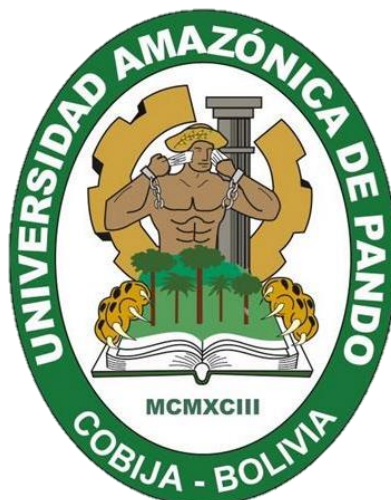


UNIVERSIDAD AMAZÓNICA DE PANDO

ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROFORESTAL



Tesis de grado

**PROPAGACIÓN IN VITRO DEL ASAÍ (*Euterpe precatoria*) BAJO EL EFECTO DE
SACAROSA Y CARBÓN ACTIVO EN GERMINACIÓN DE EMBRIONES**

Postulante:

Univ. Genaro Morales Blanco

Asesores:

Ing. Gabriela Ruth Ancasi Espejo

Lic. Isrrael Muñoz Guzman

Cobija-Pando-Bolivia

2022

HOJA DE APROBACIÓN

La presente tesis fue revisada y aprobada por:

CARGO	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMAS
Presidente	Lic. Nancy Acuña Álvarez	_____
Tribunal 1	Ing. Androcles Puerta Velazquez	_____
Tribunal 2	Ing. David Gomez Roca	_____
Tribunal 3	Ing. Ronny Balcazar Sosa	_____
Asesor	Ing. Ruth Gabriela Ancasi Espejo	_____
Asesor	Lic. Isrrael Muñoz Guzman	_____

Cobija, 2022

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de tesis de grado a Dios, por darme protección y sabiduría en cada momento y dándome más fortaleza para seguir adelante, a mi padre y a mi madre que están con Dios, a mi esposa y a mis hijos, hermanos y sobrinos, a mi padre y a mi madre desde el cielo velan por mí, a mi querida esposa quien me dio el apoyo incondicional en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento. A mis hijos por su constante apoyo y cariño que me brindaron. A mis hermanos y sobrinos por el apoyo recibido. Es por ellos logre este objetivo.

A todos Uds. Con todo amor y cariño.

Genaro Morales Blanco

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, sin él nada de esto hubiera sido posible.

A mi padre y a mi madre que están con Dios. A mi amada esposa, Adela Mamani H. Quien me apoyo a largo de mi formación académica, su amor infinito, tenacidad y lucha interminable ha hecho de ella un gran ejemplo a seguir por mí y por mis hijos y sin ella jamás hubiera podido conseguir lo que hasta ahora he logrado.

A mis queridos hermanos hijos Jorge, Ximena, Miguel Ángel y Henry por su apoyo incondicional, constante cariño y palabras de aliento que me brindaron día a día para no rendirme, y a mis amados hermanos y hermanas por el apoyo incondicional que me brindan.

A todos mis compañer@s de la Universidad, con quienes he compartido todos los sacrificios de esta vida universitaria.

A mis queridos asesores Ing. Gabriela Ancasi Espejo y Lic. Isrrael Muñoz Guzman por su paciencia, tolerancia. Comprensión y sobre todo por haber hecho posible que este proyecto de tesis sea exitoso.

A todos los docentes que nos impartieron con su enseñanza para el futuro de todos nosotros, durante todo este tiempo de mi vida Universitaria que aportaron en mi formación académica para lograr ser una excelente profesional en el futuro.

Un agradecimiento eterno a la casa superior de estudios UNIVERSIDAD AMAZÓNICA DE PANDO.

RESUMEN

Bolivia es uno de los países de América latina con significativas superficies de bosques naturales, entre las especies que las componen existen muchas especies de palmera, que gradualmente se incorporan a la actividad económica por el uso de sus productos, los cuales son denominados productos forestales no maderables.

El asaí (*Euterpe precatoria* M.) es una palmera de importancia económica, sociocultural en regiones amazónicas en los últimos años el asaí, se ha visto amenazada por una tala indiscriminada, por la extensión agrícola y ganadera, ocasionando la pérdida de genotipos, por tal motivo es urgente su conservación. La propagación invitro es una alternativa para las especies que no se puede conservar por el método tradicional. El objetivo de presente investigación fue determinar los protocolos para la propagación in vitro de Asaí (*euterpe precatoria* M.) bajo el efecto de sacarosa y carbón activo en germinación de embriones, el experimento se realizó con 8 tratamientos y cada tratamiento tubo 15 repeticiones, sumando un total de 120 repeticiones. Para la realización de esta investigación fue bifactorial con relación de: carbón activo 1 gr/L⁻¹, carbón 2 gr/L⁻¹ y sacarosa de 0 gr/L⁻¹, 15 gr/L⁻¹, 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹, dando como resultado que el tratamiento: T3 (30 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo) fue estadísticamente superior en las variables de germinación, numero de hojas, desarrollando radicular asimismo presento menor contaminación y oxidación a diferencia del demás tratamiento que fueron estadísticamente inferiores.

Palabra clave: *Euterpe precatoria* M., Cultivo *In vitro*, Carbón Activo, Sacarosa, Embrión.

ABSTRACT

Bolivia is one of the countries in Latin America with significant areas of natural forests, among the species that compose them there are many species of palm, which are gradually incorporated into economic activity through the use of their products, which are called non-forest products. timber.

The asaí (*Euterpe precatoria* M.) is a palm tree of economic and socio-cultural importance in Amazonian regions. In recent years, the asaí has been threatened by indiscriminate logging, by agricultural and livestock extension, causing the loss of genotypes, for such reason its conservation is urgent. In vitro propagation is an alternative for species that cannot be conserved by the traditional method. The objective of this research was to determine the protocols for the in vitro propagation of Asaí (*euterpe precatoria* M.) under the effect of sucrose and activated carbon in embryo germination, the experiment was carried out with 8 treatments and each treatment had 15 repetitions, adding a total of 120 repetitions. To carry out this research, it was bifactorial with a relationship of: activated carbon 1 gr/L¹, carbon 2 gr/L¹ and sucrose of 0 gr/L¹, 15 gr/L¹, 30 gr/L¹ and 45 gr/L¹, giving as a result that the treatment: T3 (30 gr/L¹ of sucrose with 1 gr/L¹ of activated carbon) was statistically superior in the variables of germination, number of leaves, developing root also presented less contamination and oxidation unlike the other treatment that were statistically lower.

Keywords: *Euterpe precatoria* M., In vitro culture, Active Carbon, Sucrose, Embryo.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.2. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.3. OBJETIVOS.....	4
1.3.1 General.....	4
1.3.2 Específicos.....	4
1.4. HIPÓTESIS.....	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Generalidades.....	5
2.2 Clasificación taxonómica.....	5
2.3. Descripción botánica.....	6
2.6 Requerimiento de suelo.....	10
2.7 Ambiente y exposición.....	10
2.8 Usos de la palmera de asaí.....	10
2.9 Valor nutricional.....	11
2.11 Formas de propagación.....	13
2.12 Selección de plantas semilleras.....	13
2.13 Obtención de la semilla.....	14
2.14 Desinfección de la semilla.....	14
2.15 Tratamientos pre germinativos en las semillas.....	15
2.16 Calidad y análisis de semillas.....	15
2.17 Crecimiento de los plantines.....	15
2.18 Biotecnología vegetal.....	16
2.19 Tipos de desinfecciones in vitro.....	16

2.20 Cultivo in vitro.	16
2.21 Medios nutritivos.....	16
2.22 Medio de cultivo Murashige & Skoog.....	17
2.23 Sacarosa.....	17
2.24 Carbón activo.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	19
3.1 Ubicación del área de estudio.....	19
3.1.1 Clima.....	19
3.2 MATERIALES.....	19
3.2.1 Material Vegetal.....	19
3.2.2 Materiales de trabajo.....	20
4. METODOLOGÍA.....	21
4.1 Preparación de área de estudio.....	21
4.2 Preparación de medio de cultivo para la germinación de embriones in vitro.	22
Cantidad de macro y micronutrientes que serán usados en la preparación del stock general o soluciones madres.....	23
4.2 Desinfecciones la semilla.....	24
4.3 Extracción e introducción de embriones.....	24
4.4 diseño experimental y tratamientos.....	25
4.5 Diseño estadístico.....	26
4.6 variables de respuesta.....	27
4.6.1 Análisis del porcentaje de germinación.....	27
4.6.2 Hinchazón de embriones.....	28
4.6.3 Emisión de plúmula.....	28
4.6.4 Emisión de raíz.....	29

4.6.5 Longitud de raíz.....	29
4.6.6 Volumen de raíz	30
4.6.7 Numero de raíz.....	30
4.6.8 Altura de plantines	31
4.6.9 Diámetro de tallo	31
4.6.10 Número de hojas.....	32
4.6.11 Oxidación	33
4.7 Contaminación	34
4.7.1 Hongos.....	35
4.7.2 Bacterias.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 ANALISIS ESTADISTICO.....	36
5.1.1 Oxidación.....	36
5.1.2 contaminación.....	36
5.1.2.1 Hongos	36
5.1.2.2 Bacterias	37
5.1.3 Análisis de varianza.....	38
5.1.4 Análisis de varianza. Experimento 1- Fase de Germinación <i>In Vitro</i> . 39	
5.1.5 Análisis de varianza. Experimento 1- Fase de enraizamiento.....	42
6. Discusión.....	48
7. Conclusiones.....	56
8. Recomendaciones.....	58
9. Bibliografía.....	60
10. Anexos.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica	6
Tabla 2. Datos químicos y nutricionales de pulpa de asaí (INLASA, 2017, citado en ficha de oferta Grupo Emprendedor Los Tucanes, comunidad Trinchera) ...	12
Tabla 3. Materiales de trabajo	20
Tabla 4. Macro y micronutrientes.....	23
Tabla 5. Diseño experimental	26
Tabla 6. Análisis de varianza para la germinación total de plantines de asaí (<i>Euterpe precatoria</i>) <i>in vitro</i> en interacción de carbón y sacarosa.	38
Tabla 7. Análisis de varianza para germinación de embriones de asaí (<i>Euterpe precatoria</i>) <i>in vitro</i> en interacción de carbón y sacarosa.	40
Tabla 8. Análisis de varianza para el desarrollo de raíz de asaí (<i>Euterpe precatoria</i>) <i>in vitro</i> en interacción de carbón y sacarosa.	43
Tabla 9. Análisis de varianza para el desarrollo de plantines de asaí (<i>Euterpe precatoria</i>) <i>in vitro</i> en interacción de carbón y sacarosa.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N 1 Estimación de distribución de palmeras de asaí (Euterpe precatoria) en la Amazonía boliviana (Adaptado de Leglise, 2017).....	9
Figura N 2 Croquis de ubicación del laboratorio de Biotecnología Vegetal. Fuente: elaboración propia.	19
Figura N 3 Material Vegetal, semillas de asaí. Fuente: elaboración propia	20
Figura N 4 Preparación de área de estudio. Fuente: Elaboración propia	21
Figura N 5 Preparación de medio de cultivo y ajuste de pH. Fuente: Elaboración propia	23
Figura N 6 Desinfección de semilla. Fuente: Elaboración propia	24
Figura N 7 Extracción e introducción de embriones. Fuente: elaboración propia	25
Figura N 8 Porcentaje de germinación. Fuente: elaboración propia	27
Figura N 9 Hinchazón, y emisión de plúmula. Fuente: elaboración propia	28
Figura N 10 Emisión de raíz. Fuente: elaboración propia	29
Figura N 11 Longitud de raíz. Fuente: elaboración propia	29
Figura N 12 Longitud de raíz. Fuente: elaboración propia	30
Figura N 13 Número de raíces. Fuente: elaboración propia.....	31
Figura N 14 Medida de altura de planta. Fuente: elaboración propia	31
Figura N 15 Medida de diámetro de tallo. Fuente: elaboración propia	32
Figura N 16 Conteo de número de hojas. Fuente: elaboración propia	32
Figura N 17 Grado de oxidación de embriones. Fuente: elaboración propia ..	33
Figura N 18 Escala para medir niveles de oxidación en medios de cultivo. Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. Universidad de Córdoba (Quintero y Jarma, 200)	34

Figura N 19	Contaminación in vitro. Fuente: elaboración propia	34
Figura N 20	Contaminación por bacterias. Fuente: elaboración propia	35
Figura N 21	Porcentaje de oxidación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.....	36
Figura N 22	Variable de Respuesta. Porcentaje de contaminación por hongos de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia. 37	
Figura N 23	Variable de Respuesta. Porcentaje de contaminación por bacterias de embriones de asaí con niveles de sacarosa.Fuente: Elaboración propia.	38
Figura N 24	Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.....	39
Figura N 25	Variable de Respuesta. Hinchazón de embriones de asaí <i>in vitro</i> con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.	40
Figura N 26	Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.....	41
Figura N 27	Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.....	42
Figura N 28	Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.....	43
Figura N 29	Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.....	44
Figura N 30	Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.....	45
Figura N 31	Variable de Respuesta. Altura de plantines de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.....	46
Figura N 32	Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.....	47
Figura N 33	Variable de Respuesta. Numero de hojas de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.....	47

1. INTRODUCCIÓN.

El asaí es de la familia Arecaceae considerada una de las palmeras perennes de ciclo largo con una gran variabilidad genética entre plantas de la misma población y teniendo aproximadamente 2.500 especies, que son distribuidas en 200 géneros (COSTA & MARCH, 2008). Estas familias de palmeras son conocidos por su amplia distribución y se encuentran principalmente en regiones tropicales y subtropicales (RUBIO NETO, 2013).

El fruto del asaí tiene un alto valor nutricional económico y por su alto contenido de proteínas, carbohidratos, grasas, calcio, hierro, vitamina A, vitamina C y antioxidantes, ocupando un cada vez más espacio en el mercado regional, nacional e internacional debido a la industria alimenticia de producción de jugos y la bebida de asaí que se extrae de la pulpa. (RUBIO NETO, 2013).

A nivel mundial Estados Unidos se posiciona como el principal importador de asaí, habiendo cuadruplicado su demanda en los últimos años y representando el 79% de las exportaciones que salen desde Brasil (CONAB 2015); Japón y Corea del Sur también destacan entre el grupo de países compradores, que además incluye a Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Suecia, Suiza, Dinamarca y otros. Las empresas que abastecen estos mercados se encuentran instaladas en Brasil, principalmente en los estados de Pará y Amapá, donde se incursionó en la liofilización¹ del producto desde el año 2003 (Gamarra 2013).

La producción de asaí en Bolivia mayormente son frutos silvestres que se producen en los bosques amazónicos de várzea (inundados estacionalmente) y en bosques de tierra firme (con suelos bien drenados según (Morales 2004, Moreno & Moreno 2006). Distribuidos en los departamentos de Pando y al norte de La Paz, Beni y Santa Cruz.

En los últimos años se sumó también la participación de Bolivia en el mercado mundial, a través de la comercialización de asaí liofilizado producido por la Industria Boliviana de Liofilización (IBL) y por Natur SRL, empresas instaladas en Santa Cruz que exportan a los mercados de Nueva Zelanda, Colombia, Alemania, Brasil y Eslovenia entre otros (Lorini 2016).

Estudios de mercado recientes efectuados por Conservation Strategy Fund (CSF) en el mercado boliviano, muestran que en las ciudades de Cobija y Riberalta, los intermediarios, transformadores y comercializadores de asaí carecen de volúmenes suficientes para cubrir la demanda nacional y asegurar una oferta constante a lo largo del año (Lorini 2015, Lorini 2016). Este fenómeno de demanda insatisfecha se repite a nivel global desde 1998 (Gamarra 2103) y merece especial atención, pues constituye una oportunidad para emprendimientos emergentes como el de la Asociación de Recolectores y Productores de Frutas Amazónicas de Petronila (ARPFAP), emprendimiento para el cual se genera el presente plan de negocios.

Por estas razones se plantea el presente trabajo de investigación que proporcionará una guía para el manejo de semillas de asaí *in vitro*, en cuanto a la determinación del efecto de los diferentes tipos de germinación de las semillas de asaí y evitar la pérdida genética de esta valiosa especie, ya que actualmente no existe investigaciones de propagación *in vitro* con genotipos de ejemplares de asaí encontrados en la amazonia de Pando- Bolivia (CUMAT, 1990).

El mejoramiento y conservación de las plantas silvestres, es una de las herramientas que ha dado respuestas, para nuevas variedades, que se responde a factores bióticos y abióticos. En cultivo *in vitro* es parte del mejoramiento genético, la embriogénesis permite la transformación de una sola célula, el cigoto, en un individuo multicelular más complejo, contenido en la semilla madura que a la vez nos proporciona protocolos específicos para la producción de plántulas y plantas sanas libres de patógenos en poco tiempo (EBERT et al., 2014).

Esta técnica se aplicó en palmeras como Chima *Bactris gasipaes* en la inducción de embriogénesis somática (STEINMACHER, 2005). y en Germinación *in vitro* de palma muriche *Mauritia flexuosa* (EBERT et al., 2014). Para el desarrollo de plantas *in vitro* la producción de energía y carbohidratos son elementales.

La sacarosa permite un rápido crecimiento heterotrófico ya que la producción de energía y carbohidratos por la fotosíntesis *in vitro* es muy poca debido a que los niveles de iluminación en las habitaciones destinadas a su crecimiento generalmente son

bajos y no garantizan que se desarrolle adecuadamente este proceso según (Leifert et al., 1995),

Así mismo en el cultivo de embriones de cigóticos *in vitro* el carbón activo favorece la inducción de raíces de la planta. También adición de carbón activado en el cultivo *in vitro* permite reducir los días a la germinación e incrementar el número de brotes obtenidos por planta. (CHERUVATHUR et al., 2010).

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La especie de asai (*Euterpe precatoria*) de la familia Arecaceae es una de las palmeras que están distribuidas en las regiones tropicales y sub tropicales de Bolivia, sin embargo, en la región norte amazónica del país la explotación de especies de la familia Arecaceae. Como el *asaí*, se ha visto amenazada por una tala indiscriminada para la obtención de palmito, se ha visto vulnerable principalmente por la destrucción de su hábitat, por la extensión agrícola y ganadera, en el departamento de Pando. Estas plantas generan un alto valor económico y nutricional. Por tal motivo es urgente su conservación, las semillas son el material adecuado para la propagación y la conservación de la mayor diversidad genética de la población. Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden contribuir a mejorar la germinación uniforme de las plantas, la propagación masiva y libre de enfermedades y patógenos.

1.2. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN.

En la actualidad existe una fuerte preocupación por el deterioro ambiental, debido a que la mayoría de los bosques están desapareciendo a ritmo acelerado. Algunas de las más importantes causas de este deterioro son el crecimiento demográfico, los incendios forestales, la tala indiscriminada de árboles para fines comerciales o energéticos. Al destruir los bosques también desaparece la palmera de *asaí* (*Euterpe precatoria*). Por esa razón se tiene como objetivo tener protocolos de propagación *in vitro* para su conservación.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1 General

Determinar protocolos para la propagación *in vitro* de Asaí (*euterpe precatoria*) bajo el efecto de sacarosa y carbón activo en germinación de embriones.

1.3.2 Específicos.

- Determinar agentes desinfectantes para el establecimiento *in vitro* de Asaí (*euterpe precatoria M*).
- Determinar la concentración de sacarosa para desenvolvimiento de embriogénesis de Asaí y carbón activado para germinación de los embriones de Asaí (*Euterpe precatoria M*).
- Determinar la concentración de carbón activado para la propagación *in vitro* de Asaí (*Euterpe precatoria M*).

1.4. HIPÓTESIS.

Ha. La concentración de sacarosa y carbón activo influyen en la germinación y desarrollo de los embriones de Asaí *in vitro* y el tiempo de aclimatación en condiciones controladas en el laboratorio de biotecnología vegetal.

Ho. La concentración de sacarosa y carbón activo no influyen en la germinación y desarrollo de los embriones de Asaí *in vitro* y el tiempo de aclimatación en condiciones controladas en el laboratorio de biotecnología vegetal.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Generalidades

La palmera de Asaí, huasaí, palma murrapo, naidí, o (en portugués) açáí (*Euterpe precatoria*) es una palmera nativa del norte de Sudamérica, apreciada por las propiedades nutritivas de su fruto.

Según (Mostacedo et al., 2003). En Bolivia existen varias especies de asaí: El *Euterpe precatoria* más conocido como asaí boliviano o asaí solitario es la especie más conocida. Se trata de una especie de palmera nativa que es abundante en toda la región amazónica de Bolivia, el departamento de Pando, el norte de La Paz y el norte del Beni, y en los bosques de Santa Cruz y Cochabamba donde es común en los bosques amazónicos, bosques húmedos de llanura y el bosque húmedo del escudo precámbrico. (GBIF, 2019) explica que el asaí brasilero (*Euterpe oleracea*) es originaria del este de Brasil, y ha sido introducido en la región por su facilidad de cultivo en sistemas agroforestales. Solo ocurre en plantaciones y sistemas agroforestales. En 2005 se registró una tercera especie del género *Euterpe* en Bolivia: *E. luminosa*, también conocido como pacsoa, una palmera cuyo palmito también es comestible.

2.2 Clasificación taxonómica

Según (MORENO & MORENO, 2006) El nombre científico es *Euterpe Precatoria Mart.*, conocido más comúnmente por los nombres de asai, Palmito o palmito mantequilla. Pertenece a la familia Arecaceae, orden Arecales, clase Liliopsida (Monoc.) y filo Magnoliophyta. Se caracteriza por ser una planta de elevada altura, y crece en tierras bajas de la Amazonia y en tierra firme.

Por tanto, esta palmera pertenece a la siguiente jerarquía taxonómica (Borgtoft et al., 1993 citados por Apuri, 1996 y Killeen et al., 1993):

Clasificación taxonómica

Clasificación taxonómica del asaí	
División	Magnoliophyta
Sub división	Angiosperma
Clase	Liliopsida (Monocotiledóneas)
Sub Clase	Arecidae
Orden	Arecales
Familia	Areceaceae
Sub Familia	Arecoideae
Género	Euterpe
Especie	Precatoria
Nombre Común	Asaí

Según Gutiérrez y Peralta (2001) mencionan que, el nombre común de esta palmera es “açai” (Brasil) asai (BOLIVIA), “y” palmiche” (Colombia), “huasí” (Perú). Su consumo data de tiempos precolombinos y es un producto muy importante en la alimentación de la población amazónica por que aporta nutrientes al organismo.

2.3. Descripción botánica

Según (Moraes, 1966) El asaí (*Euterpe precatoria*) es una palmera monoica, conspicua tanto en bosques de tierra firme como en bosques inundados estacionalmente; es una especie en subdosel, heliófila en medios umbrófilos.

Su tronco, denominado estípite es recto, cilíndrico, de color gris claro y delgado, mide entre 7 y 20 centímetros de diámetro. Esta palmera unicaule, es decir de un solo tronco, alcanza un máximo de 20 a 25 m de altura.

El estípite merece una aclaración a parte porque no es exactamente un tronco como los demás árboles, sino que este tipo de tallo es exclusivo de las palmeras. Se

caracteriza por no ramificarse y por conservar su diámetro desde el nacimiento hasta la punta terminal del estípote, por lo que no suelen tener mucho grosor. En su superficie se distinguen anillos o "marcas" producidos por los pecíolos de las hojas caídas, cuyo dibujo y textura es típico en los tallos de las palmeras adultas o "marcas" producidos por los pecíolos de las hojas caídas.

Estas "marcas" se conocen como cicatrices foliares circulares.

Sus hojas son envainadas por un pecíolo erecto que nace de la parte terminal del estípote, denominada corona o acrocaulis. Estas hojas son compuestas y con folíolos pinnatisectos, distribuidos de forma horizontal en ambos lados del nervio central, lo que se conoce como hojas pinnadas o palmadas. El número de folíolos por hoja puede variar de 40 a 80 pares por hoja, cada uno de aproximadamente 65 cm. de largo por 3 cm. de ancho. Los pecíolos miden entre 20 y 30 cm. Estas hojas pueden alcanzar grandes dimensiones, de hasta 2-3 metros de largo.

La inflorescencia del asaí es en racimo, situado debajo de la base de las hojas, compuesto por un raquis, de aproximadamente 50 cm. de largo, que a la vez se ramifica en raquillas, donde disponen las flores de la palmera.

Las flores de asaí son unisexuales de color morado y tamaño aproximado de 2 mm de diámetro. Cada raquilla contiene dos flores masculinas o estaminadas, y una flor femenina o pistilada. Las flores presentan brácteas y tienen el perianto separado en 3 sépalos y 3 pétalos.

Según el (Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi, 2015) Los frutos carnosos son unas drupas de forma globosa, pequeñas, de 1,2 cm de diámetro y 1,5 gr de peso aproximadamente. Son de color verde, que cuando maduran adquieren tonalidades moradas. Algunas variedades asaí mantienen el color verdoso en la madurez. El fruto está recubierto por una capa pulverulenta de color grisáceo cuando madura. En el mesocarpio carnoso del fruto se encuentra la pulpa, de 1-1,5 mm de espesor y color violáceo.

En el interior de cada fruto se encuentra una semilla, redondeada y de color café, que mide aproximadamente 6 mm de diámetro. Esta semilla ocupa el 60% del volumen de este pequeño fruto.

2.4 Habidad y distribución del asaí (*Euterpe precatoria*)

Según Henderson *et al.* (1996) citado por Gutiérrez y Peralta (2001) indican que, el asaí *Euterpe precatoria* se encuentra en Centro América, desde Guatemala hasta Panamá y Sudamérica desde Colombia hasta Bolivia. Crece hasta los 2000 m. sobre el nivel del mar. En la región amazónica es común encontrarla cerca de los márgenes de los ríos, en zonas periódicamente inundadas, aunque aún también llega a ser abundante en las partes altas de las pendientes y en tierras firmes.

Según (Araujo-Murakami *et al.*, 2016) En Bolivia crece de forma natural en toda la región amazónica de Bolivia, incluyendo el departamento de Pando, el norte del departamento de La Paz y Beni, y en los bosques de Santa Cruz y Cochabamba (Mostacedo *et al.*, 2003). Ocurre tanto en bosques de tierra firme y de escudo precámbrico (bosques altos) como en bosques de várzea y de igapó (bosques bajos) pero abunda más en suelos arcillosos, lateríticos y profundos. Suele desarrollarse mejor en bosques estacionalmente inundables y en algunos sitios pantanosos puede formar densas poblaciones.

Según Johnson (1996) menciona que, en los bosques tropicales, las palmeras tienen una distribución amplia como especies del sotobosque y del dosel. La especie (*Euterpe precatoria*) es una de las especies que se adaptan a los bosques primarios y secundarios, además de ser una de las más comunes y de mayor distribución en América tropical.

Es una de las especies abundante en los bosques amazónicos de Bolivia. De hecho en un estudio que identifica 227 especies hiperdominantes en la región panamazónica (Ter Steege *et al.*, 2013), no solo fue identificada como la especie más abundante en el sud-este de la Panamazonía, pero también en tres otros tipos de bosques amazónicos, con una población total estimado de 5.21×10^9 individuos en toda la Amazonía continental y una abundancia máxima de 168 especies por hectárea.

Estimaciones de densidades de asaí en la Amazonía boliviana (adaptado de Vos et al. 2016)

Tabla 1. Densidad de plantas adultas por hectárea

PARAMETRO	ZONA	ESTIMACIONES	UNIDAD	FUENTES
Densidades típicas de plantas adultas por hectárea	Bajo	40.5 a 57	Palmeras /Ha	Shanley & Medina, 2005; Vos et al., 2016; Lorini, 2016; Leglise, 2017;
	Altura	5.4 a 39		

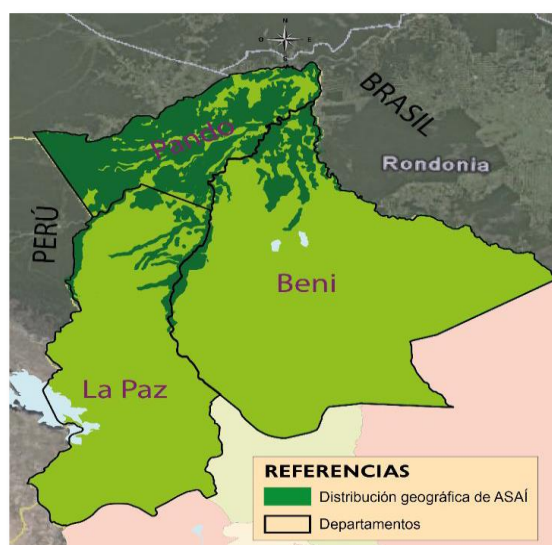


Figura N 1 Estimación de distribución de palmeras de asaí (*Euterpe precatoria*) en la Amazonía boliviana (Adaptado de Leglise, 2017).

2.5 Requerimientos climáticos

Las condiciones óptimas de crecimiento para el asaí se encuentran en climas tropicales o templados, con alto grado de humedad y preferiblemente con períodos de anegamiento del suelo. Según Jonhson (1996) señala que, los patrones de distribución de las palmeras del bosque tropical son complejos y están relacionados con variaciones sutiles de profundidad y fertilidad de suelos, drenaje, elevación y el grado de inundación anual.

Según INFOAGRO/IICA/GTZ (2002) indican que, el cultivo de asaí requiere de una zona cálida, con una temperatura promedio anual entre 24°C y 28°C, una intensidad

de luz con menos horas al año y una precipitación anual de 2.000 mm. a 5.000 mm., con períodos secos no mayores a 3 meses.

2.6 Requerimiento de suelo

Puede habitar también en bosques de altura, sin suelos inundables, aunque sí con alta pluviosidad y humedad del ambiente tal como indica JOHNSON, D. 1996. También argumenta que en cuanto a los suelos se prefiere que sean fértiles, bien drenados y de texturas livianas; en suelos arcillosos es importante el buen manejo. El tipo de suelo debe ser, franco arenoso, profundo y con buen drenaje plano, con pH entre 5.5 y 7.

2.7 Ambiente y exposición

Según Moraes y Velarde (2008) indican que la planta está acostumbrada a la espesa y densa selva amazónica, esta palmera está adaptada a vivir en sotobosque y el dosel arbóreo de estos ecosistemas. Por tanto, el asaí requiere poca luz, incluso durante la formación de las plántulas. Solamente cuando la palma sea adulta podrá tolerar cierta exposición solar.

2.8 Usos de la palmera de asaí

Según Stoain (2000) menciona que, al igual que las demás especies de su género (*Euterpe precatoria*) es un excelente ejemplo de una palmera multipropósito: en el norte amazónico de Bolivia, brinda hojas para el techo, frutos para pulpa, refrescos y vino de palma, raíces para remedios naturales, inflorescencias para escobas y troncos para la construcción, además del propio palmito. Los frutos son destinados al autoconsumo, mientras el palmito es su principal producto comercial.

Según (Araujo-Murakami et al., 2016; Lorini, 2016) Los frutos de asaí constituyen un recurso importante en la alimentación de la población amazónica desde antes de la colonización y poco a poco este producto forestal no maderable viene ganando importancia dentro de la economía familiar de las poblaciones amazónicas. La pulpa de los frutos no solo es usada para la elaboración de jugos conocidos como “leche de asaí”, pero también es aprovechada como ingrediente la elaboración de helados, tortas, galletas, bombones o incluso vinos y licores.

Según Zonta y Llanque (1994) citado por Apuri (1996) explican que en Bolivia la colecta y consumo es artesanal; las hojas son utilizadas en la fabricación de escobas, como medicina natural para aliviar dolores en el pecho, para la extracción del palmito realizada en la provincia Vaca Diez y regiones aledañas y los frutos para la elaboración de refrescos y helados.

2.9 Valor nutricional

Según Menezes E. Torres A, Srur A. explican que el valor nutricional de asai (*Euterpe precatoria*) es de cada 100 g la pulpa del fruto contiene 8,1 g de proteínas; 52,2 g de carbohidratos (incluidos 44,2 g de fibra) y 32,5 g de grasas; además 260 mg de calcio, 4,4 mg de hierro, 1002 U de vitamina A y pequeñas cantidades de vitamina C, así como ácido aspártico y ácido glutámico y además 319 mg de antocianina y otros antioxidantes. Su consumo de esta fruta es en forma de bebidas, jugos, dulces y helados.

Según Contreras *et al.* (1998) indican que, después de la castaña, el palmito y el fruto del asaí (*Euterpe precatoria*) es uno de los recursos no maderables de mayor importancia que el bosque aporta, desde el punto de vista económico, nutricional y social para las poblaciones locales.

El asaí boliviano tiene niveles muy altos de antioxidantes y ha sido reconocido como la especie con el más alto nivel de ORAC (Oxygen Radical Aborbance Capacity) con un valor de más de 200.000 eq. Trolox por cada 100 gramos de polvo de asaí liofilizado, superando en 200% el ya muy valorado asaí brasilero.

Según Benitez-Sánchez PL, León-Camacho M, Aparicio RA. explican que el asaí es una fuente rica de ácidos grasos omega ácidos (ácidos grasos omega 3, 6 y 9), que son esenciales para la salud humana. La combinación de los ácidos grasos Omega-3 y Omega-6 juega un papel importante en la regulación del metabolismo y ayudan en la salud del corazón. Estos ácidos grasos en forma de ácido oleico permiten reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y bajar los niveles de colesterol.

El cultivo intensivo del asaí se ha extendido dentro del territorio brasileño, durante los años 1980 y 1990, recientemente se ha visto la producción en el norte de Bolivia, en los Departamentos de Pando, Beni y norte de La Paz.

2.10 Composición química de la pulpa y jugo de Asaí

Según Villachica (1996a) menciona que, la pulpa de asaí es un alimento esencialmente energético, con un valor calórico y contenido de lípidos mayor que la leche cruda bovina y con contenido proteínico equivalente. La pulpa también es rica en calcio, con valor semejante a la leche bovina, en hierro y fósforo y, pobre en vitaminas, con excepción de la vitamina B1. Sin embargo, conviene resaltar que la calidad de proteínas de la leche bovina es muy superior, conteniendo 3.043 mg. De aminoácidos esenciales para la dieta humana en cada 100 gr., mientras que el asaí tiene apenas 1. 451gr. de estos aminoácidos por cada 100 gr. de pulpa.

En términos nutritivos, el asaí además que la pulpa contiene cerca de 8% de ácidos aminados, que ayudan a producir proteínas y regulan el metabolismo. Ricos en contenido de fibra dietética el polvo mantiene la salud digestiva y nos produce una sensación de saciedad por más tiempo. El aporte de calcio ayuda al desarrollo y la estructura de los huesos, mientras que la vitamina A protege al ojo y la retina (www.saborama.com, citado en Leglise, 2017).

Tabla 2. Datos químicos y nutricionales de pulpa de asaí

PARAMETRO	CONTENIDO (100 g de pulpa)
Valor energetico	233 kcal
Proteinas	3,1 g
Grasas	1,2 g
Carbohidratos	51,15 g
Calcio	86,99 mg
Fosforo	32,24 mg
Hierro	2,77 mg
Vitamina A	159,05 µg
Vitamina B1	0,03 mg
Vitamina B2	0,02 mg
Linoleico C18: n 6, omega 6	7,96 %

FUENTE: INLASA, 2017, citado en ficha de oferta Grupo Emprendedor Los Tucanes, comunidad Trinchera

2.11 Formas de propagación

Según HARTMANN, T. H; KESTER, E. D. 1997. La palmera de asaí se puede propagar mediante dos formas: Por medio de semilla o mediante el trasplante de uno de sus hijuelos. El asaí es una planta primitiva que no ramifica desde su estípote (tronco), sino que de la base de su tronco nacen diferentes hijuelos. Una planta adulta puede presentar más de 25 brotes. El asai se puede propagar con éxito mediante el trasplante de uno de estos hijuelos a un terreno con condiciones óptimas para su crecimiento.

Según Wiersum, K.F. 2004. Explica que para el cultivo por medio de semilla se debe tener cuidado para que la germinación sea efectiva, la descripción de dicho cuidado se encuentra descrito en el “Manejo Forestal de Asaí”. Asimismo, se debe tener en cuenta los requerimientos de esta planta y las condiciones óptimas para su crecimiento, entre las cuales están: La especie es típica de bosque maduro, puede cultivarse en bosques húmedos tropicales o premontañosos y zonas periódicamente inundables cercanas a ríos. La germinación de la semilla de asai se produce a los 25-39 días. Las semillas no toleran la desecación y deben mantenerse en condiciones siempre húmedas. Estas condiciones siempre húmedas. Estas condiciones hídricas afectan directamente en el éxito de la germinación de la misma.

2.12 Selección de plantas semilleras

Según Goitia (2003) menciona que, las semillas deben ser recolectadas en aquellos lugares donde existen bosques puros de árboles o rodales semilleros, tomando en consideración el control de la calidad en la colecta de la semilla. Los árboles productores de semillas deben tener ciertas características que garanticen la preservación de las especies, de forma óptima.

Según Tarima (1998) señala que, los árboles semilleros o padres, de los cuales se obtendrán los frutos y semillas para la reproducción, tienen una incidencia directa en

los nuevos individuos. Características referentes a la información genética y que se reflejan en: altura, diámetro, rectitud, tendencia a la bifurcación, torceduras y otros.

2.13 Obtención de la semilla

Según (Galeano & Bernal, 2010) La cosecha de los frutos se realiza en palmas que tengan tres o más racimos con abundantes frutos grandes y maduros, de acuerdo con la percepción de los cosechadores, no se distinguen variedades de frutos y solo se identifican las palmas que producen frutos más carnosos y grandes.

Según Villachica (1996b) indica que, la extracción de las semillas del fruto de aai (*Euterpe precatoria*), tiene pulpa adherida, por lo cual se remoja en abundante agua por dos a tres días, período en el cual la pulpa fermenta, se suaviza y es más fácil de remover. Después se lava la semilla con agua totalmente limpia. En esta fase se debe tener cuidado de utilizar agua sucia y eliminar la pulpa que queda en la depresión que presentan los tres poros que tiene cada semilla.

2.14 Desinfección de la semilla

Según Villachica (1996b) indica que, una vez que la semilla está limpia y libre de pulpa, se remoja por 10 a 15 min., en una solución que contenga un fungicida, que puede ser benlate (cuatro por mil) más vitabax, tecto, dithane o cualquier otro recomendado para hongos y un insecticida (actelic al tres por mil u otro similar), que controle los gorgojos de las semillas. Luego, la semilla se extiende limpia a la sombra y se deja escurrir y secar.

Según Goitia (2003) señala que, las semillas durante el proceso germinativo son atacadas por microorganismos patógenos, generalmente hongos e insectos. Para ello es conveniente desinfectar la semilla con ciertos productos antes o durante el proceso de germinación, entre ellos: Bicloruro de mercurio al (2 por 1000 g) (altamente peligroso), formol o formalina al 10%, óxido de zinc (puro), arazán, semezan, pentacloronitrobenceno y productos gaseosos (bromuro de metilo).

2.15 Tratamientos pre germinativos en las semillas

Según Hartmann y Kester (1997) indican que, para establecer tratamientos e inducir la germinación de las semillas, que incluye el desarrollo de mecanismos internos de letargo, es necesario conocer los requerimientos ecológicos y condiciones favorables para la supervivencia de las plántulas. De esta forma preservar las semillas y regular la germinación.

2.16 Calidad y análisis de semillas

Según Hartmann y Kester (1997) indican que, para la propagación de semillas es esencial un método para juzgar la viabilidad y puede expresarse como el porcentaje de germinación; el vigor de las semillas y de las plántulas son atributos importantes de calidad.

La calidad de las semillas de la especie (*Euterpe precatoria* M.) se determinará con el análisis del número de semillas por kilo (900 a 950 semillas/Kg) y el porcentaje de germinación (sobrepasando el 80% después de los 38 días de ser sembradas las semillas). Una cantidad muy pequeña de semillas demorará en germinar, requiriendo, muchas veces, períodos de hasta 50 días (Villachica, 1996a).

2.17 Crecimiento de los plantines

Según Rodríguez (1991b) menciona que, el crecimiento vegetativo es un proceso fisiológico muy complicado y depende de la mayoría de los otros factores que tienen lugar en una planta, como: la fotosíntesis, respiración, absorción de agua y sustancias nutritivas minerales y orgánicas. Los procesos fisiológicos se caracterizan por el desarrollo de los órganos de asimilación, como las raíces, tallos y hojas.

Según Villachica (1996a) señala que, el crecimiento inicial de las plantitas del asaí (*Euterpe precatoria*) es relativamente lento, no habiendo problemas de aprovechar las semillas de germinación tardía para la formación de plántulas, que, si son bien cuidadas, estarán en condiciones de ser llevadas al campo en la misma época que aquellas que germinaron primero.

2.18 Biotecnología vegetal

Según BENÍTEZ BURRACO A. (2005). La Biotecnología es el conjunto de técnicas que utilizan organismos vivos o partes de ellos para obtener productos modificarlos, para mejorar plantas o animales, o para desarrollar microorganismos con fines bien determinados, es decir, para la obtención de bienes y servicios. La biotecnología vegetal es la específica de las plantas.

2.19 Tipos de desinfecciones in vitro

Para la desinfección de los ex plantes, se emplearán los métodos propuestos por Vásquez (2017), Hidalgo (2014) y Rivera (2003), denominados como método I, II, y III respectivamente.

- El primer método es lavar con agua corriente y detergente comercial por cinco minutos y enjuagar con agua destilada.
- El segundo método se lo realiza con la cámara de flujo laminar.
- El tratamiento con hipoclorito de sodio es el último método.

2.20 Cultivo in vitro.

La expresión cultivo in vitro de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc), y el control de los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo In vitro de plantas.

2.21 Medios nutritivos

Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos y son formulados en forma más o menos empírica. Si bien se desarrollan periódicamente nuevas fórmulas comerciales, no existe hasta el presente un diseño racional que tenga en cuenta la composición

centesimal de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que controlan el crecimiento y la diferenciación. No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las mejores condiciones para su crecimiento y producción (Krikorian, 1991).

Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales in vitro (Heller, 1953, 1954; Murashige & Skoog, 1962; Gamborg, 1968 y 1970; Schenk & Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento.

2.22 Medio de cultivo Murashige & Skoog

Según Productos y Equipos Biotecnológicos (Probiotec P, 2017) “indica que Murashige & Skoog, se basa en la formulación de macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg) y micronutriente (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co), (Vitaminas x 100). Es rico en carbono (sacarosa) y nitrógeno esencialmente la sacarosa que ayuda grandemente en los medios in vitro se ha convertido en el medio más popular y usado en el cultivo in vitro de tejidos vegetales.

2.23 Sacarosa

La sacarosa o erróneamente sucrosa (por su nombre en inglés sucrose) es un disacárido formado por glucosa y fructosa. Su nombre químico es alfa-D-Glucopiranosil - (1→2) - beta-D-Fructofuranósido,² y su fórmula es C₁₂H₂₂O₁₁. Es un disacárido que no tiene poder reductor sobre el reactivo de Fehling y el reactivo de Tollens.

La sacarosa se adiciona al medio de cultivo de las plantas in vitro para permitir un rápido crecimiento heterotrófico ya que la producción de energía y carbohidratos por la fotosíntesis in vitro es muy poca debido a que los niveles de iluminación en las habitaciones destinadas a su crecimiento generalmente son bajos y no garantizan que se desarrolle adecuadamente este proceso (Leifert et al., 1995).

La señalización de Sacarosa ha estado involucrada en la asimilación y transporte de carbono y nitrógeno. Aunque en la naturaleza el metabolismo del fructano se induce principalmente durante los períodos de baja temperatura, el efecto del frío no es directo

sino a través de su papel en el aumento de la concentración de Sacarosa celular debido a una menor utilización de carbono. (Pontis & Martínez, 2013)

2.24 Carbón activo

El carbón activado en el cultivo in vitro tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, tiene la capacidad de atrapar diferentes tipos de moléculas, sustancias en exceso, entre estos los inhibidores de crecimiento. La capacidad de adsorción se debe a su fina red de poros y su amplia área interna, esto conlleva a favorecer a diferentes procesos de morfogénesis; además, se plantea la posibilidad que el carbón activado pueda ir liberando lentamente alguno de los reactivos adsorbidos, favoreciendo su respuesta en el cultivo de tejidos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Ubicación del área de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal perteneciente al Área de Ciencias Biológicas y Naturales (ACBN) de la Universidad Amazónica de Pando en el Municipio de Cobija. Departamento Pando.

Geográficamente se encuentra ubicada a $11^{\circ} 01' 59,20''$ latitud sur y $62^{\circ} 45' 31,13''$ de longitud oeste, cuenta con una temperatura promedio de unos 23°C a 36°C .



Figura N 2 Croquis de ubicación del laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Fuente: elaboración propia.

3.1.1 Clima

En Cobija, la temporada de lluvia es opresiva y nublada, la temporada seca es bochornosa y parcialmente nublada y es muy caliente durante todo el año. Durante el transcurso del año, la temperatura generalmente varía de 18°C a 33°C y rara vez baja a menos de 15°C o sube a más de 37°C .

3.2 MATERIALES

3.2.1 Material Vegetal

Se utilizaron semillas de Asaí, obtenidas de racimos con frutos en completo estado de maduración, presentando un color lila negro, las cuales fueron seleccionadas y desinfectadas previamente antes de ser utilizadas para introducir al medio de cultivo.

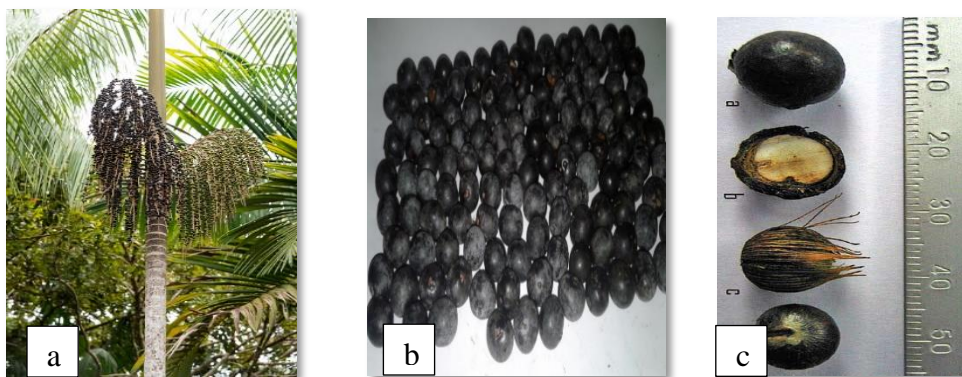


Figura N 3 Material Vegetal, semillas de asai (*Euterpe precatoria M*). Fuente: elaboración propia

a) Planta de asai b) Semillas de asai c) Características de la semilla

3.2.2 Materiales de trabajo

Los materiales, equipos, reactivos, e insumos que se utilizaron para la investigación estaban a disposición del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando, equipos de laboratorio, materiales de escritorio y algunos implementos que fueron cubiertos por parte del tesista.

Tabla 3. Materiales de trabajo

Equipos de laboratorio	Material de vidrio plástico y metal	Material químico	Material de gabinete
<ul style="list-style-type: none"> • Agitador magnético. • Temporizador (Control de horas luz - oscuridad). • Autoclave. • Balanza analítica. • Vitrinas con reguladores de luz • Cámara de flujo laminar de aire. 	<ul style="list-style-type: none"> • Frascos de vidrio para almacenar soluciones (250, 500 ml). • Matraces erlenmeyer (250, 125 ml). • Pipetas graduadas (5, 10 y 1 ml.). • Mechero de Alcohol. • Bandejas de metal. • Papel vinilo. • Alicata metálica. • Bisturi. • Pinzas. • Cajas petri. • Probetas (10, 50, 100, 500 ml.). • Tubos de cultivo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Macronutrientes • Micronutrientes • Vitaminas • Reguladores de crecimiento • Sacarosa. • Carbon activo • Ácido clorhídrico (HCL 0,1 y 1 N) • Hidróxido de sodio (Na) 	<ul style="list-style-type: none"> • Hojas de registro de datos. • Cámara fotográfica. • Cuaderno. • Marcadores. • Lápices. • Bolígrafos. • Regleta. • Hojas de registro de datos tamaño carta. • Computadora portátil.

<ul style="list-style-type: none"> • Horno microondas. • pH metro. • Refrigerador 	<ul style="list-style-type: none"> • Vasos de precipitación (25, 50, 100 y 1000 ml). • Vasos desechables. 	<ul style="list-style-type: none"> • OH 0,1 y 1 N • Carbohidratos • Alcohol etílico al 96% y 70%. • Hipoclorito de sodio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Impresora
--	---	---	---

4. METODOLOGÍA

4.1 Preparación de área de estudio

Se realizó la preparación del laboratorio para obtener la investigación correctamente, la esterilización de los materiales y herramientas a utilizar para no contaminar el medio de cultivo, la desinfección de herramientas se hizo mediante el auto clavado a una temperatura de 120 °C, luego se realizó la medición de los reactivos químicos y la preparación del medio de cultivo que ayudaron a la germinación de embriones de *asaí*. (*Euterpe precatoria M*).

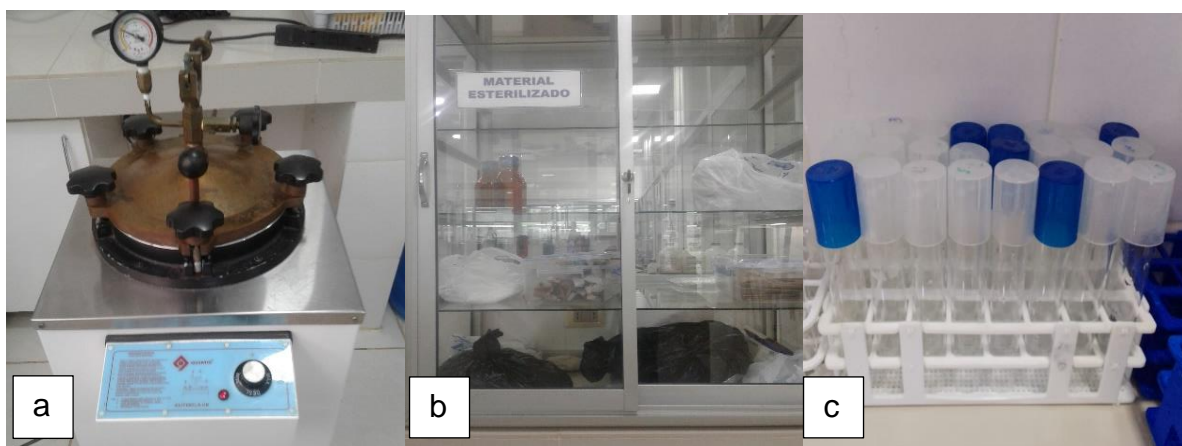


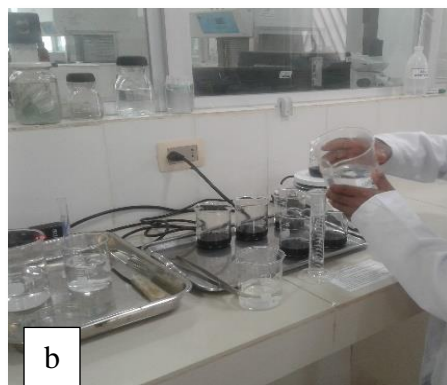
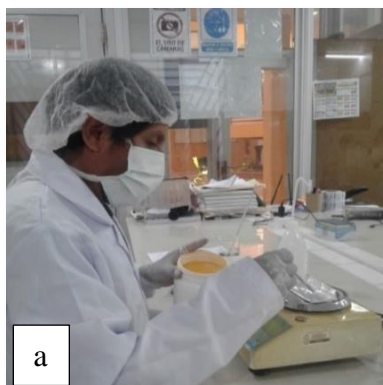
Figura N 4 Preparación de area de estudio. Fuente: Elaboracion propia

a) Autoclave b) Material esterilizado c) Tubos de ensayo

Se utilizaron jeringas, vasos precipitados y una balanza electrónica para medir las cantidades de soluciones a usar en la investigación, una vez realizada la mezcla se procedió a calibrar el PH de químicos se procedió a la colocación de las semillas de Asaí en tubos de ensayo con varias repeticiones para el nacimiento de embriones.

4.2 Preparación de medio de cultivo para la germinación de embriones in vitro.

El medio de cultivo se preparó en 8 vasos precipitados de solución de medio de cultivo para cada tratamiento, cada vaso precipitado preparado contiene 120 ml de medio de cultivo sumando en total 1800 ml, el medio de cultivo que se uso fue (Murashige & Skoog, 1962) constituidos de sales minerales y vitaminas, con suplemento de carbón activo 1 gr/L⁻¹, carbón 2 gr/L⁻¹, sacarosa de 0 gr/L⁻¹, 15 gr/L⁻¹, 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹, los tratamientos usados son: **T1** (0 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo), **T2** (15 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo), **T3** (30 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo), **T4** (45 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo), **T5** (0 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo), **T6** (15 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo), **T7** (30 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo), **T8** (45 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo) y como gelificante con 8 gr/L⁻¹ de agar por tratamiento, L. Cysteine 2 ml/L⁻¹, el pH fue ajustado con hidróxido de sodio NAOH 1N para subir el pH y cloruro de hidrogeno CLN 1N para bajar el pH, de esa manera se ajustó el valor del pH entre 5,69 a 5,79, los frascos utilizados consistieron tubos de ensayo de 50 ml, con 15 ml de medio de cultivo, los cuales fueron esterilizados en el autoclave a 120 °C y 1,3 atm de presión por 20 minutos. Así mismo en cada frasco fueron colocados los tratamientos, inmediatamente transferidos a la sala de crecimiento donde el fotoperiodo es de 16 horas, temperatura de 25°C y humedad relativa de 90%.



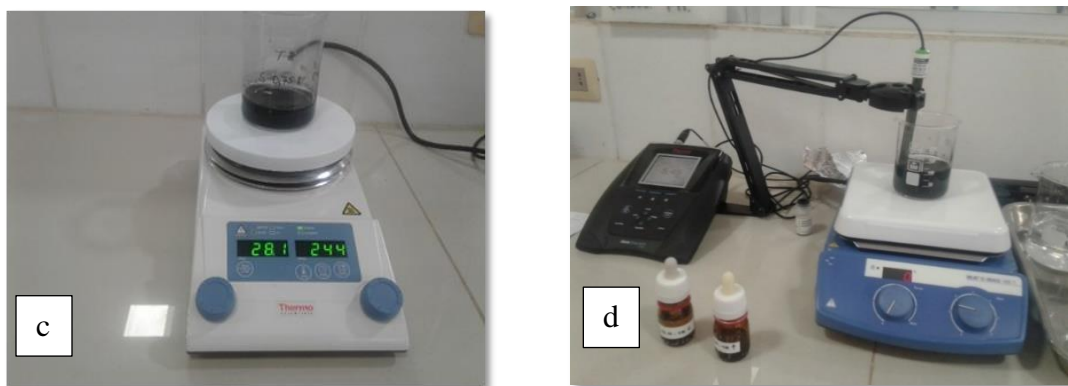


Figura N 5 Preparacion de medio de cultivo y ajuste de pH.

- a) pesaje de macro y micronutrientes b) dosificación del medio de cultivo
 c) mezclado con agitador magnetico d) ajuste de Ph

Cantidad de macro y micronutrientes que serán usados en la preparación del stock general o soluciones madres.

Tabla 4. Protocolo de Macro y micronutrientes

1L	
MACRONUTRIENTES	Mg/l
NH4 NO3	0,165
KNO3	0,19
CaCl2.2H2O	0,44
CaCl2.6H2O	0,655
MgSO4.7H2O	0,37
KH2PO4	0,17
1L	
MICRONUTRIENTES	Mg/L
MnsO4.4H2O	15,6
MnsO4.H2O	8,45
ZnSO4.7H2O	8,6
H3BO3	6,2
KI	0,83
NaMoO4.2H2O	0,25
CuSO4.5H2O	0,025
CoCl2.6H2O	0,025
FeSO4.7H2O	27,8
Na2EDTA.2H2O	37,3

Los macronutrientes y micronutrientes se usaron a concentraciones según Murashige y Skoog, esto como medio de cultivo base para los tratamientos establecidos. La marca de los reactivos que se usaron es, BAKER, SIGMA y BIOPACK Todos los reactivos que se utilizaron se pesaron por separado y se disolvieron por separado. El medio de cultivo fue preparado y mezclado dentro del laboratorio y posteriormente se hizo la distribución con una jeringa de 10 ml al tubo de ensayo.

4.2 Desinfecciones la semilla

Después de la recolección de semillas se sometió a una desinfección en alcohol a 70% (v/v) por 30 segundos e hipoclorito de sodio (NaClO) a 3.5% (v/v) por 20 minutos, en esa misma solución se añadió dos gotas de Tween 80, luego se hizo el enjuague del material vegetal en agua destilada repitiendo el proceso 4 veces para que quede libre de los químicos desinfectantes mencionados anteriormente. Inmediatamente el material vegetal *asaí* (*Euterpe precatoria M*) es transferido a la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas.



Figura N 6 Desinfección de semilla de asaí (*Euterpe precatoria M*).

a) Material de desinfección b) Desinfección de la semilla

4.3 Extracción e introducción de embriones

Una vez desinfectadas las semillas se procedió a la extracción de embriones los cuales se encuentran ubicados en la parte superior de la semilla, para la extracción del embrión se utilizó unos alicates de punta, alicate de corte y pinzas previamente esterilizadas.

La extracción del embrión se realizó en la cámara de flujo laminar para no contaminar con agentes patógenos (hongos y bacterias) con las herramientas anteriormente mencionadas, una vez avistada el embrión el cual posee un color rosa blanquecino de aproximadamente 3 milímetros de longitud con 1,5 milímetros de diámetro, la extracción del embrión se realizó cuidadosamente con la pinza e inmediatamente se introdujo al medio de cultivo, luego se hizo el sellado con para film cubriendo totalmente el tubo de ensayo donde se encuentra el medio de cultivo.

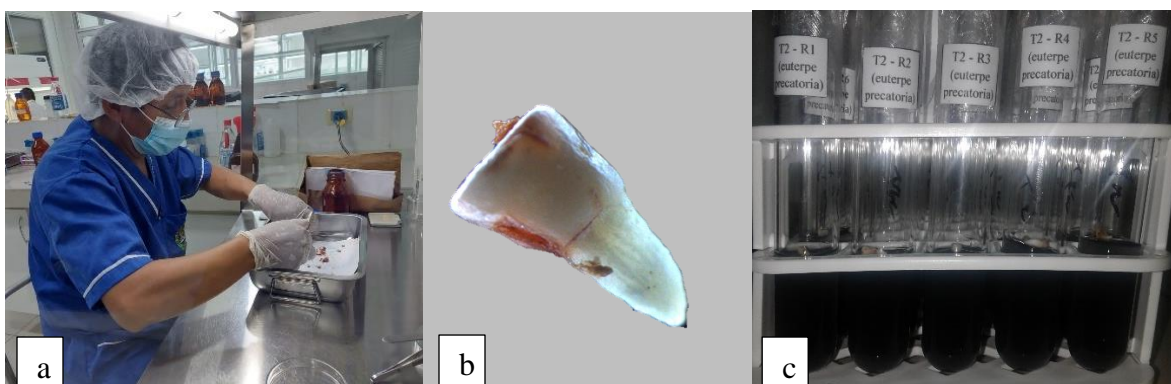


Figura N 7 Extracción e introducción de embriones. Fuente: elaboración propia

a) Extracción de embrión b) Embrión c) Introducción del embrión al medio de cultivo

4.4 diseño experimental y tratamientos

El diseño empleado para esta tesis es completamente al azar con 8 tratamientos y con 15 repeticiones por tratamiento. Por qué no existe patrón de varianza, el ambiente es controlado en laboratorio con un arreglo factorial distribuidos completamente al azar con un arreglo combinatorio. Las variables a evaluar serán los siguientes:

Tabla 5. Diseño experimental

FACTOR (A) Carbón Activo	FACTOR (B) Sacarosa	TRATAMIENTO
1 gr/L	0 gr/L	1 gr/L ; 0 gr/L = T1
	15 gr/L	1 gr/L ; 15 gr/L = T2
		1 gr/L ; 30 gr/L = T3
		1 gr/L ; 45 gr/L = T4
2 gr/L	30 gr/L	2 gr/L ; 0 gr/L = T5
		2 gr/L ; 15 gr/L = T6
	45 gr/L	2 gr/L ; 30 gr/L = T7
		2 gr/L ; 45 gr/L = T8

4.5 Diseño estadístico

Los datos de cada una de las variables de respuesta serán sometidos a los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas y se analizarán según el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = u + \alpha_i + B_j + E_{i(j)}$$

Donde:

I = 1, 2 carbon activo

J = 1, 2,3,4,5,6,7,8,9 concentración sacarosa

Y_{ij} = Variable de respuesta observada en una unidad experimental en el i-ésimo carbón activo de la j-ésima concentración de sacarosa.

U = Media general del ensayo o experimento

α_i = Efecto aleatorio del i-ésimo bloque \approx NIID (0, σ^2_r)

B_j = Efecto fijo del j-ésimo concentración de sacarosa

$E_{i(j)}$ = Efecto aleatorio de los residuales \approx NIID (0, σ^2_e)

El número de repeticiones 15 por lo tanto el número de unidades experimentales será de $15 \times 8 = 120$. Se evaluaron las siguientes variables: contaminación, oxidación, tasa de germinación *in vitro*, altura de plantines, longitud de raíz, volumen de raíz, número de raíz, diámetro de tallo y número de hojas.

Para evaluar los datos obtenidos y probar la hipótesis planteada en el trabajo de investigación, se realizará el Análisis de Varianza y la prueba de tukey, regresión, correlación, para este análisis se utilizó el programa SISVAR. De esta manera dar a conocer los resultados de los objetivos planteados para la especie nativa de asaí (*Euterpe precatoria* M.).

4.6 variables de respuesta

4.6.1 Análisis del porcentaje de germinación

Se registró el conteo de las semillas germinadas de cada tratamiento, hasta los 60 días desde la introducción al medio de cultivo *in vitro* realizada, identificando el momento en el que la semilla germine en el medio de cultivo, en el grafico se observa que los tratamientos 1 y 5 no germinaron por la nula existencia de sacarosa en el mismo.

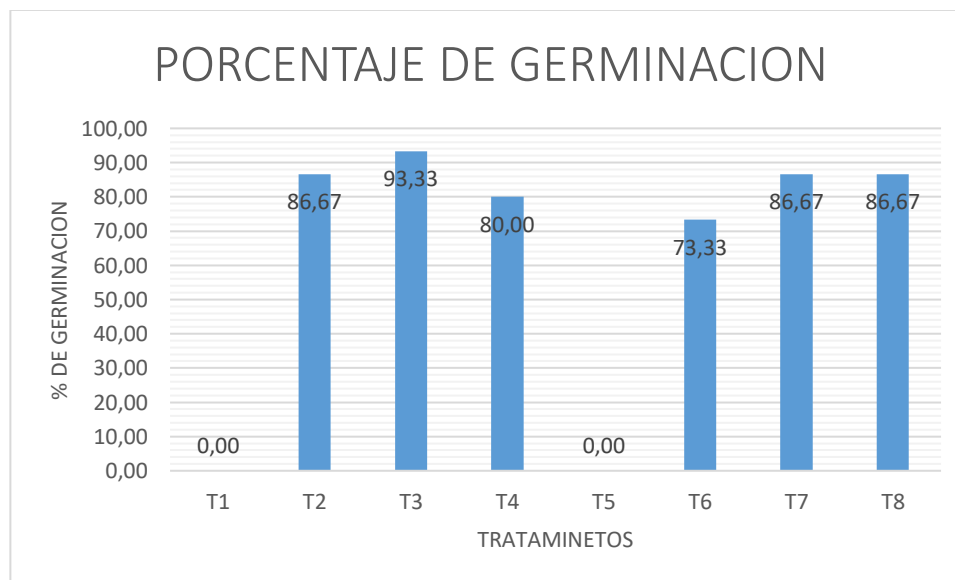


Figura N 8 Porcentaje de germinación. Fuente: elaboración propia

4.6.2 Hinchazón de embriones

Una vez terminada la introducción de embriones al medio cultivo fueron inmediatamente transferidos a la sala de crecimiento donde el fotoperiodo es de 16 horas, temperatura de 25°C y humedad relativa de 90%.

Al momento de evaluar la hinchazón del embrión de asaí se observó que a los 6 días estas comenzaron a aumentar su volumen, más concretamente en los tratamientos: **T2** (15 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo) y **T6** (15 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo) promovió una mayor hinchazón de los embriones.

Los tratamientos: T1 (0 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo) y T5 (0 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo) se observó que no aumentaron su volumen a causa de la falta de sacarosa.

4.6.3 Emisión de plúmula

La formación de plúmula es uno de los primeros eventos morfo fisiológicos que se observan en la germinación in vitro.

Después de 10 días de la introducción de los embriones de asaí (*Euterpe precatoria* M) al medio de cultivo se pudo evidenciar la emisión de la plúmula o la parte aérea (PA).

El embrión presento una curvatura debido a la elongación celular, en el desarrollo de la plúmula se observa una coloración que varía de blanco a morado, característico de esta especie debido a la presencia de antocianinas.

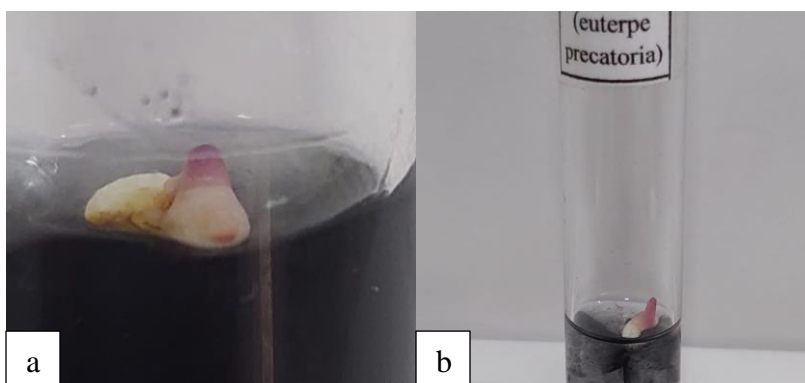


Figura N 9 Hinchazón, y emisión de plúmula. Fuente: elaboración propia

a) Elongación e hinchazón de embrión b) Emisión de la plúmula

4.6.4 Emisión de raíz

Al mismo tiempo que se desarrolla la plúmula, se pudo observar que el embrión presento una emisión radicular, originando el crecimiento de la raíz.

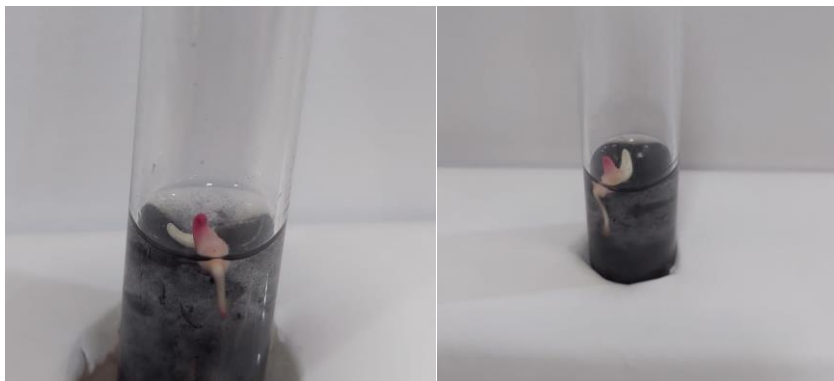


Figura N 10 Emisión de raíz. Fuente: elaboración propia

4.6.5 Longitud de raíz

Al cabo de los 60 días se realizó la medición de la raíz, dando como resultado que varios tratamientos tuvieron un buen desarrollo de raíz.

Se pudo evidenciar que en algunas repeticiones algunas de sus raíces crecieron en forma vertical en sentido contrario del medio de cultivo, se origina por el espacio reducido de los tubos de ensayo.



Figura N 11 Longitud de raíz. Fuente: elaboración propia

4.6.6 Volumen de raíz

El volumen de raíz se determinó con base en el principio de Arquímedes, usando una probeta graduada con agua, se sumergió las raíces en el agua sin tocar las paredes de la probeta, se registró en mililitros (ml) la cantidad de agua desplazada en la probeta graduada, con el dato del diámetro de la probeta y la altura de agua desplazada por la raíz se obtuvo el volumen de raíz.

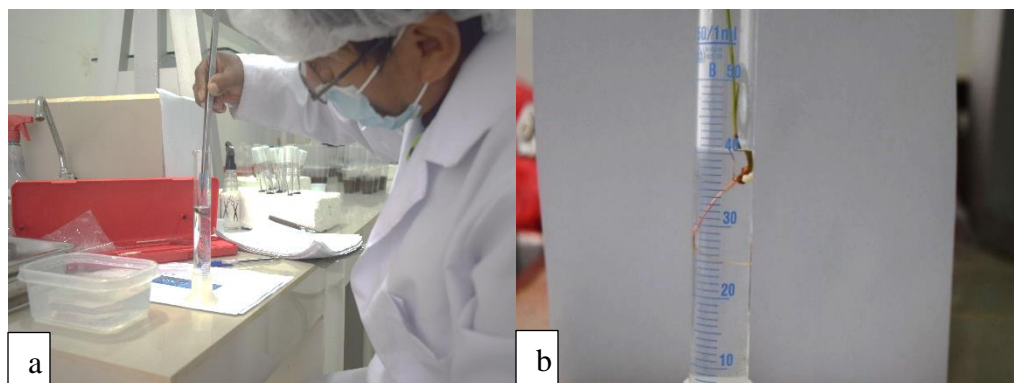


Figura N 12 Longitud de raíz. Fuente: elaboración propia

a) Introducción de la raíz a la probeta graduada b) Medición de volumen de raíz

4.6.7 Numero de raíz

El número de pelos radicales o raíces, se obtuvo de forma individual de las 15 repeticiones de cada tratamiento sumando un total de 120 repeticiones.

La medición del número de raíces se realizó de forma manual, extrayendo los plantines de su medio de cultivo con la ayuda de una pinza previamente desinfectada, a continuación, se puso el plantin sobre una hoja de papel blanca el cual nos facilita a determinar la cantidad de raíces que contiene cada plantin.



Figura N 13 Numero de raíces. Fuente: elaboración propia

4.6.8 Altura de plantines

Para determinar la altura se aprovechó que los plantines estaban fuera del medio de cultivo luego de medir el número de raíces.

El procedimiento de medición se realizó con la ayuda de unas regletas con medida milimétrica, la medición se hizo desde el cuello que es la parte que separa la raíz del tallo, hasta la copa de la planta.



Figura N 14 Medida de altura de planta. Fuente: elaboración propia

4.6.9 Diámetro de tallo

El diámetro de tallo se obtuvo extrayendo los plantines de su medio de cultivo, se debe recalcar que todo el procedimiento se lo realizó bajo asepsia, desinfectando los instrumentos de trabajo para prevenir la contaminación con hongos y bacterias, la medición se realizó con la ayuda de un instrumento de medición milimétrico conocido

como Calibrador Digital de Cuña, el calibrador se ubicó en el centro del tallo del plantin para tener una buena referencia del desarrollo y grosor del tallo.

Los datos de medición fueron en milímetros (mm) para una mayor precisión y un buen resultado del estudio de la investigación.



Figura N 15 Medida de diámetro de tallo. Fuente: elaboración propia

4.6.10 Número de hojas

El número de hojas nos indica el buen desarrollo de la planta, para esto se hizo el conteo manual de cada una de la plántula, se hace el conteo de las primeras hojas verdaderas que observaron a los 60 días después de la introducción al medio de cultivo.



Figura N 16 Conteo de número de hojas. Fuente: elaboración propia

4.6.11 Oxidación

Según (Poma, 2014) la oxidación es causada por la liberación de fenoles al medio de cultivo, que reaccionan con el oxígeno del frasco, produciendo una coloración rojiza, amarillenta o café.

Indica, que los compuestos fenólicos actúan como inhibidores del crecimiento emitidos por el propio cultivo *in vitro*, capaces de causar el envejecimiento y muerte del mismo. Se han documentado incluso diferencias en los grados de oxidación entre los cultivares de una misma especie.

La oxidación se evaluó según la escala de niveles de oxidación diseñada por Quintero y Jarma (2002) en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, en la cual se designaron 6 valores de acuerdo con la intensidad de oxidación (oscurecimiento) del medio de cultivo. Esta escala tiene valores de 0 (medios no oxidados) a 6 (medio completamente oxidado), incluidos valores de 1, 2, 3, 4 y 5, los cuales hacen también referencia a niveles intermedios de oxidación. Los niveles se representan en una escala con intensidades en tono gris, igualmente espaciados desde el 15% hasta el 90%. Se considera la semejanza que estas tonalidades tienen con la coloración real presentada en el medio de cultivo.

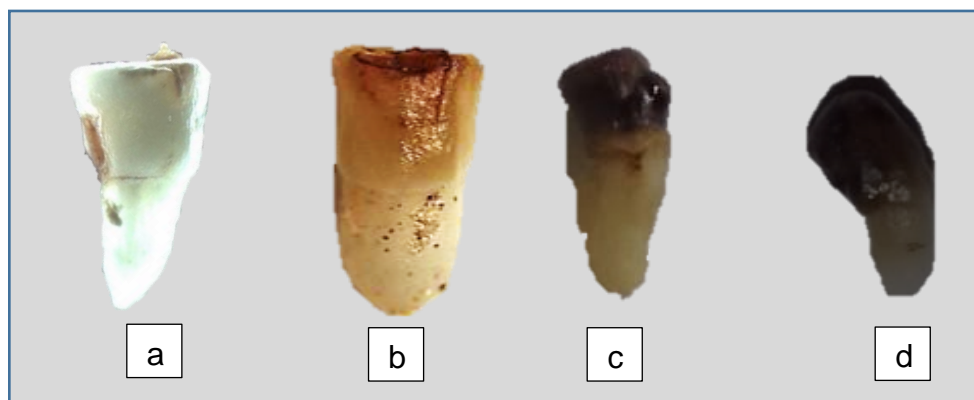


Figura N 17 Grado de oxidación de embriones. Fuente: elaboración propia

- a) Embrión con nivel de oxidación entre 1-2
- b) Embrión con nivel de oxidación entre 2-3
- c) Embrión con nivel de oxidación entre 4-5
- d) Embrión con nivel de oxidación entre 6

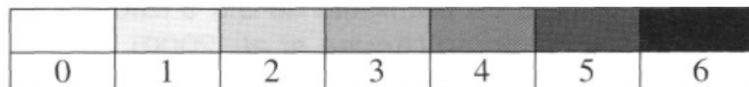


Figura N 18 Escala para medir niveles de oxidación en medios de cultivo.

**Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. Universidad de Córdoba
(Quintero y Jarma, 200)**

4.7 Contaminación

Según (Suárez E. P., 2020) las plantas en su condición de crecimiento natural tienen asociadas una fauna y flora microbiana con la cual interactúan sin verse afectado su desarrollo; por el contrario. Algunos microbios, dentro de los que se encuentran ciertas bacterias, actúan como agentes endófitos benéficos asociados al sistema vascular de la planta. Sin embargo, en condiciones de cultivo *in vitro*, estos microbios se convierten en contaminantes o agentes facilitadores de contaminación para los explantes.

La contaminación en cultivos *in vitro* ocurre cuando no se realiza una buena y adecuada desinfección, ya sea de los materiales de trabajo como del material vegetal, que en este caso son las semillas de asaí.

En caso de que ocurra la contaminación en el cultivo *in vitro* provoca que este sea inseguro y no apto para su estudio.

Los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos y bacterias denominados vitropatógenos.

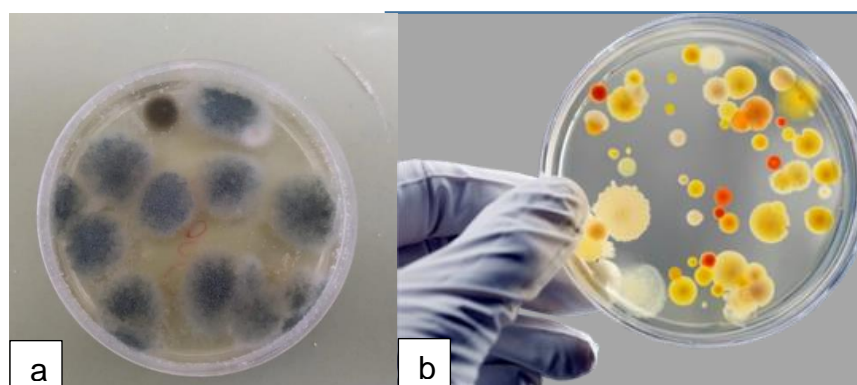


Figura N 19 Contaminación *in vitro*. Fuente: elaboración propia

a) Contaminación por hongos b) Contaminación por bacterias

4.7.1 Hongos

Para el control de hongos se hizo la verificación visual a todas las repeticiones de cada uno de los tratamientos, sus contaminaciones se caracterizan por el crecimiento micelial que rápidamente cubre el medio de cultivo resultando en la muerte rápida de los tejidos, los hongos más frecuente en cultivos *in vitro* son: Aspergillus, Candida, Cladosporium, Penicillium, la forma más sencilla de reconocer estos hongos es que tienen la característica de crecer en forma de pelos filamentosos, que se reproducen mediante esporas, estos pelillos resaltan a simple vista.

4.7.2 Bacterias

A diferencia de los hongos la principal característica de las bacterias es la forma de crecimiento, puede identificarse por la presencia de manchas de aspecto acuoso y coloración variada en el medio de cultivo, tiene una peculiar textura mucosa parecida al gel, los síntomas más comunes de la contaminación bacteriana en los tejidos vegetales son la muerte completa del material vegetal.



Figura N 20 Contaminación por bacterias. Fuente: elaboración propia

Según (Agris, 2005) las bacterias más comunes entre los microbios contaminantes de tejidos vegetales en condiciones *in vitro* con mayor incidencia son: Acinbacter, Agrobacterium, Bacillus, Corynebacterium, Erwinia, Enterobacter, Lactobacillus, Pseudomonas, Staphylococcus y Xantomona.

5 RESULTADOS

5.1 ANALISIS ESTADISTICO

5.1.1 Oxidación

Para el control de niveles de oxidación en germinación de embriones de asaí (*Euterpe precatoria*) en cultivo *in vitro*, se pudo observar en la gráfica de barras, aplicando 15 gr/L⁻¹, 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, varios niveles de oxidación, el 73% de las 120 repeticiones no presentan oxidación y están en el rango de (0 a 1), lo que significa que los embriones no presentan oxidación, el 14%, 6% y 7% en la germinación de embriones presentan oxidación, y se encuentran en el rango de oxidados (2, 3 y 4) lo cual no afecto en su desarrollo, por ultimo no se evidencio embriones con niveles de oxidación (5,6) que se consideran completamente oxidados.

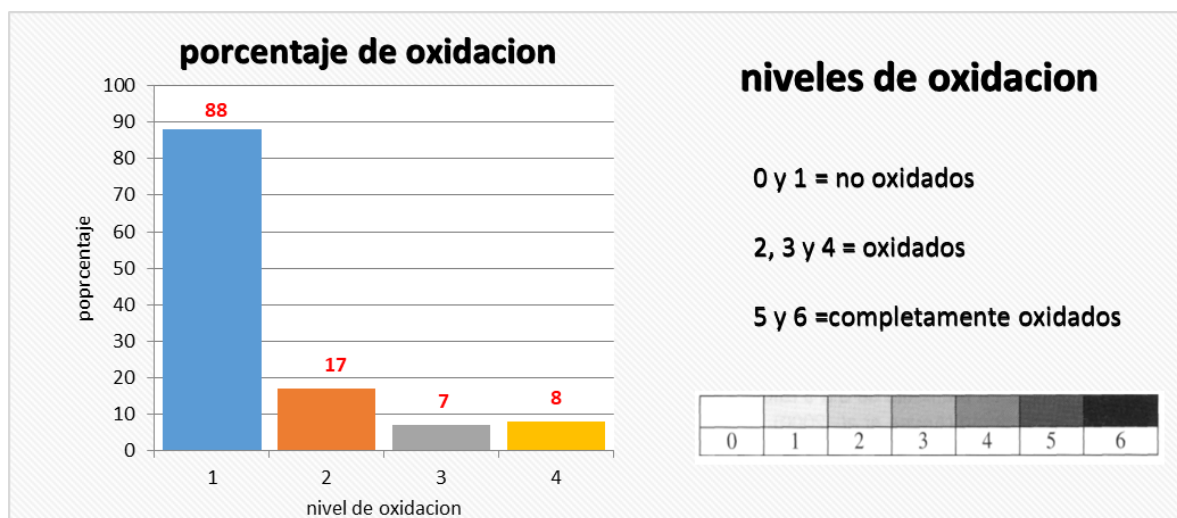


Figura N 21 Porcentaje de oxidación de embriones de asaí (*Euterpe precatoria*) con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

5.1.2 contaminación

5.1.2.1 Hongos

Para el control de contaminación por hongos en la germinación de embriones en el medio de cultivo *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*), se observa en la gráfica circular, aplicando 15 gr/L⁻¹, 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la

cantidad de carbón activo, se evidencio que solo el 1% de las 120 repeticiones resulto contaminado por hongos y el 99% no presenta contaminación por hongos lo que refleja una buena desinfección de equipos de laboratorio, materiales de trabajo, material vegetal y el cuidado en la introducción de embriones al medio de cultivo y el sellado del tubo de ensayo de manera correcta.



Figura N 22 Variable de Respuesta. Porcentaje de contaminación por hongos de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

5.1.2.2 Bacterias

Para el control de contaminación por bacterias en la germinación de embriones en el medio de cultivo *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*), se observa en la gráfica circular, aplicando 15 gr/L⁻¹, 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, se evidencio que solo el 13% de las 120 repeticiones tuvo contaminación por bacterias, se puede evidenciar que el porcentaje de contaminación por bacterias es más alto que la contaminación por hongos, esto se debe a que las bacterias tienen más resistencias a los tipos de desinfección de equipos de laboratorio, materiales de trabajo, material vegetal, el 87% no presenta contaminación por bacterias gracias al cuidado en la introducción de embriones al medio de cultivo.

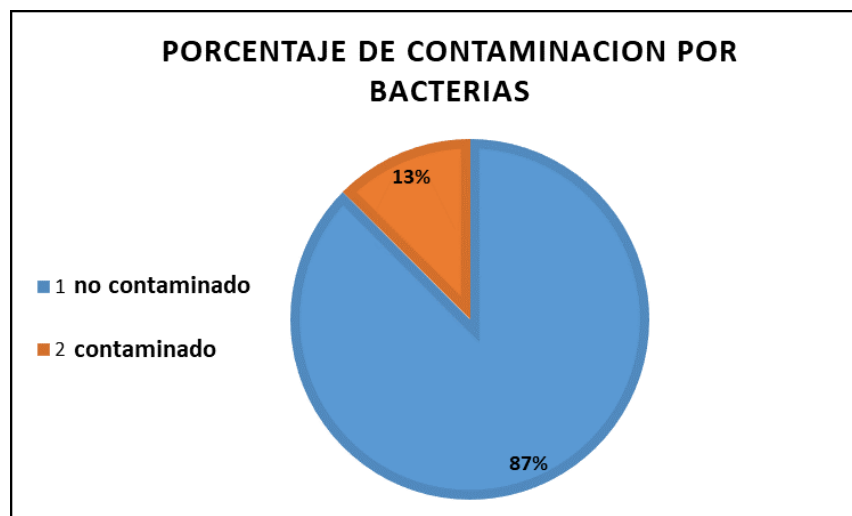


Figura N 23 Variable de Respuesta. Porcentaje de contaminación por bacterias de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

5.1.3 Análisis de varianza

Para el análisis de variancia en la propagación *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*) se observó que entre los factores de sistemas de sacarosa (0 gr/L^{-1} , 15 gr/L^{-1} , 30 gr/L^{-1} y 45 gr/L^{-1}) y de carbón activo (1 gr/L^{-1} y 2 gr/L^{-1}) existe interacción en la variable de germinación ($p < 0,01$), el coeficiente de variación es menor al 30 %, esto significa que el diseño experimental es el adecuado.

Tabla 6. Análisis de varianza para la germinación total de plantines de asaí (*Euterpe precatoria*) *in vitro* en interacción de carbón y sacarosa.

FUENTE DE VARIACIÓN	CUADRADO MEDIO (CM) Germinación
Sacarosa	3,54**
Carbón activo	0,67 *
Scr *C. activo	1,23 **
C.V(%)	24,93

Notas: ^{ns} no significativo ($p > 0,01$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$)

Para la variable de germinación total de los plantines de asaí (*Euterpe precatoria*) *in vitro*, se muestra que en los tratamientos: **T1** (0 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo) y **T5** (0 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo) la germinación fue nula por la falta total de sacarosa, los tratamientos: **T2** (15 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo), **T4** (45 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo), **T6** (15 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo), **T7** (30 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo) y **T8** (45 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo) tuvieron una tasa de germinación moderada y el tratamiento **T3** (30 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo) tuvo una tasa de germinación muy alta y por lo cual se lo considera como el tratamiento más exitoso de la investigación.

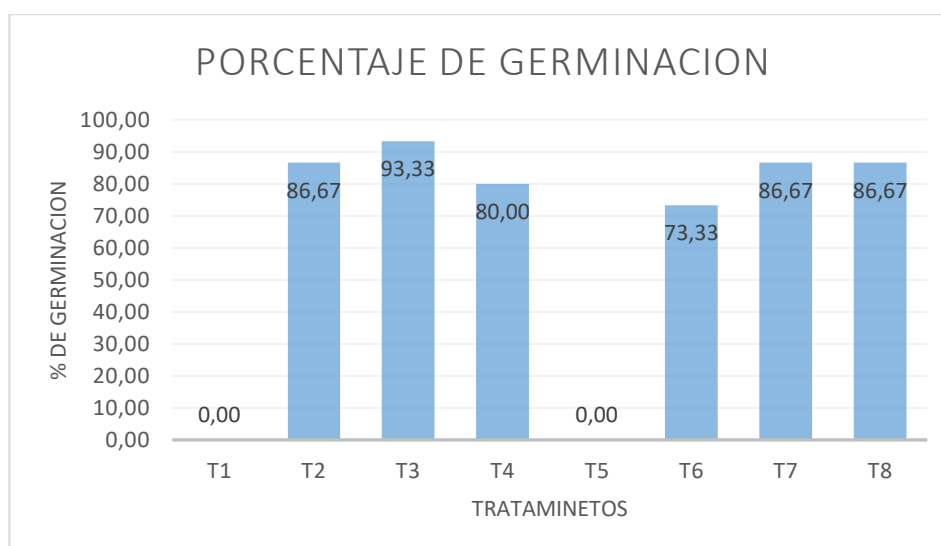


Figura N 24 Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

5.1.4 Análisis de varianza. Experimento 1- Fase de Germinación *In Vitro*.

Para el análisis de varianza de germinación *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*) se observó que entre los factores de sistemas de sacarosa (0 gr/L⁻¹, 15 gr/L⁻¹, 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹) y de carbón activo (1 gr/L⁻¹ y 2 gr/L⁻¹) existe interacción en la variable de emisión de plúmula ($p < 0,01$), para las variables de hinchazón y emisión de raíz primaria no existe interacción entre los factores de carbón activo y sacarosa, se puede evidenciar que existe diferencia significativa en las independientes de hinchazón y emisión de raíz primaria.

El coeficiente de variación para las tres variables es menor al 30 %, esto significa que el diseño experimental es el adecuado para la investigación.

Tabla 7. Análisis de varianza para germinación de embriones de asaí (*Euterpe precatoria*) *in vitro* en interacción de carbón y sacarosa.

FUENTE DE VARIACIÓN	CUADRADO MEDIO (CM)		
	Hinchazón	Emisión de raíz primaria	Emisión de plúmula
Sacarosa	5,98**	5,29**	3,54**
C. activo	0,008 ns	0,07 ns	0,67 *
Sacarosa*C. activo	0,19 ns	0,097 ns	1,23 **
C.V(%)	16,77	20,03	24,93

Notas: ^{ns} no significativo ($p > 0,01$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$)

Para la variable independiente hinchazón de embriones *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*), se pudo observar en la regresión de segundo grado, aplicando 15 gr/L⁻¹ y 30 gr/L⁻¹ de sacarosa que estadísticamente son iguales, independientemente de la cantidad de carbón activo, se evidencio mayor hinchazón de embriones estadísticamente, así mismo se pudo observar que los tratamientos: 0 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, fueron estadísticamente inferiores promoviendo una menor hinchazón de embriones.

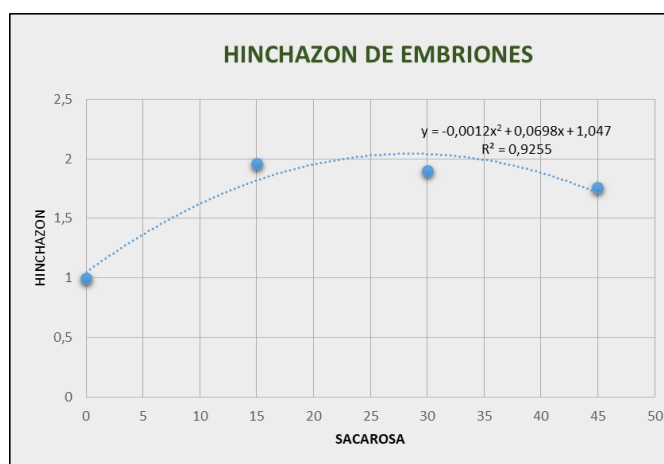


Figura N 25 Variable de Respuesta. Hinchazón de embriones de asaí *in vitro* con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

Para la variable independiente de emisión de raíz primaria *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*), se pudo observar en la regresión de segundo grado, aplicando, los tratamientos con 15 gr/L⁻¹, 45 gr/L⁻¹ y 30 gr/L⁻¹ de sacarosa son estadísticamente iguales, independientemente de la cantidad de carbón activo, se evidencia mayor emisión de raíz primaria de embriones estadísticamente, así mismo se pudo observar que el tratamiento que contiene 0 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, fue el estadísticamente inferior a los otros tratamientos en emisión de raíz primaria.

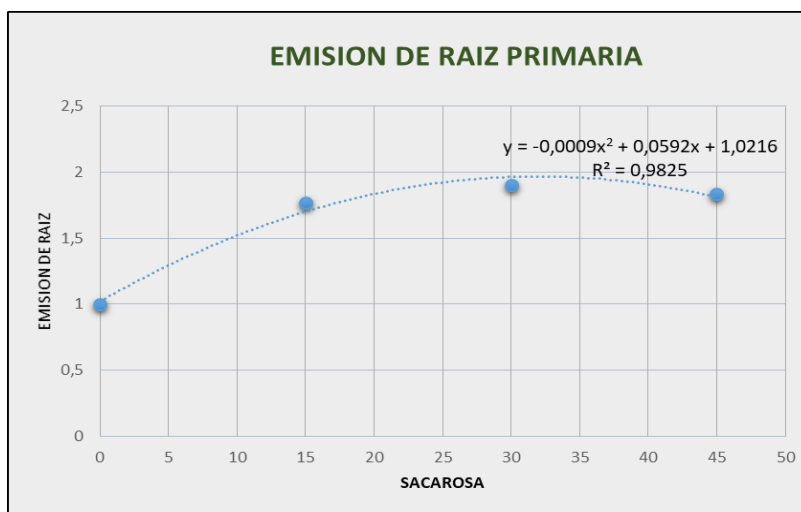


Figura N 26 Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

Para la variable independiente de emisión de plúmula de embrión *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*), se pudo observar en la gráfica, que el tratamiento tres (T3) con nivel de 30 gr/L⁻¹ de sacarosa 1 gr/L⁻¹ de carbón activo, se evidencio mayor emisión de plúmula estadísticamente, así mismo se pudo observar que los tratamientos 0 gr/L⁻¹, 15 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, fueron estadísticamente inferiores promoviendo una emisión de plúmula.

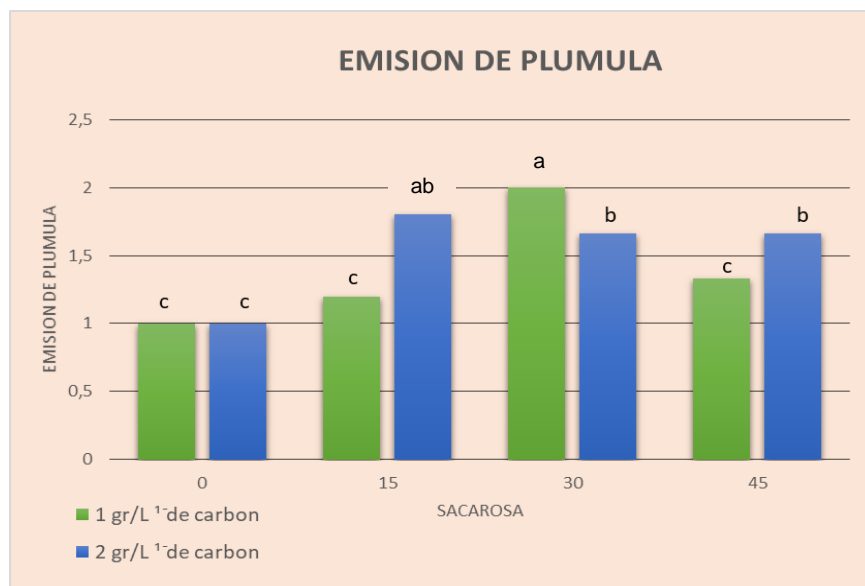


Figura N 27 Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

5.1.5 Análisis de varianza. Experimento 1- Fase de enraizamiento

Para el análisis de varianza para la fase de enraizamiento *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*) se observó que entre los factores de sistemas de sacarosa (0 gr/L⁻¹, 15 gr/L⁻¹, 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹) y de carbón activo (1 gr/L⁻¹ y 2 gr/L⁻¹) existe interacción en las variables de emisión de volumen de raíz y número de raíces ($p < 0,01$), para las variables longitud de raíz existe diferencia significativa en las independientes sacarosa y carbón activo.

El coeficiente de variación para la longitud de raíz supera el 30 %, lo que nos indica que el diseño experimental no es el adecuado para la investigación, mientras que las variables de volumen de raíz y número de raíces muestran que su coeficiente de varianza están debajo el 30%, esto significa que el diseño experimental es el adecuado para la investigación.

Tabla 8. Análisis de varianza para el desarrollo de raíz de asaí (*Euterpe precatoria*) *in vitro* en interacción de carbón y sacarosa.

FUENTE DE VARIACIÓN	CUADRADO MEDIO (CM)		
	Longitud de raíz	Volumen de raíz	Numero de raíz
Sacarosa	137,27 **	4,77 **	4,23 **
C. activo	0,95 ns	2,72 **	0,34 **
Sacarosa*C. activo	3,26 ns	1,08 **	0,056 **
C.V(%)	23,35	29,74	23,92

Notas: ^{ns} no significativo ($p > 0,01$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$)

Para la variable independiente longitud de raíz de embriones *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*), se pudo verificar en la regresión de segundo grado, aplicando 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹ de sacarosa que estadísticamente son iguales, independientemente de la cantidad de carbón activo, se evidencio mayor longitud de raíz en los embriones estadísticamente, los cuales se encuentran en el rango entre (3 a 3,5 cm) de longitud de raíz, así mismo se pudo observar que los tratamientos con 0 gr/L⁻¹ y 15 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, fueron estadísticamente inferiores promoviendo un menor desarrollo y longitud de raíz.

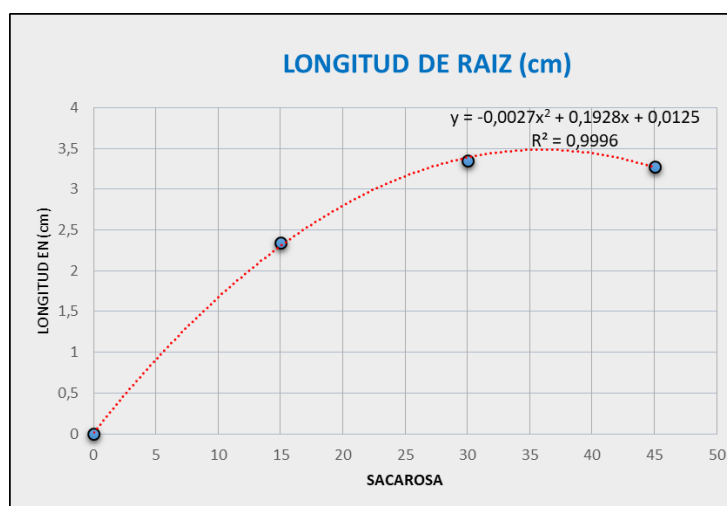


Figura N 28 Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

Para la variable independiente volumen de raíz de embriones *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*), se pudo verificar en la gráfica, que aplicando 30 gr/L⁻¹ de sacarosa y 1 gr/L⁻¹ de carbón activo se evidencio mayor volumen de raíz en los embriones estadísticamente, los tratamientos con 15 y 45 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo muestran resultados buenos y por último se pudo observar que el tratamiento con 0 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, no muestra resultados en el volumen de raíz.

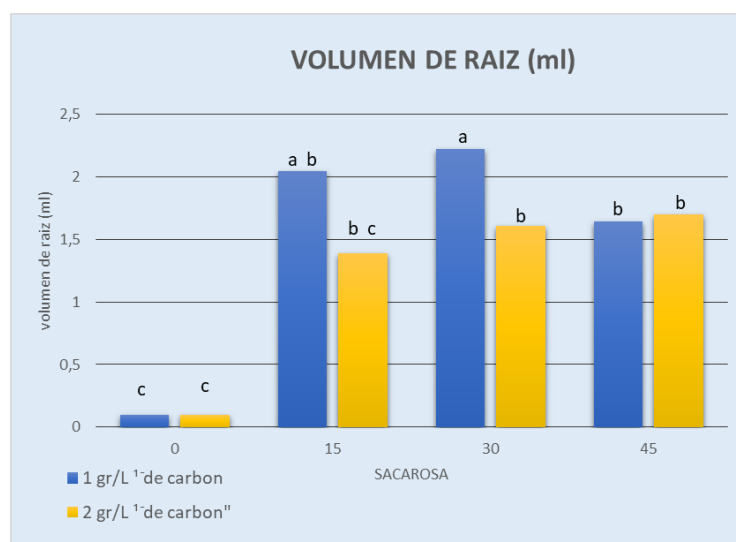


Figura N 29 Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

Para la variable independiente número de raíces de embriones *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*), se pudo verificar en la regresión de segundo grado, aplicando 15 gr/L⁻¹ de sacarosa y 2 gr/L⁻¹ de carbón activo, se evidencio una mayor cantidad de raíces en las plántulas estadísticamente, aplicando 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo que estadísticamente son iguales, con buen desarrollo en la cantidad de raíces, así mismo se pudo observar que el tratamiento con 0 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo fue un resultado estadísticamente inferior.

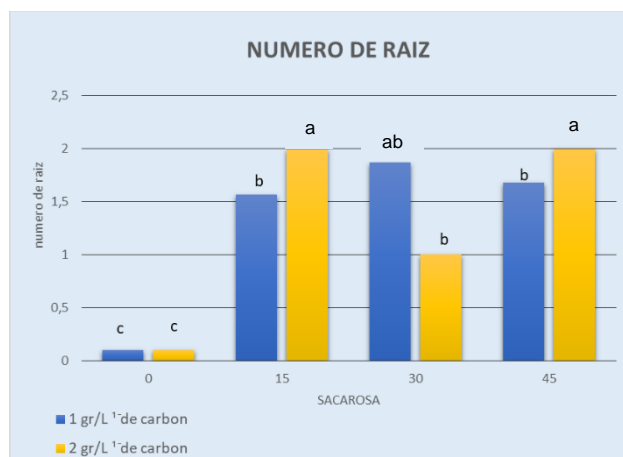


Figura N 30 Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

5.1.6 Análisis de varianza. Experimento 3- Fase de desarrollo

Para el análisis de varianza de la fase de desarrollo *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*) se observó que entre los factores de sistemas de sacarosa (0 gr/L⁻¹, 15 gr/L⁻¹, 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹) y de carbón activo (1 gr/L⁻¹ y 2 gr/L⁻¹) no existe interacción en las variables de altura de la planta, diámetro de tallo y numero de hojas, existe diferencia significativa en las independientes.

El coeficiente de variación para las variables de altura de planta, diámetro de tallo y numero de hojas están tienen el coeficiente de varianza están en el rango del 30%, esto significa que el diseño experimental es el adecuado para la investigación.

Tabla 9. Análisis de varianza para el desarrollo de plantines de asaí (*Euterpe precatoria*) *in vitro* en interacción de carbón y sacarosa.

FUENTE DE VARIACIÓN	CUADRADO MEDIO (CM)		
	Altura de planta	Diámetro de tallo	Numero de hojas
Sacarosa	8,41 **	3,42 **	1,13 **
C. activo	0,28 ns	0,02 ns	0,02 ns
Sacarosa*C. activo	0,44 ns	0,15 ns	0,01 ns
C.V(%)	25,17	19,74	13,97

Notas: ns no significativo ($p > 0,01$); * significativo a 5% ($p < 0,05$); ** significativo a 1% ($p < 0,01$)

Para la variable independiente alturas de plantines *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*), se pudo observar en la regresión de segundo grado, aplicando 15 gr/L⁻¹ y 30 gr/L⁻¹ de sacarosa, que son estadísticamente iguales independientemente de la cantidad de carbón activo, se evidencio una mayor longitud de altura de planta superando los (2cm) estadísticamente, aplicando 45 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, dio como resultado una moderado crecimiento de plantines y los tratamiento con 0 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo fueron estadísticamente inferiores de toda la investigación.

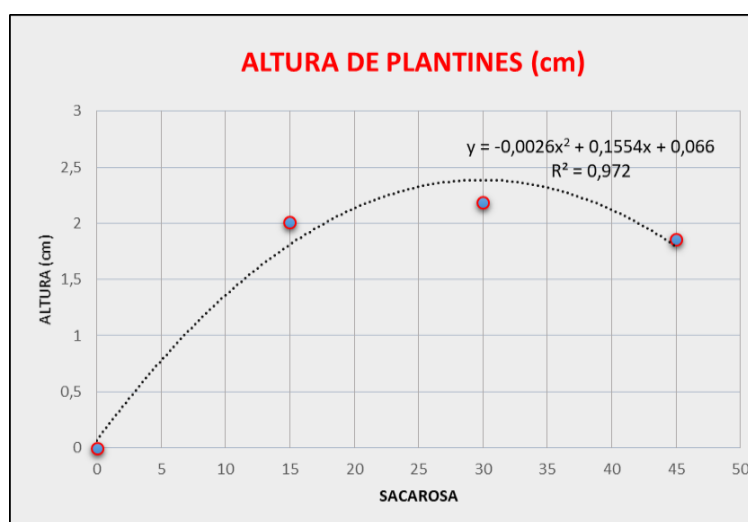


Figura N 31 Variable de Respuesta. Altura de plantines de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

Para la variable independiente de diámetro de tallo de germinación *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*), según el grafico se observa en la regresión de segundo grado, que aplicando 15 gr/L⁻¹, 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹ de sacarosa, los cuales son estadísticamente iguales independientemente de la cantidad de carbón activo, se observa una mayor diámetro de tallo estadísticamente, y los tratamiento con 0 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo fueron estadísticamente inferior de toda la investigación.

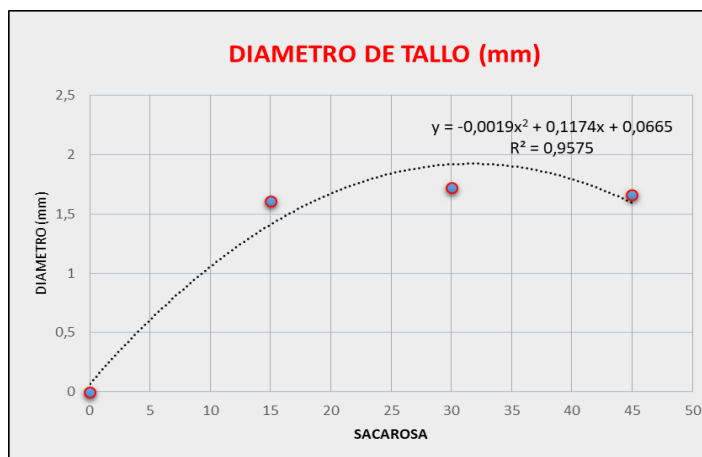


Figura N 32 Variable de Respuesta. Porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

Para la variable independiente de número de hojas de germinación *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*), se pudo observar en la regresión de segundo grado, aplicando 15 gr/L⁻¹, 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹ de sacarosa, que son estadísticamente iguales independientemente de la cantidad de carbón activo, se evidenció un mayor desarrollo de la cantidad de hojas estadísticamente, y el tratamiento que no tuvo resultados favorables para la investigación fue el que contiene 0 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo.

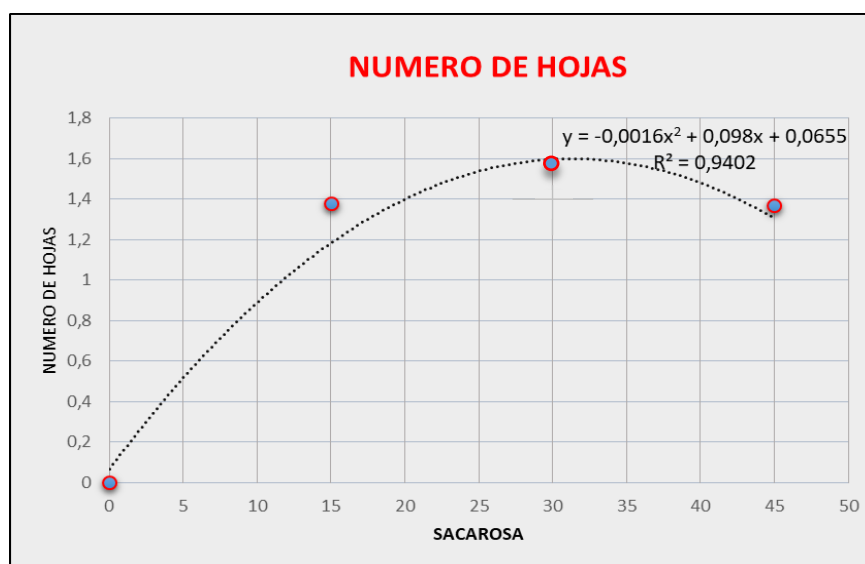


Figura N 33 Variable de Respuesta. Numero de hojas de asaí con niveles de sacarosa. Fuente: Elaboración propia.

6. DISCUSIÓN

La sacarosa es un carbohidrato que juega un papel importante al momento del desarrollo del embrión, en condiciones *in vitro* para la propagación del asaí (*Euterpe precatoria*) (Jiang et al., 2015). Los carbohidratos ayudan al desarrollo de embriones, facilitando la formación de las primeras hojas, tallos y raíces en el momento de la germinación como fuente de energía en la fotosíntesis en condiciones *in vitro*, también Torres et al. (2005) evaluaron que con 1, 2 y 3% de sacarosa como fuente de carbohidratos en la germinación de embriones *in vitro* y obtuvieron 70, 76 y 88.89% de germinación respectivamente. Ulises et al. (2010) menciona que los embriones *in vitro* mediante el uso de sacarosa y glucosa en combinación con Murashigue y Skoog (MS) obtuvieron 85% y 41% de germinación, respectivamente.

En la presente investigación el uso de la sacarosa en concentraciones de 30 gr/L⁻¹ se observó mayor germinación en asaí (*Euterpe precatoria*), así mismo Trigiano & Gray, 2011 menciona que en concentración de 20-60 de sacarosa son comúnmente utilizado como fuente de carbono y energía para el desarrollo de las plantas en condiciones *in vitro*. Según Rolland 2006 menciona que los azúcares mantiene el potencial osmótico del metabolismo y el desarrollo de los embriones y plántulas en propagación *in vitro*. En la presente investigación se pudo observar que los tratamientos que contienen 30 gr/L⁻¹ de sacarosa presentaron mayores características de crecimiento debido a los carbohidratos que aporta la sacarosa, tal como explican (Rolland et al., 2006); (Tognetti et al., 2013); (Mason et al., 2014) quienes argumentan que la sacarosa presenta funciones en el mantenimiento del potencial osmótico y además existen evidencias que sugieren que este azúcar participa como molécula señalizadora en conjunto con algunas hormonas vegetales en procesos metabólicos y de desarrollo de las plantas.

El carbón activo y la sacarosa constituyen dos factores importantes que contribuyen al crecimiento exitoso en cultivo *in vitro* de embriones. karunatare (1989). En el presente trabajo de investigación el uso de carbón activo se pudo observar en la formación de raíces y la parte foliar, también en la prevención de oxidación de embriones en el medio de cultivo *in vitro*, en este aspecto, Pan y van Staden (1998)

señalan que el carbón activado puede ser usado como promotor de crecimiento de la parte radicular y foliar en el cultivo in vitro, en función de la especie y del tipo de planta, establecido en condiciones de oscuridad, reguladores de crecimiento o libera sustancias promotoras de crecimiento de raíces en el medio de cultivo in vitro.

En la investigación de este proyecto se observó que el tratamiento con concentración de sacarosa de 30 gr/L^{-1} independientemente del carbón activo fue la mejor, tanto en la germinación de embriones como en el desarrollo de los plantas en condiciones in vitro de asaí (*Euterpe precatoria*), mientras tanto con concentraciones de sacarosa con 15 y 45 gr/L^{-1} el porcentaje de germinación y desarrollo de los plantines fue baja, esto concuerda con (Gago et al., 2014) quienes mencionan, cuando la concentración de sacarosa es muy elevada, tiende a disminuir la capacidad fotosintética en la etapa de germinación y desarrollo de plantas in vitro y cuando las concentraciones de sacarosa son bajas, se incrementa la capacidad fotosintética y con ello se reducen las anomalías fisiológicas de las plantas in vitro, también Assy-Bah y Engelmann (1993) señalaron que cuando la concentración de sacarosa es muy baja o la ausencia de este, no desarrollaba el embrión incluso decrecía el desarrollo de plantas en cultivo in vitro hasta conduciéndolos a la muerte, lo que concuerda con los tratamientos de la presente investigación, los tratamientos 1 y el tratamiento 5 que contienen 0 gr/L^{-1} de sacarosa donde los embriones no tuvieron reacción alguna de germinación en su totalidad. Por otro lado, Assy-Bah y Engelmann (1993) afirman que alcanzaron resultados semejantes en el cultivo in vitro de embriones cigóticos de coco mediante el uso del medio de cultivo MS con la adición de distintas concentraciones de sacarosa (0, 5, 10, 15, 20, 60 g/l-L) en presencia de carbón activado (2 g/l-L), los cuales evidenciaron que a medida que se incrementa la concentración de sacarosa en el medio hasta 60 g/l-L aumenta el porcentaje de germinación de los embriones hasta alcanzar un 88%.

Butia capitata Neves et al. (2010) quienes encontraron que las semillas con mayor grado de maduración resultaron con menor oxidación, aumento de tamaño alargamiento mayor desarrollo de embriones in vitro, como plantas con mayor emisión de raíces y vainas foliares. Para la investigación de este proyecto se hicieron el uso

de los mejores frutos maduros recolectados directamente de la palmera de asaí (*Euterpe precatoria*) de los cuales el 83% germinaron con éxito tal como explica HU et. Al. (1976) indican que los embriones maduros germinan con éxito hasta 93%, también argumenta que los embriones no maduros se les puede aumentar el desarrollo y el poco porcentaje de germinación puede ser superada, mediante el cultivo in vitro.

En la presente investigación del proyecto se observa que las concentraciones nulas, los tratamientos T1 (0 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo) y T5 (0 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo) no germinaron por la ausencia de sacarosa y las concentraciones altas de sacarosa, obtuvieron una menor germinación de embriones in vitro de asaí (*Euterpe precatoria*). Esto concuerda con Torres et al. (2005) Explica que utilizaron concentraciones entre 10 gr/L⁻¹ y 80 gr/L⁻¹ para germinar embriones de *Heliconia* L. donde observaron que en estas concentraciones no contribuyeron para germinación, ya que 10 gr/L⁻¹ de sacarosa es una cantidad muy baja y 80 gr/L⁻¹ de sacarosa es una concentración muy alta provocando un desbalance osmótico, esto provoca una absorción de nutrientes de manera negativa en la biología de las plantas. Por otro lado, Azad (1998), Ferri y Woral (1966) citados por Coarite (2000), indican que el embrión para iniciar el proceso de germinación requiere de un medio de cultivo adecuado, que permita la absorción de humedad, nutrientes lo cual genera un aumento reversible de volumen en el comportamiento de los embriones en el medio de cultivo.

Al momento de evaluar la hinchazón de embriones in vitro de asaí (*Euterpe precatoria*), se pudo observar que aplicando 15 gr/L⁻¹ y 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, fueron los mejores resultados para la hinchazón de embrión, según Hartmann y Kester (1997) indican que, el factor más importante para la hinchazón de embriones es el contenido de humedad, que debe ser mayor del 60%, así como la influencia de la aireación, la que consiste en el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el propio embrión, haciendo una germinación rápida y uniforme. De igual manera, Grout y Millan (1985) y Wainwright y Scrace (1989) señalan que el medio de cultivo con una correcta concentración de azúcar incrementa

la cantidad de carbohidratos absorbidos por el embrión y aumenta también la energía disponible para ayudar a la hinchazón y posteriormente a la germinación de embriones in vitro, que actúan como órganos de reserva de carbohidratos que servirán para desarrollar la plúmula, raíz y las primeras hojas. Además, destacan que, aunque este mecanismo no está bien definido la concentración de sacarosa y los tipos de carbohidratos durante la hinchazón in vitro de embriones tienen una influencia significativa en el desarrollo y crecimiento del embrión.

Al momento de evaluar el desarrollo del embrión en el medio de cultivo in vitro, se observa que en su primera etapa de germinación, el embrión aumento de tamaño y alargamiento, formando la plúmula o la parte aérea y el desarrollo de la radícula la raíz primaria, se observa en la gráfica de variable de respuesta, el porcentaje de germinación de embriones de asaí con niveles de sacarosa, existe una interacción con carbón activo, la mayor parte de los tratamiento tuvieron éxito con la emisión de la plúmula y raíz primaria. Por otro lado Rodríguez (1991a) define que, la germinación es el proceso que consiste en una serie de cambios morfológicos y fisiológicos, que comienzan con la absorción de humedad y conducen a la ruptura de la cubierta seminal por la salida de la radícula y la plúmula, acompañada por divisiones y crecimiento de las células del embrión y aumento general de la actividad metabólica y el brote de la nueva planta, (Langford & Wainwright, 1987), aportan que la sacarosa tiene un efecto favorable sobre las plantas durante la micro propagación in vitro, el carbón activo ya sea (1 y 2 gr/L^{-1}) utilizados en los tratamientos, ayudo al crecimiento y división numérica de las raíces. En la variable de respuesta de longitud de raíces se pudo observar que aplicando 30 gr/L^{-1} y 45 gr/L^{-1} de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, se evidencio mayor longitud y numero de raíces en los embriones, los cuales se encuentran entre (3 a 3,5 cm) de longitud de raíz y también se pudo evidenciar que con 30 gr/L^{-1} y 45 gr/L^{-1} de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, presentan un mayor volumen de raíz superando el 80% de tratamientos evaluados lo que concuerda con Ostroluka et al. (2007) Quienes cuantificaron resultados de 80-95% de enraizamiento in vitro con la ayuda de 1 gr/L^{-1} de carbón activo, Según Noordwijk y Willigen (1987), explica que la buena formación de la raíz abastece las necesidades de carbohidratos y nutrientes

en el desarrollo de la plántula, también explica que pequeños sistemas radiculares pueden ser suficientes para lograr el máximo crecimiento vegetal, cuando el porcentaje de humedad y nutrientes es óptima.

Para la emisión de raíz primaria in vitro de asaí (*Euterpe precatoria*), los mejores resultados obtenidos contienen la cantidad de concentraciones de sacarosa (15 gr/L^{-1} , 45 gr/L^{-1} y 30 gr/L^{-1}) de sacarosa y (1 y 2 gr/L^{-1}) de carbón activo, en el medio de cultivo de Murashige y Skoog se pudo observar que al añadir carbón activo al medio de cultivo favorece la emisión de raíces, tornando una contextura oscura en el medio de cultivo.

En la investigación se destaca que el mejor resultado obtenido fue con (30 gr/L^{-1}) de sacarosa y (1 y 2 gr/L^{-1}) de carbón activo, esto concuerda con Roca y Mroginski (1991), quienes manifiestan que la sacarosa se ha usado para superar la emisión de la raíz primaria, Koroch et al. (1997), Mencionan que al incrementar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo de 0 a 45 g L^{-1} en conjunto con carbón activo aumentan el número de raíces en *Hedeoma multiflorum*, estos resultados coinciden con lo encontrado por Andrade y López (1994), quienes señalan que el incremento en la concentración de sacarosa y carbón activo causó un aumento en el número y longitud de raíces en gerbera. Sin embargo, en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) la respuesta fue a la inversa (Andrade, 1998). Al respecto, Edwin (1993), señala que la concentración de azúcar requerida depende del tipo y edad del material vegetal (semillas) utilizado, ya que generalmente el crecimiento y desarrollo es directamente proporcional al incremento en la concentración de azúcar hasta alcanzar un punto óptimo después del cual hay una disminución. José Gallego (1998) explica que las semillas mantienen su genética en todo su esplendor siempre que se conserven bien y con un poco de cuidado aguantan cinco o diez años sin problemas, aunque la capacidad de germinación va descendiendo año tras año.

Al momento de evaluar el número de raíces en la germinación de embriones in vitro de asaí (*Euterpe precatoria*), se pudo verificar en los resultados donde se aplicó 30 gr/L^{-1} de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, desarrollaron una mayor cantidad de raíces y en los tratamientos con las concentraciones de 15 gr/L^{-1}

$1, 45 \text{ gr/L}^{-1}$ de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo presentaron desarrollo en la cantidad de raíces aceptables para la investigación, así mismo se pudo observar que el tratamiento con 0 gr/L^{-1} de sacarosa, independientemente de la cantidad de carbón activo, el número de raíces fue nulo, Jiménez (1995) explica que concentraciones adecuadas de sacarosa en el medio de cultivo permiten lograr un crecimiento vigoroso y voluminosos de las raíces, mientras que la ausencia de sacarosa impide el desarrollo de raíces en el embrión. Además, las plantas presentan una mayor supervivencia al ser trasplantadas al suelo, tal vez debido a una mejor adaptación para soportar el estrés hídrico motivado por las condiciones de mayor presión osmótica donde se desarrollan.

El análisis de varianza de altura de planta, número de hojas y diámetro de tallo, muestra diferencias significativas por efecto de sacarosa en el medio de cultivo, también se evidencia que no existe interacción significativa en las variables independientes de carbón activo e interacción de sacarosa y carbón activo tal como se observa en el análisis de varianza para el desarrollo de plantines de asaí (*Euterpe precatoria*), de acuerdo a (Pospíšilová et al., 1999); (Hazarika, 2006) explican que las condiciones *in vitro* consisten en una alta humedad relativa, baja intensidad lumínica, baja concentración de CO_2 , altas concentraciones de azúcar (Sacarosa) como fuente de carbono, así como el uso de frascos cerrados para la prevención de contaminación microbiana. Por otra parte, estos resultados coinciden con los logrados por Cueto (2000), el cual obtuvo respuesta diferencial de la adición de diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo (45 y 60 g/l-1) sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de los embriones de coco.

En los resultados que se obtuvieron al momento de evaluar la altura de la planta, número de hojas y diámetro de tallo, se pudo observar que a los 60 días tuvo un desarrollo aceptable para la investigación, los tratamientos con ($15, 30$ y 45 gr/L^{-1}) de sacarosa y (1 y 2 gr/L^{-1}) de carbón activo en el medio de cultivo, muestran resultados similares que estadísticamente son iguales, como se observa en las gráficas de la fase de desarrollo, esto se debe a la buena preparación del medio de cultivo y la combinación de sacarosa y carbón activo, Según Rodríguez, (1991b) menciona que,

el crecimiento vegetativo es un proceso fisiológico muy complicado y depende de la mayoría de los otros procesos que tienen lugar en una planta in vitro, como: La fotosíntesis, respiración, absorción de agua y sustancias nutritivas minerales y orgánicas, así mismo indica que, el conjunto de procesos caracterizado por el desarrollo de los órganos de asimilación (raíces, tallos y hojas), recibe el nombre de crecimiento y desarrollo vegetativo, Quero (2004) y Chávez et al. (2010), indican que la sacarosa además de ser la fuente principal de carbono y energía también actúa en la formación de órganos como las raíces, tallos y hojas.

Lunn y col, (2014) argumenta que la sacarosa es el producto más abundante de la fotosíntesis y en condiciones in vitro la falta de sacarosa se compensa adicionando sacarosa manualmente. Además, juega un papel crucial durante el crecimiento y el desarrollo de la altura de plantas.

Por otra parte los resultados de la investigación en la variable de desarrollo de plantines no coincide totalmente con los resultados obtenidos por Alvarenga et ál. (2007) Quien explica que en la conservación in vitro del chayote (*Sedum edule*) con en el medio de cultivo de Murashige y Skoog y la adición de diferentes concentraciones de sacarosa (0, 30, 50, 60,70 y 80 gr/L⁻¹), los cuales reportan que para la variable longitud de la planta se detectaron cuatro grupos definidos: 30 y 40 gr/L⁻¹ (los mayores incrementos), seguidos por 50 y 60 gr/L⁻¹. Los tratamientos que incluyeron 0, 70 y 80 gr/L⁻¹ de sacarosa mostraron los menores incrementos, esta última coincide con la investigación, en el cual se tuvo un grupo de (15, 30 y 45 gr/L⁻¹) mostraron los mayores incrementos en la altura de plantas, tal como se muestra en la variable de respuesta de altura de plantines.

Al momento de evaluar el diámetro de tallo se hizo la medición con la ayuda de un Calibrador Digital de Cuña logrando obtener datos que muestran un desarrollo de tallo que son estadísticamente iguales en los tratamientos con contenido de 15 gr/L⁻¹, 30 gr/L⁻¹ y 45 gr/L⁻¹ de sacarosa y 1 gr/L⁻¹, 2 gr/L⁻¹ de carbón activo, se puede apreciar que los resultados alcanzados hubo diferencia significativa en la sacarosa ($p < 0.01$) mientras que en las variables independientes de carbón activo y la interacción de sacarosa-carbón activo no hubo una diferencia significativa, para los tratamientos

estudiados. Las distintas concentraciones de carbón activado adicionadas al medio de cultivo no tuvieron un efecto significativo diferencial en el número de hojas formadas en las plantas in vitro asaí (*Euterpe precatoria*). Y finalmente se pudo observar que en el número de hojas, la sacarosa tuvo efecto significativo ($P \leq 0.01$) en el número de hojas, también se pudo notar que a medida que transcurría el tiempo a cuatro, seis y ocho semanas aumentaba la formación de nuevas hojas. Estos resultados coinciden con los alcanzados por Karunarate (1989) quien explica que al evaluar el efecto de la sacarosa y el carbón activado en el cultivo de embriones de cocos enanos, donde observaron que al incorporar al medio de cultivo con 30 g/l-L de sacarosa y 2 g/l-L de carbón activo, los embriones germinaron rápidamente y desarrollaron las hojas a los 2 meses, este resultado concuerda al resultado obtenido por la investigación, ya que se pudo observar que los embriones asaí (*Euterpe precatoria*) mostraron las 2 hojas a los 2 meses. Borges et al. (2003) complementa que la sacarosa en el cultivo in vitro ayuda al desarrollo vegetativo continuo de las hojas expresado en la formación de nuevas hojas, engrosamiento de tallo y formación de yemas, producto a una importante actividad de crecimiento de las plantas in vitro en relación con el contenido nutritivo del medio de cultivo. Asimismo, estos resultados coinciden con lo encontrado por Andrade y López (1994), quienes señalan que el incremento en la concentración de sacarosa causó un aumento en el número de hojas de gerbera.

7. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y discusiones realizadas se llegaron a las siguientes conclusiones:

Se seleccionaron semillas de asaí (*Euterpe precatoria*) de plantas de asaí sanas y vigorosas con el cuidado de seleccionar frutos maduros, lo cual nos ayudó a obtener mejores resultados y un porcentaje de germinación en condiciones *in vitro* altos.

La utilización de 30 gr sacarosa en combinación de 1 a 2 gr de carbón activo promueve mayor germinación de 86.2% a 93.3%. para la propagación *in vitro* de asaí.

En cuanto al análisis sobre el porcentaje de germinación en condiciones *in vitro* de asaí (*Euterpe precatoria*), resultó estadísticamente significativo con interacción de sacarosa y carbón activo, siendo que los mejores resultados obtenidos fueron con los tratamientos: **T3** (30 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo) el cual obtuvo un 93.33 % de germinación y el tratamiento **T7** (30 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo) obteniendo un 86.67% de semillas germinadas.

Así mismo, en los tratamientos **T1** (0 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 gr/L⁻¹ de carbón activo) y **T5** (0 gr/L⁻¹ de sacarosa con 2 gr/L⁻¹ de carbón activo) tuvieron un 0% de germinación por la carencia total de sacarosa en el medio de cultivo.

Se pudo observar a los 10 días la emisión de plúmula y raíz primaria obteniendo el mejor resultado con los tratamientos que contienen (30 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 y 2 gr/L⁻¹ de carbón activo) los que nos asegura un buen desarrollo y crecimiento de la planta.

En cuanto a la altura de plantines y número de hojas de asaí (*Euterpe precatoria*) evaluados a los 60 días, muestran diferencias significativas en la aplicación de los tratamientos, influyendo en un mayor crecimiento en altura (2.5 cm/plantín) con los tratamientos que contienen (30 gr/L⁻¹ de sacarosa con 1 y 2 gr/L⁻¹ de carbón activo), para el número de hojas se pudo observar que los tratamientos con contenido de

sacarosa ($15, 30$ y 45 gr/L^{-1}) y ($1, 2 \text{ gr/L}^{-1}$) de carbón activo fueron estadísticamente iguales.

En el diámetro de los plantines de asaí, resultó estadísticamente significativo con sacarosa. Obteniendo un diámetro de tallo superior a los (1.5 mm/plantín) de los plantines de asaí con los tratamientos ($15, 30$ y 45 gr/L^{-1}) y ($1, 2 \text{ gr/L}^{-1}$) de carbón activo fueron estadísticamente iguales, presentando un ligero aumento de diámetro en los tratamientos que contienen (30 gr/L^{-1} de sacarosa con 1 y 2 gr/L^{-1} de carbón activo).

Finalmente se concluye que, en la variable longitud de raíces, resultó estadísticamente significativo en la interacción con sacarosa, presentando resultados estadísticamente similares entre los tratamientos que contienen (30 y 45 gr/L^{-1}) de sacarosa y ($1, 2 \text{ gr/L}^{-1}$) de carbón activo, la longitud de raíz para estos tratamientos se encuentra en el rango de (3 a $3,5 \text{ cm}$) lo que nos asegura una buena suministración de nutrientes a la planta para su desarrollo y crecimiento.

8. RECOMENDACIONES

En el control de la calidad de las semillas, en especial de especies nativas no maderables, es necesario aplicar parámetros sencillos y prácticos, cuando no se cuenta con todo el equipo necesario para un análisis completo sobre semillas.

Se recomienda obtener las semillas de plantas saludables los cuales no presenten hojas amarillas, fustes torcidos y poca fructificación.

Las semillas se deben deseleccionar de los mejores frutos maduros directamente de la planta y no así del suelo para evitar la contaminación de semillas, los frutos seleccionados deberán presentar una coloración lila oscuro eliminando los frutos verdes no maduros.

Se recomienda desinfectar los frutos y posteriormente las semillas antes de usarlos para realizar la investigación, la desinfección juega un papel muy importante ya que previene la contaminación de hongos y/o bacterias que nos dificultaran en el proceso de la investigación.

Una vez realizada la desinfección se debe extraer el embrión con suma delicadeza, haciendo el uso de pinzas y alicates previamente desinfectados, se debe realizar inmediatamente la introducción al medio de cultivo y el sellado correspondiente con para film a los tubos de ensayo.

Se debe de cultivar inmediatamente el embrión al tubo de ensayo con el medio de cultivo correspondiente cuando se está trabaja en la cámara de flujo laminar, por no ser así el embrión puede llegar a tener una deshidratación y así no desarrollar.

Luego de introducir el embrión al medio de cultivó se recomienda evaluar los medios de cultivo desde el momento de la introducción de embriones hasta los 30 días con el fin de detectar signos de contaminación y oxidación en los medios de cultivo, en caso de observar algún signo de contaminación u oxidación se debe proceder a la eliminación inmediata y su posterior remplazo.

Se recomienda el trasplante del medio de cultivo al sustrato en el tiempo de 60 a 80 días, cuando la planta presente 4 raíz formadas y desarrolle por lo menos dos hojas,

el sustrato debe presentar una humedad del 60% y la planta debe permanecer en semi-sombra al menos unos 60 a 90 días para adaptarse al entorno *ex vitro*.

Finalmente, se recomienda realizar el desarrollo de otras investigaciones, que aporten al estudio de la especie de asaí (por las cualidades de uso múltiple, para los habitantes del norte amazónico boliviano) y otras palmeras, tanto en viveros forestales como en el desarrollo de los plantines en su hábitad natural.

9. BIBLIOGRAFÍA

- (Sinchi), I. A. (2011). Caracterización de especies maderable y no maderables del bosque. *Proyecto forestal guaybare*.
- A., B. B. (2005). Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. *Editorial Reverte*.
- AGRICULTURA/GTZ., I. I. (2002). Unidad de Desarrollo Rural Sostenible . *Proyecto INFOAGRO. (en línea). infoagro.gov.bo*.
- AGRICULTURA/GTZ., I. I. (2002). Unidad de Desarrollo Rural Sostenible Proyecto INFOAGRO. *Bolivia. Edit IICA/GTZ., administrador@ infoagro.gov.bo*.
- al., J. e. (2015). Sucrose metabolism gene families and their biological functions. (S. Y. Jiang, Ed.) *Scientific Reports. Scientific Reports*.
- al., L. e. (1995). Mineral and carbohydrate nutrition of plant. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 83-109.
- Alvarenga-Venutolo S, A.-E. A.-A. (2007). Conservación in vitro de chayote (*Sechium edule*). *Agronomía Mesoamericana. Universidad de Costa Rica*, 65–73.
- Andrade R., M. y. (1994). Propagación in vitro de gerbera (*Gerbera jamesonii*). *Memorias del 11º Congreso de Fitogenética. Monterrey Nuevo León. México. p.*, 260.
- APURI, M. Z. (1996). Crecimiento de plantulas de Asaí (*Euterpe precatoria Martius*) en distintas intensidades de luz. *Tesis de Grado Licenciatura Ingeniería Forestal. Riberalta, Beni. Universidad Técnica del Beni Mariscal José Ballivián. Bolivia*, 76.
- Araujo-Murakami, A. J. (2016). Frutales silvestres y promisorios de Pando. *Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado, Cobija, Bolivia.*, 96.
- Benitez-Sánchez PL, L.-C. M. (2003). Comprehensive study of hazelnut oil composition with comparisons to other vegetable oils, particularly olive oil. *Eur. Food Res. Technol*, 13–19.
- BETANCOURT, B. (1987). Silvicultura especial de árboles forestales maderables.
- BETANCOURT, B. (1987). Silvicultura especial de árboles forestales maderables tropicales. *Habana, Cuba*. 48.
- Borges M, M. S. (2003). Conservación in vitro de germoplasma de *Dioscorea alata* L. por crecimiento mínimo. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 8-12.
- Chávez M, F. M. (2010). Características morfológicas de plantas in vitro de *Pinus caribaea* var. *caribaea* influenciadas por el empleo de la sacarosa en la fase de multiplicación. *Biotecnología Vegetal.*, 31- 40.

- COARITE, J. L. (2000). Tratamientos pre germinativos de la semilla Tembe (*Bactrisgasipaes* Kint) bajo diferentes substratos en almácigo en la región de Ixiamas. *Tesis de grado Licenciatura, Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía, Carrera de Ingeniería Agronómica. La Paz, Bolivia.*, 89.
- CONTRERAS, F., MENDIETA, A., & ANDRADE, M. (2005). Elementos para el manejo del asaí. *Boletín BOLFOR N° 12. (en línea)*, [http://bolfor.chemonics.net/BOLETIN/bolet12/12 asaí. Htm](http://bolfor.chemonics.net/BOLETIN/bolet12/12%20asa%C3%AD.Htm).
- COSTA, C. J., & MARCHI, E. C. (2008). Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. *Informativo Abrates*, 39-50.
- Cueto, J. (2000). Perfeccionamiento de las técnicas in vitro para la colección e intercambio de germoplasma de cocos. *Proyecto (Cuba-México)*.
- CUMAT. (1990). Desarrollo de la amazonía: Boliviana De la actividad extractiva hacia. 44.
- Engelmann, F. (2005). In vitro collecting of coconut germplasm.
- FOSSATI, J., & OLIVERA, T. (1996). Tratamientos pre germinativos en Viveros. *Programa de Repoblamiento Forestal. Prefectura Intercooperación. Edit COTESU. Cochabamba, Bolivia.*, 8.
- Gago, J. L.-N. (2014). Modeling the effects of light and sucrose on in vitro propagated plants: a multiscale system analysis using artificial intelligence technology. *Plos One.*, 1-11.
- Galeano, G. &. (2010). Palmas de Colombia. *Guía de campo. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia.*, 688.
- Gamarra, E. (2015). Propuesta de elaboración a diseño final de procesadora de pulpa de asaí en el municipio de Santa Rosa del Abuná, Pando. 101.
- GBIF. (2019). Búsqueda de registros de Euterpe en Bolivia.
- GOITIA, L. A. (2003). Dasonomía y Silvicultura. La Paz, Bolivia. 300.
- Grout, B. W. (1985). Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Ann. Bot.* 129-131.
- GUTIERREZ, C. V., & PERALTA, R. (2001). *Edit. EL PAIS. Santa Cruz, Bolivia.*, 68.
- HARTMANN, H. T., & KESTER, D. E. (1992). Propagación de plantas: principios y prácticas. *Compañía Editorial Continental.*, 760.
- Hazarika, B. (2006). Morphophysiological disorders in in vitro culture of plants. *Scientia Horticulturae.*, 105-120.

- HENDERSON, A., & GALEANO, G. (1995). Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia (Palmae). *Flora Neotropica, New York: New York Botanical Garden*, 352.
- Jiménez, E. (1995). Propagación in vitro de la caña (Saccharumssp). Híbrido. *Tesis Doctorado UCLV, Cuba*.
- JOHNSON, D. (1996). Manejo sostenible de Asaí (Euterpe precatoria) para la producción de palmito en la Concesión Forestal de Tarumá provincia Velasco. *Proyecto Bolfor/USAID. Santa Cruz, Bolivia*, 1-4.
- Karunaratne, S. (1989). Informe sobre el cultivo de embriones del cocotero enano. *Information Express. CIDA*, 13.
- LA, I. I. (2002). Unidad de Desarrollo Rural Sostenible Proyecto INFOAGRO. (en línea). Bolivia. *Edit IICA/GTZ*, administrador@infoagro.gov.bo.
- Langford, P. J. (1987). Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots in vitro. *Ann. Bot.*, 633-640.
- Leglise, B. (2017). Implementación planta de transformación de productos de la Amazonía boliviana. *Tercer producto de consultoría - segunda versión. Ministerio de Desarrollo Productivo y Economía Plural. La Paz, Bolivia*.
- LEIFERT, C., P., K., & LUMSDEN, P. (1995.). Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences, Boca Raton*, 83-109.
- Llanque-Espinoza, O. E. (2009). Productos del Bosque, potencial social, natural y financiero en hogares de pequeños productores de la Amazonía. https://www.researchgate.net/publication/318780248_PRODUCTOS_DEL_BOSQUE_Potencial_social_natural_y_financiero_en_hogares_de_pequenos_productores_de_la_Amazonia?_iepl%5BgeneralViewId%5D=KmxRYiP2tk20L0JQ1khM09UyS4MnLWn8hVat&_iepl%5Bcontexts%5D%5B0%5D=search.
- Lorini Rodríguez, H. (2016). El mercado de La Paz, Cochabamba, Santa Cruz y Trinidad para pulpas de asaí, majo y copoazú, aceite de majo y manteca de copoazú. *Documento de trabajo. CSF, IPHAE & FOOSC*.
- M., M. (2004). Flora de palmeras de Bolivia. Herbario Nacional de Bolivia, Instituto de Ecología, Carrera de Biología, Universidad Mayor de San Andrés. 212.
- Mamani, M. A. (2011). Producción de semilla básica de papa variedad agata a partir de vitro plantas. 172.
- Mason, M., Ross, J., Babst, B., & Beveridge., B. W. (2014). Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 6092-6087.

- Menezes E. Torres A, S. A. (2008). Valor nutricional da polpa de Asai. *Acta Amazónica.*, 311–316.
- MIRANDA, C. L., & OETTING, I. (2000). Experiencia de monitoreo socio - ambiental en reserva de la biósfera y otras áreas protegidas en la Amazonía. *UICN/UNESCO/CYTED/Academía de Ciencias de Bolivia. La Paz, Bolivia.*, 432.
- Mostacedo B., J. J. (2013). Guía Dendrológica de Especies Forestales de Bolivia. *Proyecto de Manejo Forestal Sostenible (BOLFOR). Segunda Edición. Santa Cruz de la Sierra.*, 245.
- Murashige, T., & Skoog, F. A. (1962). Revised medium for rapid grow than bioassays with tobacco tissue culture. En *Physiologia Plantarum* (págs. 473-497). Copenhagen.
- Pan, M. V. (1998). The use of charcoal in in vitro culture A review. *Plant Growth Regulation*, 155-163.
- Pospíšilová, J. I. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*, 481-497.
- Probiotec P, 2. (2017). *Google académico*. Obtenido de Productos y equipos Biotecnologicos S.A de C.V: <https://www.probiotek.com>
- Quero, A. P. (2004). Propagación in vitro y evaluación en la fase de vivero de la piña (Ananas comosus L. Merr). *C.V Española Roja*.
- Roca, W. M. (1991). Cultivo de Tejidos en la agricultura. *Fundamentos y Aplicaciones. CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical.*, 496 - 510.
- RODRIGUEZ, M. R. (1991). Morfología y Anatomía vegetal. *Edit POLIGRAF. Bolivia.*, 415.
- Rolland, F., & Sheen, E. B.-G. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanism. *Annual Review of Plant Biology*, 675-709.
- STOIAN, D. (2000). La economía del palmito (Euterpe precatoria Martius) en el norte amazónico de Bolivia. 8.
- TARIMA, M. J. (1998). Manual de viveros comunales y familiares. *Modulo N° 4. 2 ed. Edit. CIAT. Santa Cruz – Bolivia*, 134.
- Ter Steege, H. P. (2013). Hyperdominance in the Amazonian tree flora. *Science.*, 342.
- Tognetti, J. H.-N. (2013). Sucrose signaling in plants. A world yet to be explored. *Plant Signalling & Behavior*, 1-10.
- Torres, A. F. (2005). Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de Heliconia rostrata in vitro. *Horticultura Brasileira*, 789-792.

- Ulises, C. G.-d.-P. (2010). propagation of *Heliconia bihai* (L.) L. from zygotic embryos. *Acta Botanica Brasilica*, 184-192.
- UNZUETA, O., TOSI, J., & HOLDRIDGE, L. (1975). Cultivo de pijuayo (*Bactris gasipaes* Kunth) Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaria Pro- Tempore. Lima Perú. *Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios*, 32 - 40.
- VILLACHICA, H. (1996). Frutales y Hortalizas Promisorios de la Amazonía. *Edit Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaria Pro- Tempore. Lima, Perú*, 367.
- Wainwright, H. y. (1989). Influence of in vitro preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on in vivo. *Sci. Hort.*, 261-267.
- Wiersum, K. (2004). Forest gardens as an intermediate land-use system in the nature-culture continuum: characteristics and future potential. *Agroforestry Systems*, 123-134.

10. ANEXOS



Material vegetal (semillas de açaí)



Desinfección de material vegetal



Extracción de embriones



Preparacion del medio de cultivo



Sala de crecimiento artificial