriones somáticos de *Parajubaea cocoides* Burret y sentar las bases para la propagación masiva de esta especie por embriogénesis somática. Para la formación de callos el 2,4-D y el carbón activado fueron elementos clave así como el empleo de ANA para la formación de embriones somáticos, con mayor número en medio de cultivo líquido.

## REFERENCIAS

- Abohatem M, Zouine JY, El Hadrami I (2011) Low concentrations of BAP and high rate of subcultures improve the establishment and multiplication of somatic embryos in date palm suspension cultures by limiting oxidative browning associated with high levels of total phenols and peroxidase activities. *Scientia Horticulturae* 130(1): 344-348
- Aguirre Z, Madsen J, Cotton E, Balslev H (2002) *Botánica Austroecuatorialiana. Estudios sobre los recursos vegetales* (Primera ed.). Abya Yala. Quito
- Aslam J, Ahmad S, Jaleel A, Mujib A, Pershad M, Shanker P (2011) Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18(4): 369-380
- Celestino C, Hernández I, Carneros E, López-Vela D, Toribio M (2005) La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación agraria: Sistemas y recursos forestales* 14(3): 345-357
- Da Silva A, Alves O, Kemaleddine A, Campos I, Do Socorro M, Medeiros S (2002) Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24(3): 601-603
- Fernández, D, Trovant B, López J (2009) Reintegración ecológica y económica de una ladera interandina del noreste de Gualaquiza (Azuay, Ecuador). Universidad Internacional Menéndez Pelayo (IUMP) y la Universidad Central del Ecuador. Quito
- Ferreira E, Contin M, Yoshimitsu S, Quirino A, Carvalho M, Manão C (2008) Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95(2): 175–184
- Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A (2003) An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Reports* 21(6): 517–524
- Freire, M (2003) Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* 3(4): 195 - 209
- Josse C, Mena P, Medina G (2000) *La Biodiversidad de los Páramos*. GTP/Abya Yala. Quito
- Peña L, Ruiz H, Tovar J (2008) Proyecto de producción de material genético de especies de palmas andinas amenazadas (*Parajubaea cocoides* Burret, *Ceroxylon parvifrons*, *Ceroxylon ventricosum* y *Ceroxylon vogelianum*). Pasto. Fundación Palmas Andinas
- Perera P, Hoche V, Verdeil J, Doubeau S, Yakandawala D, Kaushalya L (2007) Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 26(1): 21–28
- Rajesh M, Radha E, Karun A, Parthasarathy V (2003) Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm – the effect of exogenous polyamines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75(1): 41–47
- Scherwinski J, Da Silva R, Da Silva R, Poeta P, Gomes Z, Oliveira E (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration in acaí palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108(1): 1-8
- Squire, D (2008) *Guía completa para seleccionar, cultivar y propagar 220 especies de Palmeras y Cidáceas* (Primera ed.). Blume. Barcelona.
- Steinmacher D, Cangahuala-Inocente G, Clement C, Guerra M (2007) Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 43(2): 124-132
- Ulloa C, Moller P (1995) *Árboles y arbustos de los Andes* (Segunda ed.). Abya Yala. Quito
- Viñas M, Jiménez V (2011) Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (*Arecaceae*). *Revista Colombiana de Biotecnología* 13(2): 229-242

Recibido: 30-01-2014

Aceptado: 11-06-2014