



## Desinfección de embriones cigóticos de *Ceroxylon alpinum* Bonpl. para el establecimiento *in vitro*\*

### Disinfection of zygotic embryos of *Ceroxylon alpinum* Bonpl. *in vitro* establishment

Estefany Serna-Toro<sup>1</sup>, Rigoberto Villa-Ramírez<sup>2</sup>, Lina M. Arbeláez-Arias<sup>3</sup>

\* Recepción: 18 de septiembre, 2024. Aceptación: 20 de marzo, 2025. Este manuscrito formó parte de una tesis de maestría del primer autor y de un proyecto de investigación de la Universidad del Quindío.

<sup>1</sup> Universidad del Quindío. Armenia, Colombia. [svtoroa@uniquindio.edu.co](mailto:svtoroa@uniquindio.edu.co) (<https://orcid.org/0000-0003-4584-9772>).

<sup>2</sup> Universidad del Quindío. Armenia, Colombia. [rivilla@uniquindio.edu.co](mailto:rivilla@uniquindio.edu.co) (autor para correspondencia; <https://orcid.org/0000-0002-4355-2230>).

<sup>3</sup> Universidad del Quindío. Armenia, Colombia. [linama2000@uniquindio.edu.co](mailto:linama2000@uniquindio.edu.co) (<https://orcid.org/0000-0002-4739-7995>).

### Resumen

**Introducción.** El género *Ceroxylon* agrupa especies de palmas andinas vulnerables por la intervención humana. En particular, las semillas de *Ceroxylon alpinum* Bonpl. presentan baja germinación, lento crecimiento y requieren complejas interacciones ambientales para desarrollarse. **Objetivo.** Evaluar métodos de desinfección para embriones cigóticos de palma que permita el cultivo *in vitro* y la micropropagación. **Materiales y métodos.** El estudio se desarrolló entre febrero de 2021 y marzo de 2022. Las semillas de palma de cera (*Ceroxylon alpinum* Bonpl.) se colectaron en el bosque El Caíro, Salento, Quindío, Colombia, en estado de fructificación, con buen desarrollo morfológico y fitosanitario. Posteriormente, fueron transportadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal-CIBUQ en Armenia, Quindío. Las semillas se desinfectaron superficialmente con detergente neutro tween 20 a una concentración de 0,1 % (v/v) y agua corriente, seguidas de una inmersión en NaClO al 3 % durante 25 minutos. Los embriones fueron extraídos bajo estereoscopio y sumergidos en alcohol al 70 % por un minuto. Luego, se sometieron a diferentes concentraciones de NaClO durante 10 minutos antes de ser cultivados en medio MS y evaluados durante ocho semanas. Se utilizó un diseño completamente al azar con un único factor (concentración de NaClO) y tres niveles (1 %, 1,5 % y 2 %), mediante análisis de varianza y prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) usando el programa Statistica 8. **Resultados.** La desinfección con NaClO al 1,5 % (T2) fue la más eficaz, logrando un 75 % de supervivencia y un 74 % de brotación de embriones. En contraste, la concentración al 2 % de NaClO aumentó la contaminación. **Conclusión.** El método de desinfección con NaClO al 1,5 % fue el más efectivo para viabilizar los embriones cigóticos de palma de cera, al maximizar la supervivencia y brotación *in vitro*, facilitando la micropropagación y la conservación de especies en peligro.

**Palabras claves:** explantes, esterilización, hipoclorito de sodio, Inocuidad, palma de cera.



## Abstract

**Introduction.** The *Ceroxylon* genus includes Andean palm species that are vulnerable due to human intervention. Specifically, the seeds of *Ceroxylon alpinum* Bonpl. exhibit low germination rates, slow growth, and require complex environmental interactions for development. **Objective.** To evaluate disinfection methods for zygotic palm embryos to enable in vitro culture and micropropagation. **Materials and methods.** The study was conducted between February 2021 and March 2022. Wax palm (*Ceroxylon alpinum* Bonpl.) seeds were collected in the El Cairo forest, Salento, Quindío, Colombia, during the fruiting stage, selecting those with good morphological development and phytosanitary conditions. The seeds were then transported to the Plant Biotechnology Laboratory-CIBUQ in Armenia, Quindío. Surface disinfection was performed using neutral detergent Tween 20 at a concentration of 0.1 % (v/v) and running water, followed by immersion in 3 % NaClO for 25 minutes. The embryos were extracted under a stereoscope and immersed in 70% alcohol for one minute. They were then subjected to different NaClO concentrations for 10 minutes before being cultured in MS medium and evaluated for eight weeks. A completely randomized design with a single factor (NaClO concentration) and three levels (1 %, 1.5 %, and 2 %) was used, analyzed through ANOVA and Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ ) using Statistica 8 software. **Results.** Disinfection with 1.5 % NaClO (T2) was the most effective, achieving 75 % survival and 74 % embryo sprouting. In contrast, the 2 % NaClO concentration increased contamination. **Conclusion.** The disinfection method using 1.5 % NaClO was the most effective for enabling the viability of wax palm zygotic embryos, maximizing *in vitro* survival and sprouting, thereby facilitating micropropagation and the conservation of endangered species.

**Keywords:** explants, sterilization, sodium hypochlorite, safety, wax palm.

## Introducción

Sudamérica es el mayor centro de riqueza y diversidad para la familia Arecaceae o Palmae. Cuatro de las cinco subfamilias de palmas coexisten en este continente: Calamoideae, Coryphoideae, Ceroxyloideae y Arecoideae. Este patrón de diversidad se debe a factores ecológicos, relacionados con el clima y la variabilidad geomorfológica del territorio (Benchimol et al., 2017; Couvreur et al., 2024).

El género *Ceroxylon*, endémico de las montañas tropicales, está constituido por doce especies que se encuentran en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. Estas especies se distribuyen entre los 600 y 3500 m de altitud (Benchimol et al., 2017; Fernández-Hilario et al., 2024; Mahasin et al., 2020). Esta distribución es significativa para las reconstrucciones biogeográficas de los Andes y representa un mosaico de especies interesantes por sus adaptaciones fisiológicas y morfológicas. El género contiene algunas de las palmas más altas del mundo y es uno de los cinco géneros de palmas más diversificados en los Andes (Sanín & Galeano, 2016).

*Ceroxylon alpinum* Bonpl., fue descrita en 1801 por los botánicos Alexander von Humboldt y Aimé Bonpland, durante sus exploraciones en las montañas del Quindío. Esta palma conocida por capacidad de producir cera, fue presentada formalmente a la comunidad científica en 1804. Su nombre, que combina las palabras griegas “*keros*” (cera) y “*xylon*” (madera), resalta una de sus características más notables (Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, 2018).

En Colombia coexisten siete de las 13 especies registradas de *Ceroxylon*, que se desarrollan a lo largo de las tres cordilleras del país (Galeano, 2015). En el departamento del Quindío se han identificado cuatro especies de este género: *Ceroxylon quindiuense*, *Ceroxylon alpinum*, *Ceroxylon vogelianum* y *Ceroxylon parvifrons* (Rojas-Sandino, 2023). Estas especies están dispersas en los bosques de Génova, Pijao, Córdoba, Calarcá, Filandia y

Salento, con las mayores poblaciones de *Ceroxylon alpinum* Bonpl., reportadas en las veredas de Cócora, Navarco y Camino Nacional (Fernández-Hilario et al., 2024; González-Rivillas et al., 2018).

La biología de *Ceroxylon alpinum* Bonpl. es poco estudiada. Se sabe que estos individuos tienen semillas de lenta germinación y crecimiento, y que desde una perspectiva ecológica requieren numerosos elementos florísticos y faunísticos para su desarrollo (Instituto Alexander von Humboldt, 2017). Las poblaciones restantes enfrentan varios problemas de conservación debido a la expansión agrícola, ganadera y urbana, reduciéndolas a pequeños parches boscosos. Además, la extracción de sus hojas para uso durante la Semana Santa ha devastado gran parte de los individuos juveniles y adultos jóvenes (Chacón-Vargas et al., 2020).

Debido a la presión antropogénica y la pérdida de hábitat, *Ceroxylon alpinum* Bonpl. ha sido incluida como especie en peligro crítico de extinción (Rojas-Sandino et al., 2023). La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) la clasificó como una especie en peligro (Couvreur et al., 2024). Además, la Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales de Colombia la consideró de alta importancia ecológica y en estado crítico de extinción. También forma parte del listado de especies en peligro crítico del departamento del Quindío (González-Rivillas et al., 2018).

A pesar de su importancia ecológica y evolutiva, fenómenos como la germinación, polinización y fenología reproductiva en palmas han sido poco estudiados (Henderson, 2024). Un ejemplo es *Ceroxylon*, que, a pesar de su amplio rango de distribución geográfica y su relevancia ecológica y cultural, se desconocen numerosos aspectos fundamentales sobre esta especie (Bacon et al., 2021; Henderson, 2024). La poca investigación sobre estos procesos impide una comprensión completa de la ecología y las necesidades de conservación de esta especie esencial.

Las investigaciones de las últimas décadas se han centrado principalmente en la distribución geográfica, características botánicas y aspectos taxonómicos de muchas especies. Sin embargo, los datos sobre fenología reproductiva y germinación en *Ceroxylon* carecen de rigurosidad científica o son inexistentes. Evaluar estos aspectos ecológicos, como la germinación, para asegurar la recuperación y conservación de sus poblaciones (Henderson, 2024; Wang et al., 2023).

En contraste, la biotecnología se transformó en una herramienta significativa para apoyar programas de reintroducción de especies vegetales. Las principales ventajas de la micropropagación incluyen altos coeficientes de multiplicación, lo que permite manejar grandes volúmenes de plantas en cortos periodos de tiempo, para así facilitar la rápida introducción de nuevas plántulas. Esta técnica ha demostrado ser eficaz en la producción a gran escala de plantas uniformes y libres de enfermedades, que contribuye de manera importante a la conservación y mejoramiento de especies vegetales (Espinosa-Leal et al., 2018; Kulus & Tymozuk, 2024).

Considerando que *Ceroxylon alpinum* Bonpl., se encuentra en riesgo crítico de extinción (Brodsky et al., 2023; Galeano et al., 2015), y que no existe una metodología precisa para su multiplicación *in vitro*, es fundamental estudiar su micropropagación a partir de embriones cigóticos. Resulta crucial investigar opciones confiables y seguras para la propagación de esta planta bajo ambientes controlados, como un primer paso al establecimiento *in vitro* de *C. alpinum* (Espinosa-Leal et al., 2018; Kulus & Tymozuk, 2024).

La intención de esta investigación fue identificar un protocolo para la desinfección de embriones cigóticos de *Ceroxylon alpinum* Bonpl., etapa previa y necesaria para la producción de plántulas. Los resultados obtenidos servirán como soporte para la posterior evaluación de la producción *in vitro* de plantas de palma de cera.

En las técnicas de desinfección del material vegetal se utilizan diversas sustancias químicas, como el hipoclorito de sodio (NaClO), el hipoclorito de calcio (CaClO), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) y el bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>). De todas ellas, el hipoclorito de sodio ha sido el más empleado por los investigadores debido a sus excelentes resultados en la desinfección y el establecimiento *in vitro* del material vegetal, ajustando concentraciones y tiempos de exposición. Este compuesto destaca por su efectividad, bajo costo y facilidad de adquisición (Corozo et al., 2021). La finalidad de esta investigación fue evaluar métodos de desinfección para embriones cigóticos de palma que permita el cultivo *in vitro* y la micropropagación.

## Materiales y métodos

### Fase de campo

Las semillas de palma de cera (*Ceroxylon alpinum* Bonpl.) fueron colectadas en el bosque El Cairo, ubicado en el municipio de Salento, Quindío, Colombia. En coordenadas 4°35'24" N y 75°31'05". Esta región de alta biodiversidad se encuentra entre 1800 y 2400 m s. n. m. Esta región de alta biodiversidad se encuentra entre 1800 y 2400 m s. n. m. Según la clasificación de zonas de vida de Holdridge, este bosque se categoriza como Bosque Muy Húmedo Montano Bajo (bmh-MB), caracterizado por una temperatura media anual de 12 a 18 °C y una precipitación anual de 2000 a 4000 mm (Galeano et al., 2015).

Se colectaron semillas maduras de palma de cera en estado de fructificación, con desarrollo morfológico, fisiológico y fitosanitario requerido. Los frutos seleccionados no presentaban signos de enfermedad o deficiencia nutricional y conservaban un aspecto físico saludable, color naranja vivo y tamaño adecuado para obtener embriones de buena calidad. Además, se confirmó que las semillas presentaban un contenido de humedad óptimo para asegurar su viabilidad, a través del método de estufa.

### Fase de laboratorio

Entre febrero de 2021 y marzo de 2022, se desarrolló la investigación, durante la cual, para preservar la viabilidad las semillas, estas fueron transportadas en una nevera de poliestireno al Laboratorio de Biotecnología Vegetal-CIBUQ, en la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad del Quindío, en Armenia, Colombia, asegurando así su llegada en condiciones óptimas para la posterior desinfección y establecimiento *in vitro*.

### Método de asepsia

La superficie de la semilla fue lavada y desinfectada con una solución de detergente líquido neutro (tween 20) a una concentración de 0,1 % (v/v) y agua corriente para eliminar contaminantes y patógenos. Se sumergieron en una solución industrial de NaClO al 3 % durante 25 min para evitar el ataque de patógenos. Luego, se lavaron dos veces con agua destilada estéril, y con la ayuda de pinzas de punta fina, un bisturí, y bajo estereoscopio académico SZ-145 a 10-20x, con iluminación led se extrajeron los embriones de las semillas.

### Desinfección de embriones

Los embriones aislados se llevaron a la cabina de flujo laminar horizontal clase 1 de 190 cm de frente, marca implab donde se sumergieron en alcohol al 70 % durante un minuto. Luego, se sometieron a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) con agitación continua durante 10 min, seguidos de tres enjuagues en agua destilada estéril (Cuadro 1). Por último, los explantes se sembraron en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) y se llevaron a la sala de crecimiento para su evaluación y seguimiento durante ocho semanas.

### Medio de cultivo

Para la elaboración del medio de cultivo, se utilizaron las sales del medio basal MS formuladas por Murashige y Skoog (1962) y se agregó 30 g/L de azúcar (sacarosa) como fuente de carbono. El pH se ajustó a 5,8 agregando

**Cuadro 1.** Desinfección de embriones cigóticos de *Ceroxylon alpinum* para el establecimiento *in vitro*, en diferentes concentraciones de NaClO. Armenia, 2022.

**Table 1.** Disinfection of *Ceroxylon alpinum* zygotic embryos for *in vitro* establishment at different NaClO concentrations. Armenia, 2022.

Tratamiento (T)	Desinfectante/Tiempo
T0	Sin NaClO
T 1	NaClO 1,0 %; 10 min
T 2	NaClO 1,5 %; 10 min
T 3	NaClO 2,0 %; 10 min

T: tratamientos. / T: treatments.

KOH al 1N, asimismo, se adicionaron 2,8 g/L de gelificante. Se vertieron 20 mL de medio de cultivo en cada envase tipo Gerber.

Posteriormente, se esterilizaron en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 20 minutos. Después de la siembra, los cultivos se incubaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de  $24 \pm 2$  °C, bajo un fotoperiodo de 16 horas luz, con lámparas de luz blanca a una intensidad lumínica de 2000 lux. A los quince días de incubación, se sometieron a oscuridad y luego se volvieron a exponer al fotoperiodo.

### Diseño experimental

El estudio se realizó bajo un diseño completamente al azar con un solo factor (concentración de NaClO) y tres niveles (1%, 1.5% y 2%), todos a un tiempo fijo de 10 minutos. Se emplearon tres repeticiones por tratamiento y, en cada repetición, se utilizaron 30 embriones de palma de cera. Se consideró la independencia al usar frascos individuales y semillas no relacionadas entre sí. Se aplicó la transformación de proporciones para ayudar a cumplir los supuestos de normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas.

Finalmente, se corrobora (vía pruebas de residuos) que no hay violaciones graves a dichos supuestos, permitiendo así realizar el ANOVA y, posteriormente, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) para comparar las medias de cada variable (contaminación, brotación y sobrevivencia). El procesamiento estadístico se llevó a cabo en el software Statistica para Windows, versión 8 (StatSoft, 2008).

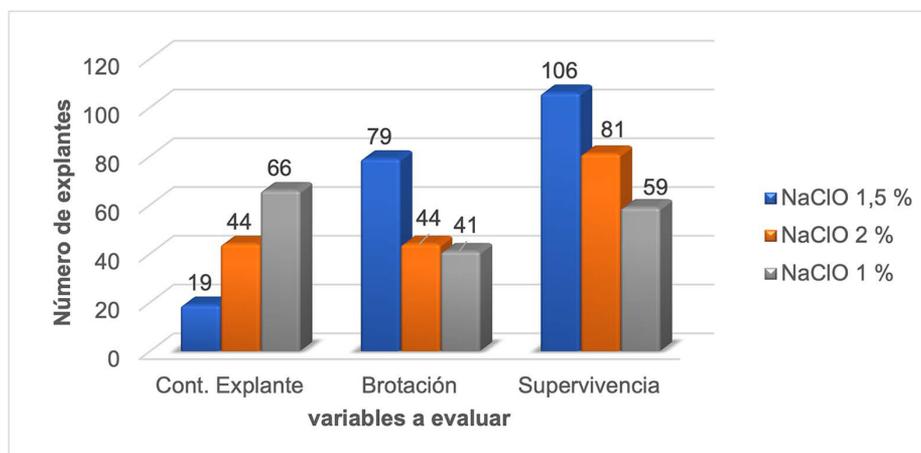
## Resultados

### Método de asepsia

El proceso de limpieza superficial de las semillas de palma de cera resultó ser eficaz para la eliminación de la contaminación de las semillas, logrando reducir la carga microbiana antes de someterlas al proceso de desinfección y esterilización, logrando una reducción notable en la contaminación durante el cultivo *in vitro*. Los porcentajes de germinación de los embriones cigóticos fluctuaron entre el 32 % y el 63 %, lo que indica una variabilidad en la respuesta, pero con resultados positivos en la germinación bajo las condiciones establecidas. Esto sugiere que, aunque la técnica aplicada fue adecuada, se podrían realizar ajustes para mejorar la tasa de éxito

### Desinfección de embriones cigóticos

El tratamiento de desinfección T2 (NaClO 1,5 %) fue el más efectivo para la esterilización de embriones de semillas de palma de cera, lo cual resultó en el mayor número de supervivencia (106 embriones), de los cuales 79 germinaron y 19 se contaminaron. En contraste, el tratamiento T3 (NaClO 2 %) produjo el mayor número de explantes contaminados (44 embriones). Aun así, 81 explantes sobrevivieron, como se ilustra en la Figura 1.



**Figura 1.** Tratamientos de desinfección para embriones de palma de cera. Armenia, 2022.

**Figure 1.** Disinfection treatments for Quindío wax palm embryos. Armenia, 2022.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección ( $p = 0,001$ ). La prueba LSD mostró que el tratamiento con NaClO al 1,5 % (T2) es el más eficiente para la esterilización de embriones de semillas de palma de cera. Este tratamiento fue significativamente más eficaz que los demás, Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Estadísticos descriptivos para tres variables evaluadas en embriones de palma de cera bajo distintos tratamientos de NaClO. Armenia, 2022

**Table 2.** Descriptive statistics for three variables evaluated in wax palm embryos under different NaClO treatments. Armenia 2022

Variable / tratamiento	Media	DE	EE	CV (%)
<b>Contaminación</b>				
NaClO 1 %	55,2 %	49,9 %	4,46 %	90,4
NaClO 1,5 %	15,2 %	35,9 %	3,22 %	236,8
NaClO 2 %	35,2 %	47,7 %	4,27 %	135,5
<b>Brotación</b>				
NaClO 1 %	32,8 %	47,0 %	4,20 %	143,0
NaClO 1,5 %	63,2 %	48,2 %	4,31 %	76,3
NaClO 2 %	35,2 %	47,7 %	4,27 %	135,5
<b>Sobrevivencia</b>				
NaClO 1 %	46,4 %	49,9 %	4,46 %	107,6
NaClO 1,5 %	84,0 %	36,7 %	3,28 %	43,6
NaClO 2 %	65,6 %	47,6 %	4,25 %	72,6

Según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) aplicada a cada una de las tres variables (contaminación, brotación y sobrevivencia) en los tratamientos de desinfección con NaClO al 1 %, 1,5 % y 2 %, confirma que NaClO al 1,5 % es el tratamiento óptimo dentro de las concentraciones evaluadas, ya que maximiza la eficiencia en el control de la contaminación a la vez que promueve un mayor crecimiento y sobrevivencia de los embriones de palma de cera (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Prueba de comparaciones múltiples (Tukey) para Contaminación, Brotación y Sobrevivencia en embriones de palma de cera bajo diferentes concentraciones de NaClO. Armenia, 2022.

**Table 3.** Multiple comparison test (Tukey) for Contamination, Germination, and Survival in wax palm embryos under different NaClO concentrations. Armenia, 2022.

Tratamiento	Contaminación (%)	Grupo	Brotación (%)	Grupo	Sobrevivencia (%)	Grupo
NaClO 1,5 %	15,2	A	63,2	A	84,0	A
NaClO 2 %	35,2	B	35,2	B	65,6	B
NaClO 1 %	55,2	C	32,8	C	46,4	C

## Discusión

Las técnicas de desinfección son esenciales para preservar la viabilidad y promover el crecimiento y desarrollo adecuado del explante (Kulus & Tymoszuk, 2024; Sivanesan et al., 2021). Una desinfección eficiente minimiza la contaminación microbiana, lo que resulta crucial para garantizar el éxito en los cultivos *in vitro*. Al reducir significativamente el riesgo de contaminación, se optimizan las condiciones necesarias para el crecimiento saludable de los embriones y se mejora el rendimiento general del proceso de micropropagación.

La eficacia del tratamiento de desinfección con NaClO al 1,5 % se debió a las propiedades germicidas y oxidantes del hipoclorito de sodio. Este compuesto desnaturaliza proteínas y desintegra membranas celulares de microorganismos, lo que resulta en una desinfección efectiva de los embriones cigóticos. Este resultado es consistente con estudios previos que subrayan la importancia de la concentración y el tiempo de exposición al desinfectante para lograr la esterilización sin dañar los explantes (Sivanesan et al., 2021; Teixeira da Silva et al., 2016).

El tratamiento T3 (NaClO 2 %) presentó un mayor número de explantes contaminados, lo que indica que concentraciones elevadas de hipoclorito de sodio pueden tener efecto fitotóxico y comprometer la viabilidad de los embriones, lo que coincide con estudios en la micropropagación de palmas y otras especies tropicales. Por ejemplo, Gammoudi et al. (2022) señalaron que el equilibrio entre la concentración y el tiempo de inmersión es crítico para evitar daños y promover la regeneración. Asimismo, Kalyana Babu et al. (2024) y Mazri et al. (2011) reportaron que dosis elevadas pueden provocar necrosis, mientras Jatou et al. (2015) destacaron que protocolos agresivos dañan las células embrionarias y dificultan su establecimiento. En conjunto, estas evidencias respaldan la idea de que una concentración excesiva de NaClO, como el 2 %, puede tener un efecto negativo en la supervivencia y el desarrollo de los embriones, reforzando la recomendación de emplear concentraciones intermedias que equilibren la reducción de contaminantes y la integridad del explante. Además, este fenómeno ha sido documentado en otros estudios sobre cultivos *in vitro*, donde concentraciones elevadas de NaClO pueden alterar las propiedades fisicoquímicas del medio de cultivo, afectando así el crecimiento de los embriones (Pais et al., 2016).

La selección de semillas en campo sin tratamiento con pesticidas contribuyó a los mayores índices de contaminación observados. Este hallazgo resalta la importancia de utilizar material vegetal procedente de invernaderos o condiciones controladas para reducir la carga microbiana inicial y mejorar las tasas de éxito en cultivo *in vitro*. Estudios han demostrado que los explantes tomados de plantas cultivadas en condiciones

controladas presentan menores niveles de contaminación (Faria & Illg, 2005; Guerra & Dal Vesco 2010; Martínez-Montero et al., 2012; Teixeira da Silva et al., 2015). Por lo tanto, la implementación de tratamientos previos con bactericidas o fungicidas en el campo puede ser una estrategia efectiva para reducir la contaminación inicial y mejorar la eficiencia de la desinfección (Permadi et al., 2023; Şekerli et al., 2024; Wang et al., 2023).

La contaminación interna del explante, que sobrevive a la desinfección superficial, puede emerger en etapas posteriores del cultivo, para así ejercer un efecto en el éxito del procedimiento. Este tipo de contaminación es difícil de eliminar por completo y subraya la necesidad de desarrollar técnicas más avanzadas y específicas para tratar contaminantes internos. La aplicación de tratamientos combinados de desinfección superficial y endógena puede ser un área prometedora de investigación para mejorar la viabilidad de los explantes (Leelavathy & Sankar, 2016; Orlikowska et al., 2017; Permadi et al., 2023).

El tratamiento con NaClO al 1,5 % demostró ser la mejor opción para la desinfección de embriones de *Ceroxylon alpinum* Bonpl., el cual favoreció la supervivencia y brotación de los embriones. Este resultado es significativo para la conservación de esta especie vulnerable, ya que facilita su micropropagación y eventual reintroducción en su hábitat natural. Reproducir plantas de manera eficiente a través de técnicas *in vitro* puede contribuir a la preservación de la biodiversidad y la restauración de ecosistemas afectados por la actividad humana (Anwar et al., 2021; Custódio et al., 2023).

Las limitaciones de este estudio incluyen la posible variabilidad en la respuesta de los embriones, causada por factores genéticos y ambientales no controlados. Además, la falta de tratamiento previo con pesticidas podría haber sesgado los resultados hacia mayores índices de contaminación. Estas limitaciones indican la necesidad de realizar estudios adicionales con controles más estrictos y una mayor muestra de embriones para validar los resultados obtenidos.

Futuros estudios deben centrarse en combinar tratamientos desinfectantes con condiciones controladas de crecimiento para optimizar la micropropagación de plantas. Es crucial investigar cómo distintas concentraciones de NaClO afectan a especies de palmas y otras plantas, como se ha observado en investigaciones con *Pistacia vera*, donde se determinaron concentraciones óptimas de NaClO para reducir la contaminación sin provocar fitotoxicidad (Gammoudi et al., 2017). Además, es fundamental revisar las estrategias de control y detección de la contaminación bacteriana en cultivos de tejidos, resaltando la necesidad de un control riguroso para mantener la asepsia y asegurar resultados eficientes en la micropropagación (Orlikowska et al., 2017).

Reproducir las plantas eficientemente a través de técnicas *in vitro* es fundamental para la conservación de especies en peligro como *Ceroxylon alpinum*. Esta metodología permite la micropropagación y la reintroducción de plántulas en sus hábitats naturales, contribuyendo de manera eficiente a la preservación de la biodiversidad y la restauración de ecosistemas (Anwar et al., 2021; Custódio et al., 2023).

## Conclusiones

El tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio al 1,5% demostró ser el método más eficaz para la esterilización de los embriones cigóticos de *Ceroxylon alpinum* Bonpl., facilitó significativamente su cultivo *in vitro* y micropropagación. El cloro activo liberado por el NaClO alteró las paredes celulares de los microorganismos, aunque un aumento excesivo en la concentración o en el tiempo de exposición podría comprometer la viabilidad del embrión.

La procedencia del material vegetal es fundamental para reducir la contaminación inicial. Emplear material vegetal proveniente de invernaderos o condiciones controladas mejora la eficiencia de la desinfección, como se ha evidenciado en este estudio. Este enfoque no solo disminuye la carga microbiana inicial, sino que también aumenta las tasas de éxito en los cultivos *in vitro*.

El estudio presenta una metodología efectiva para la desinfección y micropropagación de *Ceroxylon alpinum* Bonpl., lo que constituye una herramienta valiosa para la conservación de esta especie. La aplicación de esta técnica puede contribuir de manera importante a la preservación de la biodiversidad y la restauración de los ecosistemas afectados por la actividad humana.

## Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad del Quindío por su apoyo a esta investigación.

## Referencias

- Anwar, M., Chen, L., Xiao, Y., Wu, J., Zeng, L., & Hu, Z. (2021). Recent advanced metabolic and genetic engineering of phenylpropanoid biosynthetic pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), Article 9544. <https://doi.org/10.3390/ijms22179544>
- Bacon, C., Roncal, J., Andermann, T., Barnes, C., Balslev, H., Gutiérrez-Pinto, N., Morales, H., Núñez-Avellaneda, L., Tunarosa, N., & Antonelli, A. (2021). Genomic and niche divergence in an Amazonian palm species complex. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 197(3), 498–512. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boab012>
- Benchimol, M., Talora, D., Mariano-Neto, E., Oliveira, T., Leal, A., Mielke, M., & Faria, D. (2016). Losing our palms: The influence of landscape-scale deforestation on Arecaceae diversity in the Atlantic Forest. *Forest Ecology and Management*, 384, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.11.014>
- Brodsky, A., Abakumov, E., & Kirillova, I. (2023). Problems in threatened species conservation: Differences in national red lists assessments with global standards. *Diversity*, 15(3), Article 337. <https://doi.org/10.3390/d15030337>
- Chacón-Vargas, K., García-Merchán, V. H., & Sanín, M. J. (2020). De las especies de piedra angular a la conservación: Genética de conservación de la palma de cerdo *Ceroxylon quindiuense* en las mayores poblaciones silvestres de Colombia y colecciones de plantas ex situ vecinas seleccionadas. *Biodiversity and Conservation*, 29, 283–302. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01882-w>
- Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. (2018). *Plan de manejo y conservación de la palma real (Ceroxylon alpinum Bonpl. Ex DC.) en la jurisdicción de la CAR Cundinamarca*. <https://www.car.gov.co/uploads/files/60d37ec3b6da0.pdf>
- Corozo, L., Héctor, E., Macías, F., Vásquez, B., Pinargote, B., Cobeña, G., Mendoza, A., & Arteaga, F. (2020). Micropropagación de dos variedades ecuatorianas de yuca (*Manihot esculenta Crantz*). *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 36(3), 224–232. <https://revistas.udec.cl/index.php/chjaas/article/view/2985/3069>
- Couvreur, T. L. P., Jijon, N., Morales-Morales, P. A., Sanín, M. J., Copete, J. C., Loziquez, A., & Beech, E. (2024). Diversity and conservation status of palms (Arecaceae) in two hotspots of biodiversity in Colombia and Ecuador. *Plants, People, Planet*, 6(4), 885–901. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10506>
- Custódio, L., Charles, G., Magné, C., Barba-Espín, G., Piqueras, A., Hernández, J. A., Ben Hamed, K., Castañeda-Loaiza, V., Fernandes, E., & Rodrigues, M. J. (2023). Application of *In Vitro* Plant Tissue Culture Techniques to Halophyte Species: A Review. *Plants*, 12(1), Article 126. <https://doi.org/10.3390/plants12010126>

- Fernández-Hilario, R., Pillaca Huacre, L., Villanueva, R., Riva Regalado, S., Rojas, R., Goldenberg, R., & Michelangeli, F. (2024). Taxonomic and chorological novelties in *Blakea* (Melastomataceae: Pyxidanthae) from Peru with a list of species for the country. *Phytotaxa*, 635(1), 1-42. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.635.1.1>
- Galeano, G., Bernal, R., & Sanín, M. J. (2015). *Plan de conservación, manejo y uso sostenible de la palma de cera del Quindío (Ceroxylon quindiuense), Árbol Nacional de Colombia*. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, & Universidad Nacional de Colombia. [https://archivo.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemas/pdf/Programas-para-la-gestion-de-fauna-y-flora/Plan\\_de\\_conservaci%C3%B3n\\_manejo\\_y\\_uso\\_sostenible\\_de\\_la\\_palma\\_de\\_cera\\_del\\_Quind%C3%ADo.pdf](https://archivo.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemas/pdf/Programas-para-la-gestion-de-fauna-y-flora/Plan_de_conservaci%C3%B3n_manejo_y_uso_sostenible_de_la_palma_de_cera_del_Quind%C3%ADo.pdf)
- Gammoudi, N., Nagaz, K., & Ferchichi, A. (2022). Establishment of optimized in vitro disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: Multilayer perceptron–multi-objective genetic algorithm. *BMC Plant Biology*, 22(1), Article 324. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03674-x>
- González-Rivillas, N., Bohórquez, A., Gutiérrez, J. P., & García-Merchán, V. H. (2018). Diversity and population genetic structure of the wax palm *Ceroxylon quindiuense* in the Colombian Coffee region. *bioRxiv*, 2018, Article 443960. <https://doi.org/10.1101/443960>
- Henderson, A. (2024). Pollination systems of palms (Arecaceae). *Journal of Pollination Ecology*, 36, 144–248. [https://doi.org/10.26786/1920-7603\(2024\)782](https://doi.org/10.26786/1920-7603(2024)782)
- Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. (2017). *Estado actual de conservación de la población de Ceroxylon quindiuense (H.Karst.) H. Wendl. (Arecaceae) en la microcuenca del río Tohecito, Tolima*. [http://i2d.humboldt.org.co/ceiba/resource.do?r=rrbb\\_palma\\_tohecito\\_2017](http://i2d.humboldt.org.co/ceiba/resource.do?r=rrbb_palma_tohecito_2017)
- Jatoi, Mushtaque & Abul Soad, Adel & Markhand, Ghulam & Solangi, Najamuddin. (2015). Establishment of an efficient protocol for micropropagation of some Pakistani cultivars of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using novel inflorescence explants. *Pakistan Journal of Botany*, 47, 1921-1927. [https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/47\(5\)/40.pdf](https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/47(5)/40.pdf)
- Kalyana Babu, B., Mathur, R. K., Suresh, K., Ravichandran, G., Susanthi, B., Patil, G. B., Ruthweek, N., & Mahesh, M. (2024). Efficient regeneration protocol for producing true-to-type oil palm (*Elaeis guineensis* (jacq.) through somatic embryogenesis from immature male inflorescence. *Heliyon*, 11(1), Article e41479. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e41479>
- Kulus, D., & Tymoszek, A. (2024). Advancements in *in vitro* technology: A comprehensive exploration of micropropagated plants. *Horticulturae*, 10(1), Article 88. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010088>
- Leelavathy, S., & Sankar, P. D. (2016). Curbing the menace of contamination in plant tissue culture. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(3), 2145–2152. <https://microbiologyjournal.org/curbing-the-menace-of-contamination-in-plant-tissue-culture/>
- Mahasin, K., Hazra, M., Mahato, S., Spicer, R. A., Roy, K., Hazra, T., Bandopadhyaya, M., Spicer, T. E. V., & Bera, S. (2020). A Cretaceous Gondwana origin of the wax palm subfamily (Ceroxyloideae: Arecaceae) and its paleobiogeographic context. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 283, Article 104318. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2020.104318>
- Martínez-Montero, M. E., Arnao, M. T., & Engelmann, F. (2012). Cryopreservation of tropical plant germplasm with vegetative propagation - Review of sugarcane (*Saccharum* spp.) and pineapple (*Ananas comusus* (L.) Merrill) cases. In I. I. Katkov (Ed.), *Current frontiers in cryopreservation* (Chapter 18, pp. 359-396). Intechopen. <https://doi.org/10.5772/32047>

- Mazri, M. A., & Meziani, R. (2013). An improved method for micropropagation and regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22, 176-184. <https://doi.org/10.1007/s13562-012-0147-9>
- Orlikowska, T., Nowak, K., & Reed, B. (2017). Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128, 487–508. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1144-9>
- Pais, A. K., da Silva, A. P., Cardoso de Souza, J., Lopes Teixeira, S., Martins Ribeiro, J., Peixoto, A. R., & Domingos da Paz, C. (2016). Sodium hypochlorite sterilization of culture medium in micropropagation of *Gerbera hybrida* cv. Essandre. *African Journal of Biotechnology*, 15(36), 1995-1998. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15405>
- Permadi, N., Nurzaman, M., Alhasnawi, A. N., Doni, F., & Julaeha, E. (2023). Managing Lethal Browning and Microbial Contamination in *Musa* spp. Tissue Culture: Synthesis and Perspectives. *Horticulturae*, 9(4), Article 453. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9040453>
- Rojas-Sandino, L. D., Cruz-Cuellar, H., & Losada-Prado, S. (2023). Análisis espacial y conectividad estructural en paisajes con palma de cera (*Ceroxylon quindiuense*) y su relación con aves, mariposas y mamíferos en el departamento del Tolima, Colombia. *Caldasia*, 45(3), 518–531. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v45n3.102536>
- Sanín, M. J., & Galeano, G. (2016). A revision of the Andean wax palms, *Ceroxylon* (Arecaceae). *Phytotaxa*, 34(1), 1–64. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.34.1.1>
- Şekerli, M. (2024). Season, thermotherapy and surface sterilization play important roles in microbial contamination of hazelnut in vitro cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 157, Article 70. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02799-1>
- Sivanesan, I., Muthu, M., Gopal, J., Tasneem, S., Kim, D. H., & Oh, J. W. (2021). A fumigation-based surface sterilization approach for plant tissue culture. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), Article 2282. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052282>
- Teixeira da Silva, J. A., Winarto, B., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Zeng, S. (2016) Tissue disinfection for preparation of *Dendrobium* in vitro culture. *Folia Horticulturae*, 28(1), 57-75. <https://doi.org/10.1515/fhort-2016-0008>