

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Elaboración de un proceso de esterilización
superficial de explantes de inflorescencias y
hojas jóvenes en el establecimiento
in vitro
de Palma Africana (*Elaeis guineensis*)

Proyecto especial presentado como requisito parcial para
optar al título de Ingeniero Agrónomo en Grado
Académico de Licenciatura

presentado por

René Alexander Ávila Parra

Honduras
Diciembre, 2002

RESUMEN

Ávila Parra, René. 2002. Elaboración de un proceso de esterilización superficial de explantes de inflorescencias y hojas jóvenes en el establecimiento *in vitro* de Palma Africana (*Elaeis guineensis*). Proyecto Especial de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 32 p.

La palma africana es una planta alógama de reproducción estrictamente sexual que presenta una alta variabilidad genética y fenotípica al establecer una plantación, por ejemplo las producciones de aceite varían entre 3 a 11 t/ha/año. La micro propagación, que ofrece plantas con las mismas características de la madre, es una alternativa para contrarrestar esta desventaja. El objetivo de este estudio fue evaluar un proceso de desinfección superficial de hojas e inflorescencias para reducir la contaminación en el establecimiento *in vitro* del cultivo. El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental Santo Domingo, Ecuador. Se realizaron cuatro experimentos donde se evaluó la contaminación de los explantes luego de ser tratados con concentraciones de 20, 30, 40 ó 70% de alcohol durante 20, 40 ó 60 s seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 10, 20 ó 30% durante 20, 40 ó 60 min. En explantes de inflorescencias el menor porcentaje de contaminación (20%) se observó cuando los explantes, luego de un lavado general, se sumergieron en una solución de alcohol al 30% durante 60 s, seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 60 min. En explantes de hoja el menor porcentaje de contaminación (20.7%) se observó cuando los explantes, luego de un lavado general, fueron sumergidos en una solución de alcohol al 70% durante 60 s, seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 60 min. Se recomienda tratar las plantas de donde se extraen los explantes con fungicidas y bactericidas sistémicos a fin de reducir el porcentaje de contaminación al momento del establecimiento.

Palabras clave: Alcohol, contaminación, cultivo de tejidos, desinfección, hipoclorito de sodio, micro propagación.

INDICE GENERAL

Portada.....	I
Portadilla.....	11
Autoría.....	111
Página de firmas.....	IV
Dedicatoria.....	V
Agradecimientos.	VI
Resumen.. ..	VII
Nota de prensa.	VIII
Índice general	IX
Índice de cuadros.....	XI
Índice de figuras.....	XIII
Índice de anexos.....	XIV
1. INTRODUCCION	1
1.1 OBJETIVOS	2
1.1.1 Generales	2
1.1.2 Específicos.....	2
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LA PALMA	
2.1 AFRICANA	3
2.2 MEJORAMIENTO GENETICO EN PALMA AFRICANA	4
2.3 MICROPROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE PALMA AFRICANA	5
2.3.1 Producción de cultivos de tejido de crecimiento rápido.....	5
2.3.1 Embriogénesis.....	6
2.3.2 Obtención de plantas jóvenes.....	6
2.3.3 	7
3. 3.1 MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.2 UBICACIÓN	8
3.2.1 MATERIAL VEGETAL	8
3.2.2 Hojas.....	8
3.3 Inflorescencias..	9
3.3.1 TRATAMIENTO DE PALMAS EN EL CAMPO	9
3.4 Productos químicos	9
3.4 LAVADO Y PRUEBAS DE ESTERILIZACION SUPERFICIAL	
3.4 DE LOS EXPLANTES	10
3.4.1 Experimento 1. Efecto del hipoclorito de sodio en la esterilización	
3.4.1 superficial de explantes de hoja e inflorescencia para el	
3.4.1 establecimiento <i>in vitro</i> de palma africana.	10
3.4.1.1 Elaboración del medio de cultivo	11
3.4.1.2 Toma de datos	14
3.4.1.3 Análisis estadístico.	14

3.4.2	Experimento 2. Efecto cualitativo del alcohol y del hipoclorito de sodio en la esterilización superficial de explantes de inflorescencia en el establecimiento <i>in vitro</i> de palma africana.....	14
3.4.2.1	Toma de datos.	16
3.4.2.2	Análisis estadístico	16
3.4.3	Experimento 3. Efecto del alcohol y el hipoclorito de sodio en la esterilización superficial de explantes de inflorescencias en el Establecimiento <i>in vitro</i> de palma africana	16
3.4.3.1	Toma de datos.	17
3.4.3.2	Análisis estadístico.	17
3.4.4	Experimento 4. Efecto del hipoclorito de sodio en la esterilización superficial de explantes de hoja en el establecimiento <i>in vitro</i> de palma africana.....	17
3.4.4.1	Toma de datos.	18
3.4.4.2	Análisis estadístico.	18
3.4.5	Esquema de los experimentos.....	19
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1	EXPERIMENTO 1. EFECTO DEL HIPOCLORITO DE SODIO EN LA ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE EXPLANTES DE HOJA E INFLORESCENCIA PARA EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE PALMA AFRICANA	20
4.1.1	Análisis cuantitativo.	20
4.2	EXPERIMENTO 2. EFECTO CUALITATNO DEL ALCOHOL Y DEL HIPOCLORITO DE SODIO EN LA ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE EXPLANTES DE INFLORESCENCIA EN EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE PALMA AFRICANA.....	
4.2.2	Análisis cualitativo.	22
4.3	EXPERIMENTO 3. EFECTO DEL ALCOHOL Y EL HIPOCLORITO DE SODIO EN LA ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE EXPLANTES DE INFLORESCENCIAS EN EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE PALMA AFRICANA.....	23
4.4	EXPERIMENTO 4. EFECTO DEL HIPOCLORITO DE SODIO EN LA ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE EXPLANTES DE HOJA EN EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE PALMA AFRICANA.....	24
5.	CONCLUSIONES.	26
6.	RECOMENDACIONES	28
7.	BIBLIOGRAFIA	30
8.	ANEXOS.....	31

1. INTRODUCCIÓN

De todas las plantas oleaginosas, la palma africana (*Elaeis guineensis Jacq.*) es la de mayor rendimiento. Aún las plantaciones más pobres de África sobrepasan en producción a los mejores campos cocoteros, cultivo que la palma ha dejado atrás en el campo de la exportación (Hartley, 1983).

La reproducción vegetativa de palma africana, que es una planta perenne y alógama de reproducción estrictamente sexual, presenta, debido a su gran interés económico, una ventaja evidente para la multiplicación de los individuos con caracteres excepcionales (Ahee *et al.*, 1981). Los trabajos que utilizan las posibilidades que ofrecen los métodos de cultivo de tejidos *in vitro* son importantes debido a que esta vía permite teóricamente conseguir una reproducción masiva de plántones a partir de una porción de tejido además, de que el material obtenido presenta las mayores garantías sanitarias posibles.

Adicionalmente, los tejidos conservados bajo un volumen reducido permiten construir bancos de material genético mucho más prácticos, para la utilización y la conservación, que las colecciones de individuos adultos en el campo. Con esto se gana un tiempo notable en la valorización de los resultados de la selección, y el material vegetal proporcionado a las plantaciones es mucho más interesante, tanto en la producción como en la homogeneidad (Ahee *et al.*, 1981).

En términos de productividad, el progreso realizado tomará otro giro mediante la implementación de la propagación *in vitro* del cultivo, llegando a obtener plantaciones con un rendimiento 20-25% superior, bajo condiciones ecológicas favorables tradicionales, a través de la cría de individuos élite (Noiret *et al.*, 1985).

Desde 1970, la French Oil Crops Research Institute (IRHO), en colaboración con L'Institut Français de Recherche Scientifique (ORSTOM), se han involucrado en la investigación y métodos de propagación *in vitro* de palma africana. Técnicas comunes como estacas e injertos no pueden ser aplicadas en este cultivo debido a que tienen un solo punto de crecimiento vegetativo que es el ápex (Noiret *et al.*, 1985).

Diferentes procesos han sido investigados para lograr la propagación *in vitro* de palma africana. La utilización a partir del ápice meristemático ha sido un fracaso, pero otros métodos como la inducción de la regeneración de vitroplantas a partir de callo obtenido de diferentes órganos como raíces, inflorescencias y hojas, ha dado muy buenos resultados (Noiret *et al.*, 1985).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Generales

Desarrollar un método de esterilización superficial de explantes de inflorescencias Y de hojas para asegurar el establecimiento *in vitro* de palma africana.

1.1.2 Específicos

Elaborar un protocolo de esterilización superficial para poder establecer explantes de inflorescencias *in vitro*.

Elaborar un protocolo de esterilización superficial para poder establecer explantes de hojas *in vitro*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LA PALMA AFRICANA

La palma africana, conocida también como palma de aceite tiene el nombre científico *Eleaëis guineensis*. Pertenece a la familia de las palmáceas y es probablemente, originaria de África. Es una planta típicamente ecuatorial, cuya área de dispersión se extiende entre los 16 grados latitud norte y 15 grados de latitud sur (Nápoles y Bejarano, 1991).

Los principales países productores de aceite de palma son: Nigeria, Congo, Camerún, Dahomey, Costa de Marfil y Sierra Leona, en África e Indonesia y Malasia en el Lejano Oriente (Nápoles y Bejarano, 1991).

En África, la palma permaneció como planta propia del lugar, satisfaciendo las necesidades de aceite y de vitamina A en la dieta; no fue sino hasta finales del siglo XVIII y comienzos del siglo XIX que entró al comercio mundial. El fruto de palma de aceite es una drupa, cuya pulpa exterior proporciona el aceite comercial. Dentro de la pulpa o mesocarpio se encuentra una nuez de cáscara dura que contiene la almendra, la que más tarde provee otros dos subproductos comerciales adicionales, el aceite de almendra (de composición similar al aceite de coco) y el alimento residual para el ganado (la torta de almendras)(Hartley, 1983).

La palma de aceite es una planta de tierras bajas, y en las grandes áreas de palmares productivos se la encuentra desde el nivel del mar hasta cerca de 300 m. Sin embargo, cuando estas áreas colindan con regiones montañosas o donde la palma ha sido transportada a mesetas altas que tienen suficiente precipitación, ha podido sobrevivir a altitudes mucho mayores. Lo más probable es que las palmas de aceite crezcan naturalmente cerca de los ríos, en donde están sujetas a menor competencia de la flora selvática, por lo tanto penetra más luz, y donde habiendo mucha humedad esta no es excesiva para la planta (Hartley, 1993).

Según Hartley (1983), el fruto de la palma africana es una drupa sésil, el pericarpio del fruto consta del exocarpio exterior o piel, el mesocarpio o pulpa, y el endocarpio o cuesco. En cuanto a la forma interna del fruto la palma africana se puede clasificar en:

Dura: cuesco de 2 a 8 mm de espesor, bajo contenido de mesocarpio.

Tenera: cuesco de 0.5 a 4 mm de espesor, contenido medio a alto de mesocarpio (60 a 96%, pero ocasionalmente baja hasta 55%).

Pisífera: sin cuesco.

La palma africana se ha convertido en una de las principales fuentes de aceite vegetal. En 1999, la producción mundial de los principales aceites y grasas fue de 70.73 millones de toneladas, de las cuales el aceite de palma representó 7.5 millones (10.16%) (Rajanaidu *et al.*, 1999).

2.2 MEJORAMIENTO GENÉTICO EN PALMA AFRICANA

Con el mejoramiento genético de la palma africana, se demostró que el material élite obtenido en Nigeria ha rendido hasta 10-12 toneladas de aceite ha/año, lo cual representa el doble del rendimiento actual de 5-6 toneladas. Estas palmas de alto rendimiento son más bajas y su incremento anual de altura es de 20-25 cm/año, lo cual tiene evidentes ventajas en comparación con los 45-75 cm/año del material de siembra actual. Las palmas enanas podrían reducir el costo de la cosecha, y a la vez prolongar el ciclo de renovación del cultivo. Además, las plantas seleccionadas mostraron una considerable variación en cuanto a la composición de ácidos grasos, cuyo valor de yodo superaba los 60 (Rajanaidu *et al.*, 1999).

Las variedades seleccionadas de palma africana son híbridos 100% tenera (frutas con cuesco delgado), obtenidas del cruce de palmas duras (cuesco grueso) con palmas pisíferas (frutas sin cuesco, usualmente abortada). La plantas son seleccionadas por su producción pero tomando en cuenta el rendimiento de aceite (contenido de ácidos grasos insaturados), su capacidad limitada de crecer (reducción de los costos de cosecha) y su capacidad de tolerancia a plagas y enfermedades (Noiret *et al.*, 1985).

El efecto de la heterosis en la productividad se ha explotado, obteniendo plantas de cruces de individuos no relacionados y con características complementarias. Igualmente se han realizado pruebas comparativas para determinar la habilidad combinatoria de características con baja heredabilidad como la producción. La hibridación interespecífica con la palma aceitera americana, la cual tiene gran cantidad de aceite y un pequeño crecimiento vertical, fue emprendida hace quince años atrás y ha generado gran avance para estos dos caracteres (Noiret *et al.*, 1985).

Los resultados obtenidos, luego de 30 años, para la producción de palma de aceite bajo condiciones de ambiente promedio se obtuvieron cruzando los híbridos *E. guineensis* x *E. oleifera* con sus progenitores por medio de una selección recurrente recíproca (SRR) como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Aumento en la producción de aceite mediante el mejoramiento genético de palma africana. Indonesia, 1980.

Híbrido	Aceite de Palma (t/ha/año)
Selección normal	3.3
Primer ciclo (SRR)	3.9
Segundo Ciclo (SRR)	4.5

Fuente: Noire *et al.*, 1985

A estos avances se debe agregar un aumento del 10% en el porcentaje de ácidos grasos insaturados y un 20% en la reducción del crecimiento vertical (Noiret *et al.*, 1985). Un estudio realizado por Schwediman *et al.* (1990) demostró que los rendimientos de ciertas plantas seleccionadas en promedio fue de 6.3 t aceite ha/año, pero en un rango que varía entre 3 a 11 t aceite ha/año. La clonación de los mejores individuos ofrece obvias ventajas, al poder reproducir masivamente individuos con las mismas características de la planta madre.

2.3 MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PALMA AFRICANA

El material vegetal inicial lo constituyen fragmentos de hojas jóvenes, tomadas sin lesionar el ápice meristemático, de tal modo que aún sea posible el desarrollo del árbol. El número de explantes puede ser de aproximadamente 400 a partir de un plantón de 2 años (contándose la edad a partir de la germinación), y mayor de 1,000 a partir de un árbol adulto. El porcentaje de éxito por árbol varía según el individuo de origen, y de modo de muy significativo según la concentración de fitohormonas (Ahee *et al.*, 1981).

Se ha podido conseguir callo primario tanto a partir de árboles adultos como de plantones de semillero. El porcentaje de explantes procedentes de un árbol que producen callo a los 100 días muy pocas veces es menor a un 20%. En cierto número de casos estos porcentajes superan el 60% (Ahee *et al.*, 1981). La producción de callo varía de árbol a árbol dependiendo de su estado fisiológico y de otros factores. Al momento, entre el 20% y 80% de los explantes de hoja producen callo (Noiret *et al.*, 1985).

Los primeros callos aparecen poco más o menos a los 60 días después de la puesta en cultivo. A los 100 días, el número de explantes portadores de callos casi no evolucionan; entonces se aíslan y se transplantan a un nuevo medio de cultivo (Ahee *et al.*, 1981).

Los callos, de un color amarillento, aparecen en las nervaduras. Estos callos son formados por células muy pequeñas estrechamente unidas y prosiguen el crecimiento en el explante de origen. Después del aislamiento, este crecimiento es lento (pudiéndose observar un crecimiento de un 50% de materia fresca dentro de dos meses) y prosigue durante los subcultivos sucesivos. En el subcultivo, los callos adquieren una estructura llamada nodular ya que están formados por pequeños nódulos unidos unos a otros, de un tamaño

tamaño variable que normalmente no pasa de 0.5 cm de diámetro. En algunos casos este aspecto nodular queda oculto, probablemente por la presencia de tejidos desescamantes que producen un callo más difuso (Ahee *et al.*, 1981).

2.3.1 Producción de cultivos de tejido de crecimiento rápido

Una de las etapas que conducen a la regeneración de plantas jóvenes de palma aceitera por el método de propagación vegetativa *in vitro* es la obtención de cultivos de tejido de crecimiento rápido (Ahee *et al.*, 1981).

De colocarse en medios convenientes, algunos callos evolucionan en una forma que llamamos cultivo de tejido de crecimiento rápido (CCR) por oposición a los callos primarios. Para la mayoría de estos, el plazo de duplicación de la materia fresca varía de los 20 días según el cultivo considerado y el medio utilizado; aunque para cierto número de los mismos, este plazo es mucho más largo pudiendo llegar a 30 y hasta 60 días (Ahee *et al.*, 1981).

El aspecto y la estructura de los CCR son muy distintos de los callos primarios. Los caracteriza un color más claro, una estructura ligera y aireada algo granulosa y una friabilidad al tacto. En un corte la estructura de los CCR incluye macizos dispersos de células meristemáticas, de células de gran tamaño y de espacios lagunares (Ahee *et al.*, 1981).

2.3.2 Embriogénesis

Para un determinado clan, cuando la cantidad de tejido de crecimiento rápido es suficiente, se lleva a cabo la fase siguiente:

Se colocan los tejidos en condiciones nuevas de cultivo. Al cabo de un plazo variable aparecen formaciones blancas de contornos bien delimitados que se polarizan y se vuelven clorofílicas. Tales formaciones son independientes de los tejidos adyacentes y son muy parecidas por su estructura a unos verdaderos embriones *Elaeis*. En efecto, las mismas poseen un limbo cotiledóneo vascularizado bien individualizado, habiendo diferenciado lo que se puede asimilar a un polo caulinario y un polo radicular. Estas formaciones corresponden al parecer a embrioides y el fenómeno muestra todas las características de una embriogénesis somática (Reinert *et al.*, 1973).

Luego de un periodo de callogénesis durante el cual los explantes son mantenidos en un medio con auxinas, las estructuras embriogénicas son obtenidas en subcultivos de callo en un medio que contiene 2,4-D, citoquininas y carbón activado (Hanower y Pannetier, 1982). Cuando las estructuras embriogénicas están bien desarrolladas, son subcultivadas en un medio libre de hormonas para la proliferación del embrión y el desarrollo de las plántulas (Schwendiman *et al.*, 1990).

2.3.3 Obtención de plantas jóvenes

Cuando los embrioides formados a partir de los tejidos de CCR llegan a tener cierto tamaño, se aíslan y se transplantan a un medio que estimule su desarrollo. A consecuencia de este trasplante, se observa, en cierto número de casos, un fenómeno de multiplicación que permite lograr a partir de un solo embriode visible aislado, varios plantones jóvenes con hojas (Ahee *el al.*, 1981).

Después de un plazo de unos 2 meses, el parte aérea alcanza unos 2 cm. Algunos individuos tienen hojas y raíces, constituyendo en este estado plantones completos; muchos otros deben experimentar un tratamiento complementario de arraigo. Después de este tratamiento todas las plantas muestran raíces adventicias grandes en un plazo de 3 semanas. Se prosigue el cultivo de plántulas *in vitro* hasta que alcancen un tamaño suficiente (hoja de aproximadamente 10 cm de largo) para que puedan ser trasladadas a condiciones no axénicas. La producción masiva de plántulas es muy posible tanto por la calidad de tejidos que se puede obtener mediante la proliferación de CCR como por el poder de autopropagación de los embrioides (Ahee *el al.*, 1981).

Según Ahee *el al.* (1981) se enviaron muchas plántulas procedentes de cultivos *in vitro* a diversos países, especialmente a la estación de La Me en Costa de Marfil. Estas plántulas fueron colocadas en previvero y luego en el vivero antes de ser sembradas en el campo. Las primeras plántulas procedían de embrioides logrados en 1976, y fueron sembradas en La Me en junio de 1978. Después de dos años, las características de crecimiento y el aspecto morfológico de los árboles parecen ser muy normales. Su cariotipo resultó ser muy conforme ($2n = 32$), y las primeras inflorescencias aparecieron en julio de 1980.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

Las plantas de donde se extrajo el material vegetativo para evaluar los mejores métodos de des infestación para el establecimiento *in vitro* de palma africana, se encuentran localizadas en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIAP) Estación Experimental Santo Domingo, lote La Tolita, ubicado en el km 38 de la vía Santo Domingo de los Colorados-Quininde, perteneciente a la provincia de Pichincha (Ecuador), geográficamente situado entre las coordenadas 79° 22' de Longitud Oeste y 00° 01' de Latitud Norte, con una altitud de 360 msnm. Las características climáticas se especifican en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características climáticas en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIAP), Estación Experimental Santo Domingo. Ecuador, 2002.

Variables	Promedios Anuales		
	1987/1996.	1999/2000	20011
Temperatura (OC)	24.31	23.5	24.2
Heliofania (horas sol/año)	774.51	659.5	658.0
Humedad relativa	85.70	88.5	86.7
Precipitación (mm)	3166.58	2824.3	2643.9

Fuente: Instituto Nacional de Metereología e Hidrológica (INAMHI), Estación La Concordia. 1 Hasta Octubre del 2001

Las palmas son de la variedad "Tenera", de dos años de edad y fueron escogid9s 20 individuos para el estudio. .

3.2 MATERIAL VEGETAL

3.2.1 Hojas

Los explantes son extraídos de las hojas jóvenes de la lanza "flecha" de la palma africana sin dañar el meristemo terminal.

La obtención de los explantes se realizó dejando descansar cada planta durante un mes, con el fin de no afectar su desarrollo; se cosecharon cinco plantas semanalmente.

3.2.2 Inflorescencias

Los explantes fueron extraídos de la base de las hojas que producen frutos, estos frutos fueron escarificados con el fin de extraer las inflorescencias.

Las inflorescencias fueron cosechadas a manera de obtener dos por semana.

3. 3 TRATAMIENTO DE LAS PALMAS EN EL CAMPO

Las plantas de donde se extrajeron los explantes fueron previamente tratadas con ciertos productos químicos que se especifican a continuación, con el fin de reducir el porcentaje de contaminación en el laboratorio (Anexos 1, 2, 3,4).

3.3.1 Productos químicos

Phyton

Es un producto químico bactericida-funguicida sistémico. Su composición química es a base de sulfato de cobre pentahidratado (24%) e ingredientes inertes (76%). La dosis recomendada es de 1 litro de producto por hectárea. Se aplicaron 400 cc de solución por planta una vez cada semana, durante 4 meses, mientras se llevaba a cabo el estudio, a una concentración de 2,5 cc/l. La concentración fue aumentando en 0.5 cc/l en cada aplicación hasta llegar a 4 cc/l.

Vitavax

Es un producto químico fungicida sistémico, recomendado para la prevención y control de "pudrición de flecha y cogollo" (*Fusarium* sp.), (*Rhizoctonia* sp.), (*Thielaviopsis paradoxa*), la cual es una enfermedad endémica del área. Su composición química es a base de carboxin (5,6 dihydro-2 methyl-n-phenyl-1,4 oxathin-3-carboxamile) (20%), captan (n-trichloromethylthio-4-cyclohexene 1,2-dicarboxamide) (20%) e ingredientes inertes (60%). La dosis recomendada es de 4 g de producto por litro de agua, aplicando de 1 a 2 litros de solución por palma adulta luego de una poda de los tejidos afectados. Para las plantas utilizadas en este estudio, por ser de menor tamaño se les realizó una aplicación de 350 cc de solución por planta a una concentración de 8.5 gil, al principio del estudio, el cual tuvo una duración 4 meses.

Cuadro 3. Niveles de hipoclorito de sodio y tiempos de exposición para la esterilización superficial de explantes de hoja e inflorescencia en el establecimiento *in vitro* de palma africana. INIAP, Ecuador, 2002 (Experimento 1).

No. Tratamiento	Tipo de Explante	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (min)
1	Hoja	10	20
2	Hoja	10	40
3	Hoja	10	60
4	Hoja	20	20
5	Hoja	20	40
6	Hoja	20	60
7	Inflorescencia	10	20
8	Inflorescencia	10	40
9	Inflorescencia	10	60
10	Inflorescencia	20	20
11	Inflorescencia	20	40
12	Inflorescencia	20	60

Finalmente el material fue llevado a la cámara de flujo laminar, para realizar tres enjuagues con agua destilada estéril antes de proceder a la siembra en el medio previamente preparado.

La Providina es un antiséptico de amplio espectro formulado con providina yodada, que contiene un 10-11 % de yodo activo totalmente soluble en agua. Así se obtiene una solución yodo-agua muy estable con un 1 % de yodo disponible. Este antiséptico actúa como bactericida, fungicida, esporicida, viricida.

Este experimento se realizó con 12 tratamientos, que corresponden a dos tipos de explante (hoja e inflorescencia), sumergidos en dos concentraciones de hipoclorito de sodio (10 Y 20%) durante tres tiempos (20, 40 y 60 min). Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones y 10 unidades experimentales (VE) por repetición para un total de 360 VE, con el objetivo de conocer cual es la mejor concentración y tiempo de exposición para obtener un menor porcentaje de contaminación en la siembra de los explantes. En el Cuadro 3, se muestran los tratamientos que se llevaron a cabo en este experimento y las respectivas concentraciones de hipoclorito de sodio con los tiempos de exposición.

3.4.1.1 Elaboración del medio de cultivo. Se colocaron 500 ml de agua destilada en un biker con capacidad de 2000 ml. Se mantuvo en agitación constante mientras se agregaron las soluciones madre correspondientes de macroelementos, microelementos, vitaminas, hierro y hormona. A continuación se aforó con la ayuda de un balón aforador y se procedió a medir el pH nivelándolo a 5.7-5.8.

Seguidamente se agregó el agar, a razón de 8 g/l de medio de cultivo. Una vez agregado el agar, el medio se calentó en un horno microondas durante 10 min aproximadamente, para poder disolverlo. Durante este proceso de disolución del agar, se sacó el medio del microondas cada 4 min, aproximadamente, y se colocó en un agitador magnético durante 1 min, para ayudar a disolver el agente gelatinizante y evitar un sobrecalentamiento del medio.

Debido a que la palma muestra un pigmento café a negro después del corte, se aplicó carbón activado al medio de cultivo. Estos pigmentos son compuestos fenólicos y taninos que se oxidan y posteriormente dificultan el crecimiento y desarrollo del cultivo *in vitro*. El carbón activado es un compuesto antioxidante ya que contribuye a absorber esos compuestos fenólicos cuando están presentes (Espinal-Rueda, 2002).

Finalmente se dispensó el medio en tubos de ensayo, a razón de 10 ml por contenedor. Los contenedores previamente identificados, se taparon y colocaron en un autoclave durante 20 minutos a 121°C de temperatura y 15 PSI de presión para proceder a la esterilización.

El medio de cultivo utilizado (Cuadro 4), es una formulación que se ha reportado para el cultivo *in vitro* de embriones en *Cocos nucifera* que pertenece a la misma familia, palmáceas o arecáceas, que la palma africana (*Elaeis guineensis*) (Rillo y Paloma, 1990). El tipo de hormona (2,4-D) y la concentración (0.5 mg/l de solución) que se agregó al medio de cultivo obedece a que la literatura reporta la propagación *in vitro* de palma africana a partir de la embriogénesis somática indirecta, es decir, a través de la formación de callo inducido con la utilización de la hormona 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Espinal-Rueda, 2002).

Cuadro 4. Composición nutricional del medio de cultivo utilizado para el establecimiento *in vitro* de palma africana a partir de explantes de hoja e inflorescencia. INIAP, Ecuador, 2002.

Compuesto	Fórmula	Concentración (m gil)
Macroelemen tos		
Ammonium nitrate	NH ₄ N ₃	1650.000
Potassium nitrate	KN ₃	1900.000
Magnesium sulfate heptahydrate	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.000
Calcium chloride dihydrate	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.000
Potassium phosphate (monobasic)	KH ₂ PO ₄	170.000
Microelementos		
Potassium iodido	KI	0.830
Boric acid	H ₃ B ₃	6.200
Manganese sulfate tetrahydrate	MnSO ₄ ·4H ₂ O	15.600
Zinc sulfate heptahydrate	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.600
Sodium molybdate dihydrate	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.250
Cupric sulfate pentahydrate	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Cobalt chloride Hexahydrate	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Vitaminas		
Meso inositol		100.000
Nicotinic acid		0.500
Pyridoxine HCl		0.500
Thiamine HCl		0.500
Glycine		2.000
Fuente de hierro		
Sodium salt EDTA	Na ₂ EDTA	37.300
Ferrous sulfate heptahydrate	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.800
Reguladores de crecimiento		
2,4-D		0.500
Sucrosa		30000
Carbón activado		2500
Agar		8000

Fuente: Rillo y Paloma (1990).

3.4.1.2 Toma de datos. A los 15 días de sembrados los explantes se evaluó el número de tubos contaminados por tratamiento, el tipo de contaminación (hongo, bacteria) y la sobrevivencia de los explantes a los distintos tratamientos.

No se tomó en cuenta la sobrevivencia de explantes contaminados.

3.4.1.3 Análisis estadístico. Para este experimento se utilizó un diseño completo al azar (DCA), el cual constó de 6 tratamientos y 3 repeticiones. Cada repetición constó de 10 UE por tratamiento.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparar los tratamientos, y una separación de medias Student-Newman-Keulus (SNK) para determinar el mejor tratamiento. La separación de medias se realizó para la interacción de las variables tratamiento (*T*) y contaminación (*C*).

No se realizó una separación de medias para determinar la interacción de los tratamientos (*T*) y sobrevivencia (*S*), debido a que la sobrevivencia está influenciada por otros factores como tipo de hormona, concentración de hormona, composición de medio, y otros, los cuales no fueron objetivo de este estudio

3.4.2 Experimento 2. Efecto cualitativo del alcohol y del hipoclorito de sodio en la esterilización superficial de explantes de in florescencia en el establecimiento *in vitro* de palma africana.

Este segundo experimento fue diseñado con el fin de obtener inflorescencias no contaminadas y viables; esto debido a que los explantes de inflorescencia en el experimento 1 se observaron quemados luego de ser expuestos a los tratamientos antes mencionados, posiblemente por el prolongado tiempo de exposición (1 min) a una concentración alta de alcohol (70%) utilizada durante el proceso de esterilización.

Este experimento no se realizó con el fin de validar estadísticamente cuál es el mejor tratamiento, debido al impedimento logístico que implica la cantidad de UE necesarias para este procedimiento. El objetivo de este experimento fue observar cualitativamente cuales son los mejores seis tratamientos, para luego realizar un tercer experimento con los tratamientos previamente seleccionados, y así obtener estadísticamente un mejor tratamiento.

La desinfectación se realizó siguiendo el mismo procedimiento explicado en el inciso 3.4.1 hasta eliminar los rastros de la solución desinfectante en los explantes. Luego se aplicaron los tratamientos especificados en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Niveles de alcohol e hipoclorito de sodio con sus respectivos tiempos de exposición utilizados para la esterilización superficial de explantes de inflorescencia en el establecimiento *in vitro* de palma africana, (análisis cualitativo). INIAP, Ecuador, 2002 (Experimento 2).

Tratamiento	Alcohol (%)	Tiempo de exposición (s)	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (m in)
Testigo	--	--	--	--
1	30	30	--	--
2	30	30	10	20
3	30	30	10	40
4	30	30	10	60
5	30	40	--	--
6	30	40	10	20
7	30	40	10	40
8	30	40	10	60
9	30	60	--	--
10	30	60	10	20
11	30	60	10	40
12	30	60	10	60
13	40	30	--	--
14	40	30	10	20
15	40	30	10	40
16	40	30	10	60
17	40	40	--	--
18	40	40	10	20
19	40	40	10	40
20	40	40	10	60
21	40	60	--	--
22	40	60	10	20
23	40	60	10	40
24	40	60	10	60

Una vez realizado el procedimiento de des infestación, el material fue llevado a la cámara de flujo laminar para realizar tres enjuagues con agua destilada estéril antes de proceder a la siembra. La elaboración del medio de cultivo se realizó utilizando el mismo procedimiento explicado en el inciso 3.4.1.1.

Este experimento se realizó con 24 tratamientos y un testigo, que corresponden a explantes de inflorescencia sumergidos en dos concentraciones de alcohol (30 y 40%) durante tres tiempos (30, 40 Y 60 s), seguido de hipoclorito de sodio al 10% durante cuatro tiempos de exposición (0, 20, 40 Y 60 min). Cada tratamiento tuvo una repetición y 5 UE por repetición para un total de 125 UE, con el objetivo de conocer cualitativamente cual es la mejor concentración y tiempo de exposición y así obtener material viable y un

menor porcentaje de contaminación en la siembra de los explantes. Si en el presente experimento se observa que las concentraciones de alcohol no son suficientes para garantizar un bajo porcentaje de contaminación, se procederá a realizar pruebas con porcentajes mayores (50 y 60%).

3.4.2.1 Toma de datos. A los 15 días de sembrados los explantes, se evaluó el número de tubos contaminados por tratamiento, el tipo de contaminación (hongo, bacteria) y la sobrevivencia de los explantes a los distintos tratamientos.

No se tomó en cuenta la sobrevivencia de explantes contaminados.

3.4.2.2 Análisis estadístico. En este experimento no se realizó análisis estadístico debido a la naturaleza cualitativa del experimento.

3.4.3 Experimento 3. Efecto del alcohol y el hipoclorito de sodio en la esterilización superficial de explantes de inflorescencias en el establecimiento *in vitro* de palma africana.

De las observaciones obtenidas en el Experimento 2, se tomaron los tratamientos que mejores resultados mostraron, con el fin de validarlos estadísticamente.

Se realizó la desinfección siguiendo el mismo procedimiento explicado en el inciso 3.4.1 hasta eliminar los rastros de la solución desinfectante en los explantes, luego se aplicaron los tratamientos especificados en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Niveles de alcohol e hipoclorito de sodio con sus respectivos tiempos de exposición utilizados para la esterilización superficial de explantes de inflorescencia en el establecimiento *in vitro* de palma africana. INIAP, Ecuador, 2002 (Experimento 3).

Tratamiento	Alcohol (%)	Tiempo de exposición (s)	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (min)
Testigo	--	--	--	--
1	30	40	10	20
2	30	40	10	40
3	30	40	10	60
4	30	60	10	20
5	30	60	10	40
6	30	60	10	60

Una vez realizado el procedimiento de desinfección, el material fue llevado a la cámara de flujo laminar, para realizar tres enjuagues con agua destilada estéril antes de proceder a la siembra. La preparación del medio de cultivo se realizó utilizando el mismo procedimiento explicado en el punto 3.4.1.1.

Este experimento se realizó con 6 tratamientos y un testigo, que corresponden a explantes de inflorescencia sumergidos en alcohol al 30% durante dos tiempos de exposición (40 y 60 s), seguido de hipoclorito de sodio al 10% durante tres tiempos de exposición (20, 40 y 60 min). Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones y 10 UE por repetición, para un total de 210 UE, con el objetivo de conocer cualitativamente cuál es la mejor concentración y tiempo de exposición, para obtener material viable y un menor porcentaje de contaminación, en la siembra de los explantes.

3.4.3.1 Toma de datos. A los 15 días de sembrados los explantes se evaluó el número de tubos contaminados por tratamiento, el tipo de contaminación (hongo, bacteria) y la sobrevivencia de los explantes a los distintos tratamientos.

No se tomó en cuenta la sobrevivencia de explantes contaminados.

3.4.3.2 Análisis estadístico. Para este experimento se utilizó un diseño completo al azar (DCA), el cual consta de 6 tratamientos y 3 repeticiones. Cada repetición constó de 10 unidades experimentales por tratamiento.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEV A) para comparar los tratamientos y una separación de medias Student-Newman-Keuls (SNK) para determinar el mejor tratamiento. La separación de medias se realizó para la interacción de las variables tratamiento (T) y contaminación (C).

No se realizó una separación de medias para determinar la interacción de los tratamientos y sobrevivencia, debido a que la sobrevivencia está influenciada por otros factores como tipo de hormona, concentración de hormona, composición de medio y otros, los cuales no fueron objetivo de este estudio.

3.4.4 Experimento 4. Efecto del hipoclorito de sodio en la esterilización superficial de explantes de hoja en el establecimiento *in vitro* de palma africana.

Debido a la contaminación que tuvieron los explantes de hoja resultado de los tratamientos utilizados en el Experimento 1, se probaron dos dosis de hipoclorito de sodio (20 y 30%), con el fin de disminuir la incidencia de contaminantes.

Se realizó la desinfección siguiendo el mismo procedimiento explicado en el punto 3.4.1 hasta sumergir los explantes en alcohol al 70% durante un minuto. Luego se aplicaron los tratamientos especificados en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Niveles de hipoclorito de sodio con sus respectivos tiempos de exposición utilizados para la esterilización superficial de explantes de hoja en el establecimiento *in vitro* de palma africana. INIAP, Ecuador, 2002 (Experimento 4).

No. Tratamiento	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (min)
Testigo	--	--
1	20	20
2	20	40
3	20	60
4	30	20
5	30	40
6	30	60

Una vez realizado el procedimiento respectivo de desinfección, el material fue llevado a la cámara de flujo laminar, para realizar tres enjuagues con agua destilada estéril antes de proceder a la siembra. La realización del medio de siembra se realizó utilizando el mismo procedimiento explicado en el punto 3.4.1.1.

Este experimento se realizó con 6 tratamientos y un testigo, que corresponden a explantes de hoja sumergidos en dos concentraciones de hipoclorito de sodio (20 y 30%) durante tres tiempos de exposición (20, 40 Y 60 min). Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones y 10 UE por repetición para un total de 210 UE's, con el objetivo de conocer cualitativamente cual es la mejor concentración y tiempo de exposición, para obtener material viable y un menor porcentaje de contaminación en la siembra de los explantes.

3.4.4.1 Toma de datos. A los 5 días de sembrados los explantes, se evaluó el número de tubos contaminados por tratamiento, el tipo de contaminación (hongo, bacteria) y la sobrevivencia de los explantes a los distintos tratamientos.

No se tomó en cuenta la sobrevivencia de explantes contaminados.

3.4.4.2 Análisis estadístico. Para este experimento se utilizó un diseño completo al azar (DCA), el cual consta de 6 tratamientos y 3 repeticiones. Cada repetición consta de 10 UE por tratamiento.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEV A) para comparar los tratamientos y una separación de medias Student-Newman-Keuluss (SNK) para determinar el mejor tratamiento. La separación de medias se realizó para la interacción de las variables tratamiento (T) y contaminación (C).

No se realizó una separación de medias para determinar la interacción de los tratamientos y sobrevivencia (S), debido a que la sobrevivencia está influenciada por otros factores como tipo de hormona, concentración de hormona, composición de medio y otros, los cuales no fueron objetivo de este estudio.

3.4.5 Esquema de los experimentos

Antes de iniciar los tratamientos correspondientes de esterilización superficial con alcohol e hipoclorito de sodio, todos los explantes fueron expuestos a un lavado general, explicado en el inciso 3.4. 1.

A partir de los datos obtenidos en el experimento 1. se pudo tomar decisiones para proceder a los experimentos 2 y 3 de inflorescencia, y al experimento 4 de hoja. El flujo de los experimentos se muestra en la Figura 1.

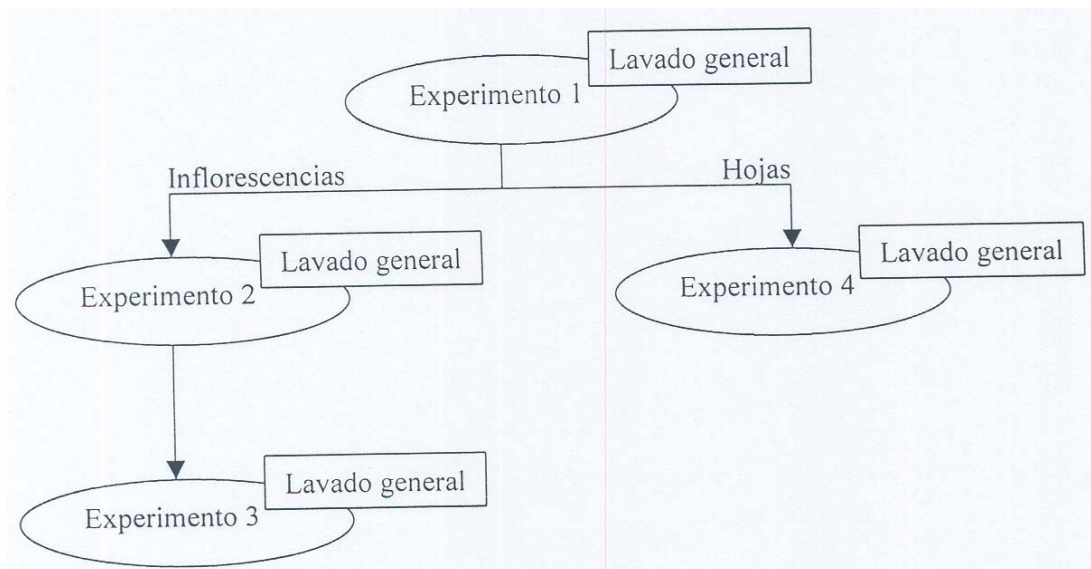


Figura 1. Flujo de los experimentos realizados para la esterilización superficial de explantes de hoja e inflorescencia para el establecimiento *in vitro* de Palma Africana. INIAP, Ecuador, 2002.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EXPERIMENTO 1. EFECTO DEL HIPOCLORITO DE SODIO EN LA ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE EXPLANTES DE HOJA E INFLORESCENCIA PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE PALMA AFRICANA

A los 15 días de sembrados los explantes, se evaluaron los tratamientos cuyos resultados se especifican en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Datos obtenidos de los tratamientos utilizados durante el proceso de esterilización superficial de explantes de hoja e in florescencia en el establecimiento *in vitro* de palma africana. INIAP, Ecuador, 2002 (Experimento 1).

Explante	No. Tubos sembrados	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (min)	Contaminación (%)		Sobrevivencia (%)
				bacterias	hongos	
Hoja	30	10	20	100	--	0
Hoja	30	10	40	100	--	0
Hoja	30	10	60	100	--	0
Hoja	30	20	20	100	--	0
Hoja	30	20	40	100	--	0
Hoja	30	20	60	100	--	0
Inflorescencia	30	10	20	0	--	0
Inflorescencia	30	10	40	0	--	0
Inflorescencia	30	10	60	0	--	0
Inflorescencia	30	20	20	0	--	0
Inflorescencia	30	20	40	0	--	0
Inflorescencia	30	20	60	0	--	0

4.1.1 Análisis cuantitativo

En este experimento no se realizó análisis estadístico debido a que no se obtuvo sobrevivencia, como resultado de los tratamientos por la contaminación de los explantes de hoja y la posible quemazón u oxidación de los explantes de inflorescencia.

En el caso de las hojas, parece ser que debido a que éstas están en constante exposición al medio ambiente tienen una mayor contaminación. Para poder ser controlada esta contaminación, los explantes deben ser expuestos a una concentración de 70% de alcohol durante 1 min seguido de una concentración de 10% de hipoclorito de sodio durante distintos tiempos de exposición (20, 40 y 60 min). Por otro lado, las inflorescencias, al estar protegidas por una espata exterior y una espata interior están menos expuestas al medio ambiente lo que reduce la probabilidad de contaminación. En adición, la inflorescencia es un material más tierno y succulento por lo tanto más sensible a los altos tiempos de exposición al alcohol.

4.2 EXPERIMENTO 2. EFECTO CUALITATIVO DEL ALCOHOL Y DEL HIPOCLORITO DE SODIO EN LA ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE EXPLANTES DE INFLORESCENCIA EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE PALMA AFRICANA.

A los 15 días de sembrados los explantes se evaluaron los tratamientos cuyos resultados se especifican en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Datos obtenidos de los tratamientos utilizados durante el proceso de esterilización superficial de explantes de inflorescencia en el establecimiento *in vitro* de palma africana. INIAP, Ecuador, 2002 (Experimento 2).

No. Tubos	Alcohol (%)	Tiempo de exposición (s)	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (min)	Contaminación (%)			Sobrevivencia (%)
					bacterias	hongos	total	
15	--	--	--	--	100.0		100.0	0.0
15	30	30	10	O	100.0		100.0	0.0
15	30	30	10	20	60.0		60.0	26.7
15	30	30	10	40	86.7		86.7	26.7
15	30	30	10	60	60.0		60.0	33.3
15	30	40	10	O	100.0		100.0	0.0
15	30	40	10	20	53.3		53.3	26.7
15	30	40	10	40	60.0		60.0	26.7
15	30	40	10	60	40.0		40.0	26.7
15	30	60	10	O	100.0		100.0	0.0
15	30	60	10	20	13.3		13.3	40.0
15	30	60	10	40	20.0		20.0	60.0
15	30	60	10	60	20.0		20.0	46.7
15	40	30	10	O	100.0		100.0	0.0
15	40	30	10	20	13.3		20.0	46.7
15	40	30	10	40	26.7		26.7	53.3
15	40	30	10	60	20.0		20.0	53.3
15	40	40	10	O	100.0		100.0	0.0
15	40	40	10	20	13.3		13.3	26.7
15	40	40	10	40	20.0		20.0	26.7
15	40	40	10	60	20.0		20.0	33.3
15	40	60	10	O	100.0		100.0	0.0
15	40	60	10	20	6.7		6.7	20.0
15	40	60	10	40	6.7		6.7	26.7
15	40	60	10	60	13.3		13.3	26.7

4.2.1 Análisis cualitativo

En este experimento se evaluó la contaminación de los explantes a los 15 días de sembrados. De acuerdo con los resultados observados, se determinó que los explantes de inflorescencia luego de ser desinfectados, siguiendo el mismo procedimiento explicado en el inciso 3.4.1 hasta eliminar los rastros de la solución desinfectante en los explantes, responden de mejor manera a una concentración de 30% de alcohol durante dos tiempos de exposición (40 y 60 s) seguido de una concentración de 10% de hipoclorito de sodio durante tres tiempos de exposición (20, 40 Y 60 s).

4.3 EXPERIMENTO 3. EFECTO DEL ALCOHOL Y EL HIPOCLORITO DE SODIO EN LA ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE EXPLANTES DE INFLORESCENCIAS EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE PALMA AFRICANA.

A los 15 días de sembrados los explantes se evaluaron los tratamientos cuyos resultados se especifican en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Datos obtenidos de los tratamientos utilizados durante el proceso de esterilización superficial de explantes de inflorescencia en el establecimiento *in vitro* de palma africana. INIAP, Ecuador, 2001 (Experimento 3).

No. Trat.	No. Tubos	Alcohol (%)	Tiempo de exposición (s)	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (min)	Contaminación (%)			Sobrevivencia (%)
						Bacterias	Hongos	Total	
T	--	--	--	--	--	100.0	--	100.0	0
1	30	30	40	10	20	66.7	--	66.7	10.0
2	30	30	40	10	40	53.3	--	53.3	13.3
3	30	30	40	10	60	50.0	--	50.0	30.0
4	30	30	60	10	20	26.7	--	26.7	30.0
5	30	30	60	10	40	26.7	--	26.7	36.6
6	30	30	60	10	60	20.0	--	20.0	36.6

En este experimento se midió la contaminación de los explantes a los 15 días de sembrado. De acuerdo con los resultados obtenidos, existe una diferencia significativa entre los tratamientos (Anexo 5). El tratamiento que mostró un promedio menor de contaminación (Anexo 6) fue aquel en el que los explantes, luego de la desinfección general explicada en el inciso 3.4.1, se sumergieron en una solución de alcohol al 30% durante 60 s seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 60 min. Sin embargo, este tratamiento es igualmente significativo con los tratamientos en los que se usó una solución de alcohol al 30% durante 60 s, seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 20 y 40 min.

Entre los tratamientos en los que se utilizó una solución de alcohol al 30% durante 40 s seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante distintos tiempos (20, 40, Y 60 min), no hubo diferencia significativa, pero si fueron diferentes al testigo en el cual no se aplicó ninguna solución desinfectante. Igualmente fueron distintos a los tratamientos en los cuales se aplicó alcohol al 30% durante 60 s seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante distintos tiempos (20, 40, Y 60 min). Las diferencias estadísticas entre tratamientos se especifican en el Cuadro n.

Cuadro 11. Diferencias estadísticas entre los tratamientos aplicados para la esterilización superficial de explantes de inflorescencias en el establecimiento *in vitro* de palma africana. INIAP, Ecuador, 2002 (Experimento 3)

Alcohol %	Tiempo de exposición (s)	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (min)	Contaminación promedio (%)	Grupo SNK
30	60	10	60	20	a
30	60	10	40	27	a
30	60	10	20	27	a
30	40	10	60	50	b
30	40	10	40	53	b
30	40	10	20	67	b
--	--	--	--	100	c

...Promedios en cada columna seguidas por letras iguales, son estadísticamente iguales $P < 0.05$

....Letras ordenadas en fonna descendente, siendo (a) el tratamiento con menor contaminación

4.4 EXPERIMENTO 4. EFECTO DEL HIPOCLORITO DE SODIO EN LA ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE EXPLANTES DE HOJA EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE PALMA AFRICANA.

A los 15 días de sembrados los explantes se evaluaron los tratamientos cuyos resultados se especifican en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Datos obtenidos de los tratamientos utilizados durante el proceso de esterilización superficial de explantes de hoja en el establecimiento *in vitro* de palma africana. INIAP, Ecuador, 2002 (Experimento 4).

No. Trat.	No. Tubos	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (min)	Contaminación (%)			Sobrevivencia (%)
				Bacterias	Hongos	Total	
T	30	--	--	100.0	--	100.0	100.0
1	30	20	20	53.3	--	53.3	46.7
2	30	20	40	63.3	--	63.3	36.7
3	30	20	60	53.3	--	53.3	46.7
4	30	30	20	36.7	--	36.7	63.3
5	30	30	40	36.7	--	36.7	63.3
6	30	30	60	26.7	--	26.7	73.3

En este experimento se midió la contaminación de los explantes a los 15 días de sembrado. De acuerdo con los resultados obtenidos, existe una diferencia significativa entre los tratamientos (Anexo 7). El mejor tratamiento que mostró un promedio menor de

contaminación (Anexo 8), fue sumergir los explantes, luego de la desinfección general explicada en el inciso 3.4.1, en una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 60 min. Sin embargo, este tratamiento es igualmente significativo con los tratamientos en los que se usó una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 20 min y 40 min de exposición.

Entre los tratamientos en los que se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 20 y 40 min, no hubo diferencias y fueron igualmente significativos con los tratamientos en los cuales se aplicó una solución de hipoclorito de sodio al 20% durante 20 y 60 min. Entre los tratamientos en los que se usó una solución de hipoclorito de sodio al 20% durante 20, 40 y 60 min no hubo diferencia, pero sí fueron significativamente diferentes al testigo en el cual no se aplicó ninguna solución desinfectante. Las diferencias estadísticas entre tratamientos se especifican en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Diferencias estadísticas entre los tratamientos aplicados para la esterilización superficial de explantes de hoja en el establecimiento *in vitro* de palma africana. INIAP, Ecuador, 2002 (Experimento 4).

Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (min)	Contaminación promedio (%)	Grupo SNK
30	60	27	a
30	20	37	a b
30	40	37	a b
20	20	53	be
20	60	53	bc
20	40	63	c
--	--	100	d

* Promedios en cada columna seguidas por letras iguales, son estadísticamente iguales $P < 0.05$ ** Letras ordenadas en forma descendente, siendo (a) el tratamiento con menor contaminación

5. CONCLUSIONES

GENERALES

- La propagación *in vitro* de la palma africana (*Elaeis guineensis*), ofrece obvias ventajas a través de la cría de individuos élite, llegándose a obtener un rendimiento de 20-25% superior a los que se han alcanzado en condiciones ecológicas favorables tradicionales.
- El uso de alcohol al 70% durante 1 min seguido de una solución de 10 ó 20% de hipoclorito de sodio durante 20, 40 Y 60 min de exposición, muestran quemazón en explantes de inflorescencia y el material se muere.
- El uso de alcohol al 70% durante 1 min seguido de una solución de 10 ó 20% de hipoclorito de sodio durante 20, 40 Y 60 min, no controla la contaminación de explantes de hoja.
- Se observó una respuesta favorable de ambos tipos de explantes (hoja e inflorescencia) a la formulación nutritiva utilizada.

ESPECIFICAS

Inflorescencias

- La utilización de una solución (400 ml agua, 10 ml Providina, 10 ml jabón líquido) durante 5 min seguido de alcohol al 30% durante 60 s y de hipoclorito de sodio al 10% durante 60 min, produce una contaminación del 20% y sobrevivencia del 37% en explantes de inflorescencia.
- Se determinó que el tiempo (40 y 60 s) que los explantes son expuestos a una concentración del 30% alcohol influye en el porcentaje de contaminación; a diferencia del tiempo (20, 40 Y 60 min) al que son expuestos los explantes a una concentración de 10% hipoclorito de sodio, que no parece influir en la contaminación.

Hojas jóvenes

- La utilización de una solución (400 ml agua, 10 ml Providina, 10 ml jabón líquido) durante 5 min, seguido de alcohol al 70% durante 60 s y de hipoclorito de sodio 30% durante 60 min, produce una contaminación del 27% y sobrevivencia del 73% en explantes de inflorescencia.
- Se determinó que la concentración (20 Y 30%) de hipoclorito de sodio al que son expuestos los explantes influye en el porcentaje de contaminación.
- Se determinó que el tiempo (20,40, 60 min) al que son expuestos los explantes a una concentración de 30% de hipoclorito de sodio, no parece tener influencia en la contaminación.

6. RECOMENDACIONES

- Para los explantes de inflorescencias, se recomienda el siguiente procedimiento de esterilización superficial:
 - Lavar los explantes con agua corriente durante 2 min con el fin de eliminar impurezas.
 - Enjuagar los explantes durante 5 min en una solución conteniendo 400 ml de agua destilada, 10 ml de Providina y 10 ml de jabón líquido. En esta solución se mantienen los explantes en agitación constante.
 - A continuación sumergir los explantes en una solución de alcohol al 30% durante 60 s seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 60 min.
 - Finalmente enjuagar los explantes tres veces con agua destilada estéril antes de proceder a la siembra.
- Para los explantes de hojas, se recomienda el siguiente procedimiento de esterilización superficial:
 - Lavar los explantes con agua corriente durante 2 min con el fin de eliminar impurezas.
 - Enjuagar los explantes durante 5 min en una solución conteniendo 400 ml de agua destilada, 10 ml de Providina y 10 ml de jabón líquido. En esta solución se mantienen los explantes en agitación constante.
 - A continuación sumergir los explantes en una solución de alcohol al 70% durante 60 s seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 60 min.
 - Finalmente enjuagar los explantes tres veces con agua destilada estéril antes de proceder a la siembra.
- Se recomienda tratar las plantas en el campo con fungicidas y bactericidas sistémicos, dos semanas antes de iniciar la cosecha de los explantes, para disminuir el índice de contaminación en la siembra *in vitro* de los explantes.
- Se recomienda evaluar otros métodos de desinfestación para explantes de inflorescencia y hojas en los que se utilicen como esterilizante superficial hipoclorito de calcio.
- Se recomienda utilizar la edad y el tamaño de explantes de inflorescencia como criterio para seleccionar los tratamientos que presenten un mayor índice de sobrevivencia.

- Se recomienda continuar con estudios de inducción callogénica a partir de explantes de inflorescencia y hojas. .

7. BIBLIOGRAFIA

- . Ahee, J; Arthuis, P; Cas, G; Duval, Y; Guenin, G; Hanower, P; Lievoux, D; Lioret, c; Malaurie, B; Pannetier, c; Raillot, D; Varechon, c; Zuckennan, L. 1981. Vegetative propagation of the oil palm *in vitro* by somatic embryogenesis. *Oléagineux* 36(3):115-118.
- Espinal-Rueda, D. 2002. Cultivo de tejidos vegetales y propagación *in vitro*: guía de lecturas y prácticas de módulo. Honduras, s.e. p. 10-36.
- Hartley, CMS. 1983. La Palma de Aceite. 2 ed. México. Continental. p.65-247
- Hanower, J; Pannetier C. 1982. *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. 2 ed. Mexico. Continental. p. 745-746.
- Nápoles, V M; Bejarano, GA. 1991. La palma africana *Elaeis guineensis*. El Palmicultor No. 2: 19-20.
- Noiret, JM; Gascon JP; Pannetier C. 1985. Oil palm production through *in vitro* culture. *Oléagineux* 40(7):370-372.
- Rajanaidu, N; Rao, V; Abdul Halim, H; Ong, A. 1999. Progresos en el mejoramiento de palma africana *Elaeis guineensis* Jacq. El Palmicultor No. 7:11-17.
- Reinert, J; Artuhuis, P; Lievoux, D. 1973. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* No. 3:221-227.
- Rillo, EP; Paloma, MBF. 1990. Comparison of three media formulations for *in vitro* culture coconut embryos. *Oléagineux* 45(7):319-323.
- Schwendiman, J; Pannetier, C; Michaux Ferriere, N. 1990. Histology of embryogenic formations during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Oléagineux* 45(10):409-415.