

328

**PROPAGACION IN VITRO DE PALMA AFRICANA**

P O R

*David Rodríguez Ibáñez*

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PREVIO A LA

OBTENCION DEL TITULO DE

**INGENIERO AGRONOMO**

MICROCISIS:	4530
FECHA:	3/09/92
ENCARGADO:	Ungas Rodde

**ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA**

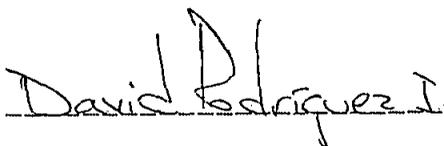
Abril, 1992

PROPAGACION *in vitro*  
DE PALMA AFRICANA

Por

David Rodríguez Ibáñez

El autor concede a la Escuela Agrícola Panamericana  
permiso para reproducir y distribuir copias de este  
trabajo para los usos que considere necesarios.  
Para otras personas y otros fines, se reservan  
los derechos de autor.

A handwritten signature in dark ink, reading "David Rodríguez I.", written over a horizontal line.

David Rodríguez Ibáñez

Abril - 1992

DEDICATORIA

A mis padres Francisco y Delmy, por todo su amor y comprensión en todo momento, a mi colega y hermano Francisco y a mi hermano menor Eric.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a mi consejero Juan José Alán por su ayuda, no sólo en la elaboración de esta tesis, sino por brindarme su amistad, consejos y conocimientos durante los dos años que he trabajado con él. A mis consejeros Roberto Young, César Zepeda y Juan Carlos Rosas.

A la Familias Gallardo y Suárez, con quienes compartí mis momentos de esparcimiento. En especial a mi hermanita Amalia Gallardo por su linda amista y apoyo.

Al Arquitecto Teodoro Albornoz, por la ayuda en la parte de fotografía.

A mis compañeros de clase y amigos, A. Rodríguez, P. Montalván, F. Villeda, A. Larco, E. Ortega, D. Vizcaíno, F. Dejud, J. Guevara, D. Moreira, O. Díaz, J. Andino, S. Weisson y los hermanos Granadino. En especial a mi compañero de cuarto Rommel A. Hernández por su amistad y apoyo durante estos dos años.

A E. Becerra por su ayuda, tiempo de trabajo y diversión durante este la realización de esta tesis.

A la Sra. Isbela de Alvarez, Deysi Ferrera y Bessy Martínez por su ayuda en la preparación de materiales para la elaboración de esta tesis.

## INDICE

TITULO . . . . .	i
AFROBACION . . . . .	ii
DERECHOS DE AUTOR . . . . .	iii
DEDICATORIA . . . . .	iv
AGRADECIMIENTOS . . . . .	v
INDICE . . . . .	vi
INDICE DE CUADROS . . . . .	vii
INDICE DE FIGURAS . . . . .	x
LISTA DE ABREVIATURAS . . . . .	xi
COMPENDIO . . . . .	xii
I. INTRODUCCION . . . . .	1
II. REVISION DE LITERATURA . . . . .	4
A. Cultivo de meristemas apicales . . . . .	5
B. Cultivo de embriones . . . . .	5
C. Cultivo de hojas . . . . .	7
D. Cultivo de inflorescencias . . . . .	9
E. Cultivo de raíces . . . . .	10
III. MATERIALES Y METODOS . . . . .	12
A. Material vegetal . . . . .	12
B. Medios de cultivo . . . . .	12
C. Desinfección del material vegetal . . . . .	16
D. Explantes utilizados . . . . .	17
1. Hojas . . . . .	17
2. Embriones . . . . .	18
3. Inflorescencias . . . . .	19
E. Cristalería . . . . .	20
F. Condiciones de cultivo . . . . .	20
G. Evaluación del efecto de los tratamientos . . . . .	21
IV. RESULTADOS . . . . .	22
A. Ensayos con explantes de embriones de palma africana . . . . .	22
1. Efectos de la kinetina y ANA, en medio de Staritsky, sobre el crecimiento de embriones de semillas maduras de palma africana. . . . .	22

2. Efectos de la kinetina y ANA, en medio de Staritsky, sobre el crecimiento de embriones de frutos inmaduros de palma africana. . . . .	23
B. Ensayos con explantes de folíolos desarrollados de palma africana . . . . .	27
1. Efectos del 2,4 D y la Kinetina, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de folíolos desarrollados de <i>Elaeis guineensis</i> . . . . .	27
2. Efectos del 2ip y ANA, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de folíolos desarrollados de <i>Elaeis guineensis</i> . . . . .	30
C. Ensayos con explantes de folíolos jóvenes de palma africana . . . . .	31
1. Efectos del 2, 4-D y Kinetina, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de folíolos de hojas jóvenes de <i>Elaeis guineensis</i> . . . . .	31
2. Efectos del ANA y 2ip, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de folíolos de hojas jóvenes de <i>Elaeis guineensis</i> . . . . .	35
D. Ensayos con explantes de raquis de hojas jóvenes de palma africana . . . . .	38
1. Efectos del 2, 4 D y la Kinetina, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de raquis de hoja jóvenes de <i>Elaeis guineensis</i> . . . . .	38
2. Efectos del ANA y 2ip, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de raquis de hojas jóvenes de <i>Elaeis guineensis</i> . . . . .	40
E. Ensayos con explantes de inflorescencias inmaduras de palma africana . . . . .	41
1. Efectos del ANA y 2 ip, en un medio MS, sobre el crecimiento de explantes de inflorescencias inmaduras masculinas de la sexta hoja, femeninas de la cuarta y quinta hojas de palma africana . . . . .	41
V. DISCUSION . . . . .	47
VI. CONCLUSIONES . . . . .	54
VII. RECOMENDACIONES . . . . .	55
VIII. LITERATURA CITADA . . . . .	56
Datos bibliográficos . . . . .	59

## INDICE DE CUADROS

- Cuadro 1. Formulación de los diferentes medios de cultivo utilizados en los experimentos con palma africana (*Elaeis guineensis*). Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1990-1991.....14
- Cuadro 2. Dosis y combinaciones de hormonas en mg/L empleadas en los diferentes experimentos *in vitro* de hojas desarrolladas de palma africana (*Elaeis guineensis*). Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1991.....15
- Cuadro 3. Dosis y combinaciones de hormonas en mg/L empleadas en los diferentes experimentos *in vitro* con folíolos y raquis de hojas jóvenes de palma africana (*Elaeis guineensis*). Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.....16
- Cuadro 4. Efectos de la kinetina y ANA, en un medio de Staritsky, sobre el crecimiento de embriones de semilla híbridas de *Elaeis guineensis*. Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1991.....23
- Cuadro 5. Efectos de la kinetina y ANA, en un medio de Staritsky, sobre el crecimiento de embriones de frutos inmaduros de *Elaeis guineensis*. Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1991.....25
- Cuadro 6. Efectos del 2,4-D y la Kinetina, en los medios de Staritsky y MS, sobre el crecimiento de explantes de folíolos desarrollados de *Elaeis guineensis*, al cabo de 16 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1991.....28
- Cuadro 7. Efectos del ANA y Zip, en los medios de Staritsky y MS, sobre el crecimiento de explantes de folíolos desarrollados de *Elaeis guineensis*, al cabo de 16 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1991.....30

- Cuadro 8. Efectos del 2,4-D y Kinetina, en los medios de Staritsky y MS, sobre el crecimiento de explantes de folíolos de hojas jóvenes de *Elaeis guineensis*, al cabo de 12 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.....32
- Cuadro 9. Efectos del ANA y Zip, en los medios de Staritsky y MS, sobre el crecimiento de explantes de folíolos de hojas jóvenes de *Elaeis guineensis*, al cabo de 12 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.....36
- Cuadro 10. Efectos del 2,4-D y Kinetina, en los medios de Staritsky y MS, sobre el crecimiento de explantes de raquis de hojas jóvenes de *Elaeis guineensis*, al cabo de 12 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.....39
- Cuadro 11. Efectos del ANA y Zip, en los medios de Staritsky y MS, sobre el crecimiento de explantes de raquis de hojas jóvenes de *Elaeis guineensis*, al cabo de 12 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.....40
- Cuadro 12. Efectos del ANA y Zip, en un medio MS, sobre el crecimiento de explantes de inflorescencias inmaduras masculinas de la sexta hoja, femeninas de la hoja cinco y seis y femenina de la cuarta hoja de *Elaeis guineensis*, al cabo de 8 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.....44

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Callo desarrollado a partir de un embrión de semillas maduras de palma africana, cultivado en un medio de Staritsky con 5 mg/L de ANA.....24
- Figura 2. Plántula completa de palma africana desarrollada de un embrión de fruto inmaduro, cultivado en medio Staritsky con 5 mg/L de ANA y 0,1 mg/L de Kinetina.....26
- Figura 3. Desarrollo de callo con estructuras globulares a partir de un explante de folíolo desarrollado de palma africana, en medio de Staritsky con 2mg/L de 2,4-D. 16 semanas después de iniciado el cultivo.....29
- Figura 4. Explante de folíolo de hoja joven de palma africana en el que se muestran callos formados en las venas, cultivado en el medio de MS con 3 mg/L de 2,4-D y 0,5 mg/L de Kinetina. 12 semanas después de iniciado el cultivo.....34
- Figura 5. Desarrollo de raíz a partir de callo en explantes de folíolos de hojas jóvenes de palma africana, en el medio de MS con 1 mg/L de ANA y 0,5 mg/L de 2ip. 12 semanas después de iniciado el cultivo.....37
- Figura 6. Desarrollo de callos lanosos a partir de explante de raquis de hojas jóvenes de palma africana, en el medio de Staritsky en el testigo sin reguladores de crecimiento. 12 semanas después de iniciado el cultivo.....43
- Figura 7. Explante de inflorescencia masculina de la hoja seis de palma africana en la que solo hubo desarrollo de las flores, sin formación de callo. El explante fue cultivado en medio de MS con 3 mg/L de ANA. 8 semanas después de iniciado el cultivo.....45
- Figura 8. Explante de inflorescencia femenina de la hoja cinco en la que se observó la formación de callo y el desarrollo de flores. El explante fue cultivado en medio MS con 2 mg/L de ANA y 0,1 mg/L de 2ip. 8 semanas después de iniciado el cultivo.....46

LISTA DE ABREVIATURAS

Medios de cultivo

LS = Linsmaier y Skoog  
MS = Murashige y Skoog  
S = Staristky

Reguladores de crecimiento

AIA = Acido indolacético  
ANA = Acido naftalenacético  
BAF = Benzil aminopurina  
Kin = Kinetina (N-6-furfurilaminopurina)  
2ip = 2-isopenteniladenina  
2,4-D = Acido diclorofenoxiacético

BOLIVIA WILSON POPENDO  
ESUELA AGROPECUARIA AMERICANA  
TERRACERVA, BOLIVIA

## COMPENDIO

La palma africana (*Elaeis guineensis*), es de gran importancia en los trópicos. En el presente trabajo se pretendió multiplicar *in vitro* plantas de palma africana, usando explantes de embriones, hojas e inflorescencias. Se probaron los medios de Murashige y Skoog (MS) y Staritsky solidificados con agar. El medio de MS resultó mejor para la producción de callos. Se probó el efecto de las auxinas 2,4-D y ANA y las citoquininas Kinetina y Zip, solas o en combinaciones. El ANA en concentraciones de 2,5 mg/L resultó mejor que el 2,4-D para la germinación de embriones y el crecimiento de plántulas. Al aumentar las concentraciones (en ambos casos) a 5 mg/L se formaron callos.

En el medio de MS, utilizando explantes de folíolos (tanto desarrollados como en desarrollo) y, al aplicarse ANA sola (2 a 4 mg/L) y Zip sola (0,5 mg/L) o en sus respectivas combinaciones (1 mg/L de ANA con 0,1 y 0,5 mg/L de Zip), se obtuvo callogénesis. En general esta combinación de reguladores de crecimiento fue mejor para la inducción de callogénesis.

La edad y tipo de explante utilizados influyó en la inducción de callo. Los explantes de folíolos, raquis de hojas jóvenes e inflorescencias de la cuarta y quinta hoja reaccionaron mejor que los de hojas desarrolladas e inflorescencias masculinas de la sexta hoja.

Se observaron mejores resultados con explantes de raquis de hojas en desarrollo, pero hubo un gran porcentaje de muerte por oxidación de los explantes y callos.

La contaminación con hongos sistémicos y bacterias fue un serio problema. Estas contaminaciones son típicas en plantas provenientes del campo. Una manera de controlar este problema fue la aplicación de fungicidas y bactericidas sistémicos a las plantas donadoras de explantes.

La oxidación de los explantes y los callos fue otro problema que se puede resolver con los subcultivos frecuentes a medios frescos.

## I. INTRODUCCION

La palma africana (*Elaeis guineensis*) pertenece a la familia Arecaceae que contiene más de 200 géneros y 2500 especies, y está distribuida, especialmente, en las regiones tropicales y subtropicales. Algunas especies importantes de palma son nativas de climas desérticos o mediterráneos.

En esta familia hay mucha variación en la estructura, la morfología y el tamaño.

Las palmas, en general, tienen gran importancia ya que son utilizadas como fuente de alimento, combustible, fibra, ropa, y materiales para construcción, muebles e implementos. Con la especialización de la agricultura y la aparición de grandes plantaciones el uso que se les dio a las diferentes palmas se fue intensificando, este es el caso de la palma africana (*Elaeis guineensis*) que es utilizada para la extracción de aceite; la palma datilera (*Phoenix dactylifera*) que se utiliza por sus frutos azucarados; y el coco (*Cocos nucifera*) por su contenido de aceite, etc.

La palma africana es la oleaginosa de mayor productividad conocida en el mundo, y puede llegar a producir 4 toneladas de aceite por hectárea por año cuando se utilizan híbridos seleccionados. Este rendimiento puede aumentar al utilizar clones de híbridos de alto potencial de producción.

Noiret (1981) informa que el aumento en la productividad debido al uso de clones está en el orden del 30%, pero con el progreso de los trabajos de hibridación y selección la productividad puede ser mayor. Los mejores individuos híbridos resultado de un cruzamiento pueden llegar a producir 60% más que el promedio de este cruzamiento. A su vez, el aceite de palma se ha convertido en el aceite vegetal de mayor importancia mundial. Debido a sus requerimientos culturales y su alto rendimiento, la palma aceitera ha llegado a convertirse en el cultivo productor de aceite más eficiente en el mundo (Teixeira,1985).

En la palma aceitera, por ser una planta perenne y alógama, estrictamente sexual, los materiales de propagación se obtienen mediante polinización controlada, utilizando para esto padres seleccionados. Aun así, la descendencia proveniente de estos padres muestra variaciones en el rendimiento por palma. Las variaciones en el vigor y la productividad, por lo general, no se expresan en las palmas hasta muchos años después de plantadas; por esto, la producción de nuevas variedades toma mucho tiempo.

Wooi (1984) informó que la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos, cuando son utilizados con éxito, hace innecesarios los programas de reproducción largos. Además, añade que es posible evitar la producción de plantas adultas con bajo rendimiento, como es común encontrar en plantaciones provenientes de semilla.

El trabajo que se ha realizado en cultivo de tejidos de palma africana es extenso, pero la importancia económica que los hallazgos representan para las grandes compañías productoras de aceite hace que los resultados no sean publicados, impidiendo encontrar información reciente que pueda servir para continuar con un experimento.

Mucho del trabajo que se realizó en esta tesis está basado en la escasa información general encontrada en algunos artículos y comunicaciones personales con investigadores relacionados con el cultivo de tejidos de esta especie.

Los objetivos de este trabajo fueron:

1) Determinar la mejor combinación de auxinas y citoquininas en la producción de callos *in vitro* de palma africana.

2) Determinar el medio de cultivo más adecuado para el cultivo *in vitro* de palma africana.

3) Determinar el explante adecuado para la obtención de callos o plántulas *in vitro* de palma africana.

## II. REVISION DE LITERATURA

En los últimos años se ha logrado desarrollar técnicas de cultivo de tejidos que han hecho posible la propagación vegetativa de muchas especies dicotiledóneas.

Jones (1976) indica que en las monocotiledóneas es necesario usar un explante que contenga tejido meristemático para que pueda crecer en medio de cultivo, a diferencia de las dicotiledóneas, en donde la diferenciación del tejido parenquimatoso a un estado meristemático es una característica natural de estas plantas que es explotada en los cultivos *in vitro*.

La palma africana de aceite (*Elaeis guineensis*) es una monocotiledónea, estrictamente sexual, que no tiene estructuras anatómicas aptas para la propagación vegetativa tradicional. El problema en esta especie es la falta de ramificación, lo que hace muy difícil la obtención de material para la propagación *in vitro*. Por esto, varios investigadores han trabajado utilizando diversos tejidos como meristemas apicales, hojas jóvenes, raíces e inflorescencias (Staritsky, 1970; Jones, 1974; Hanower y Pannetier, 1982; Wooii, 1984).

### A. Cultivo de meristemas apicales

En 1970, Staritsky utilizando corazones de palmas de dos a seis años de edad y los medios de Heller (1953), Linsmaier y Skoog (1965), y diferentes combinaciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); ácido naftalenacético (ANA); ácido indolacético (AIA) y kinetina, con un fotoperiodo de 12 horas de luz a 25°C y 12 horas oscuridad a 30°C, obtuvo un 100% de contaminaciones con explantes provenientes de plantas enfermas; y en plantas sanas y vigorosas una gran cantidad de callos vigorosos y no contaminados, en los cuales se observó la formación de primordios foliares y el desarrollo de una inflorescencia masculina. Luego, trabajando con el medio de Miller (1963) y con explantes del punto de crecimiento, obtuvo crecimiento de hojas y cuatro meses después en otros cultivos, se formaron hojas lanceoladas parecidas a las de las plántulas obtenidas de semilla.

### B. Cultivo de embriones

Los primeros estudios en cultivos de tejidos de la palma africana, se iniciaron con el cultivo de embriones provenientes de semilla. Se buscaba definir los tipos de medio de cultivo y las condiciones ambientales para las palmas y así poder desarrollar tejido en cultivos *in vitro*

(Staritsky, 1970; Rabechault *et al.* 1970, 1972).

Jones (1974), menciona que en el cultivo de embriones de palma africana *in vitro*, para obtener un buen desarrollo de las raíces y la parte aérea, son necesarios azúcares, aminoácidos y un balance adecuado de los reguladores de crecimiento como ANA, 2,4-D y especialmente AIA.

Por otra parte Paranjothy y Othman (1982), indican que para el buen desarrollo de embriones cigóticos es necesario el carbón activado, ya que encontraron que la iniciación de crecimiento y formación de raíces son escasos en medios básicos sin carbón activado.

Jones (1976) encontró que cuando un embrión es separado de su endosperma, la presencia de un brote inhibe el desarrollo de la raíz, a no ser que se supla al medio con auxinas o inhibidores de la auxina oxidasa. Además, informa que en la palma africana el cotiledón se modifica para formar el haustorio, que juega un papel muy importante en la germinación. Este actúa como órgano de alimentación así como en el control del desarrollo del embrión. En embriones germinados *in vitro* con un estímulo adecuado de reguladores de crecimiento se logra el desarrollo del haustorio.

Rabechault y Cas (1974), indican que la remoción del haustorio inhibe la germinación.

Como indica Teixeira (1985), la germinación de embriones cigóticos en cultivo de tejidos no tienen importancia en la propagación de la planta, pero si como fuente de explantes,

tanto por la cantidad de material así como por la uniformidad fisiológica del mismo.

Jones (1974) trabajó con explantes extraídos cerca del eje de embriones provenientes de cultivo *in vitro*.

Teixeira (1985) logró la inducción de callo a partir de explante de embriones, utilizando varios medios de cultivo (Murashige y Skoog, 1962; Heller, 1953 y Ong, 1975). Además, encontró que las auxinas 2,4 D o ANA son imprescindibles para la inducción y mantenimiento del crecimiento celular y que las concentraciones de auxinas pueden variar entre 1 y 10 mg/L, pero que se obtuvieron mejores resultados con concentraciones entre 2 y 4 mg/L. En estos estudios no se encontró que las citoquininas fueran necesarias para la inducción de callo, aunque podrían contribuir a la proliferación e inducción a la embriogénesis.

### C. Cultivo de hojas

Las hojas son otra fuente de la cual se ha tratado de obtener explantes con el fin de propagar la palma africana, sin dañar o matar la planta madre.

Como indica Teixeira (1985), los medios de cultivo o la adición de sustancias complejas no son relevantes, siendo más importante el tipo de tejido utilizado y las concentraciones de auxinas en los medios de cultivo.

Rabechault y Martin (1976) informaron que los mejores

resultados en la inducción de callo a partir de tejido de hojas se obtuvieron con la adición de ANA o 2,4 D en concentraciones de 2 a 6 mg/L. Estos investigadores indicaron que la adición de citoquininas no contribuye al crecimiento de callo, pero causan oxidación en el tejido. Los mismos autores descubrieron que podían obtener embriogénesis somática al incubar callos provenientes de explantes de hoja en presencia de luz y utilizando  $2,5 \times 10^{-6}$  M de ANA y  $10^{-5}$  M de kinetina, benzilaminopurina (BAP) o 2-isopenteniladenina (2ip).

Ahee *et al* (1981) y Lioret (1981) cultivaron fragmentos de hojas jóvenes tomadas de plántones de dos años de edad, tratando de no dañar el ápice de la planta. Sesenta días después de establecidos los cultivos obtuvieron callos en las nervaduras de las hojas; a los 100 días los callos fueron aislados del tejido original y transplantados en nuevos medios ya que se había detenido la evolución de los explantes portadores. Además, Ahee *et al.* (1981) desarrollaron un sistema de cultivo de tejido de crecimiento rápido con el que lograron obtener callos que en 10 ó 20 días duplicaban la cantidad de materia seca. Con este método lograron obtener embrioides que aislaron en nuevos medios de cultivo y se desarrollaron en plantas completas.

Pannetier *et al.* (1981) utilizando el método descrito por Ahee *et al* (1981), observaron cinco a seis meses después de cultivado el explante en el medio de cultivo, la formación de estructuras opacas de color blanco, de contornos definidos muy

diferentes a los callos primarios, lo que los hizo suponer que se había inducido embriogénesis. Al ser aislados y transplantados los embrioides se hicieron rápidamente clorofílicos polarizándose y prosiguiéndose su desarrollo. Observaron que muchas veces se daba un fenómeno de multiplicación, es decir un embrioides aislado daba origen a varios plántones jóvenes.

Hanower y Pannetier (1982) obtuvieron resultados similares a los anteriores, utilizando hojas jóvenes de plántulas de vivero y palmas adultas, tratando, en ambos casos, de no dañar los puntos de crecimiento. El medio utilizado fue una combinación de los macroelementos de Murashige y Skoog (1962), los microelementos de Nitsch (1969), las vitaminas de Morel (1965), y 1 g/L de ascorbato de sodio. A los 60 días del inicio del experimento y en un medio con solo auxinas se observó que un 60% de los explantes de plántulas produjeron callos, a diferencia del 35% de las plantas adultas. Con callos obtenidos con el cultivo de crecimiento rápido descrito por Ahee *et al* (1981) en medios con auxinas, citoquininas y carbón activado, lograron la inducción de embriogénesis que tuvo como resultado la obtención de plántulas completas.

#### D. Cultivo de inflorescencias

Staritsky (1981) indica que la abundancia de

inflorescencias en la palma cocotera y la palma africana hace de la utilización de estas estructuras un método muy promisorio para la obtención de explantes.

Wooii (1984) informa que obtuvieron explantes de inflorescencias jóvenes después de haber quitado las espatas y de haberlas esterilizado sumergiéndolas en alcohol al 70%. Además, informó que el inicio de formación de callos a partir de estos explantes es lento, por lo general varios meses después de establecer los explantes en el medio de cultivo.

#### E. Cultivo de raíces

Jones (1976), informó que las puntas meristemáticas de las raíces son más accesibles que otros explantes, pero que presentan problemas por la alta contaminación con microorganismos, y menciona haber obtenido cultivo de callos con raíces desinfectadas.

En trabajos realizados por Paranjothy y Othmas (1982) y Wooii (1984), mencionan la utilización de explantes de raíces. Paranjothy y Othman utilizaron raíces obtenidas de embriones germinados, mientras que Wooii utilizó raíces de plantas adultas, recomendando desinfecciones con 0,1 % de cloruro de mercurio. Wooii informa que sólo el 50% de los explantes se infectaron y que sólo del 5 al 10% de los explantes que quedaron formaron callo.

Smith y Thomas (1973), citado por Teixeira (1985), indicó

que de raíces asépticas y estériles obtenidas a partir de embriones germinados *in vitro*, se formaron callos después de tres semanas de cultivo, con el uso de  $2,5 \times 10^{-5}$  M de 2,4-D o ANA. En 1975, Ong había obtenido resultados similares y encontró que a concentraciones de 2 a 5 mg/L de ANA se presentaron resultados satisfactorios para la inducción y proliferación de callos de raíz.

También Teixeira (1985) logró inducir la formación de callos con auxinas (2,4-D o ANA), usando concentraciones de 2 a 4 mg/L; no se desarrollaron raíces, sino que formaron pequeños nódulos meristemáticos que presentaron un tiempo de duplicación en volumen de 30 a 40 días.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### A. Material Vegetal

Plántulas de vivero, semillas e inflorescencias de *Elaeis guineensis* obtenidas de la Finca San Alejo, propiedad de la United Brands Co., Departamento de Atlántida, Honduras.

El mantenimiento de las plántulas se hizo en el Departamento de Agronomía de la Escuela Agrícola Panamericana, con podas, fertilizaciones periódicas y aplicaciones de fungicidas y bactericidas sistémicos, para evitar el ataque de patógenos que afectarían el crecimiento de los explantes.

Semillas y frutos inmaduros de palma africana fueron utilizados para hacer cultivo de embriones.

Las inflorescencias inmaduras fueron traídas en refrigeración y cultivadas lo más rápidamente después de su llegada.

#### B. Medios de Cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo: Murashige y Skoog (1962) y Staristky (1970) (Cuadro 1). Para cada medio se prepararon soluciones madre de los macro y micronutrientes en concentraciones preestablecidas para facilitar la elaboración

de los medios. Una vez preparados los medios, el pH se ajustó a 5.8 con ayuda de hidróxido de sodio o ácido clorhídrico 1N. Los medios se solidificaron con agar.

Se estudió el efecto de cuatro hormonas: dos auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido naftalenacético (ANA) y dos citoquininas la 2-isopenteniladenina (2ip), y la kinetina (6-furfurilaminopurina) (Kin).

Con la ayuda de una jeringa automática se colocaron 10 ml de medio de cultivo en tubos de cultivo de 25 x 150 mm o en frascos de 125 ml de capacidad.

UNIVERSIDAD NACIONAL POLITECNICA  
ECUATORIA  
FACULTAD DE INGENIERIA  
TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

Cuadro 1. Formulación de los diferentes medios de cultivo utilizados en los experimentos con palma africana (*Elaeis guineensis*). Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 1990-1991.

	Staristky (1970)	Murashige & Skoog (1962)
	mg/L	mg/L
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	347	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O		440
KNO <sub>3</sub>	1.000	1.900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.000	1.650
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300	170
MgSO <sub>4</sub>	35	370
KCL	65	
NaFeEDTA	32	36,7
MnSO <sub>4</sub>	4,4	22,3
ZnSO <sub>4</sub>	1,5	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,6	6,2
KI	0,8	0,83
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O		0,025
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O		0,25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O		0,025
Glicina	2,0	2,0
Cisteína	10	
Piridoxina		0,5
Acido nicotínico		0,5
Meso-inositol	100	100,0
Caseína hidrolisada	100	
Tiamina	1,0	0,1
Adenina	1,0	
Sacarosa	30.000	30.000
Agar	8.000	8.000

Todos los frascos y tubos de cultivo con los medios se esterilizaron en un autoclave a 1.06 kg de presión por centímetro cuadrado (15 libras de presión por pulgada cuadrada), durante 20 minutos.

En el Cuadro 2 se presentan las dosis y combinaciones de citoquininas y auxinas que se usaron en los ensayos.

Cuadro 2. Dosis y combinaciones de hormonas en mg/L empleadas en los diferentes experimentos *in vitro* de hojas desarrolladas de palma africana (*Elaeis guineensis*). Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1991.

citoquininas (mg/L)	Auxinas (mg/L)			
	0	1	2	4
0	0:0	0:1	0:2	0:4
0,1	0,1:0	0,1:1	0,1:2	0,1:4
0,5	0,5:0	0,5:1	0,5:2	0,5:4
1,0	1,0:0	1,0:1	1,0:2	1,0:4

Se estudió el efecto de la interacciones de 2,4-D con Kinetina (Kin), ANA con Zip y 2,4-D con Zip en ensayos separados. Cada experimento constó de 15 tratamientos con 13 repeticiones. Cada explante se consideró como una repetición.

En el Cuadro 3 se indican las nuevas concentraciones de auxinas y citoquininas que se utilizaron con hojas e

inflorescencias una vez obtenidos los primeros resultados.

Cuadro 3. Dosis y combinaciones de hormonas en mg/L empleadas en los diferentes experimentos *in vitro* con folíolos y raquis de hojas jóvenes de palma africana (*Elaeis guineensis*). Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.

Citoquinina (mg/L)	Auxinas (mg/L)				
	0	1	2	3	4
0	0:0	0:1	0:2	0:3	0:4
0,1	0,1:0	0,1:1	0,1:2	0,1:3	0,1:4
0,5	0,5:0	0,5:1	0,5:2	0,5:3	0,5:4

### C. Desinfección del material vegetal

La desinfección del material se efectuó de acuerdo con el tipo de explante. Las bases de la plántula con dos hojas se enjuagaron con agua corriente para eliminar residuos y polvo y se sumergieron para desinfectarlos en etanol al 70% (v/v) por unos segundos y luego en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % a la cual se le agregaron unas gotas de Tween 80 manteniéndose esa solución durante 20 minutos en agitación constante. Finalmente en la cámara de flujo laminar se enjuagaron por lo menos tres veces en agua bidestilada estéril.

Las semillas maduras, una vez eliminados el endocarpo y

el endospermo, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio 2.6% (v/v) por 15 minutos y luego en hipoclorito de calcio al 1 %, a la cual se agregaron unas gotas de Tween 80. Luego se enjuagaron por lo menos tres veces en agua bidestilada estéril en la cámara de flujo laminar.

Las inflorescencias se enjuagaron con agua corriente para eliminar residuos vegetales y polvo, se sumergieron en una solución de etanol al 70% (v/v) por unos segundos, y luego en hipoclorito de sodio al 0.5 por ciento con Tween 80 durante 20 minutos. Finalmente, se enjuagaron por lo menos tres veces en agua bidestilada estéril en la cámara de flujo laminar.

#### D. Explantes utilizados

##### 1. Hojas

Los explantes fueron tomados de hojas jóvenes de plántulas de dos años de edad. Las plantas se cortaron por la base separando las raíces y la parte aérea. Se eliminaron todas las hojas tratando de dejar las dos o tres hojas más jóvenes que envuelven los primordios foliares.

Utilizando hojas como explantes se realizaron dos experimentos.

a) En un primer experimento se seleccionaron hojas jóvenes desarrolladas que tenían aproximadamente de 15 a 20 cm de longitud. Una vez desinfectadas se trasladaron a la cámara de

flujo laminar en donde se enjuagaron y sobre platos de Petri con papel de filtro esterilizados, se eliminaron las espantas que envuelven la hoja joven desarrollada. Una vez separadas se procedió a cortar en diferentes explantes, separando los foliolos de la hoja joven y su respectivo raquis, con la ayuda de pinzas y bisturí. Finalmente los foliolos sin raquis fueron seccionados en pedazos de 0.5 x 0.5 cm y se depositaron en los tubos de cultivo o frascos que contenían el medio de cultivo.

b) En experimentos posteriores se seleccionaron plantas que presentaron la hoja más joven no totalmente desarrollada con un tamaño de no más de 10 cm de altura, las que fueron seccionadas separando el raquis y los foliolos, se disecaron en tamaños aproximados de 0,5 x 0,5 cm con la ayuda de pinzas y bisturí, y se depositaron en los tubos de cultivo o frascos que contenían el medio de cultivo.

En ambos casos los tubos de cultivo y los frascos se sellaron con Parafilm® y se identificaron con la fecha de cultivo, medio de cultivo, tipo de explante, número del experimento y tratamientos, para facilitar la toma de datos.

## 2. Embriones

Para la obtención de embriones se utilizaron semillas maduras y frutos inmaduros. El primer experimento se realizó con semillas híbridas completamente desarrolladas. Fue

necesario escarificarlas para eliminar el endocarpo. Con la ayuda de un bisturí y un microscopio estereoscópico se eliminó el endosperma para poder obtener los embriones.

Un segundo experimento se realizó con frutos inmaduros de palma, de los que se eliminó el exocarpo, mesocarpo, endocarpo y endosperma con la ayuda de un bisturí. Este cambio se debió a que estos frutos presentaban poco desarrollo del endocarpo y el embrión estaba bien formado y era viable.

### 3. Inflorescencias

Se seleccionaron inflorescencias inmaduras femeninas y masculinas que correspondían a las hojas cuatro y cinco, en plantas adultas de cinco años, para esto se debió eliminar las hojas mas viejas con el fin de extraerlas.

Las inflorescencias inmaduras están cubiertas por dos pares de brácteas que fueron eliminadas con la ayuda de un bisturí. Los explantes fueron obtenidos de las espigas inmaduras que fueron seccionadas en pedazos de 0,5 x 0,5 cm y puestos en el medio de cultivo.

En el caso de las inflorescencias femeninas, se eliminaron también las brácteas y las flores dejando únicamente el raquis, que se seccionó en pedazos de 0,5 x 0,5 cm.

### E. Cristalería

Se emplearon tubos de cultivo de 25 x 150 ml y frascos de 125 ml de capacidad para los medios de cultivo. Así como también bicales, probetas, pipetas de diferentes volúmenes, balones aforados, para la preparación de los diferentes medios de cultivo.

La cristalería se sumergió por lo menos por 24 horas en detergente (Alconox), primeramente, se enjuagó con agua corriente y luego tres veces con agua destilada. La cristalería utilizada para contener líquidos y no utilizada en la medición de sustancias, se secó y esterilizó en un horno a 150°C durante 3 horas.

### F. Condiciones de Cultivo

Los cultivos se incubaron en una cámara de crecimiento a 25°C más o menos un grado centígrado, con una intensidad lumínica de 3000 lux proporcionada por luces fluorescentes "Cool White" y un fotoperiodo de 16 horas.

## V. RESULTADOS

En todos los experimentos realizados los resultados obtenidos a las ocho, doce y dieciséis semanas fueron similares, por lo que solo se presentarán los últimos.

### A. Ensayos con explantes de embriones de palma africana

1. Efectos de la kinetina y ANA, en medio de Staritsky, sobre el crecimiento de embriones de semillas maduras de palma africana.

Los resultados de este experimento se presentan en el Cuadro 4. En el tratamiento testigo sin reguladores de crecimiento se desarrolló una plántula que no produjo haustorio ni raíces. Por el contrario, en todos los tratamientos con ANA sólo se observó desarrollo de callos blancos (Fig. 1). De los tratamientos con kinetina sola, únicamente se obtuvieron callos al nivel de 0,5 mg/L.

En las combinaciones con las diferentes dosis de Kinetina y ANA se observó que hay mayor formación de callos en los niveles medios de Kinetina (0,1 mg/L).

Cuadro 4. Efectos de la kinetina y ANA, en un medio de Staritsky, sobre el crecimiento de embriones de semillas híbridas de palma africana *Elaeis guineensis*. Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1991.

Kin (mg/L)	ANA (mg/L)											
	0				2,5				5			
	V	P	C	%	V	P	C	%	V	P	C	%
0	1	1	0	0	4	0	4	100	2	0	2	100
0,1	0	0	0	0	2	0	2	100	1	0	1	100
0,5	3	0	3	100	1	0	1	100	0	0	0	0

V Sobrevivientes

P Plantas formadas

C Callos formados

% % de callos con base en sobrevivientes

2. Efectos de la kinetina y ANA, en medio de Staritsky, sobre el crecimiento de embriones de frutos inmaduros de palma africana.

En el Cuadro 5 se presentan los resultados de este experimento. En ninguno de los tratamientos se observó callo. En el testigo sin reguladores de crecimiento se desarrollaron plántulas sin haustorio, y en algunos casos las raíces crecieron.

En los tratamientos con kinetina sola hubo mejor desarrollo de la parte aérea a niveles de 0,1 mg/L que a 0,5 mg/L, pero no se desarrollaron ni el haustorio ni la raíz.

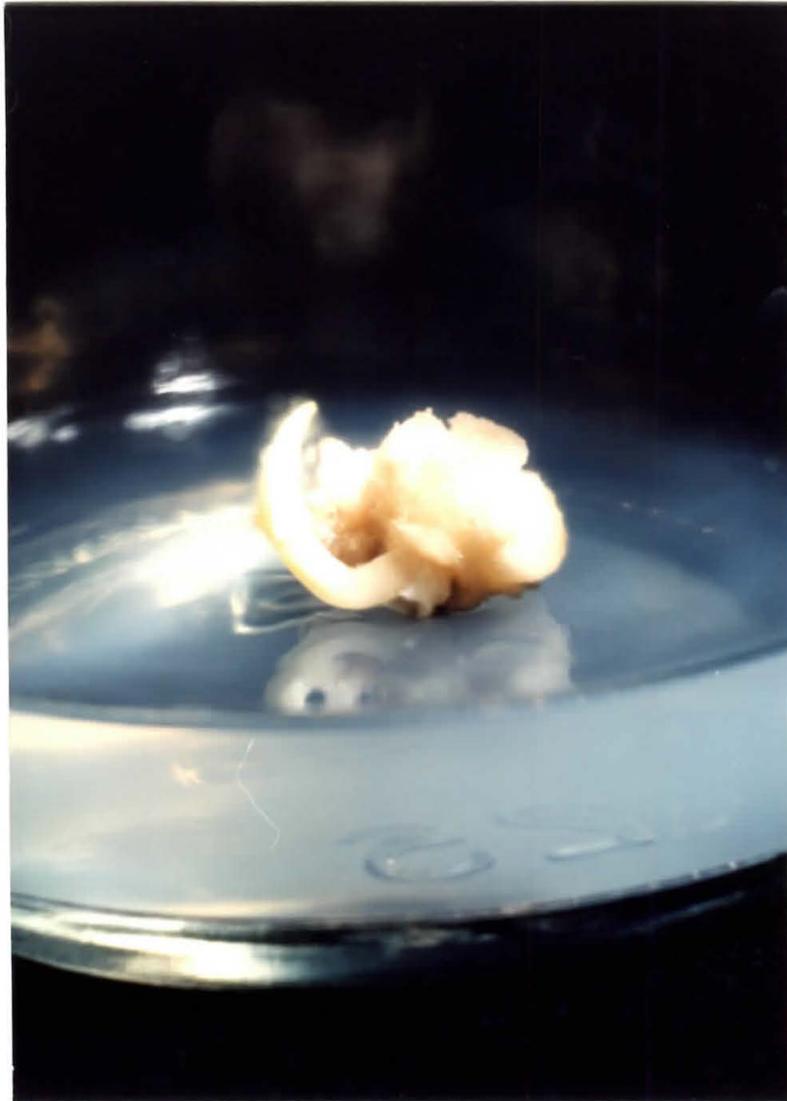


Fig. 1. Callo desarrollado a partir de un embrión de semilla madura de palma africana, cultivado en un medio de Staritsky con 5 mg/L de ANA.

Cuadro 5. Efectos de la kinetina y ANA, en un medio de Staritsky, sobre el crecimiento de embriones de frutos inmaduros de *Elaeis guineensis*. Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1991.

Kin (mg/L)	ANA (mg/L)											
	0				2,5				5			
	V	P	C	%	V	P	C	%	V	P	C	%
0	9	9	0	0	8	8	0	0	4	0	4	0
0,1	6	6	0	0	9	9	0	0	8	0	8	0
0,5	9	9	0	0	8	8	0	0	8	0	3	37

V Sobrevivientes

P Plantas formadas

C Callos formados

% % de callos con base en sobrevivientes

En los tratamientos de ANA sola, se observó que a niveles de 2,5 mg/L la mayoría de los embriones desarrollaron plántulas normales (parte aérea, haustorio y raíz). Al aumentar a 5 mg/L la mayoría de los embriones desarrollaron haustorio, en este caso de gran tamaño. Después de un tiempo se tornaron color café; en otros desarrollaron raíces y poca parte aérea.

En las combinaciones de Kinetina y ANA se observó que a niveles de 5 mg/L de ANA y 0,1 mg/L de kinetina se desarrollaron plántulas normales (Fig. 2). En el nivel de 2,5 mg/L de ANA y 0,1 mg/L de Kinetina hubo pocas plántulas que fueron normales.

En los niveles de 0,5 mg/L de kinetina con 2,5 mg/L de ANA

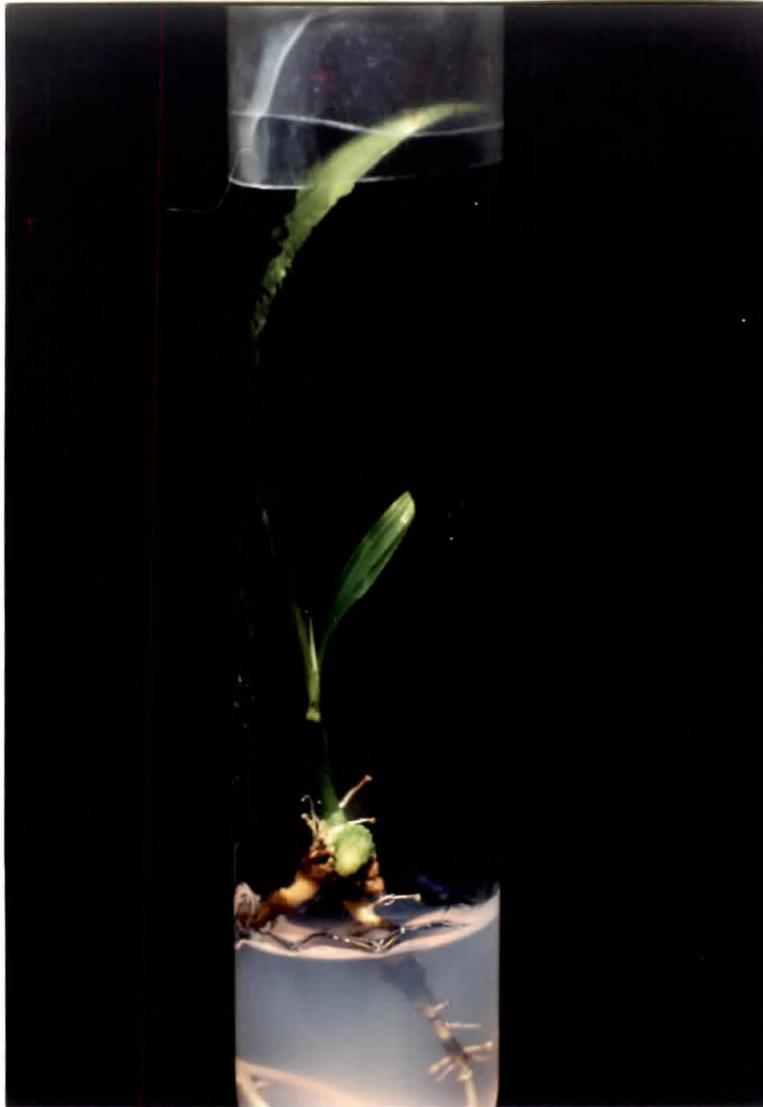


Fig. 2 Plántula completa de palma africana desarrollada de un embrión de fruto inmaduro, cultivado en medio Staritsky con 5 mg/L de ANA y 0,1 mg/L de Kinetina.

hubo desarrollo de la parte aérea, pero muy poco del haustorio y raíces. Con niveles de 5 mg/L de ANA se obtuvieron los mismos resultados, pero se formó callo en un 37% de los explantes.

B. Ensayos con explantes de folíolos desarrollados  
de palma africana

1. Efectos del 2,4 D y la Kinetina, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de folíolos desarrollados de *Elaeis guineensis*.

Tanto en el medio MS como en el Staritsky no se formó callo en el los testigos sin reguladores de crecimiento (Cuadro 6). En estos casos los tejidos se expandieron y la mayoría se tornaron fotosintéticos y conforme pasó el tiempo murieron. Lo mismo sucedió en los tratamientos sin 2,4-D.

Cuadro 6. Efectos del 2,4-D y la Kinetina, en los medios de Staritsky y MS, sobre el crecimiento de explantes de folíolos desarrollados de palma africana *Elaeis guineensis*, al cabo de 16 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1991.

Kin (mg/L)	2,4-D (mg/L)							
	0		1		2		4	
	S	MS	S	MS	S	MS	S	MS
0	0	0	50	0	100	100	0	0
0,1	0	0	0	0	0	100	0	0
0,5	0	0	0	100	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0

S Porcentaje de callo en el medio de Staritsky

MS Porcentaje de callo en el medio de MS

En el medio de Staritsky, sólo en los tratamientos con los niveles de 1 y 2 mg/L de 2,4-D y en ausencia de kinetina se formaron callos amarillentos con estructuras globulares (Fig. 3).

También se notó la formación de callos en el medio MS en los tratamientos con las combinaciones de 2,4-D (1 y 2 mg/L) y de kinetina (0,1 y 0,5 mg/L).

En ambos medios muchos explantes y callos murieron por infección de hongos, senescencia y principalmente por oxidación.



Fig. 3. Desarrollo de callo con estructuras globulares a partir de un explante de folíolo desarrollado de palma africana en el medio de Staritsky con 2 mg/L de 2,4-D. 16 semanas después de iniciado el cultivo.

2. Efectos del 2,ip y ANA, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de folíolos desarrollados de *Elaeis guineensis*.

En el Cuadro 7 se presentan los resultados del efecto del 2,ip y ANA, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de folíolos desarrollados de *Elaeis guineensis*.

Cuadro 7. Efectos del ANA y 2ip, en los medios de Staritsky y MS, sobre el crecimiento de explantes de folíolos desarrollados de palma africana *Elaeis guineensis*, al cabo de 16 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1991.

2ip (mg/L)	ANA (mg/L)									
	0		1		2			4		
	S	MS	S	MS	S	MS	C+R	S	MS	C+R
0	0	0	0	0	0	25	25	0	0	33
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	100	0	100	0	100	0	0	100	33	0
1	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0

S Porcentaje de callo en el medio de Staritsky  
 MS Porcentaje de callo en el medio de MS  
 C+R Porcentaje de callo con raíz en el medio de MS

En los testigos sin reguladores de crecimiento los explantes no formaron callo. Al principio se expandieron y se tornaron fotosintéticos, pero a medida que pasó el tiempo se volvieron amarillos y murieron. Con los diferentes niveles de 2ip y en ausencia de 2,4-D tampoco se observó crecimiento de callo en el medio MS.

En el medio de Staritsky un 100% de los explantes formaron callos en el tratamiento con 0,5 mg/L de Zip. A las 16 semanas en el medio MS se notó callo en el nivel de 2 mg/L de ANA sin Zip, e incluso hubo rizogénesis a partir del callo en este tratamiento y con 4 mg/L de ANA. Así mismo se observó la muerte de los callos y explantes en varios tratamientos debido a la oxidación.

En los tratamientos con los diferentes niveles de ANA y 0,5 mg/L de Zip en el medio de Staritsky se formaron callos. Lo mismo sucedió en el medio MS a niveles de 4 mg/L de ANA y 0,5 mg/L de Zip. En el medio de Staritsky con 2 mg/L de ANA y 1 mg/L de Zip se formaron callos en el 100% de los explantes.

### C. Ensayos con explantes de folíolos jóvenes de palma africana

1. Efectos del 2, 4-D y Kinetina, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de folíolos de hojas jóvenes de *Elaeis guineensis*

En ambos medios en el testigo sin reguladores de crecimiento no se formó callo (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efectos del 2,4-D y Kinetina, en los medios de Staritsky y MS, sobre el crecimiento de explantes de foliolos de hojas jóvenes de palma africana *Elaeis guineensis*, al cabo de 12 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.

Kin (mg/L)	2,4-D (mg/L)									
	0		1		2		3		4	
	S	MS	S	MS	S	MS	S	MS	S	MS
0	0	0	33	0	66	33	20	50	0	66
0,1	0	0	40	0	25	40	28	0	33	50
0,5	0	0	25	20	37	50	71	100	40	100

S Porcentaje de callo en el medio de Staritsky

MS Porcentaje de callo en el medio de MS

En el medio de MS en los tratamientos con kinetina sola, se desarrolló un callo al nivel de 0,5 mg/L pero se oxidó y murió alrededor de la novena semana. En el medio de Staritsky no se formó callo cuando la Kinetina se aplicó sola.

En el medio de MS, en los tratamientos con 2,4-D solo, se formó callo en diferentes niveles (2, 3 y 4 mg/L). Se obtuvieron resultados similares con el medio de Staritsky ya que se formaron callos en los niveles de 1, 2 y 3 mg/L. En todos los casos, los callos que se formaron eran blancos, translúcidos, con estructuras globulares y de tejido friable.

En el medio de Staritsky en los tratamientos con 2,4-D y kinetina, se obtuvo callo en todas las combinaciones. Por el contrario en el medio MS se formaron callos en los tratamientos de 0,5 mg/L de kinetina con los diferentes niveles de 2,4-D (Fig. 4). Estas combinaciones mostraron

porcentajes de formación de callos comparados con los tratamientos de 0,1 mg/L de kinetina con los niveles de 2 y 4 mg de 2,4-D por litro.

En ambos medios, hubo pérdida de explantes y callos por oxidación y contaminación por hongos.



Fig. 4. Explante de folíolos de hojas jóvenes de palma africana en el que se muestran callos formados en las venas en medio de MS con 3 mg/L de 2,4-D y 0,5 mg/L de Kinetina. 12 semanas después de iniciado el cultivo.

2. Efectos del ANA y 2 ip, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de folíolos de hojas jóvenes de *Elaeis guineensis*.

En el Cuadro 9 se presentan los resultados de la aplicación del ANA y 2 ip, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de folíolos de hojas jóvenes de *Elaeis guineensis*.

La reacción de los explantes en el medio Staritsky sin reguladores de crecimiento fue lenta, pero a las 12 semanas de cultivo se observó desarrollo de callos en 66% de los explantes. Los callos eran de forma filamentososa y de color blanco. En el medio MS no se logró crecimiento de callo.

En los tratamientos de 2ip solo, se pudo observar que esta citoquinina no influyó en el crecimiento de callos. La mayoría de los explantes sólo se expandían volviéndose fotosintéticos y luego se tornaban de color amarillo y morían.

En ambos medios en los tratamientos con ANA solo se formaron callos. En el medio de Staritsky reaccionaron los tratamientos de 1 y 3 mg/L de ANA y en el medio MS reaccionaron los tratamientos con 3 y 4 mg/L de ANA.

En el medio MS en los tratamientos con 2ip y ANA hubo crecimiento de callos, a niveles entre 1, 2 y 3 mg/L de ANA y 0,1 y 0,5 mg/L de 2ip presentándose organogénesis con la formación de raíces en los callos en las combinaciones de 1 mg/L de ANA y 0,1 y 0,5 mg/L de 2ip (Fig. 5).

En el medio de Staristky no se presentó organogénesis, pero se observó una reacción lenta en niveles de 1 mg/L de ANA y 0,1 mg/L de Zip. Se obtuvieron mejores y mayores porcentajes de callos con niveles de 0,5 mg/l de Zip y sus combinaciones de ANA.

Cuadro 9. Efectos del ANA y Zip, en los medios de Staritsky y MS, sobre el crecimiento de explantes de folíolos de hojas jóvenes de palma africana *Elaeis guineensis*, al cabo de 12 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.

Zip (mg/L)	ANA (mg/L)										
	0		1			2		3		4	
	S	MS	S	MS	C+R	S	MS	S	MS	S	MS
0	66	0	66	0	0	0	0	33	40	0	67
0,1	0	0	25	25	33	0	50	0	0	0	0
0,5	0	0	25	33	33	100	67	50	100	12	0

S Porcentaje de callo en el medio de Staritsky

MS Porcentaje de callo en el medio de MS

C+R Porcentaje de callos con raíz en el medio de MS



Fig. 5. Desarrollo de raíz a partir de callo en explantes de folíolos de hojas jóvenes de palma africana, en el medio de MS con 1 mg/L de ANA y 0,5 mg/L de Zip. 12 semanas después de iniciado el cultivo.

D. Ensayos con explantes de raquis de hojas jóvenes  
de palma africana

1. Efectos del 2, 4 D y la Kinetina, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de raquis de hoja jóvenes de *Elaeis guineensis*.

En el medio de Staritsky (Cuadro 10) se observa que en los tratamientos sin reguladores de crecimiento se formaron callos en 33% de los explantes (Fig. 6). Los callos eran lanoso de color blanco. Uno de ellos murió por oxidación del tejido original y del callo. En el medio MS no hubo callogénesis.

En ambos medios y en todos los niveles de kinetina sin 2,4-D no se observó ningún tipo de callo.

Cuadro 10. Efectos del 2,4-D y Kinetina, en los medios de Staritsky y MS, sobre el crecimiento de explantes de raquis de hojas jóvenes de palma africana *Elaeis guineensis*, al cabo de 12 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.

Kin (mg/L)	2,4-D (mg/L)									
	0		1		2		3		4	
	S	MS	S	MS	S	MS	S	MS	S	MS
0	33	0	83	14	33	75	80	42	66	100
0,1	0	0	75	66	87	100	100	67	57	50
0,5	0	0	100	0	100	25	50	100	75	60

S Porcentaje de callo en el medio de Staritsky

MS Porcentaje de callo en el medio de MS

Por el contrario, en los tratamientos en que se utilizó 2,4-D solo, se observó desarrollo de callos en todos los niveles (1, 2, 3 y 4 mg/L). En el medio de Staritsky con 1 mg/L los callos eran de color blanco de apariencia friable y con estructuras de forma globular. Al aumentar el nivel de auxinas el tamaño del callo aumentó, pero no influyó en el color o la forma.

En las combinaciones de los diferentes niveles de 2,4-D y kinetina, se observó callogénesis en todos los tratamientos. En la combinación de 1 mg/L de 2,4-D y 0,5 mg/L de kinetina en el medio MS el callo murió después de las ocho semanas de iniciado el experimento. Al igual que en los tratamientos sin kinetina los callos eran de color blanco, friables y con estructuras globulares, y fueron de mayor tamaño al aumentar

los niveles de 2,4-D.

Algunos callos murieron por efecto de la oxidación así como por contaminaciones con hongos.

2. Efectos del ANA y Zip, en los medios de MS y

Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de raquis de hojas jóvenes de *Elaeis guineensis*.

En el Cuadro 11 se presentan los efectos del ANA y Zip, en los medios de MS y Staritsky, sobre el crecimiento de explantes de raquis de hojas jóvenes de *Elaeis guineensis*.

Al igual que en los ensayos anteriores en el medio de Staritsky se produjeron callos en el testigo sin reguladores de crecimiento. Los callos tenían una apariencia lanosa de color blanco. Por el contrario, en el medio de MS no se formaron callos.

Cuadro 11. Efectos del ANA y Zip, en los medios de Staritsky y MS, sobre el crecimiento de explantes de raquis de hojas jóvenes de palma africana *Elaeis guineensis*, al cabo de 12 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.

Kin (mg/L)	ANA (mg/L)									
	0		1		2		3		4	
	S	MS	S	MS	S	MS	S	MS	S	MS
0	27	0	0	0	50	75	75	33	66	100
0,1	40	0	100	25	66	33	100	75	60	33
0,5	40	100	50	40	50	50	28	50	33	100

S Porcentaje de callo en el medio de Staritsky

MS Porcentaje de callo en el medio de MS

Se observó en ambos medios que los tratamientos en los que se aplicó Zip solo, hubo desarrollo de callo de color blanco con estructuras de forma globular.

De igual manera el ANA favorece la formación de callo a partir del nivel de 2 mg/L. En el medio de Staritsky los callos fueron de color blanco, translúcidos y con estructuras de forma globular.

En los diferentes tratamientos de Zip y ANA se observó la formación de callo en los dos medios probados. En el medio de MS, especialmente en los niveles altos de 2 mg/L de ANA y de 0,5 mg/L de Zip. En el medio de Staritsky se favorecía la formación de callos blancos con estructuras globulares y friables. En estos resultados se observa que a niveles de 0,1 mg/L de Zip y sus respectivas combinaciones con ANA se obtuvo una mayor callogénesis.

Al igual que en los ensayos anteriores varios callos murieron por oxidación.

#### E. Ensayos con explantes de inflorescencias inmaduras de palma africana

1. Efectos del ANA y 2 ip, en un medio MS, sobre el crecimiento de explantes de inmaduros de inflorescencias masculinas de la hoja seis e inflorescencias femeninas de las hojas cinco y seis de palma africana.

Los resultados de este experimento se presentan en el Cuadro 12. Luego de ocho semanas en cultivo los explantes de las inflorescencias masculinas prosiguieron con el desarrollo de las flores, sin producir ninguna estructura parecida a un callo (Fig. 7).

En las inflorescencias femeninas no hubo desarrollo de callos en los testigos sin reguladores de crecimiento y en los tratamientos en que se utilizó 2ip solo.

En las inflorescencias femeninas de la cuarta hoja se observó una mejor respuesta para la callogénesis en los tratamientos con ANA solo en los niveles de 2, 3 y 4 mg/L. En las inflorescencias de la quinta hoja se observó formación de callo únicamente en el nivel de 2 mg/L de ANA.

En las combinaciones de ANA y 2ip se observa que tanto la auxina como la citoquinina en forma combinada ayudan a la formación de callos. En las inflorescencias de la cuarta hoja en el nivel de 2 mg/L de ANA y 0,1 mg/L de 2ip se formó mayor cantidad de callo que en los niveles de 3 mg/L de ANA y 0,5 mg/L de 2ip.

En las inflorescencias femeninas de la quinta hoja se desarrollaron callos tanto para los niveles de 2 y 4 mg/L de ANA y 0,1 y 0,5 mg/L respectivamente. En ambos casos el porcentaje de callos fue similar. En estos tratamientos se desarrollaron varios primordios florales que no se habían eliminado durante la disección de los explantes (Fig. 8). En estos cultivos se formaron callos duros de color anaranjado.

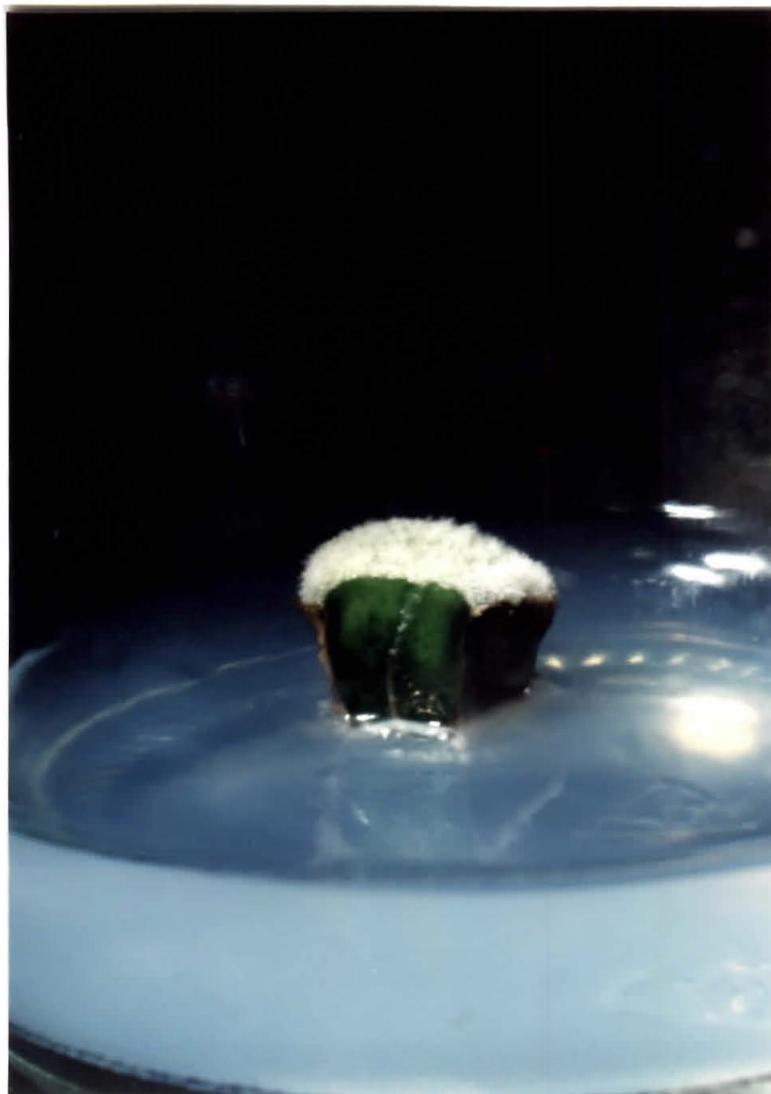


Fig. 6. Desarrollo de callos lanosos a partir de explantes de raquis de hojas jóvenes de palma africana, en el medio de Staritsky en el testigo sin reguladores de crecimiento. 12 semanas después de iniciado el cultivo

Cuadro 12. Efectos del ANA y Zip, en un medio MS, sobre el crecimiento de explantes de inflorescencias inmaduras masculinas de la hoja seis, femeninas de las hojas cuatro y cinco de palma africana *Elaeis guineensis*, al cabo de 8 semanas de cultivo. Escuela Agrícola Panamericana, 1991-1992.

Zip (mg/L)	ANA (mg/L)														
	0			1			2			3			4		
	IM6	IF5	IF4	IM6	IF5	IF4	IM6	IF5	IF4	IM6	IF5	IF4	IM6	IF5	IF4
0	0	0	0	0	0	0	0	33	100	0	0	100	0	0	100
0,1	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	50	0
0,5	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	100	0

IM6 Porcentaje de callo en inflorescencias masculinas de la hoja seis

IF5 Porcentaje de callo en inflorescencias femeninas de la hoja cinco

IF4 Porcentaje de callo en inflorescencias femeninas de la hoja cuatro

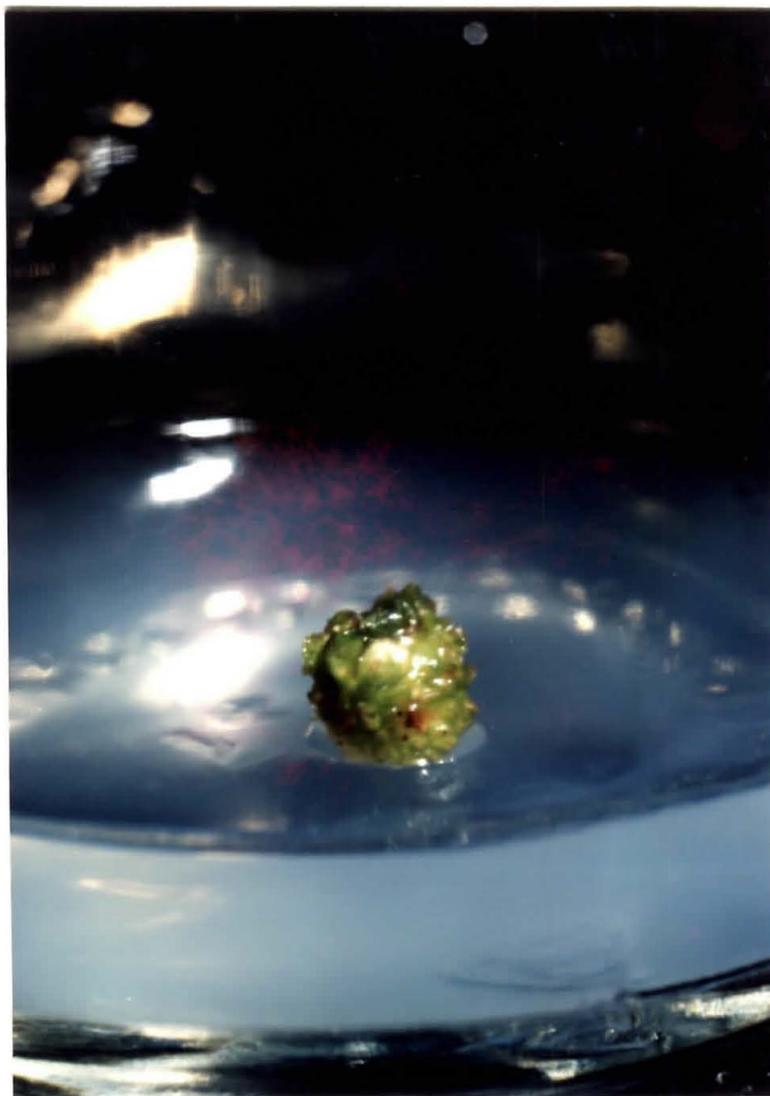


Fig. 7. Explantes de inflorescencia masculina de la hoja seis de palma africana en la que solo hubo desarrollo de las flores, sin formación de callo. El explante fue cultivado en medio de MS con 3 mg/L de ANA. 8 semanas después de iniciado el cultivo.



Fig. 8. Explante de inflorescencia femenina de la hoja cinco en la que se observó la formación de callo y el desarrollo de flores. El explante fue cultivado en medio MS con 2mg/L de ANA y 0,1 mg/L de Zip. 8 semanas después de iniciado el cultivo.

## V. DISCUSION

En el primer experimento con embriones provenientes de semillas maduras se obtuvo solo una planta completa (Cuadro 5). Algunos embriones no germinaron y otros que lo hicieron, no desarrollaron las raíces o el haustorio. Este órgano es muy importante no sólo para la germinación del embrión sino que se ha relacionado con el desarrollo de la plántula. La falta de desarrollo de raíces o parte aérea pudo deberse a que se le causó daño a la plúmula o la radícula durante la disección del embrión. Algunos embriones iniciaron la germinación pero degeneraron y formaron callos en los niveles de 2,5 mg/L de ANA.

Con los embriones de frutos inmaduros (Cuadro 6) a diferencia de los embriones maduros se obtuvo desarrollo de plántulas en la mayoría de los tratamientos. En los testigos sin reguladores de crecimiento se desarrollaron plántulas, pero no desarrollaron el haustorio. Algo similar sucedió al utilizar 2,5 mg/L de ANA, pero en este caso se formaron plántulas con haustorio. Esto contradice los resultados de Reuveni y Lilien-kipnis (1974) que encontraron que el ANA inhibe la germinación de los embriones en palma datilera y que lo mejor sería el desarrollo de los embriones en medios sin reguladores de crecimiento. Estos resultados los obtuvieron

con los medios de MS y LS.

En los tratamientos con Kinetina sola se formó la parte aérea pero no se formaron raíces. Esto coincide con los resultados de Reuveni y Lilien-Kipnis (1974). Estos mismos autores encontraron un efecto dominante del ANA en relación con la Kinetina; pero en los resultados obtenidos en nuestro experimento (Cuadro 5), tanto la auxina como la citoquinina favorecen la germinación de los embriones, pero a niveles muy altos se induce a la formación de callos.

La mayor cantidad de plántulas completas se obtuvo en los tratamientos con 2,5 mg/L de ANA, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Tisarapog-Yanisarapan (1985) quienes obtuvieron plántulas completas a partir de embriones con concentraciones de 1 y 2 mg/L de ANA. La importancia de la producción de plántulas completas a partir de embriones, como indica Teixeira (1985), no es por su importancia en la propagación clonal de las plantas ya que es necesario conocer su potencial de producción antes de propagarla. Su principal uso es en la experimentación, ya que se puede obtener una gran cantidad de material con una misma uniformidad fisiológica.

La formación de callos a partir de embriones se obtuvo con niveles altos de auxinas (5 mg/L de ANA), lo que concuerda con los resultados por Teixeira (1985), quien obtuvo callos a partir de explantes de embriones utilizando 2,4-D o ANA a niveles de 1 a 10 mg/L, pero obtuvo mejores resultados con concentraciones de 2 y 4 mg/L; Tirapong-Yanisarapan

(1985), también obtuvieron callos compactos y amarillos cuando utilizaron concentraciones de 5 y 6 mg/L de ANA. Al igual que en el punto anterior estos resultados son útiles en la investigación, ya que los resultados pueden ser aplicados en otros explantes de una planta élite.

Los explantes de hojas desarrolladas (Cuadros 6,7,8 y 9) no respondieron bien a ningún tipo de tratamiento. La mayoría murieron y se formaron pocos callos, posiblemente porque los tejidos estaban más diferenciados.

Los explantes foliares que reaccionaron mejor fueron los de hojas jóvenes en desarrollo. No sólo se mantuvieron vivos por más tiempo, sino que llegaron a formar mayor cantidad de callos.

El ANA resultó más eficaz en la formación de callos y raíces en los niveles de 2 y 4 mg/L. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Rabechault y Martin (1976), quienes indican que los mejores resultados en formación de callos los obtuvieron utilizando ANA o 2,4-D en concentraciones de 2 a 4 mg/L.

De las citoquininas que se probaron, solo el Zip en el medio de Staritsky indujo la formación de callo, lo que contradice los resultados de Rabechault y Martin (1976) que indican que las citoquininas no influyen en la callogénesis. Tanto las dos auxinas (2,4-D y ANA) como las citoquininas (Kinetina y Zip) en sus diferente combinaciones promovieron la formación de callos.

En el medio de MS se obtuvo mayor formación de callo y de raíces en los tratamientos con ANA sola. Bidwell (1979) indica que las auxinas afectan no solo el crecimiento y la división celular sino que también la formación de raíces, brotes, tejido calloso e influye en otros procesos fisiológicos en las plantas. Este mismo efecto se observó cuando el ANA se utilizó en combinación con Zip.

Los explantes de raquis (Cuadros 10 y 11) dan mejores resultados que los de folíolos en la formación de callos, pero se presentó mayor muerte de tejidos y callos por efecto de la oxidación.

No se encontró diferencia en ninguno de los dos medios de cultivo (MS y Staritsky) en cuanto a la callogénesis.

El 2,4-D y ANA influyeron de forma similar en la formación de callo. El Zip resultó ser la citoquinina más eficaz para este propósito en ambos medios de cultivo. La combinación de ANA y Zip fue la mejor combinación para la formación de callos en ambos medios de cultivo.

En cuanto a las inflorescencias (Cuadro 12), las masculinas y las femeninas produjeron diferentes resultados. Los explantes provenientes de inflorescencias masculinas de la hoja seis aumentaron en volumen pero no produjeron callo. Por el contrario, los explantes de las inflorescencias femeninas de las hojas cuatro y cinco formaron callos en un alto porcentaje. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos con inflorescencias de palma africana realizados por

Corley y Barret (1977), Jones (1974). También Eeuwens (1976; 1978), obtuvo resultados similares en cocotero.

Los resultados sugieren que la edad del tejido de donde proviene el explante es un factor crucial para la formación de callos. Se encontró que los tejidos jóvenes (hojas en desarrollo e inflorescencias inmaduras), rinden mejores explantes para este propósito. En tejidos de hoja que ya habían adquirido su forma definitiva (aunque no su tamaño final) los explantes únicamente se expandieron, algunos se volvieron fotosintéticos y murieron poco después.

El estado fisiológico de la planta donadora de los explantes puede afectar la formación de callos. Posiblemente los explantes de hojas, raquis y folíolos en desarrollo, al encontrarse en un estado de división celular constante (no totalmente diferenciados) respondieron de mejor forma en los medios de cultivo y a la aplicación de reguladores de crecimiento, a diferencia de los tejidos de folíolos desarrollados que al encontrarse en un estado más diferenciado es más difícil la respuesta a la aplicación de reguladores de crecimiento para la inducción del tejido a callogénesis.

Wooi (1984) informa que la tasa de callogénesis no solo depende de la edad de las hojas, sino también del genotipo de la palma y la concentración de auxina.

En general, la contaminación por bacterias y hongos sistémicos en los explantes, callos y medios de cultivo fue uno de los problemas más serios durante el trabajo, ya que

muchos de los explantes que se eliminaron tenían este problema, posiblemente porque las plántulas y material utilizados para la obtención de explantes provenían de plantaciones comerciales, donde estos patógenos no afectan la producción o el desarrollo de la planta. Esto afectó el número de explantes sobrevivientes y no fue posible observar la reacción de los mismos. Una manera de disminuir la contaminación en los cultivos fue la aplicación semanal de una mezcla de bactericidas y fungicidas sistémicos a las plantas donadoras de explantes.

En cultivo de tejidos la oxidación de los explantes es el resultado de sustancias fenólicas que se liberan en los lugares donde se hicieron los cortes. Estas sustancias se oxidan en los medios de cultivo y son tóxicas para los tejidos. Este es un problema común en cultivo de tejidos con explantes de tejido adulto de especies leñosas (Bhojwani y Razdan, 1983).

En este trabajo la oxidación también afectó el desarrollo y crecimiento de callos, sobre todo en los cultivos de raquis donde se observó ennegrecimiento de medios y la muerte de los callos. Rabechault y Martin (1976) dicen que la oxidación en los explantes de palma africana es causada por las citoquininas. Sin embargo en nuestros resultados con el uso de Zip se produjo callo y la oxidación no fue muy alta. Otros autores (Reuveni y Lilien-kipnis, 1974) también tuvieron oxidación al cultivar explantes de palma datilera en medios

con ANA y Kinetina.

## VI. CONCLUSIONES

- 1.- La producción de callo en la palma africana es posible aplicando métodos de propagación *in vitro*.
- 2.- Es posible la producción de plántulas completas a partir de embriones de semillas maduras e inmaduras.
- 3.- El mejor explante para la producción de plántulas completas son los embriones provenientes de frutos inmaduros.
- 4.- El ANA favorece la germinación de los embriones.
- 5.- De los dos medios probados, MS y Staritsky, el primero fue mejor para la callogénesis.
- 6.- Los explantes provenientes de tejidos menos desarrollados reaccionaron mejor a la aplicación de reguladores de crecimiento.
- 7.- El ANA solo favorece la rizogénesis en explantes de folíolos jóvenes desarrollados y en desarrollo.
- 8.- De las citoquininas probadas solo el 2ip promovió la formación de callo.
- 9.- Con las diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas, los mejores resultados se obtuvieron con ANA y 2ip.

## VII. RECOMENDACIONES

- 1.- Continuar trabajando con explantes jóvenes, tales como inflorescencias o raquis de hojas en desarrollo.
- 2.- Probar nuevas combinaciones de auxinas y citoquininas para intentar la producción de brotes.
- 3.- Transferir los callos a medios frescos con frecuencia para tratar de evitar la oxidación.
- 4.- Investigar métodos para evitar la oxidación de los explantes.

- LINSMAIER, E. M. Y SKOOG, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (EE.UU.) 18:100-127.
- LIORET, C. 1981. Vegetative propagation of oil palm by somatic embryogenesis. *In Oil Palm in the Eighties Vol. I.* Ed. by E. Pushparajah and P.S. Chew. Incorporated Society of Planters. p. 163-172.
- MILLER, C. D. 1963. Kinetin and Kinetin-like compounds. *In Moderne Methoden der Pflanzenanalyse.* Ed. by Paech y M.V. Tracy. Berlin, Springer-Verlang. v. 6, p. 194-202.
- MOREL, G. M. 1965. Clonal propagation of orchids by meristem culture. *Cymbidium Society News* 20(7): 3-11.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growt and biossays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* (EE.UU.) 15: 473-497.
- NITSCH, J. P. 1969. experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19:389-404.
- NOIRET, J. M. 1981. Aplicación del cultivo *in vitro* a la mejora y la producción de material clonal en la palma africana. *Oleagineux* (Francia) 36(3):125.
- ONG, H. T. 1975. Callus formation from roots of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Proceedings National Plant Tissue Culture Symposium, Kuala Lumpur, 1975, pp. 26-31.*
- PANNETIER, C.; ARTHUIS, P.; LIEVOUX, D. 1981. Neoformación de jóvenes plantas de *Elaeis guineensis* a partir de callos primarios obtenidos en pedazos de hojas cultivadas *in vitro*. *Oleagineux* (Francia) 36(3):119-120.
- PARANJOTHY, K.; OTHMAN, R. 1982. *In vitro* propagation of oil palm. *In A. Fujiwara, ed, Plant Tissue Culture 1982. Proceeding of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Tokyo, p.747-748.*
- RABECHAULT, H., AHHE, J. et GUENIN, G. 1970. Colonies cellulaires et formes embryoides *in vitro* a partir de cultures d'embryons de palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var *dura* becc). *Comptes Rendus de la Academie de Sciences de Paris. Série D.* 270: 3067-3070.
- \_\_\_\_\_.; MARTIN, J.P.; CAS, S. 1972. Recherches sur la culture des tissus du palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Oleagineux* (Francia) 27:531-534.

- \_\_\_\_\_.; CAS, S. 1974. Recherches sur la culture *in vitro* des embryons de palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.). x. Culture de segments d'embryons. Oleagineux (Francia) 29: 73-78.
- \_\_\_\_\_.; MARTIN J.P. 1976. Multiplication végétative du palmier huile (*Elaeis guineensis*, Jacq.) a l'aide de cultures de tissu foliaires. Comptes Rendus de l'Académie de Sciences de Paris, Ser. D. 283: 1735-1737.
- REUVENI, O.; LILIEK-KIPNIS, H. 1974. Studies of *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues and organs. The Volcani Institute of Agricultural Research. Department of horticulture. Pamphlet No. 145. Bet Dagan (Israel), Division of Scientific Publications. 40 p.
- SMITH, W. K. ; THOMAS, J. A. 1973. The isolation and *in vitro* cultivation of cells of *Elaeis guineensis*. Oleagineux (Francia) 28:123-127.
- STARITSKY, G. 1970. Tissue culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. Euphytica (Holanda) 19:288-292.
- TEXEIRA, J.B. 1985. Propagação clonal de dendê. Simposio de Interciencia Biotecnológica en las Américas II. Aplicaciones en la agricultura tropical. San José, Costa Rica. Julio 15-17, 1985.s.p.
- TIRAPONG-YANISARAPAN. 1985. Vegetative propagation of oil palm through tissue culture. M.S. Thesis. Bangkok, Thailand, Kasetsart University. 89 p.
- WOOI, K.C. 1984. Palm tissue culture. In Micropropagation of selected root crops, palms, citrus and ornamental species. FAO. Plant Production and Protection Paper 59. Rome, 1984 p. 88-112.

## VII. LITERATURA CITADA

- AHÉE, J.; ARTHUIS, P.; CAS, G.; DUVAL, Y.; GUENIN, G.; HANOWER, J.; HANOWER, P.; LIEVOUX, D.; LIORÉ, C.; MALAURIE, B.; PANNETIER, C.; RAILLOT, D.; VARECHON, C.; ZUCKERMAN, L. La propagación vegetativa *in vitro* de la palma africana por embriogénesis somática. *Oleagineux* (Francia) 36(3):117-118.
- BIDWELL, R. S. S. 1979. Fisiología vegetal. Traducido del inglés por Guadalupe Gerónimo Cano y Cano y Manuel Rojas Garcidueñas. México, D.F., AGT.editor. 784 p.
- BHOJWANI, S.; RAZDAN, M. 1983. Plant tissue culture: Theory and practice. Amsterdam (Holand), Elsevier. 502 p.
- CORLEY R. H. V.; BARRET J. H. 1977. Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. *Oil Palm News* (Malasia) 22:2-7.
- EEUWEENS, C. J. 1976. Mineral requirements and initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* (EE.UU.) 36:23-28.
- \_\_\_\_\_. 1978. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 42:173-178.
- HANOWER, J.; PANNETIER, C. 1982. *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. Proceeding of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Ed. by A. Fujiwara. The Japanese Association for Plant Tissue Culture. p.745-746.
- HELLER, R. 1953. Recherches sur la nutrition minérale de tissus végétaux cultivés *in vitro*. Theses, Faculte des Sciences, L'Université de Paris. 223p.
- JONES, L. H. 1974. Propagation of clonal oil palm by tissue culture. *Oil Palm News* (Malasia) 17: 1-8.
- \_\_\_\_\_. 1976. Tissue culture propagation of important tropical crops. Sin publicar. 25 p.

## VII. LITERATURA CITADA

- AHÉE, J.; ARTHUIS, P.; CAS, G.; DUVAL, Y.; GUENIN, G.; HANOWER, J.; HANOWER, P.; LIEVOUX, D.; LIORET, C.; MALAURIE, B.; PANNETIER, C.; RAILLOT, D.; VARECHON, C.; ZUCKERMAN, L. La propagación vegetativa *in vitro* de la palma africana por embriogénesis somática. *Oleagineux* (Francia) 36(3):117-118.
- BIDWELL, R. S. S. 1979. Fisiología vegetal. Traducido del Inglés por Guadalupe Gerónimo Cano y Cano y Manuel Rojas Garcidueñas. México, D.F., AGT.editor. 784 p.
- BHOJWANI, S.; RAZDAN, M. 1983. Plant tissue culture: Theory and practice. Amsterdam (Holand), Elsevier 502 p.
- CORLEY R. H. V.; BARRET J. H. 1977. Vegetative propagation of oil palm via tissue culture. *Oil Palm News* (Malasia) 22:2-7.
- EEUWEENS, C. J. 1976. Mineral requirements and initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* (EE.UU.) 36:23-28.
- \_\_\_\_\_. 1978. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 42:173-178.
- HANOWER, J.; PANNETIER, C. 1982. *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. Proceeding of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Ed. by A. Fujiwara. The Japanese Association for Plant Tissue Culture. p.745-746.
- HELLER, R. 1953. Recherches sur la nutrition minérale de tissues végétaux cultivés *in vitro*. Theses, Faculte des Sciences, L'Université de Paris. 223p.
- JONES, L. H. 1974. Propagation of clonal oil palm by tissue culture. *Oil Palm News* (Malasia) 17: 1-8.
- \_\_\_\_\_. 1976. Tissue culture propagation of important tropical crops. Sin publicar. 25 p.

- \_\_\_\_\_.; CAS, S. 1974. Recherches sur la culture *in vitro* des embryons de palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.). x. Culture de segments d'embryons. Oleagineux (Francia) 29: 73-78.
- \_\_\_\_\_.; MARTIN J.P. 1976. Multiplication végétative du palmier huile (*Elaeis guineensis*, Jacq.) a l'aide des cultures de tissu foliaires. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Ser. D. 283: 1735-1737.
- REUVENI, D.; LILIEK-KIPNIS, H. 1974. Studies of *in vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues and organs. The Volcani Institute of Agricultural Research. Department of Horticulture. Pamphlet No. 145. Bet Dagan (Israel), Division of Scientific Publications. 40 p.
- SMITH, W. K. ; THOMAS, J. A. 1973. The isolation and *in vitro* cultivation of cells of *Elaeis guineensis*. Oleagineux (Francia) 28:123-127.
- STARITSKY, G. 1970. Tissue culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. Euphytica (Holanda) 19:288-292.
- TEXEIRA, J.B. 1985. Propagação clonal de dendê. Simposio de Interciencia Biotecnológica en las Américas II. Aplicaciones en la agricultura tropical. San José, Costa Rica. Julio 15-17, 1985.s.p.
- TIRAPONG-YANISARAPAN. 1985. Vegetative propagation of oil palm through tissue culture. M.S. Thesis. Bangkok, Thailand, Kasetsart University. 89 p.
- WOOI, K.C. 1984. Palm tissue culture. In Micropropagation of selected root crops, palms, citrus and ornamental species. FAO. Plant Production and Protection Paper 59. Rome, 1984 p. 88-112.

- LINSMAIER, E. M. Y SKOOG, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (EE.UU.) 18:100-127.
- LIORET, C. 1981. Vegetative propagation of oil palm by somatic embryogenesis. *In Oil Palm in the Eighties Vol. I.* Ed. by E. Pushparajah and F.S. Chew. Incorporated Society of Planters p. 163-172.
- MILLER, C. O. 1963. Kinetin and Kinetin-like compounds. *In Modern der Pflanzenanalyse.* Ed. by Paech y M.V. Tracy. Berlin, Springer-Verlang. v. 6, p. 194-202.
- MOREL, G. M. 1965. Clonal propagation of orchids by meristem culture. *Cymbidium Society News* 20(7): 3-11.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growt and biossays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* (EE.UU.) 15: 473-497.
- NITSCH, J. P. 1969. experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19:389-404.
- NOIRET, J. M. 1981. Aplicación del cultivo *in vitro* a la mejora y la producción de material clonal en la palma africana. *Oleagineux* (Francia) 36(3):125.
- ONG, H. T. 1975. Callus formation from roots of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Proceedings National Plant Tissue Culture Symposium, Kuala Lumpur, 1975, pp. 26-31.*
- PANNETIER, C.; ARTHUIS, P.; LIEVOUX, D. 1981. Neoformación de jóvenes plantas de *Elaeis guineensis* a partir de callos primarios obtenidos en pedazos de hojas cultivadas *in vitro*. *Oleagineux* (Francia) 36(3):119-120.
- PARANJOTHY, K.; OTHMAN, R. 1982. *In vitro* propagation of oil palm. *In A. Fujiwara, ed, Plant Tissue Culture 1982. Proceeding of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Tokyo, p.747-748.*
- RABECHAUULT, H., AHHE. J. et GUENIN, G. 1970. Colonies cellulaires et formes embryoides *in vitro* a partir de cultures d'embryons de palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var *dura* becc). *Comptes Rendus de la Academie de Sciences de Paris. Série D.* 270: 3067-3070.
- \_\_\_\_\_.; MARTIN, J.P.; CAS, S. 1972. Recherches sur la culture des tissus du palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Oleagineux* (Francia) 27:531-534.