

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
Sistema de Estudios de Posgrado

ORGANOGENESIS DIRECTA EN APICES CAULINARES
DE PEJIBAYE (Bactris gasipaes H. B. K.)

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa
Conjunto de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos
Naturales de la Universidad de Costa Rica y el Centro Agronómico
Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar el grado de

Magister Scientiae

por

Mario Herman Pinedo Panduro

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
Departamento de Producción Vegetal

Turrialba, Costa Rica

1987

A la memoria de mi Madre,
su estoicismo y sacrificio

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Victor Palma, Dr Hugo Villachica, Ing Hugo Delgado, Ing Tomás Alvarez e Ing José Mesia, funcionarios del INIPA-Perú por aprobar nuestra concurrencia al CATIE y otorgarnos la beca en época de profunda crisis económica de nuestro País

Al Dr Antonio Pinchinat, especialista en investigación agrícola del IICA-Perú por su asesoramiento y apoyo

Al Doctor Herbert Frömberg, funcionario de la GTZ (Alemania) y Ex-Coordinador de la Unidad de Recursos Fitogenéticos del CATIE por su amplio respaldo y asesoramiento en la gestión y desarrollo del estudio

Al Dr Romeo Martínez, ex Jefe del Departamento de Producción Vegetal del CATIE por su decisivo apoyo y asesoramiento.

Al Dr Ludwig Müller, Consejero Principal por su permanente respaldo, y eficiente asesoramiento en la estrategia, metodología e interpretación de los resultados

Al Dr Victor Villalobos, Coordinador de la Unidad de Recursos Fitogenéticos del CATIE por su amplia colaboración, y valiosos aportes en la revisión del presente trabajo

Al Ing José Arze, Dr José Fargas y Dr Gustavo Enríquez por su apoyo y participación como miembros del comité de tesis

Al Dr José Di Stefano, Director del Programa de Posgrado UCR-CATIE por su apoyo y transigencia ante factores imprevistos durante nuestro programa de estudios.

A los colegas Sebastián Salazar, Roberto Fernández y Jorge Sandoval especialistas en cultivo de tejidos del CATIE, por su importante asesoramiento y amplia colaboración tanto en aspectos generales como específicos referentes al pejibaye.

Al colega Carlos Astorga por su valiosa colaboración en la consecución del material de campo y a todos los demás integrantes de la Unidad de Recursos Fitogenéticos del CATIE por su estimulante participación

Al Dr Pedro Ferreira, Jefe del Centro de Cómputo del CATIE por su asesoramiento y apoyo en el análisis estadístico

Al Dr Jorge Mora-Urpí profesor de Genética de la Universidad de Costa Rica por su asesoramiento, permanente apoyo y por permitirnos tomar información de su biblioteca especializada sobre pejibaye.

Al colega Charles Clement, especialista en Mejoramiento de Frutales Tropicales del Instituto Nacional de Investigaciones de la Amazonía-Brasil por su altruista ayuda y asesoramiento

A los compañeros estudiantes por su solidaridad y colaboración permanentes.

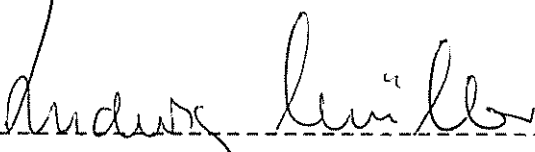
Al Sr Francisco Solano, Técnico Fotográfico del CATIE por su valiosa ayuda

Al Sr Rigoberto Aguilar, Sra. Laura Coto y demás trabajadores de la Biblioteca del CATIE por su eficiente colaboración para obtener y reproducir información.

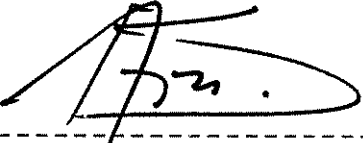
Esta tesis ha sido aceptada en su forma presente por la comisión de Estudios de Posgrado del Programa Conjunto UCR/CATIE como requisito parcial para optar al grado de

Magister Scientiae


COMITE ASESOR:




Ludwig Müller, Ph D Profesor Consejero



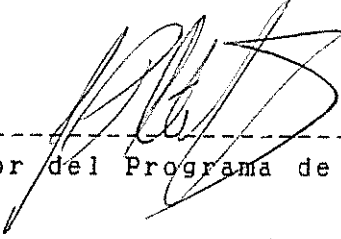
José Arze, M S. Miembro del Comité



José Fargas, Ph. D Miembro del Comité



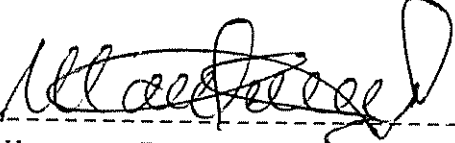
Gustavo Enríquez, Ph D. Miembro del Comité



Director del Programa de Estudios de Posgrado



Decano del Sistema de Estudios de Posgrado



Mario Herman Pinedo Panduro, Candidato

INDICE

	página
RESUMEN	viii
SUMMARY	xi
LISTA DE CUADROS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
1 INTRODUCCION	1
2 REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Propagación <u>in vitro</u> de palmeras	3
2.1.1 Métodos de regeneración de plantas	3
2.1.2 Contaminación y oxidación	8
2.1.2.1 Desinfección	10
2.1.2.2 Oxidación	11
2.1.3 Cultivo de ápices caulinares en palmeras	12
2.1.4 Cultivo <u>in vitro</u> de flores	14
2.2. Morfología del pejibaye	20
2.3. Propagación vegetativa	22
2.3.1. Aplicación de métodos tradicionales	22
2.3.2. Cultivo de tejidos de pejibaye	26
3 MATERIALES Y METODOS	31
3.1. Localización del estudio	31
3.2. Material vegetal	31
3.3. Desinfección de los explantes	32
3.3.1. Apices caulinares	32
3.3.2. Espigas	35
3.4. Explantes y medios de cultivo por experimentos	35

3 5	Características de los factores en estudio, diseños experimentales y variables evaluadas	40
3 6	Condiciones ambientales de la cámara de crecimiento	46
3 7	Estudios histológicos	47
3 8	Trasplante	48
4	RESULTADOS Y DISCUSION	49
4.1	Apices caulinares	49
4 1 1	Desinfección	49
4 1 2	Establecimiento y organogénesis	53
4 1 2 1	Fase de establecimiento	53
4 1 2 2	Organogénesis tipo 1	57
4 1 2 3	Organogénesis tipo 2	59
4 1 2 4	Organogénesis tipo 3	61
4 1 3	Fase inductiva	63
4 1 3 1	Organogénesis tipo 4	63
4 1 3 2	Organogénesis tipo 5	64
4 1 4	Trasplante	73
4.2	Espigas y yemas florales	73
4 2 1	Fase de establecimiento	73
4 2 2	Fase inductiva	81
4 2 3	Indicios morfogenéticos aleatorios	85
5	CONCLUSIONES	88
6	RECOMENDACIONES	89
7	BIBLIOGRAFIA	90
8	ANEXO	103

PINEDO, P M 1987 Organogénesis directa en ápices caulinares de pejibaye (Bactris gasipaes H. B. K.) Tesis Mag Sc Turrialba C R, Programa Universidad de Costa Rica/CATIE 112 p

Palabras clave: ápices caulinares, Bactris gasipaes, cultivo de tejido, organogénesis, palma, pejibaye, propagación vegetativa

RESUMEN

La gran variabilidad genética del pejibaye (Bactris gasipaes H. B. K.), que se manifiesta en la propagación sexual así como su largo ciclo reproductivo, limitan la aplicación del proceso de mejoramiento genético convencional. Una alternativa a este problema es la propagación de genotipos superiores a partir de hijuelos. Sin embargo la supervivencia de hijuelos al trasplante generalmente no es mayor de 25 %.

Con el objeto de estudiar la aplicación de cultivo de tejidos en la propagación clonal del pejibaye fueron cultivados in vitro ápices caulinares y flores masculinas inmaduras. Se emplearon tanto ápices de hijuelos de plantas adultas como de plantas juveniles. Los explantes fueron mantenidos en incubación a una temperatura de 24 ± 3 C y fotoperiodo de 16 h.

Durante la fase de establecimiento de los ápices se empleó las sales MS suplementado con (mg/l): i-inositol 100; tiamina-HCl 0,4; sacarosa 30 000; carbon activado (Sigma) 3 000; Bacto Difco agar 8 000 y ácido naftalenacético (ANA) 10. El grado de oxidación y la tasa de crecimiento de los ápices fue variable según la constitución genética. Durante esta fase ocurrió organogénesis en tres ápices de plantas juveniles con regeneración de plántulas. Entre estos casos el mas promisorio dio origen a

14 plántulas después de siete meses de cultivo. Todas estas plántulas sobrevivieron al ser transferidas y aclimatadas en macetas con suelo estéril.

En otro proceso de diferenciación (fase inductiva) los ápices fueron cultivados en un medio de cultivo que contenía sales MS suplementado con (mg/l): i-inositol 100; tiamina HCl 0,4; sacarosa 30 000; Gelrite 1,2; ANA 3 en combinación con 0, 7, 14 y 21 de benciladenina (BA) respectivamente. En todos los genotipos ensayados se observó engrosamiento de los ápices y subsecuente formación de protuberancias en la parte basal debido al efecto de la combinación de ANA con BA. A partir de estas protuberancias, luego de nueve meses de cultivo, el 54 % de las introducciones diferenciaron brotes vegetativos. Observaciones histológicas demostraron que los brotes tuvieron un origen directo, sin la intermediación de callos. El nivel adecuado de BA para estimular los eventos morfogénicos varió según el genotipo.

En base a la hipótesis de trabajo, los brotes regenerados pueden tener dos orígenes: el desarrollo de yemas pre-existentes, lo cual limitaría el potencial de micropropagación, y el otro por formación de yemas de novo (adventicias). En ambos casos la ausencia de una fase intermedia de callo permite inferir que las plantas regeneradas muy probablemente no mostrarán modificaciones genotípicas.

Los reguladores de crecimiento: ácido giberélico (GA), BA, ácido indolbutírico (AIB), ANA y ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) en diferentes combinaciones y concentraciones no indu-

ieron la diferenciación de brotes vegetativos en los explantes florales empleados

Este trabajo demostró que el factor genético de la planta madre determina en parte el grado de respuesta a la oxidación, crecimiento y potencial morfogénico de los ápices. De igual forma se evidenció experimentalmente alternativas para la inducción de brotes vegetativos a partir de ápices y la aclimatación de las plántulas obtenidas. La metodología desarrollada podrá ser aplicada al pejibaye como opción promisoría para la clonación de esta palma //

PINEDO, P M 1987 Direct organogenesis in shoot tips of the peach palm (Bactris gasipaes H B K). Tesis Mag Sc Turrialba, C R , Costa Rica University/CATIE Programme 112 p.

Key words: Shoot tip, Bactris gasipaes, tissue culture, palm, peach palm, organogenesis, vegetative propagation

SUMMARY

In the peach palm (Bactris gasipaes H B K) the great genetic variability manifest during sexual propagation and the long reproductive cycle are the limiting factors for conventional breeding programs. The attempts to propagate selective plants by using off-shoots is one alternative. However, the survival rate of off-shoots from mature plants during transplanting has usually not been more than 25 %.

In this research shoot tips and immature male flowers were cultivated in vitro in order to study the application of tissue culture in peach palm clonal propagation. Explants were taken from mature as well as juvenile plants, and incubated at $24 \pm 3^{\circ} \text{C}$ with a 16 hours photoperiod.

During the initiation phase the nutrient media consisted of Murashige and Skoog's salts, supplemented with the following (mg l⁻¹): i-inositol 100; thiamine-HCl 0,4; sucrose 30000; Sigma activated charcoal 3000; Difco Bacto agar 8000 and alpha-naphthalene acetic acid (NAA) 10. The rates of growth and browning of the shoots were different according to the genotype. During this phase organogenesis occurred in three shoot-tips dissected from young plants and complete plants were regenerated from the shoot tips by the end of the experiment. Of these, the most promissory one gave origin to 14 shoots after

seven months of culture. After these shoots developed into plantlets, they were successfully transplanted to pots containing sterilized soil

For another differentiation process (inductive phase) the apexes were cultured on a Murashige and Skoog medium supplemented with (mg l⁻¹): i-inositol 100; thiamine HCl 0,4; sucrose 30000; Gelrite 1200; NAA 3 in combination with benzyladenine (BA) at 0, 7, 14 and 21. In all genotypes an increase of the diameter of the apexes was observed. This was followed by the formation of protuberance-like structures at the base of the apexes due to the effect of the interaction ANA-BA. After nine months the protuberances became vegetative shoots in 54 % of the genotypes tested. Histological studies confirmed that such shoots originated without a callus phase. The best BA level to induce such morphogenetic response differed according to the genotype

In agreement with the hypothesis of work, the regenerated shoots can have two origins: the development of existent buds, which would constitute a limiting factor for micropropagation, and the formation of buds de novo (adventitious). In both cases the absence of a callus phase suggests that the regenerated plants probably will not show genotypic changes

The growth regulators: gibberellic acid (GA), BA, indolebutyric acid (AIB), ANA, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in different combinations did not induce the differentiation of vegetative shoots in the cultured floral explants

This research proved that the genetic constitution of the

mother plant is an important factor in the response of the apexes to the degree of oxidation, growth and morphogenesis. It was possible to induce the formation of vegetative shoots from cultured apexes and successfully acclimate the plantlets. The methodology developed can apply to the peach palm as a promissory means for clonal propagation of this plant.

LISTA DE CUADROS

En el texto

Cuadro No.		Página
1	Soluciones empleadas para deshidratar los tejidos durante el estudio histológico	47
2	Porcentaje de oxidación en ápices caulinares de diferentes procedencias después de 90 días de cultivo <u>in vitro</u> (Experimento 2)	54
3	Crecimiento en longitud (mm) de los ápices caulinares cultivados <u>in vitro</u> durante cuatro meses	56
4	Número de brotes a partir de un ápice (Organogénesis tipo 1, Experimento 2)	59
5	Número de brotes a partir de un ápice (Organogénesis tipo 2, Experimento 2)	61
6	Número de brotes a partir de un ápice (Organogénesis tipo 3, Experimento 2)	63
7	Protuberancias y brotes en ápices provenientes de diferentes introducciones después de nueve meses de cultivo <u>in vitro</u> en presencia de BA (Organogénesis tipo 5, Experimento 2)	67

En el Anexo

Cuadro No.		
1A	Cuadrados medios estimados para porcentajes de contaminación de ápices caulinares (Experimentos 1a y 1b)	104
2A	Pruebas de Duncan del porcentaje de contaminación de ápices caulinares (Experimentos 1a y 1b)	105
3A	Cuadrados medios estimados para diámetro, número de protuberancias, número de brotes y longitud de raíces de ápices caulinares de pejíbave después de siete meses de cultivo (Experimento 2)	106
4A	Cuadrados medios estimados para oxidación y peso de espigas en función de su estado de desarrollo, consistencia del medio y presencia de luz después de dos meses de cultivo (Experimento 3A)	107

5A	Cuadrados medios estimados para peso(mg) de flores masculinas después de dos meses de cultivo (Experimento 4A)	108
6A	Pruebas de Duncan de la oxidación y peso de espigas por efecto del tamaño de espigas, consistencia del medio y presencia de luz después de dos meses de cultivo (Experimento 3a)	109
7A	Prueba de Duncan de la oxidación y peso de espigas por efecto de medios basales y antioxidantes después de dos meses de cultivo (Experimento 3b)	110

LISTA DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Frutos e hijuelos de pejibaye	23
2	Material empleado como fuente de explantes	34
3	Porcentaje de contaminación de ápices después de un mes de cultivo en relación a diferentes tipos de desinfectantes (Experimento 1a)	50
4	Porcentaje de contaminación de ápices después de un mes de cultivo sometidos a diferentes concentraciones de NaOCl (Experimento 1b)	52
5	Organogénesis del tipo 1 en explantes de pejibaye	58
6	Organogénesis del tipo 2 en explantes de pejibaye	60
7	Organogénesis del tipo 3 en explantes de pejibaye	62
8	Longitud de raíces en ápices por efecto de los reguladores ANA y BA después de siete meses de cultivo	64
9	Diámetro de los ápices de diferentes introducciones después de siete meses de cultivo en presencia de BA	66
10	Protuberancias y brotes en ápices después de nueve meses de cultivo en presencia de BA (Experimento 2)	68
11	Organogénesis de los tipos 4 y 5 en explantes de pejibaye (Experimento 2)	69
12	Cortes histológicos de ápices meristemáticos	71
13	Eventos en la organogénesis directa en ápices caulinares de pejibaye en relación al tiempo expresado en meses	72
14	Aclimatación de plántulas	74
15	Oxidación de diferentes tamaños de espiga en medio líquido y semisólido después de dos meses de cultivo en oscuridad (Experimento 3a)	76

16	Oxidación de diferentes tamaños de espigas en medio líquido y semisólido después de dos meses de cultivo bajo condiciones de luz (Experimento 3a)	77
17	Peso de espigas en medio líquido y semisólido luego de dos meses de cultivo bajo condiciones de luz (Experimento 3a)	78
18	Peso de espigas en medio líquido y semisólido luego de dos meses de cultivo en oscuridad (Experimento 3a)	79
19	Oxidación de espigas en relación con factores antioxidantes luego de dos meses de cultivo (Experimento 3b)	80
20	Peso de espigas en relación con factores antioxidantes luego de dos meses de cultivo (Experimento 3b)	80
21	Peso de flores masculinas en función de los reguladores de crecimiento BA y AIB sin 2,4-D luego de dos meses de cultivo (Experimento 4a)	82
22	Peso de flores masculinas en función de los reguladores de crecimiento BA, AIB y 0,5 mg/l de 2,4-D luego de dos meses de cultivo (Experimento 4a)	82
23	Prominencias puntiagudas en espigas en relación con bajos niveles de 2,4-D luego de cuatro semanas de cultivo (Experimento 4b)	83
24	Longitud de espigas en relación con bajos niveles de 2,4-D luego de cuatro semanas de cultivo (Experimento 4b)	83
25	Prominencias puntiagudas en espigas en relación con altos niveles de 2,4-D después de dos meses de cultivo (Experimento 4c)	84
26	Peso de espigas en relación con altos niveles de 2,4-D luego de dos meses de cultivo (Experimento 4c)	84
27	Cultivo <u>in vitro</u> de inflorescencias de peji-baye	86

LISTA DE ABBREVIATURAS

AIA	ácido 3-indolacético
AIB	ácido 3-indolbutírico
ANA	ácido naftalenacético
ANOA	ácido 2-naftoxiacético
BA	6-benciladenina
CA	carbón activado
DMSO	dimetilsulfóxido
FAP	6-furfurilaminopurina (cinetina)
GA3	ácido giberélico
MS	medio de Murashige y Skoog (1962)
PVP	polivinilpirrolidona
Y3	medio de Eeuwens (1976)
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2-iP	2-isopenteniladenina

1. INTRODUCCION

El origen híbrido y la alogamia explican en gran medida la amplia variación genotípica del pejibaye (Bactris gasipaes) (Mora-Urpi, 1981). Por esta razón la propagación sexual en las primeras generaciones no reproduce satisfactoriamente los caracteres agronómicos deseables y genera heterogeneidad de las cosechas. Este hecho constituye una gran desventaja económica para el productor y limita la industrialización de los frutos.

Chaves et al (1948) encontraron genotipos con 14 800 U I de vitamina A en 100 g de pulpa fresca y 62% de grasa en pulpa seca. Además el contenido y calidad de proteínas, grasas y carotenos, entre otros metabolitos, evidencian el gran potencial industrial de esta palma (Johannesen, 1967; Clement et al, 1985). La grasa del mesocarpo puede tener 60 % de ácidos grasos no saturados (Hammond et al 1982; Mora-Urpi, 1982), lo que le confiere mayor fluidéz y favorecería su mercadeo (Clement y Arkcoll, 1985).

La harina del pejibaye puede sustituir a la del trigo, sorgo y maíz en un 15, 50 y 75% respectivamente. Pero el inhibidor de enzimas proteasas que contiene, la alta humedad del mesocarpo y presencia de la semilla dura son limitantes para su industrialización (Murillo et al, 1983, Cooz, 1984, Tracy, 1985; 1986).

Sin embargo existen genotipos sin inhibidor y frutos partenocarpicos con baja humedad y buena calidad, pero no ha sido posible propagarlos vegetativamente en forma tradicional (Camacho, 1972; Gonzales y Dominguez, 1977; Pérez, 1983; Mora-Urpi et al, 1984; CENTRO DE INVESTIGACIONES EN PRODUCTOS NATURALES, 1986).

La técnica de cultivo de tejidos ha sido ensayada en palmeras como coco, dátil, palma aceitera y mas recientemente en peji-baye. Se obtuvo tanto organogénesis como embriogénesis somática previa inducción de callo (Fisher y Tsai, 1979; Tisserat, 1981a, ;1981b; Rosario y De Guzman, 1982; Branton y Blake, 1983; Arias y Huete, 1983). Pero, en los casos de embriogénesis ésta ha ocurrido aleatoriamente y la tasa de multiplicación fue baja (Tisserat y DeMason, 1980; Paranjothy, 1984; Raju et al., 1984; Krikorian y Kann, 1986; Soh, 1986). Además la intermediación de callosidades conlleva un riesgo de modificaciones en el genoma (Smith y Thomas, 1973; D'Amato, 1978; Fisher y Tsai, 1979).

La importancia actual y potencial del pejibaye para países del trópico y la utilidad de la propagación clonal para la multiplicación de individuos sobresalientes motivaron el presente estudio. Se propuso investigar un sistema in vitro para regenerar propágulos sin la fase intermedia de callos por lo que se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general: Estudiar la propagación vegetativa in vitro del pejibaye por organogénesis directa

Objetivos específicos:

- a. Determinar una metodología de desinfección para ápices caulinares de hijuelos basales de plantas adultas
- b. Estudiar el efecto de 6-benciladenina (BA) para estimular brotes vegetativos en ápices caulinares aislados
- c. Estudiar el efecto de las auxinas ácidos indolbutírico (AIB) y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y la citocinina BA para estimular la inversión de tejidos florales a vegetativos

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Propagación in vitro de palmeras

2.1.1 Métodos de regeneración de plantas

Algunos autores han mencionado que la propagación vegetativa de palmeras es difícil debido a su naturaleza perenne y monocotiledónea (Kovoor, 1981; Eeuwens, 1976). Por eso los métodos han resultado laboriosos y la frecuencia de diferenciación completa de plantas ha sido baja. Generalmente el número de explantes adecuados que se puedan extraer de una planta es muy reducido. Además los propágulos son propensos a oxidaciones y contaminaciones (TISSUE CULTURE of the Oil Palm, 1970; Vouyouklis, 1981; Tisserat, 1982; Moran, 1983).

El coco (Cocos nucifera L.), palma aceitera (Elaeis guineensis Jacq.) y dátil (Phoenix dactylifera L.), son de importancia económica en muchos países. Por eso el grueso de los estudios sobre propagación de palmas in vitro han versado sobre estas especies.

Ya en 1954 fue publicado un trabajo sobre cultivo de embriones de coco (Cutter y Wilson, 1954). Sin embargo no fue sino hasta los años 60 y 70 en que el interés por clonar palmeras in vitro cogió importancia (De Guzman y Rosario, 1964; Rabechault et al, 1970; Staritsky, 1970).

Casi todos los órganos de dichas palmeras sirvieron como explantes. Por ejemplo en la palma datilera se emplearon inflorescencias, yemas laterales, ápices caulinares y meristemas

(Tisserat et al ,1979) En el caso de la palma aceitera se ensayaron embriones, ápices, segmentos de tejido sub-apical, raquis, inflorescencias y raíces (Lioret y Ollagnier,1981) Similarmente en el coco fueron cultivados in vitro embriones, estructuras florales, raíces y hojas jóvenes (Cutter y Wilson,1954; De Guzman y Rosario,1964; Smith,1984; Raju et al ,1984).

Respecto a embriogénesis somática, la inducción de callo ha sido un propósito generalizado en los cultivos de palmeras como paso previo a la obtención de embrioides. Por ejemplo en palma aceitera y dátil se logró obtener plantas completas a partir de callos embriogénicos. Para la primera se emplearon con éxito explantes de hojas inmaduras y raíces. A partir de callos producidos en la palma aceitera se logró en un 20 a 80 % la diferenciación de plantas luego de seis meses de cultivo (Iyer,1982; Noiret et al ,1985). En cambio no fue posible la inducción de brotes laterales en ápices caulinares de esta especie (Tran Than Van,1973; Choo et al ,1982).

En dátil un 30 a 40% de los callos produjeron raíz y vástago (Tisserat,1982). Se encontró que los callos de esta palmera son altamente totipotentes (TISSUE CULTURE of the oil palm, 1970). Similar a lo observado en palma aceitera el cultivo de ápices no fue exitoso para regenerar plantas (Noiret et al). Según Tisserat (1984a), no se conoce hasta la fecha una metodología para estimular la inducción de hijuelos in vitro, proceso que como se señaló anteriormente es deseable por el menor riesgo de cambios genéticos en las plantas propagadas. Las

dificultades encontradas para el establecimiento y germinación de embrioides de callos de raquilla limitan la micropropagación del coco (Pannetier y Buffard-Morel, 1982; Raju *et al*, 1984) También los intentos para lograr la inversión de tejidos reproductivos a vegetativos sin callogénesis en esta palmera no han sido completamente exitosos (Eeuwens y Blake, 1977; De Guzman y Rosario, 1979; Iyer, 1982) Tampoco se han logrado plantas completas en palma aceitera por esta vía (Jones, 1974) En cambio, en dátil se logró la transformación de yemas florales femeninas a plantas completas (Drira y Benbadis, 1985) En varias otras palmeras como macauba (Acrocomia spp.) y palma navideña (Veitchia merrilli Bacc) fueron obtenidos embriones somáticos mediante cultivo *in vitro* (Teixeira, 1985; Srinivasan *et al*, 1985) Tisserat (1984b) en una revisión compiló 40 artículos sobre la producción de callos en tejidos de diferentes palmeras cultivadas *in vitro* Estos trabajos hicieron referencia a 40 especies de 26 géneros La iniciación de embriones asexuales o estructuras embriogénicas tuvo lugar en 11 especies Según esta misma revisión la producción de plantas mediante el enraizamiento de ápices caulinares solo ocurrió en palma aceitera y dátil

Raju *et al* (1984) obtuvieron 48 embrioides sin pasar por la fase de callo en tejidos vasculares de ápices del coco Aún cuando este proceso pudiera considerarse bastante promisorio es poco frecuente y difícilmente controlable Según Soh (1986) los ápices de plantas provenientes de semillas de palma aceitera mostraron mayor potencial morfogénico que ápices extraídos de

hijuelos basales

La organogénesis y embriogénesis en palma aceitera son procesos completamente aleatorios (Choo *et al* ,1982; Blake y Eeuwens,1982; Paranjothy,1984; Noiret *et al* ,1985; Teixiera,1985; Krikorian y Kann,1986) Recientemente Soh(1986) consideró que la propagación clonal *in vitro* de palma aceitera es deficiente por la baja frecuencia en la obtención de líneas embriogénicas Krikorian y Kann(1986) encontraron un máximo de 2 % de embriogénesis somática. Asimismo, trabajos en coco evidenciaron aleatoriedad de inducción de callos y embrioides así como diversidad de respuesta según el genotipo ensayado (Fisher y Tsai,1979; Branton y Blake,1983). En cuanto al dátil, Tisserat(1981a;1982) ha hecho referencia a la formación no sincronizada de plantas y la dificultad de su trasplante a suelo

La ocurrencia de mutaciones a causa del empleo de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo de palmeras y sus implicaciones prácticas es tema controversial Fisher y Tsai(1979) detectaron células con número anormal de cromosomas en callos de coco que mostraron rápido crecimiento. Sin embargo esas células tenían capacidad para regenerar raíces También en callos de rápido crecimiento de palma aceitera fueron encontradas células con mitosis anormales y poliploides (Smith y Thomas,1973) D'Amato(1978) concluyó que variaciones en el número cromosómico ocurren prácticamente en todos los callos y cultivos en suspensión Este autor opinó que la única manera de asegurar estabilidad genética para la propagación clonal es el empleo de ápices meristemáticos

Resulta aparentemente contradictorio el hecho de que Corley et al. (1977) encontraran en palma aceitera variación apreciablemente menor entre palmeras dentro de clones que entre aquellas propagadas por semilla sexual. Solo el 1,8 % de plantas de un clon propagado via callo y ninguna de un grupo de 13 000 plantas fueron identificadas como anormales. Se estima que estos son valores muy bajos ya que el 10 % de plántulas de palma aceitera y el 30 % en el caso del coco son comunmente descartadas por anomalías al propagarlas sexualmente (Corley et al., 1977)

Se especuló que la relativa uniformidad de los clones de palma aceitera podría ser el resultado de alta estabilidad genética; o quizás de la escasa supervivencia de las células anormales (Corley et al., 1977). En muchas otras especies las mutaciones ocurridas in vitro han ocasionado mayores anomalías visibles (Reynolds, 1982)

Pese a las dificultades citadas arriba, se han logrado significativas aplicaciones agro-económicas especialmente en el caso de la palma aceitera. Aunque los explantes provinieron siempre de plantas propagadas por semilla, 32 clones de dicha especie (3.000 plantas) fueron establecidas en 1977 en Malasia (Corley et al., 1977). Estos clones, según Iyer (1982) han producido por lo menos 30% más de aceite que aquellas plantas propagadas sexualmente. Este es un caso que ejemplifica la aplicación de la micropropagación para incrementar rendimientos mediante la introducción de un genotipo superior. De acuerdo con Noiret et al. (1985) la técnica también podría ser aplicada en la propaga-

ción de individuos fértiles del híbrido inter-específico Elaeis melanococca x Elaeis guineensis

La producción de miles de embrioides y plantas a partir de varios clones de dátil fue lograda por Tisserat(1982) Otro caso de exitosa aplicación es la propagación del cultivar híbrido de coco "makapuno" cuyo embrión normalmente aborta Su semilla, como caso excepcional, está llena con un endosperma gelatinoso de alto valor comercial (Reynolds,1982). Este cultivar pudo ser propagado mediante el cultivo de embriones in vitro (De Guzman y Del Rosario,1964; Balaga y De Guzman,1970)

La criobiología para preservar germoplasma ha sido probada en callos de dátil, los cuales fueron reactivados luego de tres meses de almacenamiento en nitrógeno líquido (Tisserat et al ,1981

También han sido dados los primeros pasos para el cultivo de células en palmeras. Bass y Hughes(1984) aislaron protoplastos de células de palma aceitera, los cuales formaron paredes celulares y se dividieron. La división de una célula regenerada a partir de protoplastos ha sido observada también en coco; esta proliferación continuó hasta aproximadamente el estado de ocho células (Kovoor,1981).

2.1.2. Contaminación y oxidación

La contaminación y oxidación de explantes primarios, principalmente en la fase de establecimiento, son dificultades muy frecuentes en el microcultivo de palmeras (TISSUE CULTURE of the oil palm, 1970; Paranjothy,1984; Tisserat,1984c) Sharma

et al. (1980) opinaron que menos del 25% de contaminación de explantes de dátil es óptimo. Durante el cultivo de ápices de dátil, Tisserat (1984c) observó niveles de contaminación de 20 a 40%.

Tanto para palma aceitera, dátil o coco se han encontrado serios problemas de oxidación durante el cultivo de los explantes (Tisserat, 1984a). Las yemas florales inmaduras de dátil fueron empleadas con relativa facilidad como fuentes de explantes. Debido a sus condiciones asépticas en el campo y a la posibilidad de ser extraídas y trasladadas al laboratorio con sus dos espatas, el riesgo de contaminación es mínimo (Paranjothy, 1984; Choo, 1984).

Staritsky (1970) consideró posible que células de levaduras y bacterias penetren hasta los ápices de la palma aceitera a través de los amplios vasos del metaxilema. Esta penetración puede ser favorecida por los retrasos en la excisión y siembra de los tejidos.

El oscurecimiento de los explantes y del medio de cultivo ha sido ampliamente señalado como una consecuencia de la oxidación de polifenoles y formación de quinonas (Sharma et al., 1980; Schwabe, 1984; Litz y Jarret, 1986). Pero también han sido señaladas otras causas, como presencia de citocininas, agar y balanceo nutritivo del medio (Tisserat, 1981a; 1984b; Paranjothy, 1984).

2.1.2.1. Desinfección En la micropropagación de palmeras han sido usados varios productos como desinfectantes. Hipocloritos de sodio y calcio han resultado mayormente aceptables para esterilización superficial y son quizás los mas usados actualmente. Permanganato de potasio, cloruro de mercurio, hipoclorito de sodio y etanol, solos o en combinación, fueron probados por ejemplo en dátil. En este caso se desinfectaron raíces, pecíolos de hojas, ápices caulinares y frutos inmaduros (Sharma *et al.*, 1980); Fisher y Tsai (1978) encontraron que el uso de 10% de hipoclorito de sodio inhibió el crecimiento de los embriones de coco; mientras que concentraciones de 0,5 a 1,5% no provocaron efectos negativos sobre el explante.

Tisserat (1984b) recomendó doble aplicación de NaOCl al 2,6% a explantes de dátil. En estudios de esta misma palma, Choo (1984) mencionó el uso de 1% de NaOCl durante 15 minutos y remojo adicional previo a la siembra durante cinco segundos. Este remojo final según Tisserat (1979a) fue especialmente efectivo para obtener cultivos de dátil libres de patógenos y sin inhibición de su crecimiento.

La doble esterilización también fue practicada por Blake y Eeuwens (1982) y Gupta *et al.* (1984) en explantes de coco. Para la primera desinfección usaron HgCl₂ y NaOCl; para la segunda y previamente a la siembra usaron NaOCl en concentraciones no especificadas.

Paranjothy (1984) logró completa desinfección de raíces de palma

aceitera con 3% de ácido peracético; sin embargo, éstas no produjeron callo. En cambio, mediante 1% de HgCl₂ sobrevivieron el 50% de los explantes y aproximadamente el 5 a 10% de los restantes formaron callo. El uso de antibióticos, según informaron Reuveni y Lilien-Kipnis (1969), fue efectivo contra contaminantes internos encontrados en tejidos de dátil.

2.1.2.2. Oxidación. Pretratamientos a los explantes e inclusión de adsorbentes a los medios de cultivo, fueron ampliamente probados en el cultivo de tejidos de palmeras. El ácido ascórbico fue usado en combinación generalmente con ácido cítrico para retardar la oxidación de los tejidos aislados (Murashige, 1974; El-Hennawy y Wally, 1980; Iyer, 1982; Tisserat, 1981a; 1984a; Choo, 1984).

Reuveni y Lilien-Kipnis (1969) demostraron la ineffectividad del ácido ascórbico, dihidroxinaftaleno, DMSO y PVP como antioxidantes en explantes de dátil. Similarmente Reynolds y Murashige (1979) y Tisserat (1979a) no encontraron efecto positivo de PVP (peso molecular 10.000 y 40.000) contra la oxidación. En cambio Rhiss *et al* (1979) retardaron exitosamente la oxidación de ápices de dátil gracias al suministro de 200 mg/l de PVP al medio nutritivo.

Existen numerosos ejemplos del uso con éxito del CA para prevenir la oxidación y mejorar el crecimiento, callogénesis y morfogénesis de explantes de muchas especies. Fisher y Tsai (1978) e Iyer (1982) notaron mejor crecimiento de embriones de coco cuando el medio de cultivo incluía CA. Blake (1966) tam-

bién observó la utilidad de CA en ápices vegetativos de esta misma especie. La oxidación en explantes de palma aceitera fue superada por Nwanko y Krikorian (1983) mediante el uso de CA. Aplicaciones de 0,1 a 3% de CA redujeron la oxidación de explantes de dátil y aumentaron su supervivencia y organogénesis (Tisserat, 1979a; 1984b; Choo, 1984). Sharma *et al* (1980) opinaron que el CA fue mejor que cisteína para este fin, ya que esta última sustancia puede ser fitotóxica en altas concentraciones.

2.1.3. Cultivo de ápices caulinares en palmeras

Muy pocas veces se han cultivado ápices de palmeras *in vitro* con el expreso fin de multiplicarlos sin formación previa de callo. Particularmente en palmeras que no producen hijuelos basales (coco y palma aceitera) el interés, al parecer, ha sido mucho menor. La mayoría de los pocos trabajos efectuados a este respecto versan sobre dátil.

Apices de coco de 2 x 5 mm, con cinco primordios foliares, crecieron normalmente en medio nutritivo con bajo nivel de auxina (Blake, 1966). Este crecimiento fue mucho mayor con la adición de CA (0,25%). El estímulo de raíces en la base de estos brotes fue conseguido con $2,5 \times 10^{-6}$ M de ANA (sin CA) o $2,5 \times 10^{-4}$ M (con CA). De esta manera se logró la conformación balanceada de plantas y su posterior transferencia a suelo.

Staritsky (1970) estableció *in vitro* ápices de palma aceitera, cuyas hojas crecieron vigorosamente. Aunque también obtuvo raíces a partir de bloques de tejido sub-apical, no logró

regenerar plantas completas.

Rhiss *et al.* (1979) obtuvieron brotes vegetativos a partir de ápices caulinares de hijuelos basales de dátil. Para ello usaron varios reguladores de crecimiento, a saber: 0,1 a 1 mg/l de BA, más FAP, más 2-iP. Se agregó además AIB, AIA y ANOA en dosis de 0,5, 0,5 y 1 a 5 mg/l respectivamente. Este fue el caso menos aleatorio (entre los consultados) de inducción de brotes vegetativos, ya que fue repetitivamente logrado en 3 variedades. Estos brotes fueron aislados y enraizados en medio con 2-iP (0,1 mg/l), más ANA (1 mg/l) más AIB (2mg/l), y AIA (3 mg/l). Los primeros brotes se obtuvieron a los 3-4 meses sin formación previa de callo.

Los primeros trabajos de Tisserat (1979) demuestran el establecimiento y considerable crecimiento de ápices de dátil en medio nutritivo suplementado con ANA ó 2,4-D (0 a 1mg/l). La aleatoriedad de rizogénesis es claramente expuesta luego de varios recultivos en el mismo medio. En trabajos más recientes, Tisserat (1984c) mejoró la técnica del cultivo de ápices de dátil, principalmente en la fase de establecimiento. A juzgar por la supervivencia y crecimiento, el uso de 10 mg/l de ANA fue satisfactorio. Además, bajo las condiciones de cultivo el 5-10% de los ápices produjeron yemas axilares. La posterior transferencia a medio líquido con ANA (0,1 mg/l) más BA (10 mg/l) estimuló la mayor frecuencia de brotes ($3,5 \pm 2,4$ brotes/ápice). Con el empleo de agar solo se consiguió $1,4 \pm 0,8$ brotes/ápice. De esta manera se obtuvieron hasta 20 brotes/ápice después de seis meses de cultivo. Sin embargo, la mayoría de los ápices

pese a su robusta conformación no emitieron brotes. Asimismo, la inducción de rizogénesis en los ápices desarrollados ocurrió aleatoriamente

Mediante el uso de ANA y FAP (0,1 mg/l), sin GA, Drira y Benbadis (1983) lograron la proliferación de yemas axilares en ápices de dátil. El proceso de inducción de brotes no fue mejorado con el trabajo de Garb y Tisserat (1985), ya que solo ocurrieron en un 5-10% de los cultivos y en forma aleatoria. Sin embargo, estos autores mencionaron como progreso la facilidad para inducir raíces en los ápices mediante 0,1 mg/l de ANA. Asimismo concluyeron que los ápices de 3 mm de longitud mostraron el mejor crecimiento. La mejor respuesta de crecimiento en este caso fue obtenida en ápices transferidos a medio líquido, luego de dos semanas de establecimiento en medio con agar.

2.1.4. Cultivo in vitro de flores

El cultivo de yemas florales es particularmente útil para examinar las condiciones que permiten la diferenciación de partes florales específicas (Nitsh, 1963; Ganapathy, 1969; Shabde-Moses y Murashige, 1979). El cultivo de flores también se aplica a estudios concernientes al control de morfogénesis (Tepfer et al , 1963; 1966). En el caso de monocotiledóneas, no se logró en muchos casos la diferenciación de flores cultivadas in vitro (Hicks y Sussex, 1969).

El inicio de brotes vegetativos a partir de yemas florales es un fenómeno teratológico que en la naturaleza ocurre en géneros

como Agave, Anagalis, Ananas, Anthophytum, Furcraea, Gonatanthus, Impatiens y ciertas liliáceas. Estos pueden originarse espontáneamente como resultado de fotoinducción incompleta, infección por fitopatógenos, tratamientos quirúrgicos ó por la aplicación de reguladores de crecimiento (Mohan y Wadhi, 1968; Davis y Sudasrip, 1981)

Tal como lo mostraron Davis y Sudasrip (1981), la producción de brotes vegetativos en lugar de inflorescencias, raquillas o flores individuales, fue común en algunas especies de palmas. Al igual que en muchas especies agaváceas y liliáceas, este fenómeno ha ocurrido en coco (Eeuwens, 1976; Davis, 1978; Davis *et al.*, 1981; Davis, 1982; Reynolds, 1982), palma aceitera (Sudasrip, 1980; Davis y Sudasrip, 1981; Krikorian y Kann, 1986), en dátil (Davis *et al.*, 1981), y en pejibaye (Camacho, E.; dato no publicado), como también en otras palmas como Arenga pinnata, Borassus flavellifer y Chysalidocarpus lutescens (Sudasrip, 1980). Desafortunadamente ha sido limitada la aplicación de los fenómenos teratológicos de palmeras en términos de propagación clonal (Tisserat, 1984a).

Existen varios ejemplos sobre la obtención de brotes adventicios a partir de estructuras florales cultivadas *in vitro*. Mediante la combinación de distintas auxinas y citocininas se logró plantas completas *in vitro* en una diversidad de familias. Por ejemplo la mezcla de FAP (4 mg/l) con AIA (5 mg/l) fue eficiente para obtener plantas de coliflor (Torres *et al.*, 1980). Bakry *et al.*, (1985) lograron plantas completas a partir de fragmentos de ápices de inflorescencias de banano

Para ello emplearon AIA o ANA 1 a 2 mg/l y BA o FAP 1 a 2 mg/l en combinación. Con explantes muy similares Cronauer y Krikorian (1985) también lograron plantas completas inducidas con BA (5 mg/l) y 10% de agua de coco. En ambos casos tampoco hubo formación previa de callo. Resultados similares fueron obtenidos con: Echinochloa colonum (Tyagi et al.), Brassica oleracea L (botrytis e itálica) (Torres et al 1980), Atractylodes lancea D.C. (Hiraoka et al., 1984), Kalanchoe pinnata Pers (Mohan y Wadhi, 1968; Ganapathy, 1969) y Allium cepa (Dunstan y Short, 1979). En cambio, en ciertos casos como en algunas herbáceas (Bonga, 1982), Dactylis glomerata (Conger y McDonnell, 1983) y Browalia demisa (Ganapathy, 1969), la previa formación de callo fue imprescindible.

Partes de inflorescencias de palma aceitera crecieron y fotosintetizaron sobre un medio con 5 mg/l de AIA (TISSUE CULTURE of the oil palm, 1970). Igualmente Smith y Thomas (1973) encontraron que explantes de inflorescencia mostraron algún desarrollo in vitro. Jones (1974) observó también que explantes de inflorescencia crecieron y conservaron un alto grado de organización, pero raramente produjeron callo. Sin embargo, Lioret y Ollagnier (1981) lograron iniciación de callos de inflorescencia inmadura, aunque estos fueron de rara ocurrencia y crecimiento lento.

Blake (1966) cultivó raquillas de coco de 2,5 mm de longitud y logró la formación de pseudo-brotes vegetativos. Estos fueron cultivados por largos períodos pero no pudieron ser mantenidos luego de su enraizamiento. El medio de cultivo óptimo para la

inducción de dichos brotes contenía 4-5 % de azúcar, 5×10^{-7} M de GA, suplementado al medio básico Y3 de Eeuwens (1976). En coco se emplearon explantes de raquilla de inflorescencia. Estos tejidos iniciaron raíces luego de ocho semanas de cultivo. Las primeras dos semanas el medio contenía $2,5 \times 10^{-7}$ M de ANA, más 5×10^{-6} M de BA; luego la auxina fue incrementada a $2,5 \times 10^{-6}$ o $2,5 \times 10^{-5}$ M. El medio básico de Eeuwens (1976), modificado con 0,2M de azúcar, constituyó el sustrato de cultivo. Los explantes procedieron de yemas florales cuyas espátas internas medían entre 2 y 20 cm de longitud (Eeuwens, 1978).

Eeuwens (1976) encontró que el crecimiento de explantes de raquillas de coco fue grandemente influenciado por la composición mineral del medio; tal vez lo más importante fue la fuente y concentración de nitrógeno inorgánico.

Los trabajos de De Guzman y Del Rosario (1979), y Del Rosario y De Guzman (1982) significaron notables esfuerzos hacia la propagación vegetativa del coco mediante inflorescencias. Segmentos de raquilla de 10 mm desarrollaron púas gruesas y pequeñas proyecciones que no mostraron mayor capacidad de organogénesis. Los explantes fueron cultivadas en el medio basal de MS más 2,4-D (0,25 mg/l) y CA (0,02%).

Los logros de Iyer (1982) en su trabajo, también con raquillas de coco, fueron similares a los ya expuestos. La yema correspondiente a la primera hoja abierta después del eje central suministró los explantes más promisorios. Estos consistieron en raquillas de 1 a 1,5 cm, cuyas yemas florales en un 50%

desarrollaron pseudo-brotes vegetativos que no diferenciaron mayormente. En este caso el medio básico fue el Y3 de Eeuwens (1976), el cual fue suplementado con BA (2 mg/l), 2-iP (2 mg/l) y 80 g/l de azúcar.

Branton y Blake (1983) emplearon rodajas de 0,25 mm de espesor de raquillas de coco de 8 a 20 mm de longitud. La reducción de la concentración de 2,4-D en el medio de cultivo a partir de ⁻⁴ 10 M después de varios trasplantes, indujo el desarrollo de estructuras nodulares. Sin embargo, no consiguieron mayor desarrollo de dichos nódulos. Salazar (*) informó que aún en la actualidad no fue lograda la inducción controlada de plantas a partir de tales nódulos.

Los trabajos de Smith (1984) confirmaron el escaso potencial morfogénico de los tejidos florales con posterioridad a la callogénesis. Hasta un 80% de esos explantes produjeron callo, pero sus posibilidades de progreso morfogénico fueron más reducidas que en el caso de explantes de hoja ó raíz.

Gupta (1984) logró enraizamiento y desarrollo limitado de pequeños apéndices semejantes a brotes sobre estructuras globulares a partir de raquillas de coco. El medio de cultivo inductor consistió del medio básico Y3 líquido, suplementado con bajos niveles de 2,4-D (2,3 x 10⁻⁶ M), reducidas concentraciones de BA (4,44 µM), FAP (2,32 µM) y ANA (5,38 µM).

Salazar, S S 1987 Propagación del coco mediante cultivo in vitro de raquillas Turrialba, C R, CATIE (Comunicación personal)

Probablemente debido a una mejor respuesta de los explantes los trabajos con flores aisladas de dátil han sido más intensos, y exitosos, ya que tanto por vía directa como a través de callogenesis fueron logradas plantas completas, aunque no se conocen casos de su aplicación en gran escala

Varios trabajos efectuados por Tisserat (1979a; 1981a; 1982) demostraron que altos niveles de auxina (30 a 100 mg/l de 2,4-D con 0,3% de CA) indujeron usualmente callos friables a partir de raquillas. En algunos casos esos callos diferenciaron raíces y embrioides los cuales dieron origen a plantas completas las que progresaron con éxito al ser trasplantadas. Sin embargo este autor consideró que las regiones meristemáticas de la planta madre tienen tejidos con mayor capacidad para producir callo y plantas completas. Tisserat *et al* (1981) y Tisserat, (1984c) encontraron que cuando se cultivaron yemas florales masculinas de dátil, sus carpelos vestigiales crecieron prominentemente.

La conformación directa de plantas completas a partir de flores de dátil fue obtenida por Drira y Benbadis (1985). Las plantas donantes eran femeninas y tenían 50 años de edad. Las raquillas cultivadas median de 1 a 3 cm de longitud. Se logró hasta un 50% de inversión a brotes vegetativos luego de 9 meses de cultivo. El medio de cultivo empleado estuvo constituido por (mg/l): Sales minerales MS; sacarosa 50 000; i-inositol 100; glicina 2; l-glutamina 100, ácido nicotínico 0,5; piridoxina-HCl 0,5; tiamina-HCl 0,1; KH₂PO₄ 120; adenina 25 y bacto agar (marca Difco) 8 000. La combinación óptima de reguladores fue.

2,4-D 0,5; AIB 0,5 y BA 0,2 mg/l respectivamente

Otro caso exitoso en explantes de inflorescencia fue logrado por Reynolds (1982) con la palmera ornamental Chamaedorea costaricana Oerst. La regeneración de plantas fue conseguida en este caso por dos métodos distintos, a saber: a) A partir de explantes de inflorescencias cultivados con 100 mg/l de 2,4-D, se obtuvieron callos y embriones somáticos. Sub-cultivos de estos tejidos en medio sin 2,4-D estimularon la diferenciación de plantas completas a partir de dichos embrioides. b) También se indujo brotes vegetativos en forma directa, presumiblemente por "inversión" de esos tejidos florales. Tales brotes fueron multiplicados en baja tasa mediante el estímulo del desarrollo de las yemas axilares.

2.2. Morfología del pejibaye

Esta palmera es una especie perenne que presenta las siguientes características:

Estípites. Mide aproximadamente 12 a 20 cm de altura y 10 a 12 cm de diámetro con espinas numerosas coriáceas de 3 a 8 cm de largo. Con mucha frecuencia existen hijuelos basales hasta en número de 10; los nudos son lisos y los entrenudos espinosos presentan coloración ceniza (Prance y Silva, 1975; Fournier, s.f.)

Las yemas axilares, situadas a la altura del rizoma en plantas juveniles, se diferencian en brotes vegetativos para formar la cepa. El número de estas yemas es de aproximadamente 12. En

plantas juveniles, los hijuelos también nacen de varias partes de la cicatriz del pecíolo de las frondas (Mora-Urpi, 1981)

Hojas Compuestas, pinnadas, de arreglo espiralado, cartáceas, venación reduplicada, pecioladas, 2 a 4 m de largo, margen entero, ápice acuminado y base sésil. El pecíolo mide 90 cm de largo y es canaliculado con vaina semiamplexicaule, espinoso también en el raquis y nervaduras secundarias (Prance y Silva, 1975; Fournier, s. f.)

Inflorescencias Panícula de racimos, protegida por una espata de 71 ± 8 cm con diferencias en distribución y tamaño de espigas. El número de espigas por racimo es de 53 ± 11 (Valle, 1986). Pinedo (datos no publicados) observó que la yema de la inflorescencia del peñibaye está protegida por dos espatas. La externa tiene forma triangular y es de crecimiento limitado. La interna alcanza mucho mayor desarrollo y presenta generalmente espigas sobre la superficie exterior. Esta constituye la espata propiamente dicha y es la más notoria desde el exterior.

Flores Las flores estaminadas son numerosas (promedio de 20 000 por inflorescencia; Valverde, 1986). poseen seis estambres dispuestos en pares a los lados de los tres pétalos de la corola. Los estambres aparecen libres o entrelazados y cada uno tiene cuatro sacos polínicos. En las espigas aparecen flores hermafroditas funcionales y además flores masculinas modificadas (intersexuales).

Las flores pistiladas son tricarpelares, sincárpicas, uniloculares y tienen una morfología interesante desde el punto de

vista de la polinización; son sésiles, sin estilo (Mora-Urpi, 1983) El estigma esta formado por la unión incompleta de los ápices de los carpelos Estas características morfológicas del gineceo, más la producción de olor para la atracción de insectos, parece propiciar la polinización entomófila

Frutos Drupa de forma cónica, ovoide o elipsoidal, con mesocarpo carnoso comestible; 2,5 a 4,5 cm de diámetro por 2 a 5 cm de longitud Hay mucha variación del color, puede ser verde amarillento, amarillo claro, anaranjado, marron, rojo o variegado (Prance y Silva, 1975; Fournier, s f) La semilla posee un cotiledón, con albumen oleaginoso, protegido por el endocarpo fibroso (Prance y Silva, 1975)

En la Figura 1 se muestran algunas características de la especie que ilustran la descripción expuesta arriba, especialmente en lo que se refiere a los frutos e hijuelos

2.3 Propagación vegetativa

2.3.1. Aplicación de métodos tradicionales (dátil y pejibaye)

El dátil y el sago son palmeras similares al pejibaye por tener hijuelos basales de difícil aislamiento para su propagación (Eeuwens, 1978; Sharma et al , 1980; Choo, 1984)

Después de 3 a 5 años de crecimiento y adecuado desarrollo radical, los hijuelos del dátil pueden ser trasplantados con éxito (Tisserat, 1979a; Tisserat et al , 1979). Bajo condiciones normales de campo, los hijuelos grandes de dátil enraizan bien

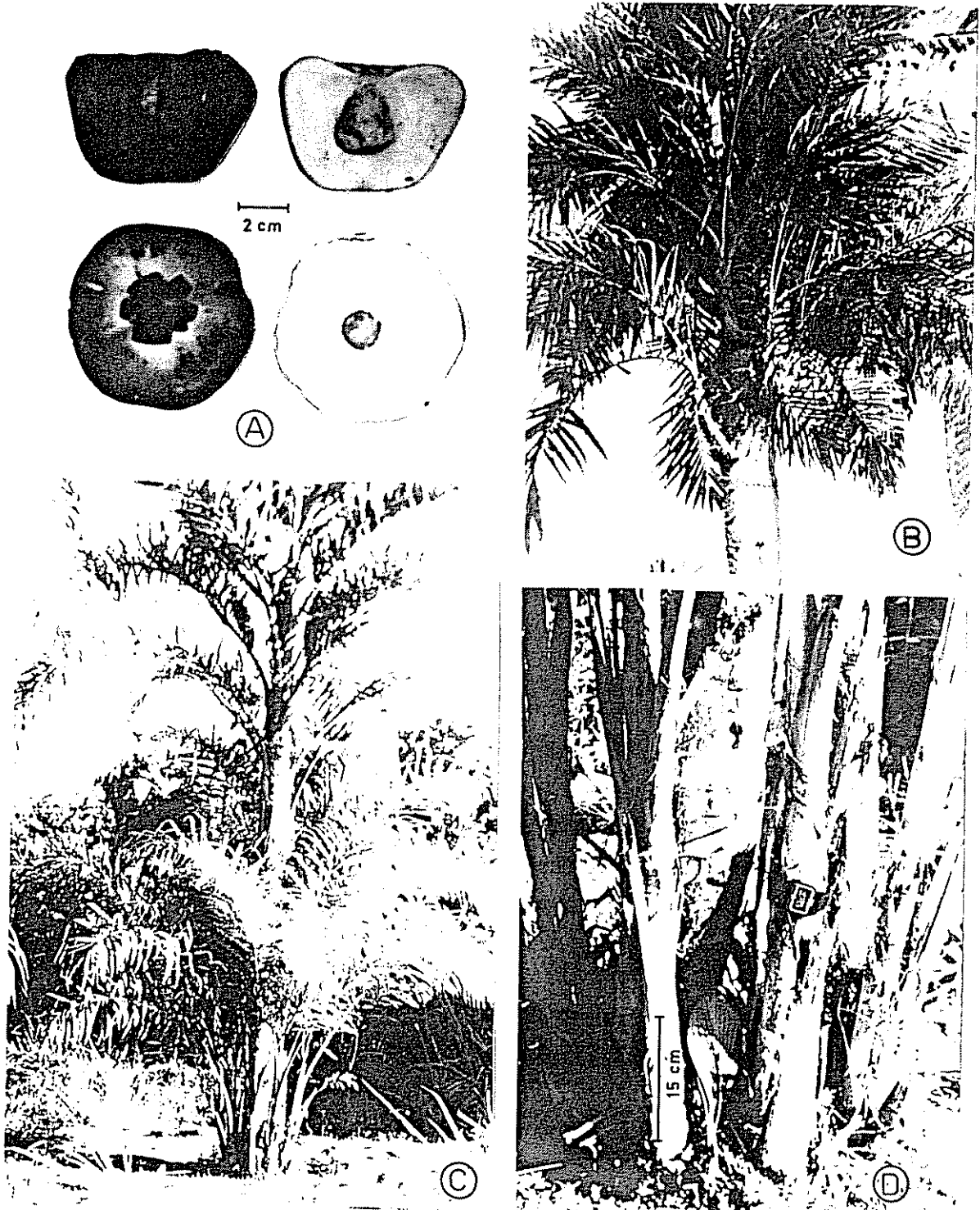


Figura 1 Frutos e hijuelos de pejibaye A Frutos maduros en vista de lado y punto de inserción, con los respectivos cortes (longitudinal y transversal) B Brotes aéreos en vez de inflorescencias debido a una inversión natural C Planta de seis años con hijuelos basales D Hijuelos basales adecuados para extraer explantes

sin suministro exógeno de reguladores (Tisserat, 1983a)

Saaïdi *et al* (1979) encontraron que el factor varietal, modo de plantación, régimen de irrigación tipo y peso de hijuelo (mínimo de siete kg) influenciaron sobre su supervivencia al ser trasplantados

Los hijuelos de pejibaye pueden originarse basalmente (Figuras 1C y 1D) o como caso teratológico por diferenciación de brotes vegetativos en lugar de inflorescencias (Mora-Urpi, 1981) Camacho, E (s f ; dato no publicado) registró un caso de diferenciación de hijuelos aéreos en vez de inflorescencias (Figura 1B) En una plantación de Turrialba, Camacho (1972) determinó que el 89% de las plantas tenían 5 a 12 brotes basales Pinedo (dato no publicado) encontró un promedio de 4,7 hijuelos basales por planta (ámbito de 1,6 - 9) al evaluar 137 introducciones procedentes de Brasil y Colombia. Según Mora-Urpi *et al* (1984) el número de brotes basales depende de la variedad y condiciones de luz

El empleo de hijuelos basales de pejibaye para la propagación clonal data del año 1775 (Patiño, 1960) Popenoe y Jiménez (1921) recomendaron que los hijuelos deben tener 7 cm de diámetro en la base y de 1,3 a 2,0 m de alto para ser removidos exitosamente Esta recomendación tuvo en cuenta el mayor desarrollo radical y la facilidad para su extracción y establecimiento Fournier (s f) recomendó que el grosor de los hijuelos antes de su separación de la planta madre, debe ser de 2,5 a 15 cm Al parecer este método de propagación, según Baracaldo

(1980), es mas frecuente entre las tribus selváticas de la cuenca del Orinoco

La escasa resistencia de los hijuelos aislados a deshidratación o exceso de lluvia contribuye al bajo nivel de supervivencia y, por tanto, su restringida utilidad propagativa (Pérez, 1983; Mora-Urpi et al., 1984) Pérez (1983) sólo obtuvo 3.4% de prendimiento de un total de 480 hijuelos basales trasplantados Mora-Urpi y Tosi (1983) confirmaron que el porcentaje de prendimiento fue menor del 10% y señalaron, además, que las plantas así logradas tienden a producir menos fruta

Gonzales y Dominguez (1977) emplearon hijuelos sin vástago, y hasta con 100 cm de longitud y obtuvieron luego de 45 días de evaluación 23.28% de prendimiento Es importante recalcar que estos hijuelos, al igual que para los casos anteriormente señalados, fueron aislados de plantas adultas

Un máximo de 63.3% de supervivencia a 70 días del trasplante fue obtenido con hijuelos de plantas jóvenes de pejibaye (plantación para palmito) En este caso se observó que el desarrollo radical y la altura de hijuelos fueron las variables de mayor correlación con rizogénesis y supervivencia (PROPAGACION VEGETATIVA del pejibaye, 1986)

Algunos tratamientos fueron probados para la inducción in vivo de brotes basales de pejibaye Aunque las respuestas fueron variables, la eliminación del meristema caulinar y la aplicación de flurenol (morfactina) estimularon la formación de los brotes en plantas juveniles (Arias, 1979; Blaak, 1980)

2.3.2. Cultivo de tejidos de pejibaye

Huete y Arias (1981) publicaron las primeras experiencias sobre cultivo de tejidos en pejibaye, las cuales fueron iniciadas en la segunda mitad de 1977. Ellos mencionaron el alto grado de oxidación en secciones de hojas inmaduras, lo cual no fue superado con el uso de ácido ascórbico. Por otro lado, las frecuentes contaminaciones en explantes de raíces fueron serios limitantes para su cultivo in vitro.

A partir de callos organogénicos de ápices caulinares se logró diferenciar plantas completas (Arias y Huete, 1983). Los ápices fueron excisados de plantas de 4 a 6 meses de edad. Su desinfección consistió en enjuague con agua destilada, remojo en alcohol 70 % durante un minuto, luego en NaOCl (2,5 %) más Tween 80 durante 15 minutos. Los niveles de contaminación de los explantes no fueron informados en este estudio. El medio de cultivo empleado contenía las sales minerales de MS sin agar. La formación de callo fue favorecida por 20 a 50 mg de 2,4-D, lo cual ocurrió en 2 a 4 meses de cultivo. Luego de dos meses iniciales se transfirieron los explantes a medio con agar y sin reguladores. En algunos cultivos se observaron (previa callogénesis) embrioides, que al cabo de 5 meses de desarrollo generaron varios brotes apicales con un sistema radical.

Se observó el crecimiento de ápices y conformación de plantas completas en 5-6 meses. El porcentaje de diferenciación de plantas a partir de callos en los cultivos fluctuó entre 10 y 35. El número de plantas obtenidas a partir de un callo fue de

3 a 5 (Arias y Huete, 1983)

Arias (1985) recomendó el uso de 30 mg/l de 2,4-D y 5 mg/l de BA en combinación, en oscuridad, para desarrollar callos en ápices caulinares de pejibaye. El 83% de estos explantes no presentaron oxidación cuando se usó 400 mg/l de caseína hidrolizada. El cultivo de segmentos de hoja joven, flores masculinas y femeninas y raquillas no mostró respuesta y solo los ápices radicales crecieron. En cambio, los embriones inmaduros produjeron callo y los embriones maduros y ápices meristemáticos, además de formar callo, regeneraron plantas. Las plantas enraizaron en un medio nutritivo sin reguladores de crecimiento y fueron mantenidas in vitro hasta tener 10-15 cm de longitud. Sin embargo, estas plantas murieron al ser trasplantadas a suelo estéril o no estéril. El método de desinfección de los ápices fue indicado anteriormente (Arias y Huete, 1983), excepto que esta vez se hizo un remojo adicional con una solución de Agrimicin 500 (500 mg/l) más Benlate (2g/l). La mezcla fue hecha en la proporción 1:1 y el remojo efectuado durante 15 minutos previo al enjuague con alcohol. No se reportó el porcentaje de contaminación.

El efecto positivo de la caseína hidrolizada y NH_4Cl con KNO_3 en el medio fue publicado por Chaverri (1984). Tal efecto consistió en menor oxidación y mayor formación de callo, organogénesis y embriogénesis. La embriogénesis, según este estudio, puede ser estimulada con caseína hidrolizada (100 a 800 mg/l). Esto también depende de otros factores del medio y del explante. La autora identificó varios contaminantes en los

cultivos Los hongos más frecuentes fueron: Aspergillus sp y Saccharomyces sp, los cuales se encuentran comunmente en el ambiente de un laboratorio Las bacterias identificadas fueron: Pseudomas sp, Proteus sp, Enterobacter sp, y Klebscilla sp. Estos organismos se encuentran asociados con la planta de pejibaye

Varios trabajos sobre cultivo de tejidos de pejibaye fueron publicados recientemente, la mayoría de ellos en búsqueda de embriogénesis somática via callosidades

Valverde y Arias (1986a) demostraron que la ausencia de luz favoreció callogénesis y morfogénesis en ápices caulinares de 5 mm de longitud Los mismos autores observaron la mayor estimulación morfogénica por Piclorán (0.06 mg/l), más BA (5mg/l) A 6 meses de cultivo en oscuridad, el 68% de los explantes formaron callo De estos callos el 39% mostraron organogénesis y el 11% produjeron embrioides (Valverde y Arias, 1986b)

En un trabajo con embriones maduros de pejibaye, Villalobos y Arias (1986) mostraron el desarrollo de callo friable y probables embrioides directos En todos los casos se observó un desarrollo prolífico de raíces y una aparente inhibición de la parte aérea Una dosis de 2,5 mg/l de 2,4-D favoreció la formación de callo El ANA (3mg/l), también indujo formación de callo, pero además raíces, sobre las cuales se desarrollaron yemas vegetativas El Piclorán (0,04 mg/l) desarrolló callos de dos tipos; un tipo friable, cremoso y otro compacto y traslúcido En estos callos se observó formación de primordios

Pasberg-Gauhl (1986) observó un alto nivel de contaminación (86,6 %) cuando cultivó 304 ápices de plantas jóvenes de peji-baye provenientes de semilla sexual. El nivel de contaminación se redujo a menos del 5 % cuando se usó ápices de hijuelos basales (palmitos), además de doble desinfección de los tejidos durante la excisión de los explantes. Los ápices de hijuelos basales no mostraron formación de callo ni raíces luego de 6 meses de cultivo, a pesar del uso de BA y ANA (0 a 100 mg/l) en combinación con BA (0 a 100 mg/l). A los 4 meses de cultivo los ápices medían entre 5 y 15 mm, lo que evidenció su lento crecimiento. Además, no se observaron tendencias claras en el crecimiento y otras características de los ápices cultivados.

Los ápices provenientes de plantas propagadas por semilla sexual y empleados en un primer ensayo mostraron mayor capacidad de crecimiento y diferenciación del área foliar; esto en comparación con los ápices aislados de hijuelos basales (Pasberg-Gauhl, 1986).

Salazar (1986) observó un notable crecimiento de ápices caulinares extraídos de hijuelos basales y probables embrioides y brotes axilares. Estudios histológicos mostraron la presencia de yemas axilares, posiblemente estimulados por el 2,4-D (0,3 mg/l) en ausencia de CA. El autor encontró que la mejor respuesta en crecimiento y organización de los tejidos se logró con niveles altos de 2,4-D, 30 mg/l en presencia de luz y 100 mg/l en la oscuridad y CA como adsorbente. Las respuestas fueron similares en explantes cultivados en medios con y sin CA, pero en el segundo caso fue necesario un nivel de 2,4-D 100

veces mayor para compensar la adsorción por el CA El nivel de contaminación en este caso fue 12,5%

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización del estudio

El trabajo fue realizado en los laboratorios de cultivo de tejidos del CATIE, (Turrialba ; Costa Rica), desde diciembre de 1985 hasta marzo de 1987

3.2 Material vegetal

El banco de germoplasma ex-situ de la Unidad de Recursos Fito-genéticos del CATIE sirvió como fuente de casi todo el material empleado. Cada introducción está constituida por una hilera de cuatro a siete plantas procedentes generativamente de una sola planta madre.

En la Figura 2 se muestran las características del material empleado como fuente de los explantes. El tamaño o estado fenológico de los hijuelos empleados fue variable y el criterio de selección fue ajustado a los objetivos experimentales específicos. Se emplearon hijuelos de aproximadamente 40 a 150 cm de altura. Esta fue medida desde la superficie del suelo hasta el vértice formado por el eje central y el pecíolo de la primera hoja extendida.

Para los experimentos de cultivo de flores se emplearon plantas adultas. Estas plantas fueron aisladas de cepas de 18 años de edad pertenecientes a las introducciones procedentes de Costa Rica del Banco de Germoplasma. Se extrajeron yemas florales pre-emergentes, cuyas espatas externas tenían entre 8 y 20 cm de

longitud

3.3. Desinfección de los explantes. A continuación se explican las metodologías practicadas en la desinfección superficial de los ápices caulinares y explantes florales

3.3.1. Apices caulinares

La alta contaminación de los ápices caulinares establecidos in vitro fue un factor limitante para el desarrollo del presente estudio. Por eso se consideró que una investigación respecto a este factor sería un pre-requisito indispensable para iniciar el experimento principal con ápices caulinares (Experimento 2). Como producto de esta investigación previa se determinó una técnica para desinfección superficial de ápices caulinares de hijuelos de pejibaye. La obtención de explantes a partir de los hijuelos y la mencionada desinfección se lograron mediante las siguientes etapas:

Excisión del material. Se efectuó en el campo al tiempo de separar los hijuelos desde la planta madre, para esto se emplearon lampa, machete y guantes de cuero. Se eliminó el tejido foliar verde, raíces y parte del tejido sub-apical hasta obtener el material que se muestra en la Figura 2A.

Preparación del material. Se efectuó en las instalaciones auxiliares del vivero (Cabiria-CATIE) con disponibilidad de agua limpia. Previo lavado del material se continuó la remoción de tejidos hasta unos 7 cm de longitud, incluyendo tanto tejido foliar como sub-apical. Su diámetro (3-7 cm) dependió de las

dimensiones iniciales del hijuelo. Un cuchillo afilado fue adecuado para esta operación.

Preparación preliminar de los explantes Esta fase fue llevada a cabo en el laboratorio, en parte bajo condiciones no estériles. Previo lavado intenso con agua potable se cortaron los tejidos hasta obtener un bloque de 25 mm de longitud con base cuadrada de unos 10 mm de lado (Figura 2D). La mitad de su longitud, al igual que en la etapa anterior, correspondió al tejido sub-apical. Este bloque, con el meristema apical en el centro, fue desinfectado mediante agitación durante 15 minutos en una solución de NaOCl (3%). Como humectante se agregó Tween 80 (una gota por cada 100 cc de solución). Bajo flujo de aire estéril se sustituyó la solución desinfectante por agua bi-destilada estéril, con tres cambios consecutivos. El explante fue luego almacenado en refrigeradora (10° C) durante 20 horas.

Preparación final del explante e inoculación Se efectuó bajo condiciones asépticas mediante pinzas y escalpelos. La eliminación de los tejidos supérfluos continuó hasta obtener un ápice de 5 a 7 mm de longitud. Esta dimensión incluía 2 mm de tejido sub-apical, con base cuadrada de 3mm de cada lado. Así el explante definitivo estuvo integrado por el meristema apical, de 4 a 5 primordios foliares y 2mm de tejido sub-apical (Figura 2E). Luego fue desinfectado otra vez en una solución de NaOCl (0,2%) mediante inmersión durante 3 segundos. Por último se efectuó una inmersión del explante por 10 seg en agua bi-destilada estéril. Inmediatamente después el explante fue colocado en el medio de cultivo.

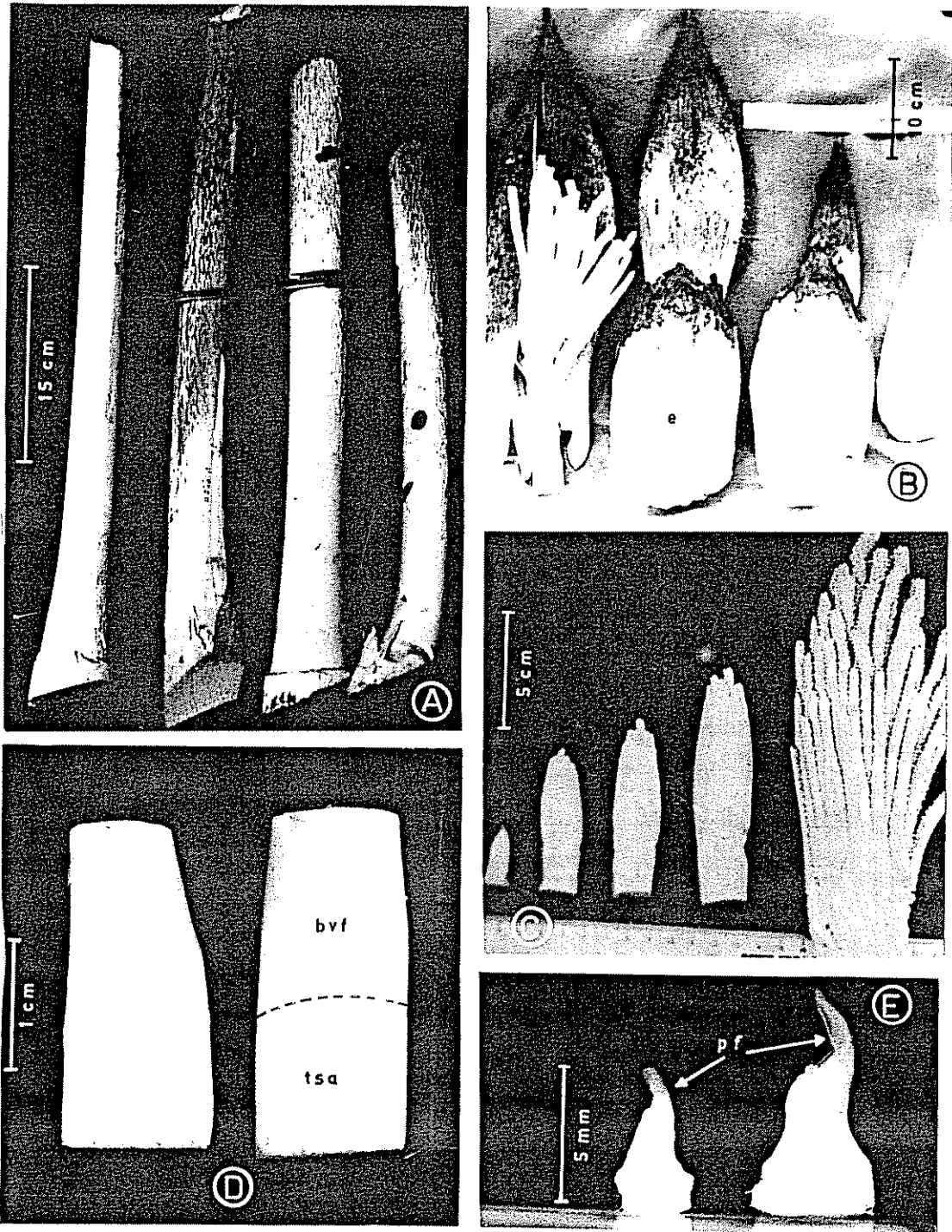


Figura 2 Material empleado como fuente de explantes A Explantes iniciales después de eliminar las hojas externas y ápices foliares restantes como también la parte subapical del tallo ("palmito") B Inflorescencias jóvenes mostrando las espigas con las espatas externa (e) e interna (e) C Inflorescencias en distintos estados de desarrollo D Explantes primarios bases de vainas foliares (bvf) y tejido subapical (tsa) E Apices caulinares con primordios foliares (pf) listos para la inoculación

3.3.2. Espigas

Las yemas florales fueron extraídas por remoción acrópeta de los tejidos foliares en la inflorescencia. Para su obtención fue necesario cortar tallos adultos de aproximadamente 10 m de altura. De estos tallos se extrajeron las inflorescencias juveniles, con el cuidado de mantener intactas las dos espatas. Luego se procedió a desinfectarlas. Para ello se agitó el material en una solución de NaOCl (0,5%) durante 15 minutos. Bajo flujo de aire estéril se removieron las espatas (Figura 2B) mediante pinzas y escalpelos de varios tamaños de acuerdo a las dimensiones del material disectado. Las inflorescencias inmaduras quedaron así al descubierto y listas para ser fraccionadas (Figura 2C). Las espigas fueron luego removidas con escalpelo e inoculadas al medio de cultivo.

3.4. Explantes y medios de cultivo por experimento

La composición de los medios nutritivos basales empleados fue:

Medio MS

Sales minerales según Murashige y Skoog, 1962

Macroelementos		Microelementos	
Componente	mg/l	Componente	mg/l
NH ₄ NO ₃	1 650	H ₂ BO ₃	6,2
KNO ₃	1 900	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8,6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	KI	0,83
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
Na ₂ -EDTA	37,3	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025

Medio Y3

Sales minerales según Eeuwens, 1976

Macroelementos		Microelementos	
Componente	mg/l	Componente	mg/l
KNO ₃	2020	Fe-EDTA	32,5
KCl	1492	MnSO ₄ · 2H ₂ O	11,2
NH ₄ Cl	535	KI	8,3
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	312	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	7,2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	294	H ₃ BO ₃	3,1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	247	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,24
		Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,24
		CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,16
		NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,024

Para el ajuste del pH y la esterilización por autoclave se adoptaron metodologías comunes

Después de incluir todos los componentes del medio (incluso gelificante y carbón) y luego de leve calentamiento ($\pm 50^{\circ}\text{C}$) se ajustó el pH a 5,7. Los medios de cultivo, ya dispensados en los tubos, fueron autoclavados durante 15 minutos a 121°C ($1,1\text{ kg/cm}^2$ de presión)

Experimento 1a Los ápices caulinares de 5-7 mm (Figura 2E) fueron extraídos de plantas e hijuelos basales; las plantas tenían una altura de vástago de 30 cm y procedieron de semilla sexual. Los hijuelos basales pequeños tenían de 40 a 80 cm de altura y los grandes de 1,5 a 3,0 m. El medio de cultivo estuvo constituido (en mg/l) por: Sales minerales de MS al 50 %; i-inositol 50; tiamina-HCl 0,25; piridoxina-HCl 0,25; ácido nico-

tfnico 0,25, glutamina 200; azúcar 15.000 y bacto-agar(marca Difco) 7.000. Se emplearon alícuotas de 5 ml del medio de cultivo en tubos de vidrio de 20 x 85 mm con tapas de rosca plásticas. Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad.

Experimento 1b. Las mismas características que para el experimento 1a, excepto que los hijuelos donantes tenían entre 50 y 200 cm de altura de vástago.

Experimento 2. Se emplearon las introducciones 12515, 11327, 11719, 11736, 12232, 12508, 9660, 9672, 9740, 13177 y 9710, las cuales tenían más de 5 hijuelos/planta en promedio. Este material forma parte de la colección del CATIE y proceden de Brasil, Colombia y Costa Rica. Al momento de extraer los hijuelos las plantas madres tenían alrededor de seis años de edad. La pérdida de ápices caulinares establecidos a causa de severas oxidaciones motivó la inclusión de ápices adicionales. Estos, a diferencia de los demás, fueron extraídos de una plantación comercial dedicada a la explotación de palmito (Asociación Bananera Nacional, Guápiles). En este caso los hijuelos midieron entre 70 y 150 cm de altura de vástago. En general los hijuelos fueron extraídos durante el mes de febrero de 1986.

Para la fase de establecimiento el medio de cultivo tenía la siguiente constitución (mg/l): Sales minerales MS, i-inositol 100; tiamina-HCl 0,4; sacarosa 30.000, CA neutralizado (marca Sigma) 3.000; bacto-agar (marca Difco) 8.000 y ANA 10. Se emplearon alícuotas de 7 ml en tubos de vidrio de 25 x 95 mm con tapas de plástico con rosca. Los cultivos fueron mantenidos

en presencia de luz (ver condiciones de la cámara de crecimiento; página 47).

Fase de inducción-a. Únicamente las introducciones que presentaron nivel de oxidación menor de 25 % (Cuadro 2, p. 54) pudieron ser empleados en esta fase. El medio estuvo constituido por (mg/l): Sales minerales M5 (concentración normal); i-inositol 100; tiamina HCl 0,4; sacarosa 30 000, Gelrite-TM (marca Kelco) 1.000; ANA 0,1 y BA 0,7, 14 y 21.

Fase de inducción-b. El medio estuvo constituido en mg/l por: Sales minerales M5 (concentración normal); i-inositol 100; tiamina-HCl 0,4; sacarosa 30 000; Gelrite 1 200; ANA 3 y BA 0,7, 14 y 21.

Tanto en la fase de inducción a, como b, se emplearon alícuotas de 15 ml de medio de cultivo en tubos de vidrio de 25 x 150 mm con tapas de plástico a presión. Los cultivos fueron mantenidos en presencia de luz.

Experimento 3a. Se emplearon yemas florales de inflorescencias cuyas longitudes de espigas externas variaron de 7 a 10 cm. Las espigas midieron 2 a 2,5, 3 a 4 y 4 a 5 mm de longitud, de acuerdo con el tratamiento. El medio de cultivo era el siguiente (mg/l): Sales minerales Y3; glutamina 100; arginina 100; asparagina 88; i-inositol 100, tiamina-HCl 1; piridoxina-HCl 1; ácido nicotínico 1; hidrolisato de caseína 400; sacarosa 50.000; CA neutralizado (marca Sigma) 3 000; bacto-agar (Difco), 8 000 (donde fue aplicable); BA 1 y GA 0,1. El ácido giberélico fue esterilizado con filtro Sartorius, Mini-sart

NML-SM-16534, 0,2 μ M Se emplearon alícuotas de 8 ml de medio de cultivo en tubos de vidrio de 25 x 57 mm con tapas de plástico con rosca Cuando el medio fue líquido se empleó puente de papel filtro Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad o bajo luz, según el tratamiento

Experimento 3b. Se emplearon espigas de 5 mm procedentes de una yema floral cuya espata externa medía 8 cm El medio de cultivo estuvo constituido (en mg/l) por: Medio basal MS ó Y3 de acuerdo con el tratamiento; caseína hidrolisada 400 (donde fue aplicable) ;sacarosa 50 000; CA neutralizado(marca Sigma) 1 000, 2 000 ó 3 000 (donde fue aplicable) y bacto-agar (marca Difco) 8.000 (donde fue aplicable) Se emplearon alícuotas de 8 ml de medio de cultivo en tubos de vidrio de 25 x 57 mm con tapa de plástico con rosca Cuando el medio fue líquido se empleó puente de papel filtro Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad

Experimento 4a. Se sembraron yemas florales masculinas individuales. Estas fueron aisladas de espigas previamente cultivadas durante 6 semanas en medio sin hormona Al momento del subcultivo de los primordios florales, estos midieron alrededor de 1 mm de diámetro. El medio de cultivo tenía la siguiente composición (mg/l): Sales minerales MS ,i-inositol 100, glicina 2; glutamina 100; ácido nicotínico 0,5; piridoxina-HCl 0,5; tiamina-HCl 0,1; KH_2PO_4 120; adenina 25; cisteína-HCl; sacarosa 50.000; Gelrite 1.200; BA 0, 0,2 ó 0,4; AIB 0, 0,5 ó 1,0 y 2,4-D 0 ó 0,5. Se emplearon alícuotas de 8 ml de medio de cultivo en tubos de vidrio de 25 x 57 mm provistos de tapas de plástico

con rosca Los cultivos fueron mantenidos bajo luz.

Experimento 4b Se sembraron secciones distales de 3 mm procedentes de raquillas de 7 a 10 mm de longitud El medio de cultivo contenía lo siguiente (mg/l): Medio basal Y3 ;sacarosa 50 000; CA neutralizado (marca Sigma) 3 000; Gelrite 1.200; BA 0 ó 4; ANA 0 ó 3 y 2,4-D 0, 5, 10, 15 ó 20. Se emplearon alícuotas de medio de cultivo de 8 ml en tubos de vidrio de 2,5 x 57 mm con tapas de plástico con rosca Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad

Experimento 4c El explante y las condiciones fueron las mismas que en el Experimento 4b, excepto para los niveles de 2,4-D, que en este caso fueron de 0, 20, 40, 60 ,80 y 100 mg/l

3.5. Características de los factores en estudio, diseños experimentales y variables evaluadas

Experimento 1a Con el fin de determinar una metodología para la desinfección superficial de los ápices se ensayaron los siguientes factores:

Factor A : Desinfectante

	Solución	Producto comercial
a1 :	NaOCl, 0,5 %	(Saniclor 5,25% de NaOCl)
a2 :	Ca(OCl) ₂ , 1,0 %	(HTH 65% Ca(OCl) ₂)
a3 :	1,54% de Savloñ (1)	

 (1): Savlon Marca Registrada de la ICI (Imperial Chemical Industries Ltd Macclesfield, Inglaterra) para un desinfectante cuyos ingredientes activos son gluconato de clorohexidina (1 %) y cetrimida (15%)

Factor B : Estado de desarrollo del hijuelo

- b1 : Planta proveniente de semilla (aproximadamente 30 cm de longitud del vástago)
- b2 : Hijuelo basal de planta adulta que aún no tenía tallo muy lignificado (40 a 80cm de altura)
- b3 : Hijuelo basal de planta adulta con tallo muy lignificado (150 a 300 cm de altura)

- Unidad experimental: Grupo de 5 a 10 ápices, cada uno contenido en un tubo de ensayo
- Número de repeticiones: 4
- Diseño experimental: Completamente aleatorizado (factorial 3 x 3)
- Variables a evaluar: Porcentaje de contaminación por hongos y/o bacterias.

Experimento 1b En base a los resultados del experimento 1a se ensayaron en el presente experimento los siguientes factores:

Factor A : Concentraciones de NaOCl

- a1 : 1%
- a2 : 2%
- a3 : 3%

Factor B : Tamaño del explante (ápice)

- b1 : 1 mm de tejido sub-apical
- b2 : 3 mm de tejido sub-apical
- b3 : 1 mm de tejido sub-apical y redesinfección con 0,2% de NaOCl

- Unidad experimental: grupo de 5 a 7 ápices; cada ápice estuvo contenido en un tubo de ensayo
- Número de repeticiones: 4

-Diseño experimental: Completamente aleatorizado (factorial 3 x 3)

-Variables a evaluar: Porcentaje de contaminación por hongos y/o bacterios.

Experimento 2 Con el fin de inducir brotes vegetativos se ensayaron los siguientes tratamientos:

Tratamientos (fase inductiva b)

T1 : 3 mg/l de ANA

T2 : 3 mg/l de ANA más 7 mg/l de BA

T3 : 3 mg/l de ANA más 14 mg/l de BA

T4 : 3 mg/l de ANA más 21 mg/l de BA

-Unidad experimental: Un ápice contenido en un tubo de ensayo

-Número de repeticiones : 11

-Diseño experimental: Bloque completo aleatorizado Los cuatro ápices de un bloque pertenecieron a una introducción, la cual estuvo constituida por cuatro a siete plantas provenientes de una sola planta madre mediante propagación sexual. En un bloque fueron incluidos ápices que al final de la fase de establecimiento mostraron altura similar.

-Variables a evaluar: Altura del ápice, número de protuberancias por ápice, número de brotes axilares o adventicios por ápice, longitud de raíces por ápice, contaminación y oxidación.

Experimento 3a. Para determinar una metodología para el establecimiento de las espigas se ensayaron los siguientes factores:

Factor a : Estado de desarrollo de las espigas

	Longitud	Peşo aproximado
a1:	2 a 2,5 mm	(0,4 mg)
a2:	3 a 4 mm	(1 mg)
a3:	4,5 a 5 mm	(2 mg)

Factor b Consistencia del medio

b1	gelificado
b2	líquido

Factor c : Luz

c1	oscuridad
c2	luz (3 300 lux)

-Unidad experimental: Tres espigas contenidas en un tubo de ensayo

-Número de repeticiones: 4

-Diseño experimental Completamente aleatorizado (factorial 3 x 2 x 2) Las espigas procedentes de tres inflorescencias en estado de desarrollo semejante fueron distribuidas aleatoriamente en las unidades experimentales. Las plantas donantes pertenecían a una sola introducción.

-Variables a evaluar: Nivel de oxidación de las espigas

0 =	0% de oxidación
1 =	25% de oxidación
2 =	50% de oxidación
3 =	75% de oxidación
4 =	100% de oxidación

-Peso de las espigas (mg) luego de dos meses de cultivo

Experimento 3b Como fase complementaria al Experimento 3a, se ensayaron los siguientes tratamientos:

T1 : MS, líquido, con caseína

T2 : Y3, líquido, con caseína

T3 : Y3, líquido, sin caseína

T4 : MS, gelificado, 1g/l de CA

T5 : MS, gelificado, 2g/l de CA

T6 : MS, gelificado, 3g/l de CA

-Unidad experimental: Dos ó tres espigas contenidas en un tubo de ensayo

-Número de repeticiones 4

-Diseño experimental: Completamente aleatorizado Las espigas procedentes de una inflorescencia fueron distribuidas aleatoriamente en las unidades experimentales

-Variables a evaluar: Igual que para el Experimento 3a

Experimento 4a Con el fin de inducir brotes vegetativos en flores masculinas se estudiaron los siguientes factores

Factor A : Niveles de BA

a1 : 0 mg/l

a2 : 0,2 mg/l

a3 : 0,4 mg/l

Factor B Niveles de AIB

b1 : 0 mg/l

b2 : 0,5 mg/l

b3 : 1,0 mg/l

Factor C : Niveles de 2,4-D

c1 : 0 mg/l

c2 : 0,5 mg/l

-Unidad experimental: Una flor masculina; un tubo contenía tres flores

-Número de repeticiones: 20

-Diseño experimental: Completamente aleatorizado, factorial de 3 x 3 x 2.

-Variables a evaluar: Número de flores oxidadas y peso de flores (mg) luego de dos meses de cultivo

Experimento 4b En base a los antecedentes en otras palmeras, para inducir brotes vegetativos en flores, se ensayaron los siguientes tratamientos

	BA (mg/l)	ANA (mg/l)	2,4-D (mg/l)
T1	0	0	0
T2	4	3	0
T3	4	3	5
T4	4	3	10
T5	4	3	15
T6	4	3	20

-Unidad experimental Una sección terminal de una espiga contenida en un tubo se ensayo

-Número de repeticiones: 5 a 7

-Diseño experimental: Completamente aleatorizado; las espigas de una inflorescencia fueron distribuidas aleatoriamente en las unidades experimentales

-Variables a evaluar: Peso final de los explantes (mg), número de explantes oxidados, longitud de los explantes y morfogénesis luego de cuatro semanas de cultivo

Experimento 4c Con base en los resultados del Experimento 4b se estudiaron los siguientes tratamientos con el fin de inducir brotes vegetativos en espigas

Tratamientos:

	BA (mg/l)	ANA (mg/l)	2,4-D (mg/l)
T1	0	0	0
T2	4	3	0
T3	4	3	20
T4	4	3	40
T5	4	3	60
T6	4	3	80
T7	4	3	100

-Unidad experimental Una sección terminal de una espiga contenida en un tubo de ensayo.

-Número de repeticiones. 6 a 7

-Diseño experimental: Completamente aleatorizado; las secciones terminales de las espigas de una sola inflorescencia fueron distribuidas aleatoriamente en las unidades experimentales

-Variables a evaluar Las mismas que en el Experimento 4b; en este caso se evaluó luego de dos meses de cultivo

3.6. Condiciones ambientales de la cámara de crecimiento.

Después de colocar los explantes en los tubos de ensayo fueron

trasladados al cuarto de crecimiento en el cual existían las siguientes condiciones ambientales:

Temperatura : $24^{\circ} \text{C} \pm 3$

Intensidad de luz 3 300 lux a nivel del estante, proporcionada por lámparas fluorescentes de 40 w tipo luz de día

Fotoperíodo: 16 h día / 8 noche

3.7. Estudios histológicos

La preparación de los tejidos se efectuó principalmente en base a la metodología propuesta por Sass (1958), la que consistió de las siguientes etapas

Fijación Se usó la mezcla (FAA): Etanol absoluto, 90 ml, ácido acético glacial, 5 ml y formaldehído, 5ml. Los tejidos permanecieron sumergidos en esta mezcla durante 22 h

Deshidratación Se empleó la siguiente serie de soluciones:

Cuadro 1 Soluciones empleadas para deshidratar los tejidos durante el estudio histológico (concentraciones para 100 ml de cada solución)

Solución	Etanol 95%	Etanol absoluto	Butanol terciario	Agua
1	50		10	40
2	50		20	30
3	50		35	15
4	50		50	
5		25	75	

Los tejidos fueron sumergidos durante tres horas en cada solución y transferidos progresivamente de la solución 1 a 5.

Infiltración. Se empleó parafina histológica, sirviendo una mezcla de butanol terciario (75%) más cloroformo (25%) como solvente para la infiltración inicial

Seccionamiento. Se empleó un micrótopo rotatorio provisto de hoja de afeitar. Los cortes tenían 20 μ de espesor

Coloración. Se empleó la combinación safranina-fast green

3.8. Trasplante

Las plántulas obtenidas a partir de ápices caulinares primeramente fueron lavadas con agua para remover el medio adherido a ellas. Inmediatamente después fueron trasplantadas a suelo estéril contenido en macetas plásticas pequeñas. El suelo consistió en una mezcla de 70% de materia orgánica descompuesta, más 30% de suelo arenoso. La esterilización se realizó a 180^o C durante 15 horas. Las plantas fueron extraídas de los tubos de ensayo y establecidas inmediatamente en las macetas. En el invernadero se suministró riego por aspersion durante 10 segundos cada 30 minutos por espacio de 15 días; en lo sucesivo el riego fue reducido a cinco segundos cada hora

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Apices caulinares. A continuación se presentarán los resultados referentes a las prácticas de desinfección ensayadas, así como a los procesos de inducción de brotes laterales en ápices caulinares

4.1.1. Desinfección Se efectuaron dos experimentos secuenciales (1a y 1b) para determinar una metodología de desinfección superficial de los ápices

Experimento 1a El tamaño de los hijuelos tuvo influencia directa en el porcentaje de contaminación de los ápices (Cuadro 1A) Mientras que los ápices de hijuelos grandes (150 a 300 cm de altura) presentaron 41 % de contaminación, aquellos provenientes de plantas propagadas por semilla se contaminaron en un 94 % (Figura 3 y Cuadro 2A) En explantes similares Pasberg-Gauhl(1986) observó 87 % de contaminación La contaminación de los ápices de hijuelos grandes fue significativamente menor en comparación con los demás (Prueba de Duncan, Cuadro 2A), lo cual es explicable por la mayor protección de sus tejidos

El compuesto desinfectante no ejerció diferencias importantes sobre la contaminación ni se detectó interacción significativa entre tamaño de hijuelo y tipo de desinfectante mediante el análisis de varianza (Cuadro 1A)

La relación inversa entre tamaño de hijuelo y contaminación por bacterias de los ápices in vitro sugiere dos explicaciones:

a Que los bacterios estén presentes en los explantes antes de su aislamiento (endófitos), posiblemente con mayor frecuencia en ápices provenientes de vástagos más cortos, en razón de su proximidad al suelo. A este respecto Staritzky (1970) sugirió que células de levaduras y bacterios podrían penetrar a través de los amplios vasos del metaxilema. b Que al efectuar los cortes de los tejidos se favorezca la introducción de los microorganismos. Esto ocurre con mayor facilidad en los vástagos más pequeños. Es posible que también ambas formas de contaminación ocurran con algún grado de simultaneidad.

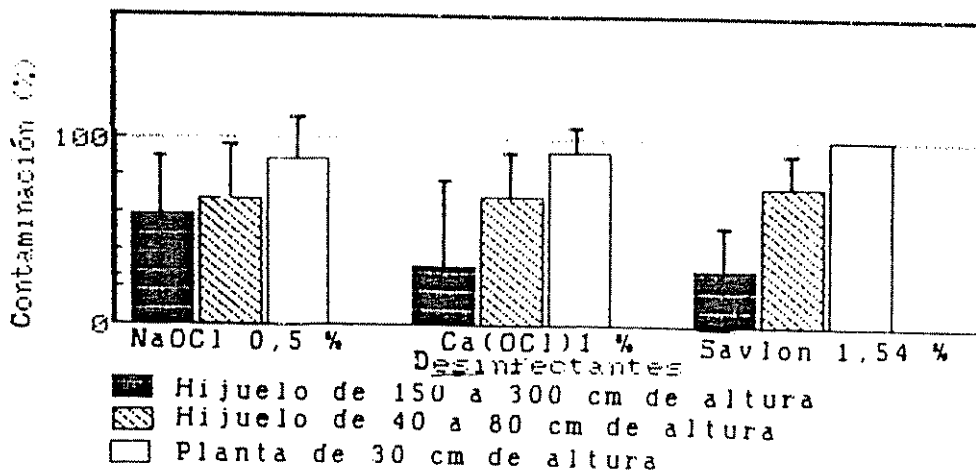


Figura 3 Porcentaje de contaminación de ápices después de un mes de cultivo en relación a diferentes tipos de desinfectantes (Experimento 1a) (CV=47,09 %)

El nivel de contaminación de ápices de hijuelos pequeños en este experimento fue relativamente alto (71 %, Cuadro 2). Dada la necesidad de emplear este tipo de hijuelos como fuente de explantes para el Experimento 2, se ensayaron nuevos métodos de desinfección mediante el Experimento 1b.

Experimento 1b Aunque a mayor concentración de NaOCl el porcentaje de contaminación tendió a disminuir, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre concentraciones (Cuadro 1A) En cambio la media correspondiente al tratamiento con doble desinfección del tejido sub-apical resultó significativamente diferente a los demás tratamientos, tal como lo demostró la prueba de Duncan (Cuadro 2A)

Las respuestas observadas evidencian la importancia del tamaño del tejido sub-apical del explante sobre su contaminación in vitro Esto pudiera implicar que los bacterios se alojan en él antes o durante su aislamiento La interacción entre las concentraciones de NaOCl y tamaños de tejido sub-apical (Cuadro 1A) confirma tal tendencia, ya que la efectividad del desinfectante dependió en parte del tamaño del tejido sub-apical Esta interacción se aprecia también en la Figura 4 por la diferencia de tendencias observadas entre explantes con 3 mm y 1 mm de tejido sub-apical

Fue muy clara la efectividad de la doble desinfección del explante, inmediatamente antes de su inoculación al medio de cultivo Esta efectividad fue excelente cuando la doble desinfección se combinó con el uso de 3 % de NaOCl (Figura 4) Es así que el tratamiento correspondiente a 1 mm de tejido sub-apical y doble desinfección del explante con NaOCl (3 y 0,2 % respectivamente), fue adecuado para lograr explantes axénicos Este método fue probado en el experimento de inducción de brotes en el cual se observó como resultado un 2,7 % de contaminación después de cuatro semanas de cultivo La doble desin-

fección del explante (ya listo para su inoculación), con remojo de NaOCl en bajas concentraciones, fue practicado también en otras palmeras con resultados satisfactorios (Tisserat, 1979; Blake y Eeuwens, 1982; Gupta, 1984) La probada efectividad de la doble desinfección es atribuible a la eliminación de los bacterios que hayan logrado penetrar hasta el explante

Durante la ejecución de los experimentos precedentes se ha tenido en cuenta ciertos factores en el manejo del material los cuales pudieran ser determinantes en la asépcia de los explantes; estos fueron:

a Evitar en lo posible el contacto de los hijuelos excisados con suelo

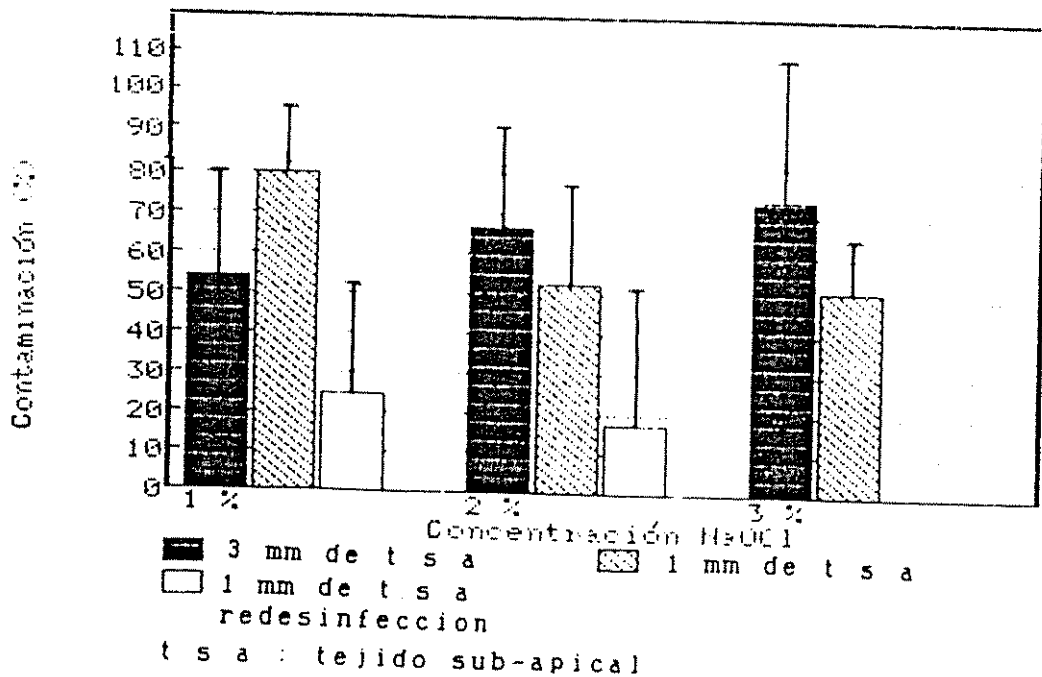


Figura 4 Porcentaje de contaminación de ápices después de un mes de cultivo sometidos a diferentes concentraciones de NaOCl- (Experimento 1b) (CV=74,04 %)

b. Iniciar el lavado del material y extracción de los explantes lo más pronto posible, con el fin de evitar la mayor proliferación y penetración de los microorganismos hasta el explante. Retrasos mayores de 24 horas para iniciar las desinfecciones, luego de la extracción de los hijuelos, ocasionaron en algunos casos alta contaminación por bacterias

4.1.2. Establecimiento y organogénesis (Experimento 2)

4.1.2.1. Fase de establecimiento. La oxidación ocasionó la pérdida de muchos explantes tal como se observa en el Cuadro 2. Esto significó un serio impedimento (bajo las condiciones del presente estudio) para lograr el establecimiento del 45 % de las introducciones estudiadas

El suplemento de CA (0,1-3%) al medio de cultivo redujo la oxidación y mejoró el crecimiento de los explantes en otras palmeras (Blake, 1966; Fisher y Tsai, 1978; Iyer, 1982; Nwanko y Krikorian, 1983; Tisserat, 1984b; Choo, 1984). En el presente estudio el uso de 0,3 % de CA no fue suficiente para evitar la oxidación de los ápices. Aunque la oxidación de polifenoles pueda ser una de las causas (Sharma *et al.* 1980; Hasegawa y Maier, 1980), es importante tener en cuenta otros factores que puedan originar dicha oxidación. Algunos autores encontraron que la presencia de citocinina y agar, así como el desbalanceo del medio nutritivo, pueden promover la oxidación (Rabechault, 1962; Martin y Rabechault, 1978; Apavatjirut y Blake, 1977). En el presente estudio se observó oxidación al trasplantar ápices que no habían oxidado, de un medio sin CA y sin reguladores, a otro

Cuadro 2 Porcentaje de oxidación en ápices caulinares de diferentes procedencias después de 90 días de cultivo *in vitro* (Experimento 2)

Número de introducción	Procedencia	Número de ápices sembrados	Oxidación (%)
12515	Amazonas, Brasil	16	12
11327	Limon, Costa Rica	17	24
11719	Turrialba, Costa Rica	14	64
11736	P Zeledon, Costa Rica	11	9
12232	Colombia	17	35
12508	Amazonas, Brasil	13	69
9660	Cali, Colombia	16	56
9672	Cali, Colombia	18	22
9740	Cali, Colombia	20	15
13177	Alajuela, Costa Rica	25	60
9710	Cali, Colombia	17	6
⁺ s/n	Guapiles, Costa Rica	25	27
X ± D E		17±4	33±23

(+): sin número; material juvenil procedente de una plantación comercial dedicada al aprovechamiento de "palmito"

con CA y 10 mg/l de ANA. Esto sugiere que otros factores no determinados, inherentes a la composición del medio (en este caso tal vez los 10 mg/l de ANA) podrían también originar la oxidación de los ápices de pejíbave.

En comparación con dátil (Tisserat, 1979), la capacidad de crecimiento de los ápices caulinares de pejíbave fue 10 veces menor (15,2 mm en pejíbave y aproximadamente 150 mm en dátil, ambos valores después de cuatro meses de cultivo). Es importante señalar que mayor crecimiento de los ápices ocurrió en Gelrite al efectuar la sustitución del agar (Cuadro 3). Al parecer, la inclusión de Gelrite estimuló el crecimiento de los ápices y posiblemente también la iniciación de los procesos organogénicos. La naturaleza de éste gelificante (derivado del almidón) puede haber mejorado las características físicas y/o químicas del medio nutritivo.

Para reemplazar explantes oxidados se incluyeron ápices de material juvenil procedentes de una plantación para "palmito" (Guápiles, Costa Rica). Este material tuvo manejo agronómico muy distinto al material restante. No fue posible determinar la procedencia original de este material. Las plantas donantes de los ápices en referencia fueron rejuvenecidas aproximadamente cada ocho meses mediante la cosecha de palmito. La fertilización nitrogenada y combate de malezas se efectuó cada cuatro meses. Además, bajo éstas condiciones de cultivo, existe mayor disponibilidad de luz directa para los hijuelos. Estas características posiblemente determinaron el potencial morfogénico in vitro de los ápices de dichos hijuelos.

Cuadro 3 Crecimiento en longitud (mm) de los ápices caulinares cultivados in vitro durante cuatro meses (Experimento 2)

Número de introducción (++)	Meses de cultivo			Tasa creci- miento (mm/mes)
	2	3	4	
11327	6,25	7,50	11,75	2,75
9672a	12,75	16,75	37,00	12,12
9672b	9,75	12,00	21,50	5,87
9672c	6,75	8,25	14,25	3,75
12515	7,75	8,75	10,75	1,50
9740a	6,75	7,25	11,00	2,12
9740b	5,25	6,75	12,00	3,37
11736 +	7,75	7,75	12,25	2,25
s/n	5,75	7,75	12,00	3,12
s/n	5,25	5,50	9,50	2,12
$X \pm D.E$	$7,40 \pm 2,3$	$8,82 \pm 3,2$	$15,20 \pm 8,3$	$3,90 \pm 3,1$

(+): sin número, material juvenil proveniente de una plantación comercial dedicada al aprovechamiento de "palmito"

(++): Las procedencias de las introducciones están indicadas en el Cuadro 2, p 54

En tres de los 25 ápices (12 %) procedentes de plantas juveniles se observaron eventos morfogénicos que progresaron hasta la diferenciación de plantas completas. Tales cambios fueron observados visualmente después de 30 días de cultivo durante la fase de establecimiento. En los tres explantes mencionados, la primera respuesta fue la inhibición del crecimiento longitudinal del ápice. Posteriormente a partir de la zona ventral o dorsal de los primordios ocurrió la rizogénesis, emisión de brotes o probable embriogénesis somática. Es posible que el estado juvenil de este material haya favorecido la respuesta morfogénica in vitro. A continuación se describen los tres procesos observados.

4.1.2.2 Organogénesis tipo 1 Luego de 15 días de cultivo los tejidos de un ápice adoptaron posición horizontal sobre el medio de cultivo. En parte del explante ocurrió fragmentación espontánea de los tejidos. Los fragmentos fueron visibles sobre el medio de cultivo después de dos meses de la inoculación del explante y presentaban coloración verde. Estos fragmentos después de cuatro meses de la inoculación tenían apariencia de embrioides (Figura 5A) las que mostraron luego un desarrollo polarizado en vástago y raíces (Figuras 5B, 5C y 5F). Parte del tejido foliar emitió varios brotes sin fragmentación previa. Es probable que en este caso parte de los supuestos embrioides hayan permanecido implantados en el tejido foliar y luego iniciaron su desarrollo (Figura 5A). Este grupo de estructuras provenientes de un solo ápice (Figura 5A) mostró desarrollo de raíces, vástagos y brotes secundarios (Figuras 5D y 5E) cuando

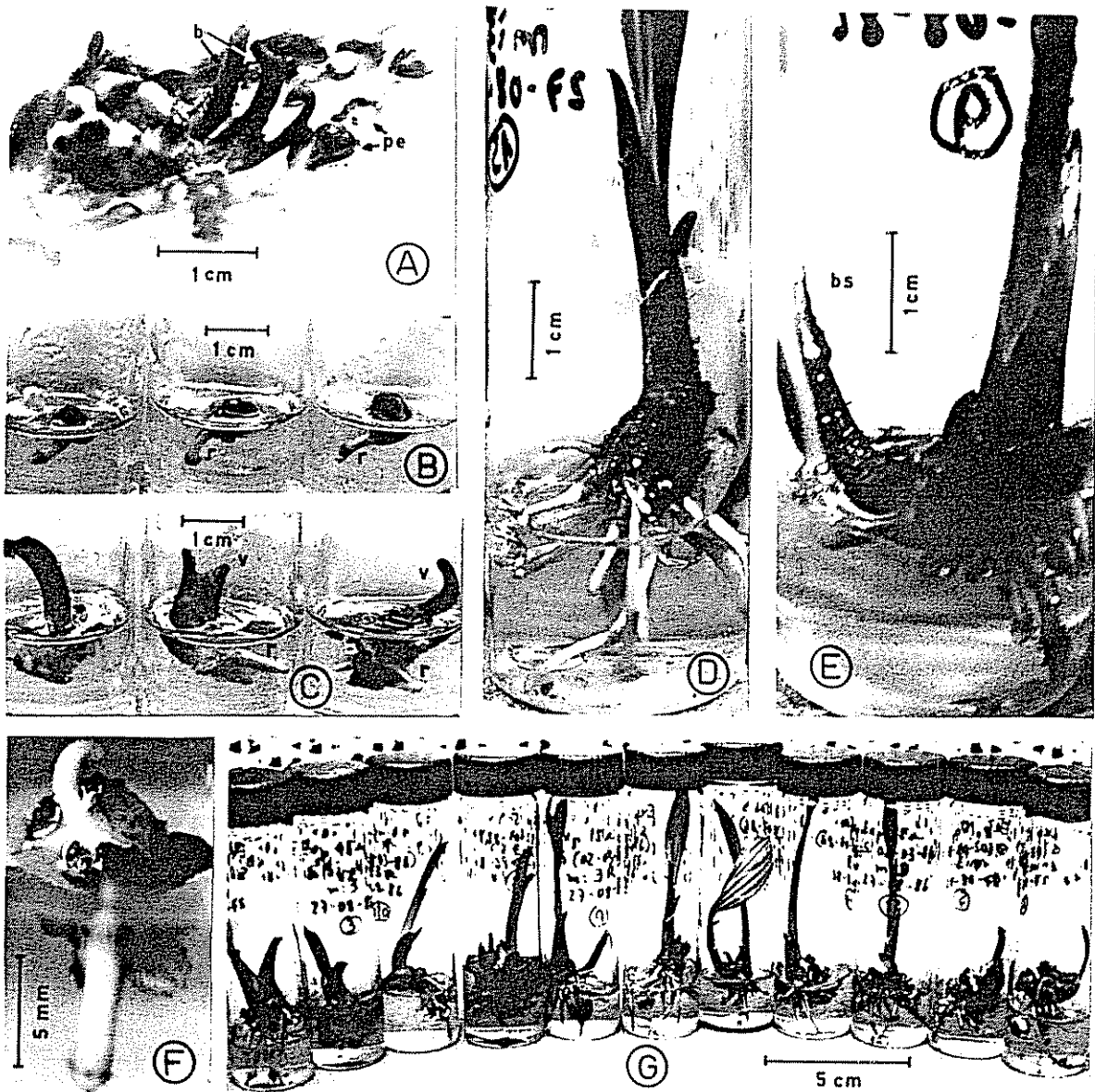


Figura 5 Organogénesis del tipo 1 en explantes de pejíbaye. A. Brotes en desarrollo inicial (b) y probables embrioides (pe). B. Probables embrioides (pe) subcultivados en medio sin reguladores de crecimiento mostrando desarrollo inicial de raíces (r). C. Brotes subcultivados en medio sin reguladores de crecimiento mostrando desarrollo inicial de vástagos (v) y raíces (r). D. Planta completa regenerada por recultivo de un brote como en C. E. Planta completa con brote secundario (bs). F. Probable embriode con desarrollo polarizado en vástago y raíz. G. Plantas en estado avanzado de desarrollo provenientes de los tejidos de un solo ápice A.

fueron sub-cultivados a un medio con Gelrite y sin reguladores de crecimiento

El balanceado desarrollo de vástago y raíz, y profuso desarrollo de raíces normalmente conformadas, observado en esta organogénesis (Figura 5D) es reminiscente del desarrollo de un embrión

A los siete meses de cultivo se diferenciaron 35 vástagos, de los cuales 14 se transformaron en plantas completas, listas para ser trasplantadas a macetas (Cuadro 4)

Cuadro 4 Número de brotes a partir de un ápice (Organogénesis tipo 1- Experimento 2)

Meses de cultivo	Número En iniciación	de vástagos Diferenciados	Total	No plantas completas
3	10	10	20	-
5	13	19	32	-
7	5	35	40	14

4.1 2.3 Organogénesis tipo 2. Los primordios foliares dispuestos paralelos al medio de cultivo gelificado, mostraron notable enraizamiento adventicio ya durante el primer mes de cultivo (Figura 6A) Al final del segundo mes existían dos vástagos bien conformados (Figura 6B) Hubo fragmentación del explante, pero en menor grado que en la organogénesis tipo 1 Algunos de esos fragmentos no mostraron regeneración de órganos y permanecieron inactivos hasta después de siete meses de cultivo Los brotes diferenciados fueron recultivados en medio

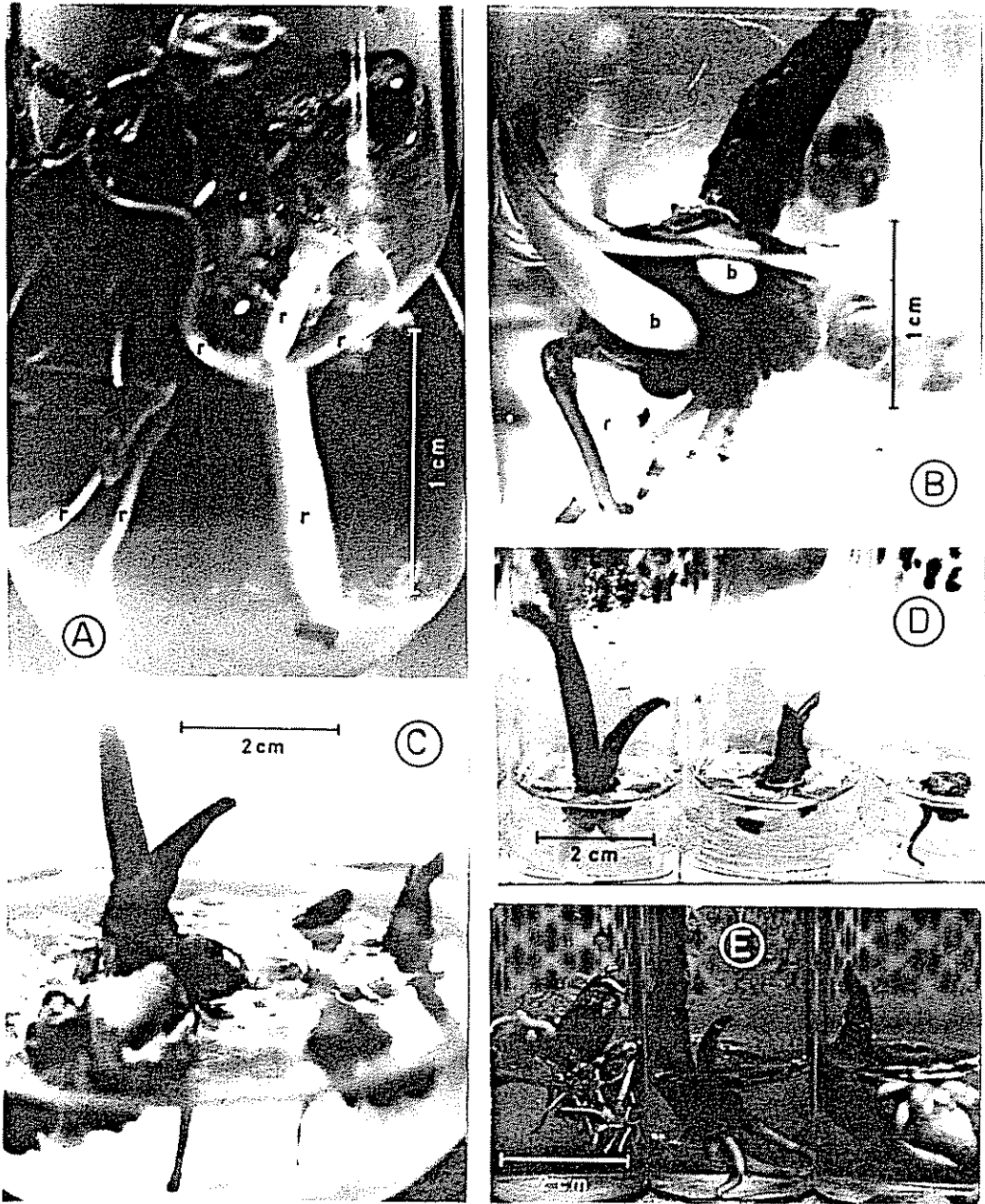


Figura 6. Organogénesis del tipo 2 en explantes de peyibaye. A. Apice caulinar (a) con abundantes raíces adventicias (r). B. brotes vegetativos (b) en distintos estados de desarrollo en un explante con raíces adventicias (r). C. Brotes recultivados que muestran pronunciado desarrollo de los vástagos. D. Los mismos brotes subcultivados en medio sin reguladores de crecimiento. E. Los mismos brotes en estado más avanzado de desarrollo.

sin reguladores y continuaron su desarrollo foliar y radical (Figuras 6D y 6E) El número de brotes logrados se presenta a continuación en el Cuadro 5

Cuadro 5. Número de brotes a partir de un ápice (Organogénesis tipo 2-Experimento 2)

Meses de cultivo	Número En iniciación	de Diferenciados	vástagos Total	No plantas completas
2	4	2	6	-
4	3	3	6	-
6	3	3	6	2

4.1.2.4. Organogénesis tipo 3 La respuesta inicial del ápice fue una proliferación conspicua de tejido foliar. En las primeras semanas este tejido fue de color blanco y de conformación laminar, el cual en el segundo mes de cultivo se volvió verde. A partir de este tejido ocurrieron diferenciaciones de hojas de novo, pero con tejido común en el area basal (Figura 7A). Este tejido fue rígido y duro al momento de seccionarlo. Cuando las secciones fueron subcultivadas, los vástagos se diferenciaron completamente (Figura 7B y 7C). Aunque en una de las fracciones subcultivadas hubo diferenciación de abundantes raíces (Figura 7C) la rizogénesis fue generalmente insuficiente para la obtención de plántulas completas (Figura 7D, Cuadro 5)

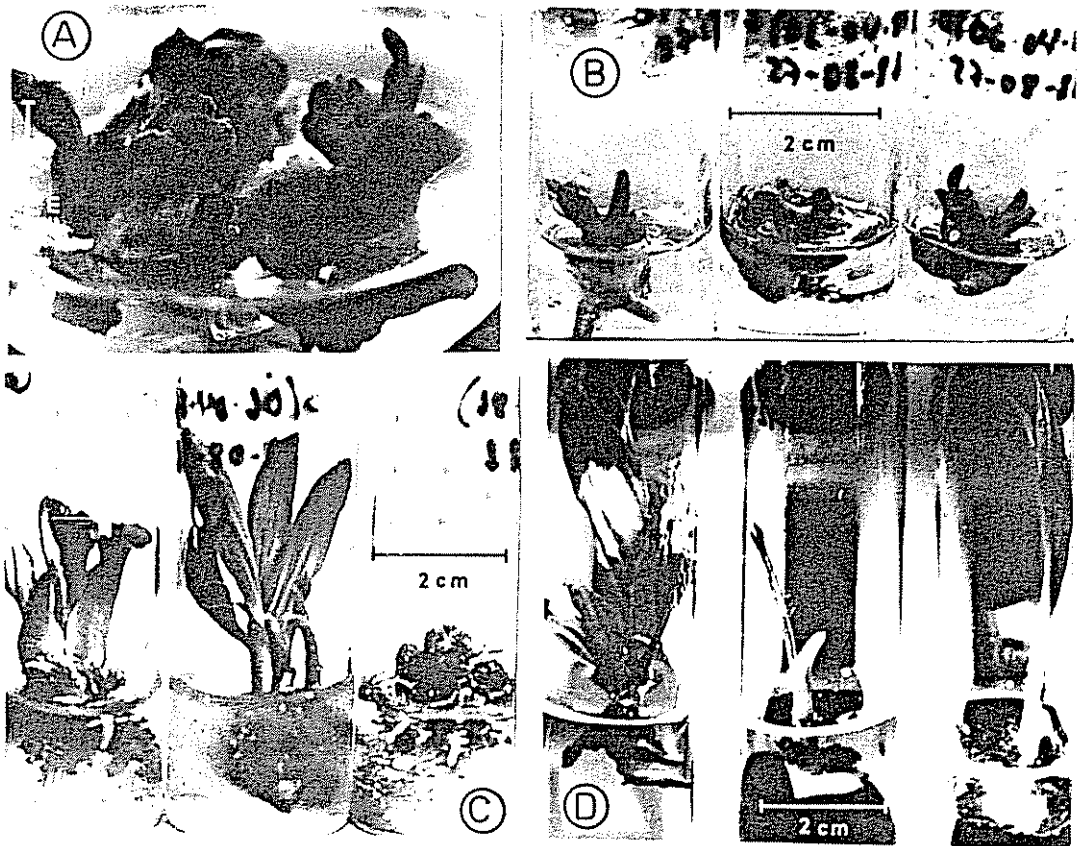


Figura 7 Organogénesis del tipo 3 en explantes de peyibaye A Inicio de la formación de hojas (h) en un ápice después de cuatro meses de cultivo B Explantes secundarios obtenidos del explante primario en A en un medio sin reguladores de crecimiento C Diferenciación de vástegos y raíces D vástegos recultivados que no regeneraron raíces luego de tres meses de cultivo en un medio sin reguladores de crecimiento

Cuadro 6 Número de brotes a partir de un ápice (Organogénesis tipo 3, Experimento 2)

Meses de cultivo	Número En iniciación	de vástagos Diferenciados	Total	No plantas completas
4	4	4	8	-
6	2	6	8	-
8	2	6	8	-

4.1.3. Fase inductiva

En presencia de los reguladores de crecimiento ANA y BA los ápices cultivados emitieron raíces (Organogénesis tipo 4) o brotes laterales (Organogénesis tipo 5)

4.1.3.1. Organogenesis tipo 4 Se incluyó en este caso la regeneración de plantas mediante enraizamiento de los ápices. El uso de 3 mg/l de ANA no estimuló enraizamiento en la mayoría de los genotipos, sin embargo ocurrió en forma aleatoria en los ápices de plantas juveniles, probablemente sin estímulo exógeno de reguladores. El estado juvenil de este material posiblemente fue determinante en su capacidad de enraizamiento *in vitro*. La iniciación de raíces en el material adulto fue precedido por el alargamiento del ápice (Figura 11A). Esta organogénesis en ápices de plantas adultas solo ocurrió en aquellos que correspondieron a la introducción 9672 (Figura 11B y 11E). Además, los niveles de rizogénesis mostraron una relación directa con el estado de desarrollo de los ápices. Para la diferenciación más temprana, tanto de brotes como de raíces, fue requisito indispensable una tasa de crecimiento de por lo menos 3,5mm/mes

en los primeros cuatro meses de cultivo Tisserat(1979) y Garb y Tisserat(1985) informaron de la aleatoriedad de rizogénesis en el cultivo de ápices de dátil

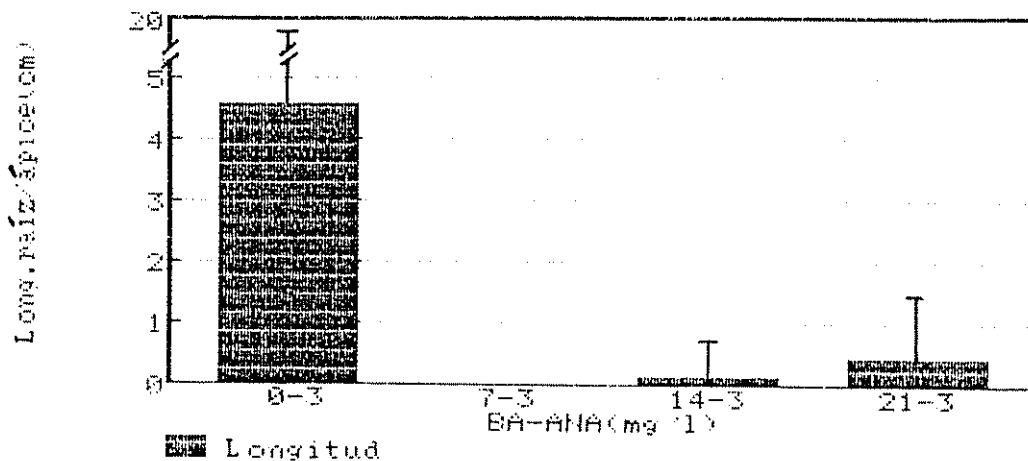


Figura 8 Longitud de raíces (cm) en ápices por efecto de los reguladores ANA y BA después de siete meses de cultivo

(CV=53,4 %), corresponde a datos transformados con la fórmula $\sqrt{X+1}$; donde \bar{X} = longitud de raíces

El análisis de varianza detectó que las diferencias de la longitud de raíces entre tratamientos fue significativa (Cuadro 3A). Además, el análisis de regresión mostró una relación lineal negativa significativa entre longitud de raíces y dosis de BA, lo cual se observa en la Figura 8

4.1.3.2. **Organogénesis tipo 5.** Durante las primeras seis semanas de la fase inductiva se estimuló el engrosamiento de los ápices en presencia de BA. Esta respuesta fue evidente en los explantes de todos los genotipos (Figura 9). Las diferencias entre los promedios del diámetro de los ápices no fueron significativas pero sí entre introducciones o bloques (Cuadro 3A)

La Figura 9 muestra las diferentes tendencias en el engrosamiento de los ápices según el genotipo. En esta introducción se observó también una relación directa entre la tasa de crecimiento de los ápices (Cuadro 3, p 56) con su diámetro luego de siete meses de cultivo (Figura 9). El engrosamiento de los ápices precedió a la proliferación de un tejido blanco en su base. Esta proliferación condujo a la organización de protuberancias sobre ese mismo tejido (Figuras 11C y 11F) y posteriormente a la emisión de brotes (Figuras 11D, 11G y 11H).

La Figura 10 muestra el número de protuberancias y brotes por efecto de BA y una correspondencia aproximada entre ambas variables. El análisis de varianza detectó diferencia significativa entre el número de protuberancias entre tratamientos pero no entre número de brotes (Cuadros 3A). Esta falta de diferencia en número de brotes fue determinada por el brotamiento en un ápice de planta juvenil en medio sin BA (Cuadro 6). Dosis entre 14 y 21 mg/l de BA indujeron la formación de protuberancias y brotes en los ápices de plantas adultas. En el caso del material juvenil, la cantidad de 7 mg/l fue óptima (Cuadro 2).

El engrosamiento en la base de los ápices y la formación de protuberancias fueron eventos secuenciales generalizados a pesar de la naturaleza genética diversa. Esta respuesta indica la posible repetitividad de la inducción de dichas protuberancias como estructuras precursoras de brotes.

Como se muestra en la Figura 9, todas las introducciones mostraron engrosamiento y subsecuente formación de protuberancias.

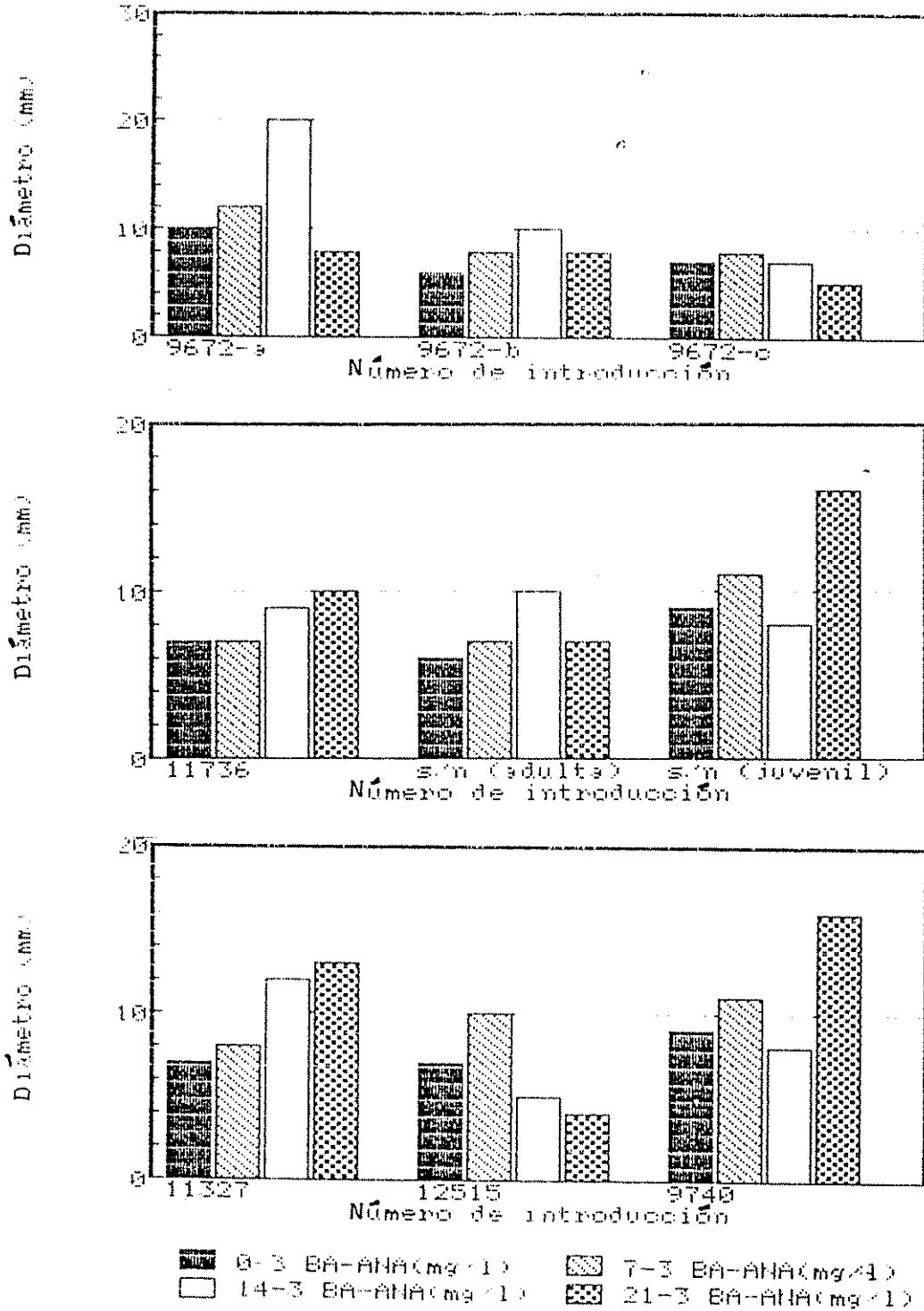


Figura 9. Diámetro de los ápices de diferentes introducciones después de siete meses de cultivo en presencia de BA (Las procedencias de las introducciones se indican en el Cuadro 2, p 54)

Cuadro 7 Protuberancias y brotes en ápices provenientes de diferentes introducciones después de nueve meses de cultivo in vitro en presencia de BA (Organogénesis tipo 5 Experimento 2)

Introducción (++)	BA - ANA mg/l							
	0 - 3		7 - 3		14 - 3		21 - 3	
	P	B	P	B	P	B	P	B
11327	0	0	0	0	0	0	1	0
9672-a	0	0	0	0	3	14	0	0
9672-b	0	0	0	0	0	1	4	1
9672-c	0	0	0	0	1	0	1	0
12515	0	0	0	0	4	0	1	0
9740-a	0	0	0	0	4	1	4	0
9740-b	0	0	0	0	4	4	3	3
11736	0	0	0	0	1	0	3	0
+ s/n adulta	0	0	0	0	2	0	0	0
s/n juvenil	0	3	7	0	2	0	0	0
s/n juvenil	0	0	7	1	0	0	1	0
Promedio	0	0,27	1,27	0,09	1,91	1,82	1,36	0,36

P : Protuberancia

B : Brote

(+) : sin número

(++) : Las procedencias de las introducciones están indicadas en el Cuadro 2, p 54

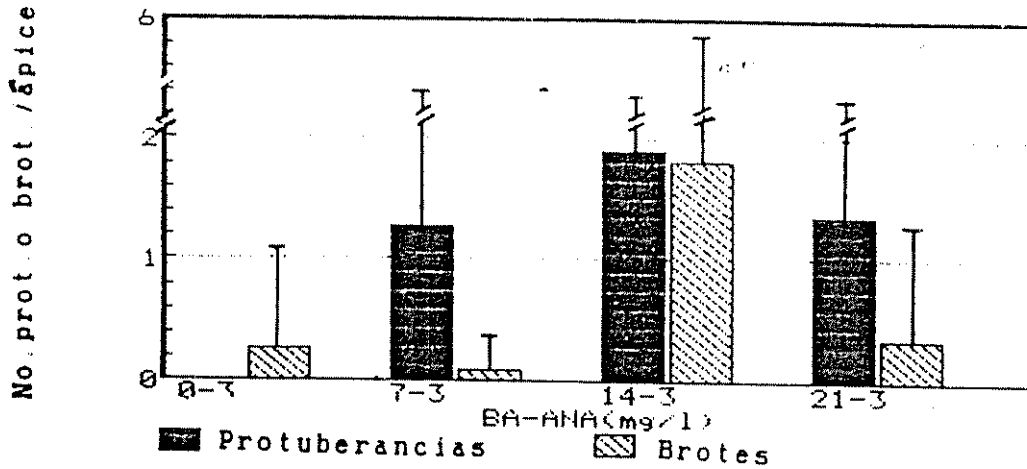


Figura 10. Protuberancias y brotes en ápices después de nueve meses de cultivo en presencia de BA (Experimento 2)

(CV=40,38) corresponde a datos transformados mediante la fórmula $\sqrt{x+1}$, donde x=número de protuberancias o brotes.

en el área basal del ápice. En el 54 % de las introducciones hubo diferenciación de brotes a partir de las protuberancias (Cuadro 7). Sin embargo solo un ápice entre los 11 cultivados en medio con 14 mg/l de BA produjo brotes basales aptos para ser sub-cultivados luego de nueve meses. A los 11 meses de cultivo este ápice tenía 16 vástagos desarrollados (Figura 11H). Este sería el caso ideal a reproducir en un sistema eficiente. Para ello, en base de las observaciones, se requeriría una tasa de crecimiento de alrededor de 12 mm/mes en la fase de establecimiento Rhiiss (1979), Drira y Benbadis (1983) y Gabr y Tisserat (1985) también obtuvieron brotes a partir de ápices caulinares de dátil

En cuanto a la ontogenia de los brotes podría plantearse como hipótesis que resulten del desarrollo de yemas axilares pre-existentes o de la formación de yemas de novo (adventicias) En

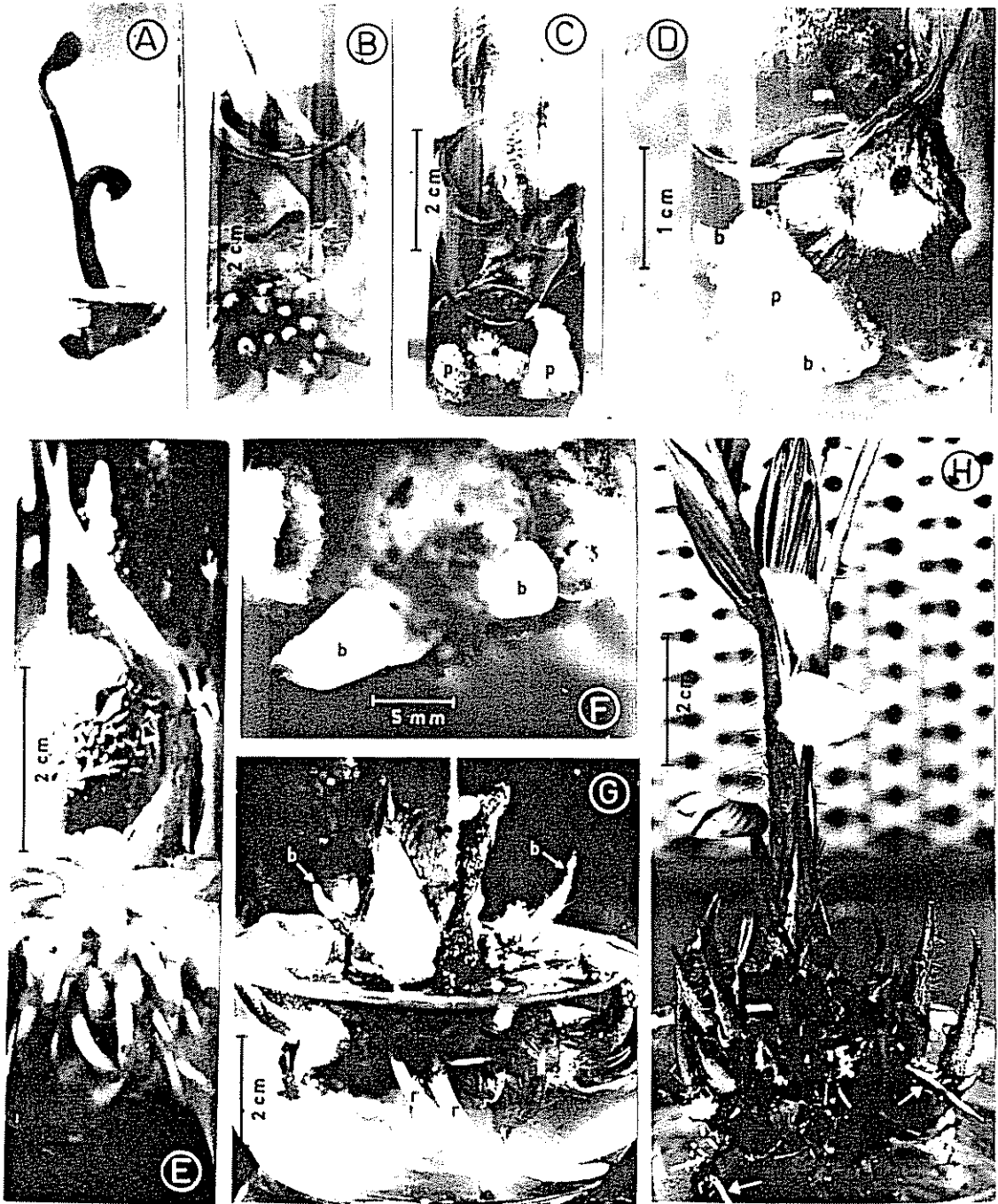


Figura 11 Organogénesis de los tipos 4 y 5 en explantes de pejiyabe A Apice elongado después de cuatro meses en un medio con ANA B Iniciación de raíces (r) en un medio con ANA C Formación de protuberancias (p) en la base del explante en un medio con ANA y BA D Protuberancia (p) que dió origen a brotes vegetativos (b) E Estado avanzado del desarrollo radical en el explante B F Iniciación de brotes (b) a partir de protuberancias G Brotes (b) y raíces (r) en un medio sin reguladores de crecimiento H Planta con raíces (flechas) y 16 brotes laterales luego de 12 meses de cultivo

ambos casos, la ausencia de una fase intermedia de callo permite inferir que las plantas regeneradas con mucha probabilidad no presentarían variaciones genéticas debido a mutaciones. Sin embargo se requiere efectuar estudios de comprobación en el campo, así como un estudio histológico detallado para determinar con precisión el origen de los brotes vegetativos

El estudio histológico de las protuberancias de tres ápices reveló la presencia de primordios foliares y meristemas propios de un brote vegetativo (Figura 12A). La presencia de haces vasculares en los tejidos de las protuberancias (Figura 12E) demuestran que no hubo desorganización de los mismos. Probablemente el aumento de volumen precedente a la formación de protuberancias correspondió a un proceso principalmente hipertrófico. De acuerdo a la definición de Muller y Krykorian (1985), este proceso implica principalmente un aumento del tamaño de las células y no tanto de la tasa de multiplicación

La Figura 13 resume los tipos de organogénesis observados y la secuencia de eventos en relación al tiempo. Mientras que la organogénesis tipo 1 mostró mayor precosidad, la del tipo 5 fue la más tardía. Sin embargo, esta última pudo ser inducida mediante el empleo de la combinación de los fitoreguladores ANA y BA. En cambio, la organogénesis tipo 1 ocurrió aleatoriamente ya que se desconoce su causalidad; razón por la cual no sería posible reproducir el proceso con base en los conocimientos actuales

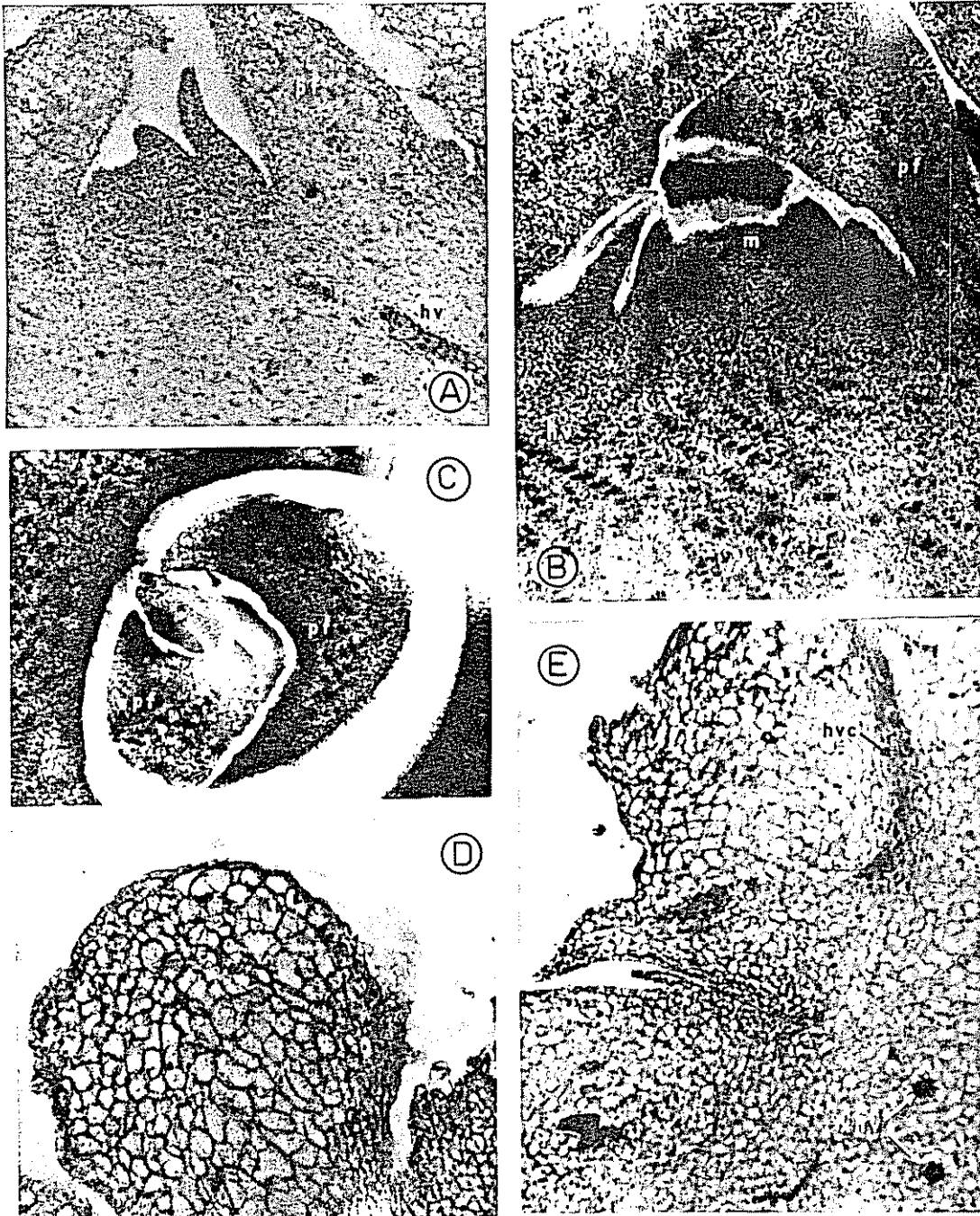


Figura 12. Cortes histológicos de ápices meristemáticos. A Corte longitudinal de una yema en formación (50x) B Corte longitudinal de un ápice caulinar proveniente de una planta desarrollada en el campo (45x) C. Corte transversal de un ápice caulinar proveniente de una planta desarrollada en el campo (30x) D Corte longitudinal de una protuberancia formada en una flor masculina (25x) E Corte longitudinal con primordio foliar y haces vasculares desarrollados en tejido de protuberancias de ápices cultivados con BA y ANA [meristema (m); primordios foliares (pf); haces vasculares (hv); haz vascular completo (hvc); elementos xilemáticos de haces vasculares (xhv)]

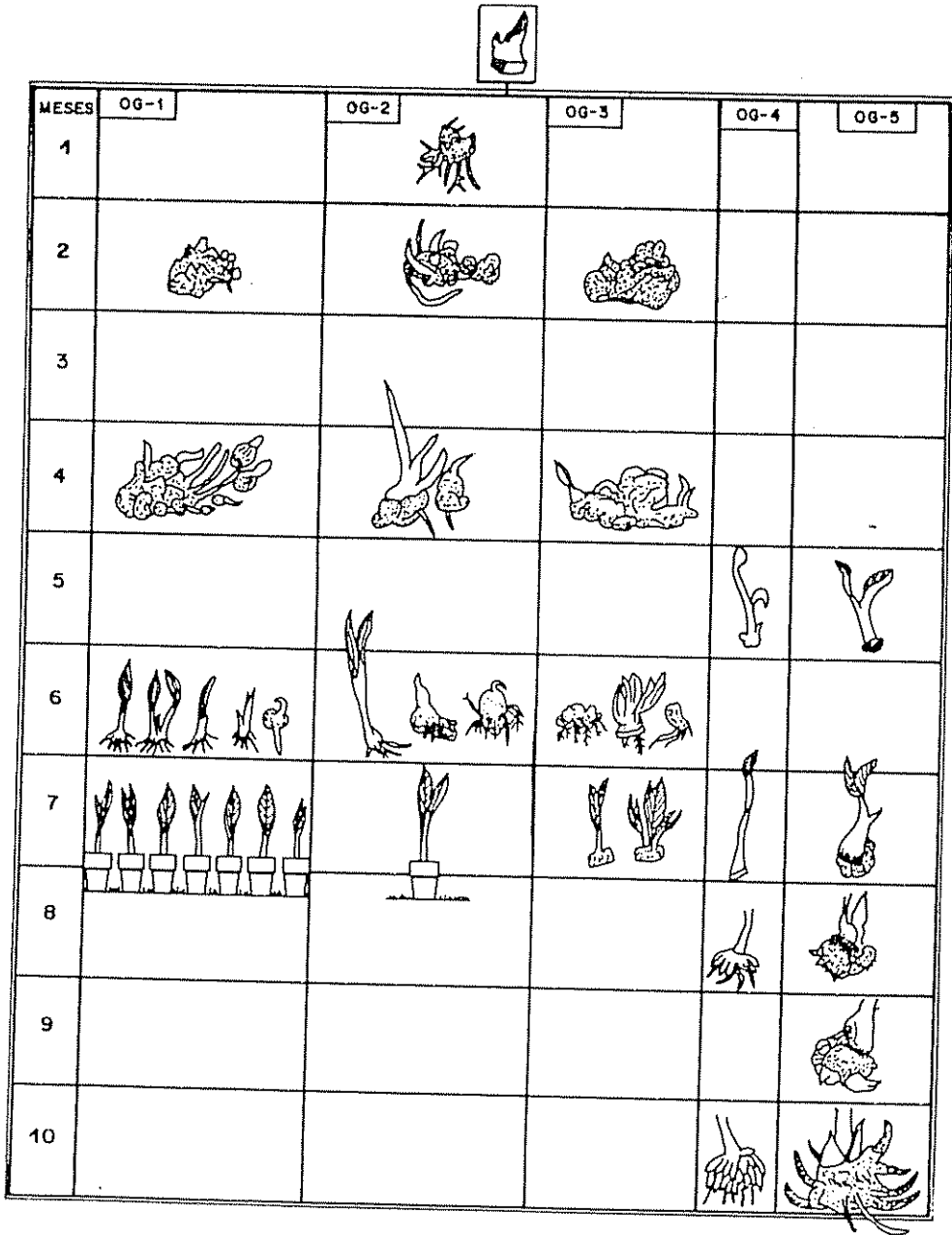


Figura 13 Eventos en la organogénesis directa en ápices caulinares de pebibaye en relación al tiempo de cultivo expresado en meses OG-1 a OG-5 = Organogénesis tipos 1 a 5

4.1.4. Trasplante

Las 14 plantas resultantes de la organogénesis tipo 1 con una longitud de 10 a 15 cm (Figura 14A), fueron transferidas a macetas con suelo estéril. Luego de seis semanas había 100 % de supervivencia con desarrollo normal (Figura 14B). El éxito de esta transferencia se atribuye a la excelente conformación de las plantas y su adecuado tamaño. En los trabajos de Arias (1983; 1985) se informó de la muerte de plantas regeneradas por cultivo de callos al ser trasplantadas a suelo estéril o no estéril.

4.2. Espigas y yemas florales

4.2.1. Fase de establecimiento (Experimentos 3a y 3b)

Ensayos efectuados en ésta investigación demostraron la seria dificultad que implica cultivar espigas en medio sin CA. Fue evidente que después de siete días de su siembra los explantes murieron a consecuencia del problema de oxidación. El suplemento de 0,3 % del CA al medio de cultivo solucionó satisfactoriamente ese problema. Con tal antecedente se iniciaron los Experimentos 3a y 3b, lo que permitió confirmar la efectividad del CA.

Experimento 3a. La oxidación de las espigas fue significativamente diferente entre consistencias del medio y tamaños del explante, pero no así entre ambientes iluminado y oscuro (Cuadro 4A). Las pruebas de Duncan revelaron menor oxidación de las

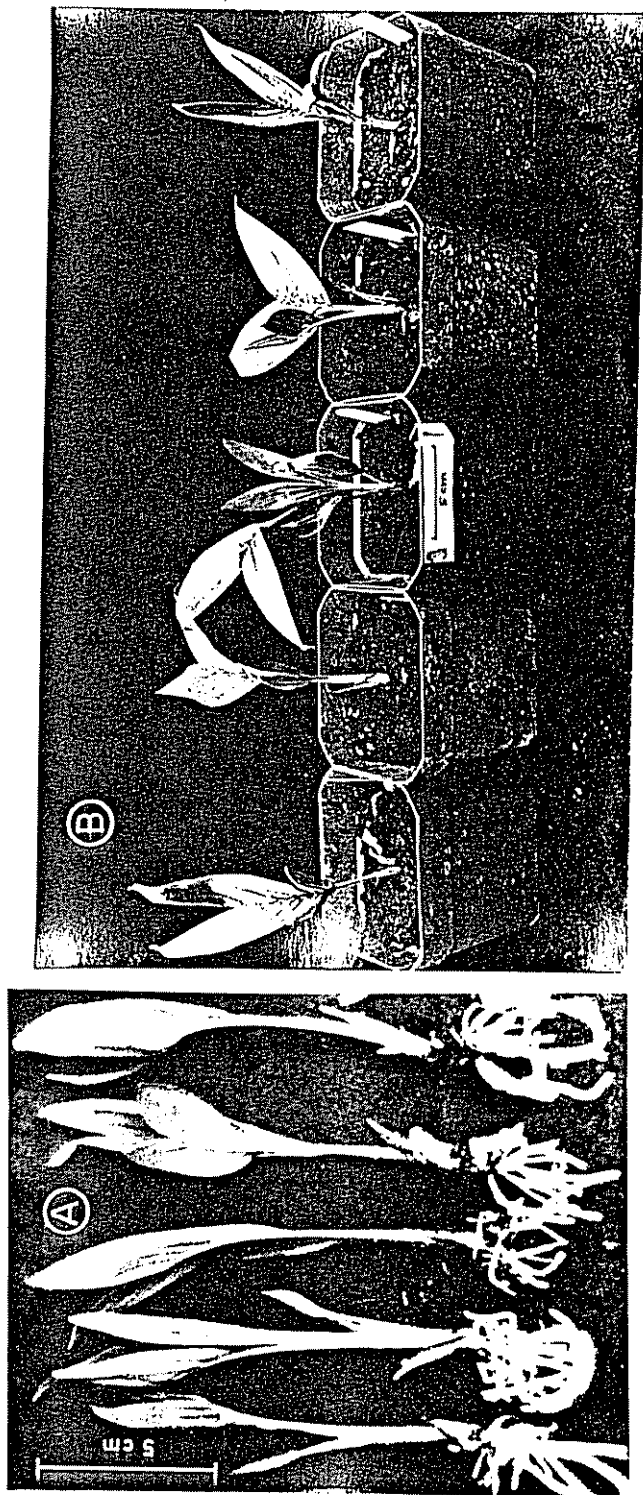


Figura 14 Aclimatación de plántulas. A. Plántulas removidas de los recipientes de cultivo antes de ser introducidas en macetas. B. Plantas seis semanas después de su establecimiento en suelo estéril mantenidas, en invernadero bajo nebulización.

espigas medianas y pequeñas y cuando se empleó medio gelificado suplementado con 0,3 % de CA (Cuadro 6A)

La oxidación de las espigas se atribuye a la liberación de polifenoles u otras sustancias tóxicas. En el caso de espigas esta conjetura tiene mayor validez que para ápices, ya que la oxidación fue mayormente evitada mediante el uso de 0,3 % de CA. El tejido de raquilla (raquis de la espiga) posiblemente excreta sustancias oxidantes en el cultivo in vitro; a mayor tamaño de la espiga, mayor volumen de raquilla, por lo tanto mayor oxidación. La oxidación fue mucho mayor en medio líquido, posiblemente porque las espigas sobre el puente de papel filtro tuvieron más contacto con oxígeno.

El análisis estadístico de la oxidación evidenció interacción entre tamaños de espiga y consistencias del medio, así como entre tamaños de espiga y condiciones de iluminación (Figuras 15 y 16 y Cuadro 4A)

La liberación de polifenoles en medio líquido y sin adsorbentes puede haber sido un agente más deletéreo para las espigas pequeñas. La mayor sensibilidad de tales explantes en comparación con las de mayor tamaño, explicaría la interacción entre tamaños de espiga y consistencias del medio.

Es posible que la interacción mostrada entre tamaños de espiga y presencia de luz esté determinada por la respuesta de las espigas pequeñas, las cuales se oxidaron mucho más bajo condiciones de luz. Es posible que este comportamiento este asociado a una interacción entre el factor luz y algún otro componente

del medio. Esta interacción provocaría la mayor oxidación de las espigas pequeñas por su mayor sensibilidad y un efecto ligeramente inverso para los demás explantes. Es así que las espigas medianas y grandes mostraron, por lo general, menor oxidación en ambiente iluminado que en oscuridad.

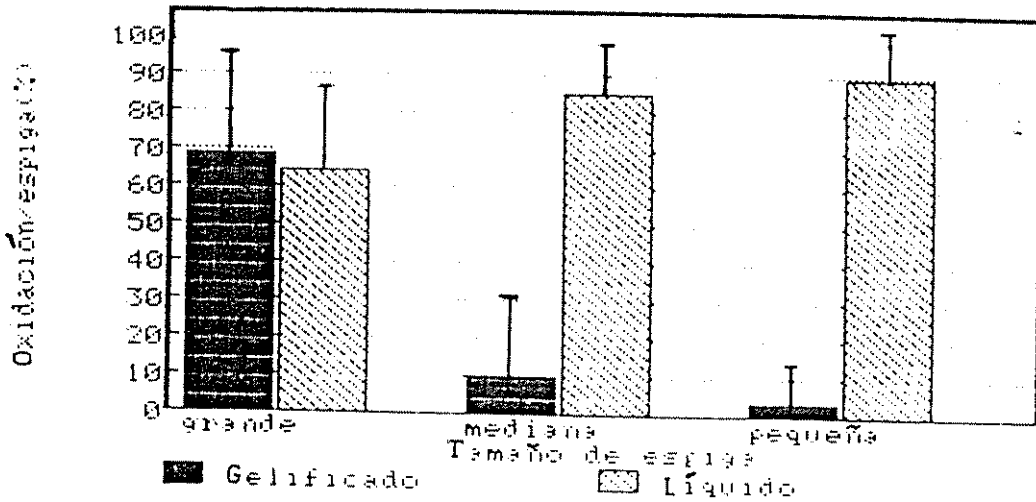


Figura 15 Oxidación de diferentes tamaños de espigas en medio líquido y semisólido después de dos meses de cultivo en oscuridad (Experimento 3a). CV=69,75 %.

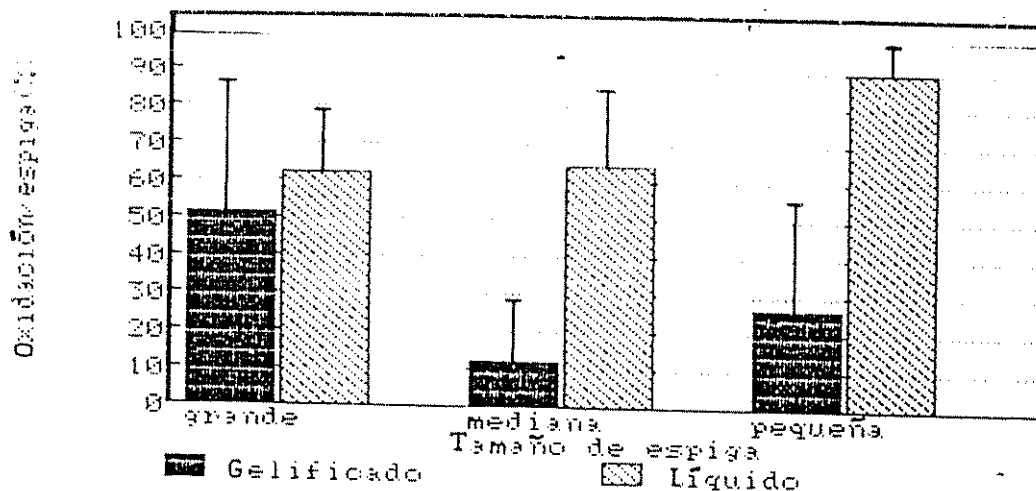


Figura 16 Oxidación de diferentes tamaños de espigas en medio líquido y semisolido después de dos meses de cultivo bajo condiciones de luz (Experimento 3a). CV=56,40 %

Al comparar las Figuras 17 y 18 se observa que el factor luz fue benéfico para el crecimiento de las espigas grandes evidenciado por su mayor peso. Este efecto fue más notable cuando se empleó medio gelificado. Tal superioridad de las espigas grandes podría ser consecuencia de una mayor capacidad fotosintética. Además en ese estado de desarrollo en el medio gelificado, la actividad fotosintética podría ser favorecida por la menor oxidación. En cambio en la oscuridad las espigas medianas mostraron peso ligeramente superior que las demás, principalmente como consecuencia de la inhibición del incremento de peso de las espigas grandes en la oscuridad.

Aunque no se observaron diferencias en cuanto a la oxidación de las espigas en ambiente oscuro comparado con el iluminado, las diferencias entre el peso de las mismas fueron significativas

Cuadro 6A) Las diferencias en la consistencia del medio también afectaron significativamente el peso final de las espigas. lo mismo ocurrió con la interacción tamaño de espiga por presencia de luz Sin embargo, la interacción tamaños de espiga por consistencia del medio, no tuvo ningún efecto sobre el peso de las espigas a diferencia de su influencia sobre la oxidación (Cuadro 4A) Esta aparente independencia entre las variables oxidación y peso de espigas implicaría que por lo menos durante los dos meses iniciales de cultivo la oxidación no interfiere mayormente con los procesos metabólicos del explante Sin embargo, la oxidación reduciría el potencial morfo-génico del explante

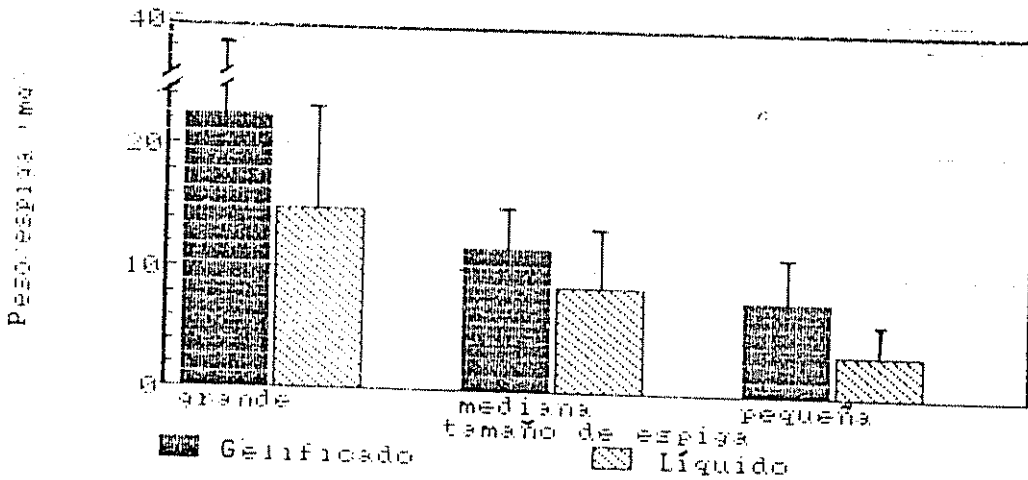


Figura 17 Peso de espigas en medio líquido y semisólido luego de dos meses de cultivo bajo condiciones de luz (Experimento 3a). CV=75,69 %

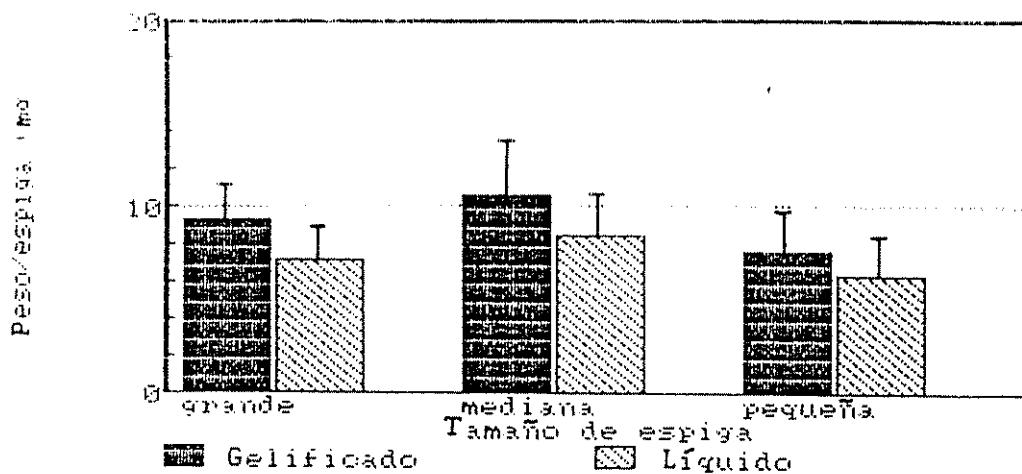


Figura 18 Peso de espigas en medio líquido y semisólido luego de dos meses de cultivo en oscuridad (Experimento 3a). CV=28,29 %

Experimento 3b No se encontraron diferencias, ni de oxidación ni peso, de las espigas entre medios de cultivo con y sin caseína, ni entre medios con sales de MS y Y3. Estos resultados difieren con los obtenidos por Eeuwens(1976), quien observó que el crecimiento de explantes de raquillas de coco fue grandemente influenciado por la composición mineral del medio. En cambio, fue notable la influencia positiva del CA, tanto en la oxidación como en el peso (Figuras 19 y 20, Cuadro 7A). Las pruebas de Duncan respectivas comprueban las diferencias significativas de una menor oxidación y mayor peso de las espigas cultivadas en medio con 0,3 % de CA (Cuadro 7A).

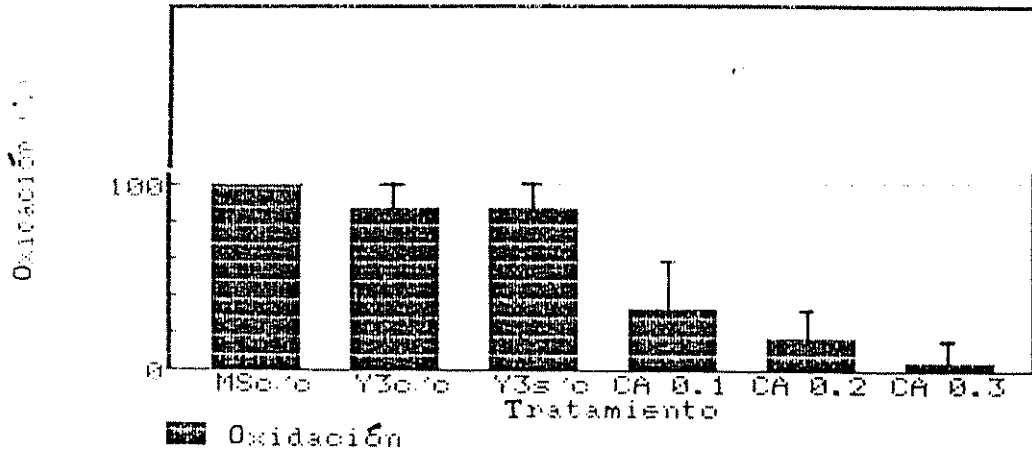


Figura 19 Oxidación de espigas en relación con factores anti-oxidantes luego de dos meses de cultivo (Experimento 3b) CV=26,7%

MS c/c: Medio MS con caseína; Y3 c/c o s/c: Medio Y3 con caseína o sin caseína; CA 0,1 0,2 y 0,3: Carbón activado 0,1, 0,2 y 0,3 %

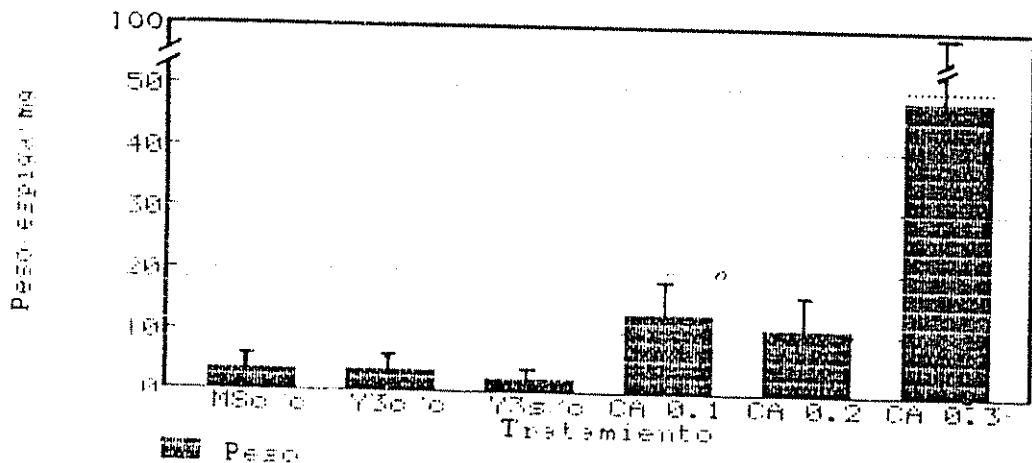


Figura 20 Peso de espigas en relación con factores antioxidantes luego de dos meses de cultivo (Experimento 3b). CV=172,65 %

Las espigas cultivadas en medio con 0,3 % de CA mostraron menor oxidación y mayor peso en comparación con los demás tratamientos. Estas tendencias fueron confirmadas con las Pruebas de Duncan respectivas (Cuadro 7A). Este efecto benéfico del CA ha sido observada consistentemente en otras palmeras y con distintos explantes (Tisserat, 1979a;1984b; Choo, 1984; Sharma *et al* ,1980)

4.2.2. Fase inductiva

Superada la fase de establecimiento, se intentó la inversión de estructuras florales a estado vegetativo con base en los antecedentes en otras palmas

Experimento 4a En este experimento no ocurrió emisión de brotes vegetativos a partir de las flores. Sin embargo, la evaluación del peso final, luego de dos meses de cultivo, muestra tendencias que podrían ser útiles, tanto para estudios morfológicos como para la continuación de esta investigación

Las diferencias entre el peso de las flores correspondientes a los distintos niveles de BA fueron altamente significativas y hubo una relación lineal entre dichas variables. El peso de las flores también varió significativamente en presencia de los distintos niveles de AIB, pero en este caso la relación de regresión fue cuadrática (Cuadro 5A). No hubo diferencias estadísticamente detectables entre el peso de las flores en relación con la presencia de 2,4-D en el medio. Empero, la presencia de este regulador favoreció ligeramente el peso de los explantes. Se detectó interacción entre los niveles de BA y

AIB, pero este efecto fue mucho mas marcado entre las auxinas AIB y 2,4-D. Esto fue evidente por el mayor peso final de las flores (Cuadro 5A y Figuras 21 y 22).

La combinación de BA 0,4; AIB 0,5 y 2,4-D 0,5 mg/l respectivamente indujo el máximo crecimiento de las espigas

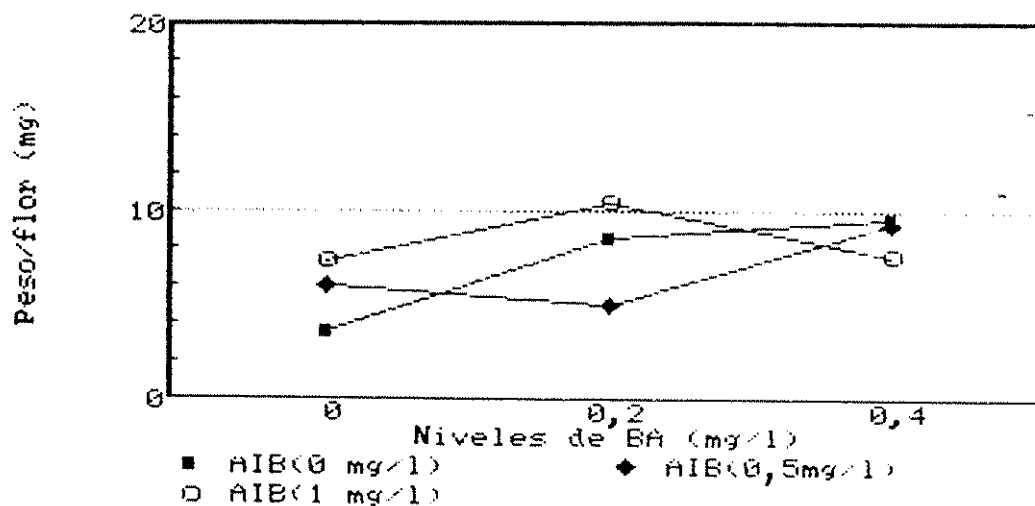


Figura 21 Peso de flores masculinas en función de los reguladores de crecimiento BA y AIB sin 2,4-D, luego de dos meses de cultivo (Experimento 4a). CV=78,70 %

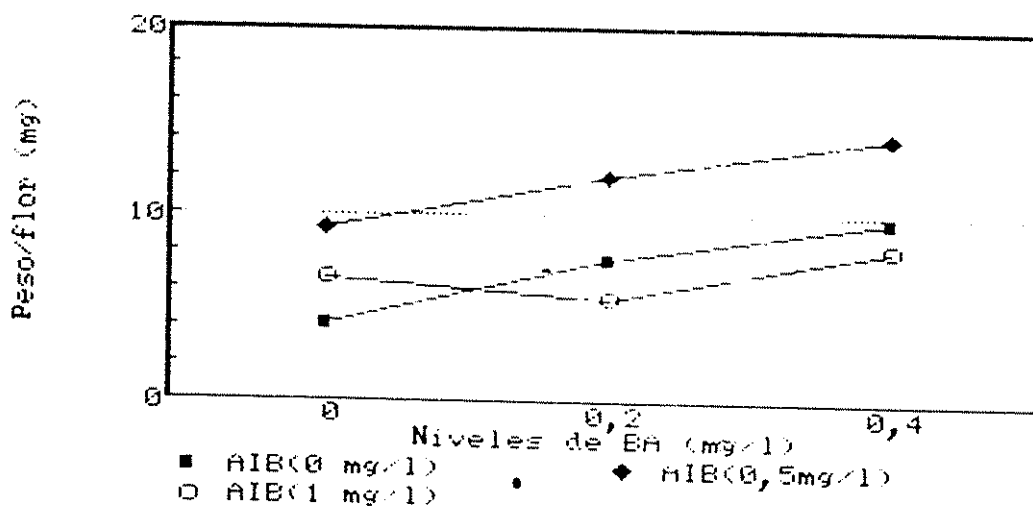


Figura 22 Peso de flores masculinas en función de los reguladores de crecimiento BA, AIB y 0,5 mg/l de 2,4-D, luego de dos meses de cultivo (Experimento 4a). CV=76,48 %

Experimento 4b El suministro de dosis crecientes de 2,4-D (0, 5, 10, 15 y 20 mg/l) en presencia de BA y ANA estimuló la proliferación de pequeñas prominencias puntiagudas sobre las secciones apicales de las espigas (Figuras 23 y 27E). Sin embargo, no se logró mayor organización a partir de esas estructuras, las cuales, durante su posterior recultivo se oxidaron y predominó el crecimiento de las yemas florales presentes en las espigas.

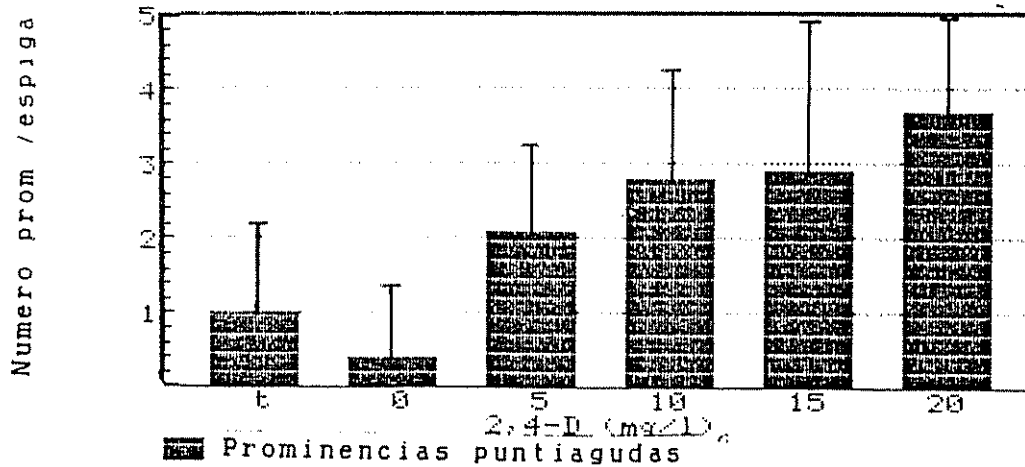


Figura 23 Prominencias puntiagudas en espigas en relación con bajos niveles de 2,4-D, luego de cuatro semanas de cultivo (Experimento 4b). CV=59,18 %

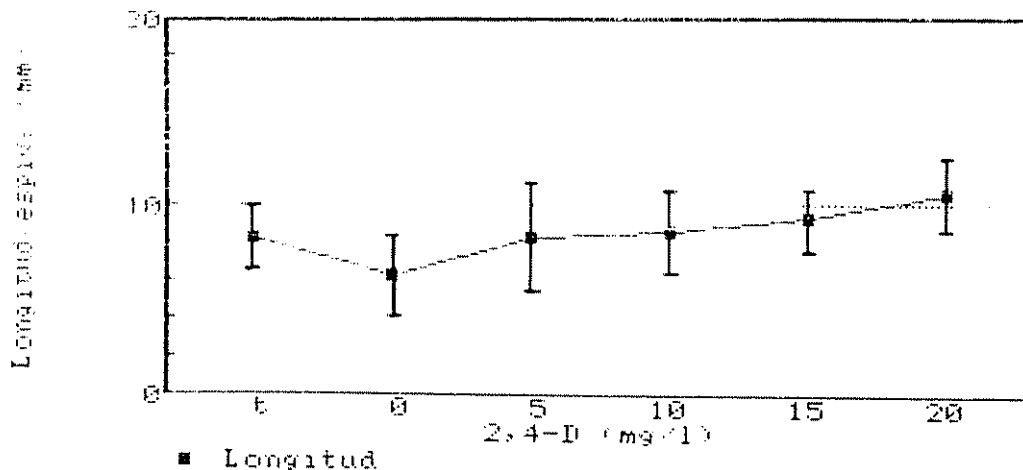


Figura 24 Longitud de espigas en relación con bajos niveles de 2,4-D, luego de cuatro semanas de cultivo (Experimento 4b). CV=23,87 %

Experimento 4c La dosis de 2,4-D mayores de 40 mg/l (en presencia de BA y ANA 4 y 3 mg/l respectivamente) ocasionaron inhibición de la formación de prominencias y crecimiento de las espigas (Figuras 25 y 26)

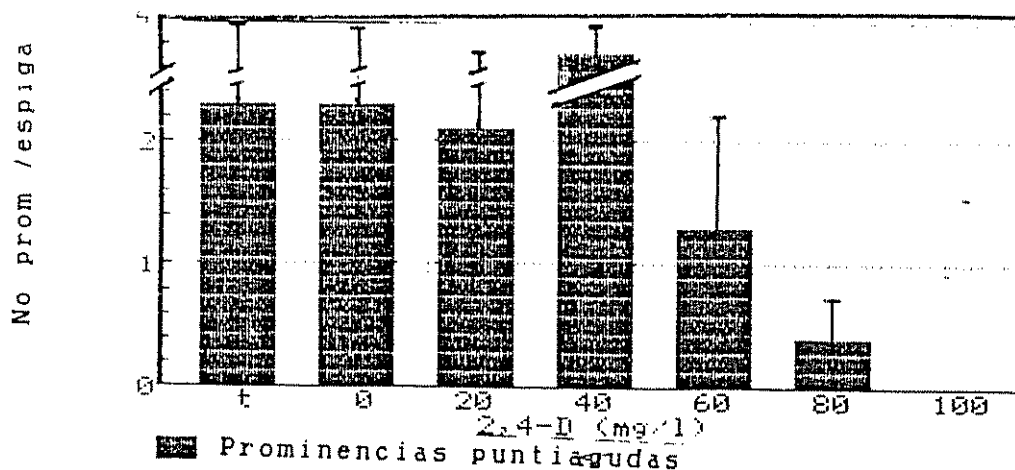


Figura 25 Prominencias puntiagudas en espigas en relación con altos niveles de 2,4-D después de dos meses de cultivo (Experimento 4c). CV=68,79 %

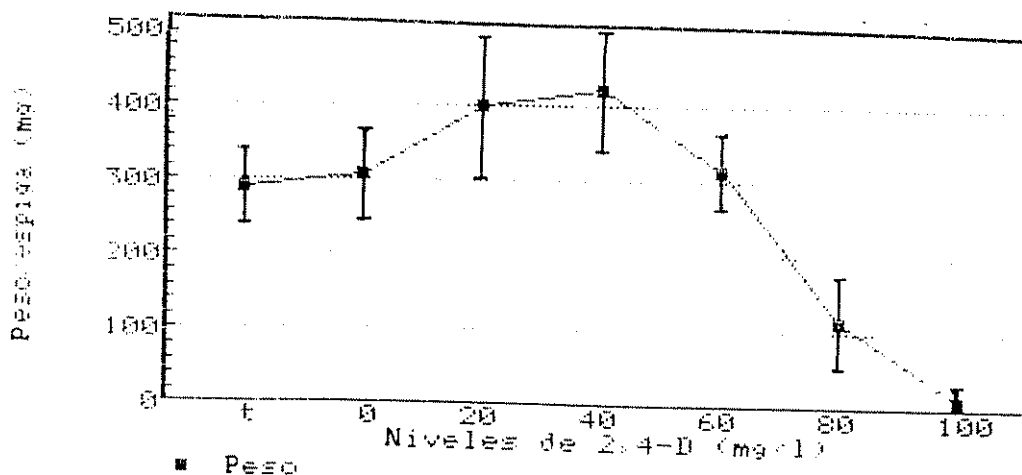


Figura 26 Peso de espigas en relación con altos niveles de 2,4-D luego de dos meses de cultivo (Experimento 4C). CV=27,18 %

En el experimento 4c, igual que en el 4b, las prominencias inducidas no mostraron mayor diferenciación. Tampoco se observaron pellosidades en las espigas aun con dosis de 100 mg/l de 2,4-D.

4.2.3. Indicios morfogénéticos aleatorios

En experimentos previos con espigas de 10 mm de longitud se observó la emisión de pseudo-brotes a partir de flores masculinas. Estas espigas fueron establecidas en un medio de cultivo con 3 mg/l de BA. En esta oportunidad las espigas fueron inoculadas verticalmente, introduciendo sobre el medio de cultivo su extremo proximal. Esta posición motivó luego de dos meses de cultivo un crecimiento ahusado de la espiga con ensanchamiento en la parte basal. Solo en esta area basal proliferaron pseudo-brotes de crecimiento lento (Figura 27c). Luego de su aislamiento dichas flores masculinas con pseudo-brotes fueron recultivados a un medio con CA y 10 mg/l de ANA. Sin embargo, esas estructuras no mostraron mayor respuesta organogénica.

Mediante el cultivo *in vitro* de las espigas inmaduras de peji-baye no se reprodujeron las características de las flores observadas bajo condiciones normales en el campo. Los verticilios florales desarrollaron anormalmente, su consistencia fue más rígida y los estambres variaron en forma y número. Yemas florales en ese estado anormal fueron transferidas a un medio de cultivo con 3 mg/l de ANA y 0,5 mg/l de BA en combinación.

Luego de cuatro meses de cultivo, las yemas florales masculinas mostraron distintos patrones de comportamiento (Figura 27).

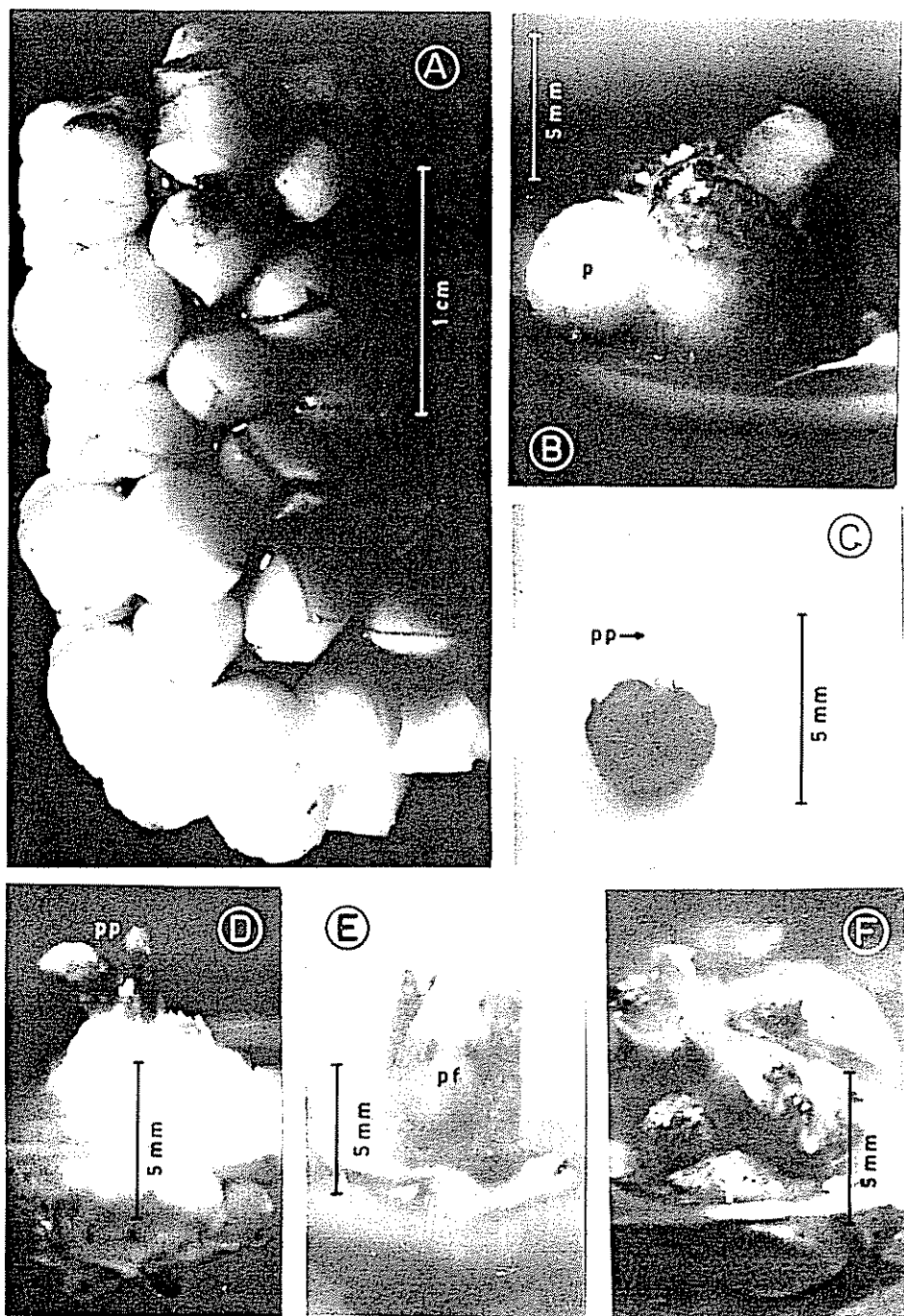


Figura 27. Cultivo *in vitro* de inflorescencias de pejobaye. A Espigas con flores masculinas cultivadas *in vitro* durante tres meses. B Protuberancias (p) formadas en una flor masculina luego de cuatro meses de cultivo en medio con ANA y BA. C Prominencias puntiagudas (pp) de lento crecimiento en una flor masculina luego de cuatro meses de cultivo. D Prominencias puntiagudas (pp) en el extremo distal de una espiga. E Primordios foliares (pf) en vez de estambres en una flor masculina. F Excrecencias en una flor masculina.

Algunas flores evidenciaron estructuras semejantes a primordios foliares en lugar de estambres (Figura 27E) En otros casos se observaron estructuras nodulares que al ser recultivadas en medio sin reguladores no continuaron su desarrollo y murieron (Figura 27B) Otra respuesta aislada consistió en un notable crecimiento lateral y formación de numerosas excrecencias en lugar de los verticilios florales (Figura 27F) Las prominencias agudas mostradas en las Figuras 27C y 27D fueron similares en cuanto a forma y comportamiento a las inducidas en coco por Blake(1966), Del Rosario y De Guzman(1982), Iyer(1982) y Gupta(1984) Asimismo, Tisserat et al (1981) y Tisserat(1984c), observaron carpelos vestigiales prominentes en flores masculinas de dátil En ninguno de estos casos se lograron brotes vegetativos

Al cabo de siete meses de cultivo las flores masculinas individuales de pejibaye no mostraron inversión completa a estado vegetativo

5. CONCLUSIONES

Entre las condiciones experimentales en que se llevó a cabo el presente estudio se establecieron las siguientes conclusiones:

- 1 La reducción máxima del tejido sub-apical y la doble desinfección del explante con NaOCl fueron prácticas eficientes para lograr cultivos axénicos de ápices caulinares
- 2 El establecimiento de los ápices no fue satisfactorio por la alta oxidación y baja tasa de crecimiento
- 3 El estado juvenil del material es muy probablemente favorable para la capacidad organogénica in vitro de los ápices
- 4 En todos los genotipos ensayados ocurrió engrosamiento de los ápices y formación de protuberancias en el área basal en presencia de BA
- 5 El 54 % de los genotipos diferenciaron brotes sin intermediación de callos en presencia de BA
- 6 El establecimiento de espigas fue exitoso en medio gelificado y con 3 g/l de CA
- 7 Las combinaciones de reguladores de crecimiento empleadas no fueron efectivas para inducir inversión de las flores a estado vegetativo. Los indicios morfogénicos aleatorios no progresaron hasta plantas
- 8 Entre los procesos observados en ápices, las organogénesis del tipo 1 y 5 constituyen alternativas promisorias para la propagación vegetativa del pejibaye

6. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados del presente estudio se plantean las siguientes recomendaciones:

- 1 Emplear ápices con 1 mm de tejido sub-apical y aplicar doble desinfección con NaOCl (3 y 0,2 % respectivamente)
- 2 Realizar estudios con el fin de identificar los factores que determinan la capacidad organogénica mostrada por el material juvenil en el cultivo de ápices, especialmente para el caso de la organogénesis del tipo 1
- 3 Efectuar estudios con el fin de evitar la oxidación e incrementar la tasa de crecimiento de los ápices en la fase de establecimiento
- 4 Realizar estudios con el fin de acortar el tiempo necesario para inducir brotes laterales en ápices mediante el regulador de crecimiento BA (benciladenina; organogénesis tipo 5)
- 5 Efectuar estudios histológicos de la ontogenia de los brotes laterales inducidos con BA, así como estudios citológicos y de campo, para comprobar la identidad genotípica del material propagado in vitro
- 6 Emplear medio con 0,15 % de Gelrite como gelificante y 0,3 % de CA (carbón activado) como adsorbente para el establecimiento de espigas
- 7 Continuar los ensayos con explantes florales con el fin de invertirlos a estado vegetativo

7. BIBLIOGRAFIA

- AHEE, J. ; ARTHUIS, P. ; CAS, G. ; DUVAL, Y. ; GUENIN, G. ; HANOVER, J. ; HANOVER, P. ; LIEVOUX, D. ; LIORET, C. ; MALAURIE, B. ; PANNETIER, C. ; RAILLOT, D. ; VARECHON, C. ; ZUCKERMAN, L. 1981 La multiplication végétative in vitro du palmier à huile par embryogénèse somatique Oléagineux (Francia) 36(3):113-118
- APAVATJRUT, P. ; BLAKE, J. 1977 Tissue culture of stem explants of coconut (Cocos nucifera L.) Oléagineux (Francia) 32(6) 267-271
- ARIAS, M. O. 1979 Efecto del flurenol en la producción de hijos laterales de pejibaye (Bactris gasipaes H B K) Agro-nomía Costarricense (C R) 3(1):47-52
- ; HUETE, V.F. 1983 Propagación vegetativa in vitro de pejibaye (Bactris gasipaes H B K) Turrialba (C R) 33(2):103-108
- 1985 Propagación vegetativa por cultivo de tejidos del pejibaye (Bactris gasipaes H B K) Asbana (C R) 24(9):24-27
- BAKRY, F. ; LAVARDE-GUIGNARD, F. ; ROSSIGNOL, L. ; DEMARLY, Y. 1985 Développement de pousses végétaives à partir de la culture in vitro d'explants inflorescentiels de bananiers Fruits (Francia) 40(7-8):459-465
- BALAGA, H. Y. ; DE GUZMAN, E. V. 1970 The growth and development of the coconut 'makapuno' embryos in vitro II Increased root incidence and growth response to media composition and to sequential culture from liquid to solid medium Philipp Agric (Filipinas) 53:551-565
- Citado por: Tisserat, B. 1983
- BARACALDO, A. R. 1980. El chontaduro o cachipay un cultivo promisorio de América Intertropical Bogotá, Col Ministerio de Agricultura 45 p
- BASS, A. ; HUGHES, W. 1984 Conditions for isolation and regeneration of viable protoplast of oil palm (Elaeis guineensis) Plant Cell Reports (EE UU) 3(5):169-171.
- BEELEN, J. s f Introductory course on in vitro culture Department of Tropical Crop Science, Agricultural University International Agricultural Center Wagennigen, The Netherlands s n t 84 p

- BIONDI, S ; THORPE, T A 1982 Clonal propagation of forest tree species In Tissue Culture of Economically Important Plants. International Symposium (1982, Singapore) Proceedings Edited by A N Rao Singapore, COSTE/UNESCO/SBIOL p 197-204
- BIAAK, G 1980 Vegetative propagation of pejibaye (Bactris gasipaes H B K) Turrialba (C R) 30(3):258-261
- BLAKE, J 1966 Flower apices cultured in vitro Nature(U K) 211(5052):990-991
- BLAKE, J ; EEUWENS, C J 1982 Culture of coconut palm tissues with a view to vegetative propagation In Tissue Culture of Economically Important Plants; International Symposium (1982, Singapore) Proceedings Edited by A N Rao Singapore, COSTE/UNESCO/SBIOL p 145-148
- BONGA, J M 1982 Vegetative propagation of mature trees by tissue culture In Tissue Culture of Economically Important Plants; International Symposium (1982, Singapore) Proceedings Edited by A N Rao Singapore, COSTE/UNESCO/SBIOL p 191-196
- BRANTON, R ; BLAKE, J 1983 A lovely clone of coconut New Scientist (U.K) 98(1359):554-557
- ; ----- 1983. Development of organized structures in callus derived from explants of Cocos nucifera L. Annals of Botany (U.K.) 52(4):673-678
- CAMACHO, V E 1972. El pejibaye (Guilielma gasipaes (B K) L H Bailey). In Simposio Internacional sobre Plantas de Interés Económico de la Flora Amazónica (1972, Belém, Bra) [Trabajos presentados] Ed. por IICA-Trópicos Turrialba, C R p. 101-106.
- CENTRO DE INVESTIGACIONES EN PRODUCTOS NATURALES 1986 Aprovechamiento industrial del pejibaye (Bactris gasipaes); San José, C R Universidad de Costa Rica 302 p
- CHAVERRI, J Y 1984 Efecto de diferentes fuentes y niveles de nitrógeno en el medio nutritivo para el cultivo in vitro de ápices de pejibaye (Bactris gasipaes H B K) Tesis Ing Agr San José, C R., Universidad de Costa Rica 63 p
- CHAVES, J M ; PECHNIK, E ; MATTOSO, E I V 1948 Pupunha (Guilielma speciosa Mart.); Estudo da constituição química e do valor alimenticio Revista de Química Industrial (Bra) 17(198):186-187

- CHOO, K W ; YEW, CH W ; CORLEY, R H V 1982: Tissue culture of palms: A review In Tissue Culture of Economically Important Plants; International Symposium (1982, Singapore) Proceedings Edited by A N Rao Singapore, COSTE/UNESCO/EBIOL. p 138-144
- 1984 Palm tissue culture In FAO/NORWAY Symposium on Plant Tissue Culture, Technology and Utilization (1984, As, Noruega) Micropropagation of selected rootcrops, palms citrus and ornamental species; Proceedings. FAO Plant Production and Protection Paper no 59 p. 88-112
- CLEMENT, CH R ; ARKCOLL, D B. 1985 El Ractris gasipaes H B K Palmae como cultivo oleaginoso potencial y prioridades de investigación Bogotá, Col s n 11 p
- Presentado en : Seminario-Taller sobre oleaginosas promisorias PIRB/INTER-CIENCIA, Bogotá, Col. 1985.
- ; MORA-URPI, J ; PATIÑO, V M 1985 Introducción al chontaduro; resumen del estado de su conocimiento Bogotá, Col s.n. 12 p
- Presentado en : Seminario-Taller sobre oleaginosas promisorias PIRB-INTER-CIENCIA, Bogotá, Col 1985
- CONGER, B V ; MCDONNELL, R E 1983 Plantlet formation from cultured inflorescences of Dactylis glomerata L Plant Cell, Tissue and Organ Culture (EE UU.) 2(3):191-197
- CONSTANTIN, M J.; HENKE, R R.; MANSUR, M A 1977 Effect of activated charcoal on callus growth and shoot organogenesis in tobacco In Vitro (EE UU) 13(5):293-296
- COOZ, S A. 1984. Efecto de la sustitución de maíz por harina de pejibaye en dietas para pollas de reemplazo durante la etapa de iniciación Tesis Ing Agr San José, C R Universidad de Costa Rica 47 p
- CORLEY, R.H V ; BARRET, J.N.; JONES, L.H 1977 Vegetative propagation of oil palm via tissue culture Oil Palm News (U.K.) no. 22:2-7
- CRONAUER, S S ; KRIKORIAN, A D 1985 Reinitiation of vegetative growth from aseptically cultured terminal floral apex of banana American Journal of Botany (EE UU.) 72(10) :1598-1601
- CUTTER, V ; WILSON, K 1954. Effects of coconut endosperm and their growth stimulants upon the development in vitro of embryos of Cocos nucifera Bot Gaz (EE.UU.) 115:234-240.

- B. AMATO, F. 1978 Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants *In* *Frontiers of Plant Tissue Culture* Ed by T A Thorpe Calgary, Can. International Association Plant Tissue Culture p 287-295
- DAVIS, T A 1978 Some unusual formations in palms *Principes* (EE UU.) 23(2):80-83
- ; SUDASRIP, H ; AZIS, H 1981 Bulbil-shoot production from clonally propagated coconuts. *Principes* (EE UU) 25(3):124-129
- 1982 Propagation of the coconut *In* *Tissue culture of economically important plants; International Symposium (1982, Singapore) Proceedings* Edited by A N Rao Singapore, COSTE/UNESCO/SBIOL p 302-303
- DE GUZMAN, E V ; DEL ROSARIO, A G 1964 The growth and development of *Cocos nucifera* L 'makapuno' embryo *in vitro* *Philipp Agric. (Filipinas)* 48:82-94
- Citado por : Tisserat, B 1983b
- : ----- 1979 Vegetative shoot development and formation in coconut inflorescence tissues cultured *in vitro* *In* *FAO Technical Working Party of Coconut Production, Protection and Processing (5., 1979, Filipinas)* [Resúmenes] FAO p 1-2 Solo sumario
- ; -----; UBALDE, E M 1978 Proliferative growths and organogenesis in coconut embryo and tissue cultures *The Philippine Journal of Coconut Studies* (Filipinas) 3: 1-10
- DEL ROSARIO, A G ; DE GUZMAN, E V 1976 The growth of coconut "makapuno" embryos *in vitro* as affected by mineral composition and sugar level of the medium during the liquid and solid cultures *The Philippine Journal of Science* (Filipinas) 105(4):215-222
- ; ----- 1982 The status of plant tissue culture of economically important plants *In* *Tissue Culture of Economically Important Plants; International Symposium (1982, Singapore) Proceedings* Edited by A N Rao Singapore, COSTE/UNESCO/SBIOL p 293-294
- DREW, R L K. 1979 Effect of activated charcoal on embryogenesis and regeneration of plantlets from suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) *Annals of Botany* (U K) 44:387-389

LEIRA N BENBADIS, A 1983 Multiplication végétative du palmier dattier (Phoenix dactylifera L) par la culture in vitro de bourgeons axillaires et défeuilles qui en dérivent In C R Acad. Sci. Paris 296, ser III p 1077-1087

Citado por : Salazar, S.S 1986

----- 1985 Multiplication végétative du palmier dattier (Phoenix dactylifera L) par réversion en culture in vitro, d' ébauches florales de pieds femelles Journal Plant Physiology (Alemania) 119:227-235

DUNSTAN, D I ; SHORT, K C 1979. Shoot production from the flower head of Allium cepa L Scientia Horticulturae (Holanda) 10(4):345-356.

EEUWENS, C.J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (Cocos nucifera) and cultured in vitro Physiologia Plantarum (Dinamarca) 36(1) 23-28.

----- ; BLAKE, J 1977 Culture of coconut and date palm tissue with a view to vegetative propagation Acta Horticulturae (U.K.) 78:277-286

----- 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 (Dinamarca) 42(2):173-178

EL-HENNAWY, H.M ; WALLY, Y.A 1980 Vegetative propagation of date palm Phoenix dactylifera L by explant culture in vitro Egypt J Hort (Egipto) 7(2):211-220

FISHER, J B. ; TSAI, J H. 1978 In vitro growth of embryos and callus of coconut palm In Vitro (EE UU) 14(3):307-311

----- ; ----- 1979 A branched coconut seedling in tissue culture. Principes (EE.UU) 23(3):128-131

FOURNIER, A L s f Pejibaye (Guilielma gasipaes (H B K) L H.Bailey) San José, C R s n t 14 p

FRIDBORG, G ; PEDERSEN, M ; LANDSTROM, L ; ERIKSSON, T 1978 The effect of activated charcoal on tissue cultures: Adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis Physiologia Plantarum (Dinamarca) 43(2):104-106

GAER, M F ; TISSERAT, B 1985 Propagating palms in vitro with special emphasis on the date palm (Phoenix dactylifera L) Scientia Horticulturae (Holanda) 25(3):255-262

- GANAPATHY, P S 1969 Floral morphogenesis and flowering in aseptic cultures of Browalia demissa L. *Biologia Plantarum* (Checoslovaquia) 11(2):165-174
- GONZALES, G ; DOMINGUEZ, R 1977 Sistemas de propagación del chontaduro (Guilielma gasipaes, B) Tesis Ing. Agr. Palmira, Col., Universidad Nacional de Colombia 60 p
- GUPTA, P K ; KENDURKAR, S V ; KULKARNI, V M ; SHIRGURKAR, M V ; MASCARENHAS, A F 1984. Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (Cocos nucifera L.) in vitro *Plant Cell Reports* (EE UU) 3(6):222-225
- HAMMOND, E.G ; PAN, W.P ; MORA-URPI, J 1982 Fatty acid composition and glyceride structure of the mesocarp and kernel oils of the pejibaye palm (Ractris gasipaes H.B.K) *Revista de Biología Tropical* (C R) 30(1):91-93.
- HASEGAWA, S ; MAIER, V P 1980 Polyphenol oxidase of dates *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (EE.UU) 28(5): 891-893
- HICKS, G S ; SUSSEX, I M. 1969 Development in vitro of excised flower primordia of Nicotiana tabacum. *Canadian Journal of Botany* 48:133-139
- HIRAOKA, N ; NOBUYUKI, Y ; KODAMA, T ; TOMITA, Y 1984 In vitro propagation of Atractylodes lancea *Plant Cell Reports* (EE UU) 3(3):85-87.
- HUETE, V F ; ARIAS, M O 1981 Propagación vegetativa del pejibaye *Asbana* (C R) 5(14):10-13
- IYER, R D 1982. Embryo and tissue culture for crop improvement, specially of perennials, germplasm conservation and exchange In Tissue Culture of Economically Important Plants; International Symposium (1982, Singapore) *Proceedings* Edited by A N Rao Singapore, COSTE/UNESCO/SBIOL p 219-230
- IZQUIERDO, J.A s f Análisis e interpretación estadística en la experimentación in vitro Chillan, Chile s n t 31 p
- JONES, L H 1974 Propagation of clonal oil palms by tissue culture *Oil Palms News* (U.K) no 17:1-8
- JOHANNESSEN, C.L 1967 Pejibaye palm; Physical and chemical analysis of the fruit. *Economic Botany* (EE UU) 21(4):371-378
- KOVOOR, A 1981 Palm tissue culture; state of the art and its application to the coconut Roma, FAO 69 p (FAO Plant Production and Protection Paper no 30)

Presentado en : The fifth session of the FAO Technical Working Party on Coconut Production, Protection and Processing , Manila, Filipinas, 1979

- KRIKORIAN, A D ; KANN, R P 1986 Oil Palm improvement via tissue culture Plant Breeding Reviews (EE UU) 4:175-202
- LIORET, C ; OLLAGNIER, M. 1981 La culture in vitro de tissus chez le palmier à huile. Oléagineux (Francia) 36(3):111-112
- LITZ R E ; JARRET, R L 1986? Organogénesis y embriogénesis somática Homestead (EE UU), Tropical Research and Education Center, University of Florida 46 p
- MARTIN, J P ; RABECHAUULT, H 1978 Procède de multiplication végétative de végétaux et plants ainsi obtenus Brevet D'Invention no. 76, 28361, Institut National de la Propriété Industrielle, Paris s p
- Citado por : Paranjothy, K 1984
- MOHAN, H Y ; WADHI, M 1968 Morphogenic potentialities of flower buds of Kalanchoe pinnata Pers grown in vitro Annals of Botany (U K.) 32(128):825-831
- MORAN, R M J 1983 Posibilidad de utilizar las técnicas in vitro en algunas palmeras de la Amazonía Peruana In FAO (C R)/CATIE. Reunión de consulta sobre palmeras poco utilizadas de América Tropical (1983, Turrialba, C R) 1984 [Informe] San José, C.R p. 161-162
- MORA-URPI, J 1981 El ciclo de floración en pejíbave (Bactris gasipaes H B K) y su posible manejo agronómico Agronomía Costarricense (C R) 5(1/2):115-119
- 1982 Composición química del aceite de pejíbave Asbana (C R) 6(18):19-20
- 1983. El pejíbave (Bactris gasipaes H B K): Origen ,biología floral y manejo agronómico In FAO(C R)/CATIE Reunión de consulta sobre palmeras poco utilizadas de América Tropical (1983, Turrialba, C R) 1984 [Informe] San José, C.R p 118-160
- , TOSI, O J 1983. Report on the feasibility of producing pejíbave in the chapare region of Bolivia San José, C R USAID (Bolivia) 47 p
- ; VARGAS, E ; LOPEZ, C A ; VILLAPLANA, M ; ALLON, G ; BLANCO, C 1984 The pejíbave palm (Bactris gasipaes H B K) San José, C R FAO/Universidad de Costa Rica/Banco Nacional de Costa Rica 16 p

- MULLER, L ; KRIKORIAN, A D 1985 Glosario de los términos más frecuentes empleados en el cultivo de tejidos vegetales Ed preliminar. Turrialba, C R , Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. s p (Serie Técnica. Boletín Técnico CATIE; no 15)
- MURASHIGE, T ; SKOOG, F 1962 A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 15(3):473-497
- 1974 Plant propagation through tissue cultures *Ann Rev Plant Physiology* (EE UU.) 25:135-166.
- MURILLO, R M ; KRONEBERG, A ; MATA, J F ; CALZADA, J G ; CASTRO, V 1983 Estudio preliminar sobre factores inhibidores de enzimas proteolíticas en la harina de pejibaye (Bactris gasipaes). *Revista de Biología Tropical* (C R) 31(2):227-231
- NITSH, J.P 1963 The in vitro culture of flowers and fruits. In Plant tissue and organ culture; A symposium (1961, India) [Trabajos presentados] Edited by P Maheshwari; N.S Ranga Swamy Delhi, India, UNESCO/University of Delhi p 198-214
- NOIRET, J M ; GASCON, J P ; PANNETIER, C 1985 La production de palmier à huile par culture in vitro Oléagineux (Francia) 40(7):365-372
- NWANKWO, B A. ; KRIKORIAN, A.D 1983 Morphogenetic potential of embryo and seedling derived callus of Elaeis guineensis Jacq var pisifera Becc *Annals of Botany* (U K) 51(1): 65-76
- PANNETIER, C ; ARTHUIS, P ; LIEVOUX, D 1981 Néof ormation de jeunes plantes d' Elaeis guineensis a partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés in vitro Oléagineux (Francia) 36(3):119-122
- ; BUFFARD-MOREL, J 1982 Premiers résultats concernant la production d'embryons somatiques à partir de tissus foliaires de cocotier, Cocos nucifera L Oléagineux (Francia) 37(7):349-354
- PARANJOTHY, K 1984 Oil palm In Handbook of Plant Cell Culture Ed by W Sharp, D A Evans, P V Ammirato, Y Yamada. New York, Macmillan Publishing Company v 2 p. 591-605
- PASBERG-GAUHL, C 1986 Propagación vegetativa del pejibaye (Bactris gasipaes H.B.K.) por cultivo de tejidos Turrialba, C R Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE 12 p Mimeografiado

- PATIÑO, V M 1960 Historia colonial y nombres indígenas de la palma pijibay (Guilielma gasipaes (H B K) Bayley. Revista Colombiana de Antropología (Col) 9:25-72
- PEREZ, V J M 1983 Palmeras de la zona de Yurimaguas, Perú In FAO (C R.)/CATIE Reunión de consulta sobre palmeras poco utilizadas de América Tropical (1983, Turrialba, C R) 1984 [Informe] San José, C R p 165-166.
- POPENOE, W. ; JIMENEZ, O 1921 The pejibaye a neglected food-plant of tropical America The Journal of Heredity (EE UU) 12(4):154-166
- PRANCE, G T ; SILVA, M F 1975 Arvores de Manaus Manaus, Bra Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia. 312 p
- PROPAGACION VEGETATIVA del pejibaye (Bactris gasipaes H B K); Propagación por hijuelos 1986. In Sattler, Z.R. Reconocimiento de nuevas fuentes de aceite y grasa a partir de palmas oleaginosas nativas del trópico húmedo Americano Turrialba, C R , CATIE p 3-9
- RABECHAUULT, H ; AHEE, J ; GUENIN, G 1970 Colonies cellulaires et formes embryoides obtenues in vitro à partir de cultures d'embryons de palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq var. dura Becc) C R Acad Sc Paris Séries no 270 p 3067-3070
- ; MARTIN, J P ; CAS, S 1972 Reserches sur la culture des tissus de palmier a huile (Elaeis guineensis Jacq) Oléagineux (Francia) 27(11):531-534
- RAJU, C R ; PRAKASH, K.P. ; CHANDRAMOHAN, M ; IYER, R D 1984. Coconut plantlets from leaf tissue cultures Journal of plantation Crops (Short Scientific Reports) (India) 12(1): 75-78
- RECORDS EXPERIMENTAL designs and statistical analysis of data 1976. In de Fossard, R A Tissue culture for plant propagators New England, Australia, Universidad of New England p 95-131.
- REUVENI, O ; LILLEN-KIPNIS, H 1969 Date palm Volcani Institute Agric Res Div Sci Publ Pam (1960-69), Bet Dagan, Israel p 143-180
- Citado por: Tisserat, B 1984
- REYNOLDS, J ; MURASHIGE, T 1979 Asexual embryogenesis in callus cultures of palms In Vitro (EE UU) 15(5):383-387
- 1982 Vegetative propagation of palm trees In Tissue Culture in Forestry Ed by J M Bonga, D V Durzan. Boston, EE UU Martinus Nijhoff/Dr W Junk Publishers p 182-207

- RHISS A ; POULAIN, C ; BEAUCHESNE, G 1979. La culture in vitro appliquée à la multiplication végétative du palmier-dattier (Phoenix dactylifera L.) Fruits (Francia) 34(9): 551-554
- SAAIDI, M ; DUVAUCHELLE, G ; TOUTAIN, G 1979. Multiplication du palmier-dattier; Etude de quelques facteurs conditionnant la reprise végétative des réjets de palmier-dattier Fruits (Francia) 34(9):555-561
- SALAZAR, S S 1986. The effect of 2,4-D, light and activated charcoal on offshoot-tip culture of the pejibaye palm (Bactris gasipaes H.B.K.). Tesis Mag Sc Birmingham, U K, University 70 p
- SASS J E 1958 Botanical microtechnique 3 ed Iowa, EE UU The Iowa State University Press 228 p
- SCHROEDER, C A 1970 Tissue culture of date shoots and seedlings Date Growers' Institute Report 27:25-27
- Citado por : Tisserat, B 1983
- SCHWABE, W W 1984 Scope and possibilities of tissue culture techniques In FAO/NORWAY Symposium on Plant Tissue Culture, Technology and Utilization (1984, As, Noruega) Micropropagation of selected rootcrops, palms, citrus and ornamental species; Proceedings FAO Plant Production and Protection Paper no 59 p 11-23
- SHABDE-MOSES, M ; MURASHIGE, T 1979. Organ cultures In Plant Cell and Tissue Culture (1979, New York, EE UU) [Trabajos presentados] New York, Tissue Culture Association v 1 p 5 28-5 43
- SHARMA, D R ; KUMARI, R ; CHOWDHURY, J.B 1980. In vitro culture of female date palm (Phoenix dactylifera L.) tissues Euphytica (Holanda) 29(1):169-174
- SMITH, B G 1984 Tissue culture of Cocos nucifera; Biochemical changes preceding embryogenesis s.l Unilever Research, Bedford, U.K. 5 p
- SMITH, W K ; THOMAS, J A 1973 The isolation and in vitro cultivation of cells of Elaeis guineensis. Oléagineux(Francia) 28(3):123-127
- Citado por: Choo, et al 1982
- SOH, A C 1986 Expected yield increase with selected oil palm clones from current DXP seedling materials and its implications on clonal propagation, breeding and ortet selection Oléagineux (Francia) 41(2):51-56

- SRINIVASAN, C ; LITZ, R E ; BARKER, J ; NORSTÖG, K 1985 Somatic embryogenesis and plantlet formation from christmas palm callus HortScience (EE UU) 20(2):278-280
- STARITSKY, G 1970 Tissue culture of the oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) as a tool for its vegetative propagation Euphytica (Holanda) 19(3):288-292
- SUDASRIP, H 1980 Reversal of Arenca pinnata spadices into vegetative shoots and its relevance to the origin of coconut bulbils Principes (EE UU.) 24(4):147-153
- TEIXEIRA, J B 1985 Multiplicação vegetativa de macaúba por cultura de tecidos Palmeiras Uteis da América Tropical (Bra.) no 1:9-10
- 1985 Propagação clonal de dendê Brasília, Bra., Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [17]-p
- TEPPER, S S ; GREYSON, R I ; GRAIG, W R ; HINDMAN, J L 1963 in vitro culture of floral buds of Aquilegia American Journal of Botany (EE UU.) 50:1035-1045
- ; KARPOFF, A J ; GREYSON, R I 1966 Effects of growth substances on excised floral buds of Aquilegia American Journal of Botany (EE UU.) 53(2):148-157
- THORPE, T A ; PATEL, K R 1984 Clonal propagation Adventitious buds In Cell Culture and Somatic Cell Genetics of plants Ed by Indra K Vasil Orlando, Fla., EE UU Academic Press v 1, p 49-60
- TISSERAT, B. 1979a Propagation of date palm (Phoenix dactylifera L.) Journal of Experimental Botany (U K.) 30(119) 1275-1283
- 1979b Tissue culture of the date palm The Journal of Heredity (EE UU.) 70(3):221-222
- ; FOSTER, G ; DEMASON, D 1979 Plantlet production in vitro from Phoenix dactylifera L. Date Growers' Institute Report 54:19-23
- ; DEMASON, D A 1980 A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of Phoenix dactylifera L. Annals of Botany (U K.) 46(4):465-472
- 1981a Date palm tissue culture Estados Unidos Agricultural Research Service Western Series no 17 50 p.
- 1981b Production of free living date palms through tissue culture. Date Journal (Iraq) 1(1):43-54.

- ; ULDRICH, J M ; FINKLE, B J 1981. Cryogenic preservation and regeneration of date palm tissue HortScience (EE UU) 16(1):47-48
- 1982 Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures Euphytica (Holanda) 31(1):201-214
- 1983a Asexual embryogenesis in palms In Vitro (EE UU) 19(3):237 Solo sumario
- 1983b Development of new tissue culture technology to aid in the cultivation and crop improvement of date palms In Symposium on the Date Palm (1982, Al-Hassa, Arabia Saudita) Proceedings Al-Hassa, Arabia Saudita, King Faisal University p. 126-139
- 1983c Tissue culture of date palms; A new method to propagate an ancient crop and a short discussion of the California date industry Principes (EE UU) 27(3):105-117
- 1984a Clonal propagation; Palms In Vasil Indra K Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants Vol 1 Laboratory procedures and their applications Department of Botany, University of Florida Gainesville, Florida p 825
- 1984b Date palm In Handbook of Plant Cell Culture Ed by W R Sharp, D A Evans, P V Ammirato, Y Yamada New York Macmillan Publishing Company v 2 p. 505-545
- 1984c Propagation of date palms by shoot tip cultures HortScience (EE UU) 19(2):230-231.
- TISSUE CULTURE of the oil palm (Elaeis guineensis Jacq) 1970 In Centre for Agriculture Research in Surinam Report for Agricultural Research in Surinam Report for the Year 1970 State Agricultural University (Holanda) Celos Bulletins no 13 p 10-11
- TORRES, A C ; PAVIANI, T I ; CALDAS, L S ; VECCHIA, P T D 1980 Anatomy of shoot production in vitro from explants of cauliflower curd (Brassica oleracea L Var Botrytis subvar cauliflora DC) Pesquisa Agropecuária Brasileira (Bra) 15(4):435-440
- ; VECCHIA, P T D ; SOUZA, E L S ; CALDAS, L C 1980 Propagação vegetativa de brócolos (Brassica oleracea L. var italica) por meio da cultura de tecidos, visando a manutenção de linhagens auto-incompatíveis Revista Ceres (Bra) 27(149):83-90

- TRACY, M. D. 1985 The pejibaye fruit; Problems and prospects for its development in Costa Rica Tesis Ms Ar Texas, EE UU, University of Texas at Austin 110 p
- 1986? Harina de pejibaye (Bactris gasipaes H B K) utilizada en la panificación San José, C R s.n 12 p
- TRAN THANH VAN, M 1973 Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of Nicotiana tabacum L Planta (Alemania) 115:87-92
- VALLE, B L 1986 Descriptores de la inflorescencia de pejibaye (Bactris gasipaes H B K) de 4 poblaciones y sus implicaciones filogenéticas Tesis Lic Bio San José, C R. Universidad de Costa Rica 94 p
- VALVERDE, M E 1986 Descriptores de la flor de pejibaye (Bactris gasipaes H B K) en cuatro poblaciones y sus posibles implicaciones filogenéticas Tesis Lic Bio San José, C R, Universidad de Costa Rica 90 p
- VALVERDE R ; ARIAS, O 1986a Efecto de la luz sobre la morfogénesis de tejidos de pejibaye cultivados in vitro In Congreso de la Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas-Región Tropical (33, 1986, San José, C R) [Trabajos presentados] Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica/ASHS /CATIE San José, C R v 1 p 356-357 Solo sumario
- ; ----- 1986b Efecto del picloran sobre la morfogénesis del pejibaye (Bactris gasipaes H B K) in vitro In Congreso de la Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas-Región Tropical (33, 1986, San José, C R) [Trabajos presentados] Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica /ASHS/CATIE San José, C R v 1 p 358-359 Solo sumario

8 ANEXO

Quadro 1A Cuadrados medios estimados para porcentajes de contaminación de ápices caulinares (Experimentos 1a y 1b)

F V	G L	Porcentaje de contaminación (+)
Tamaño de vástago (A)	2	1,75 **
Desinfectante (B)	2	0,04 N S
Interacción (AxB)	4	0,12 N S
Error	27	0,13
C V (%)		34,66
Tamaño de tejido sub-apical (C)	2	2,17 **
Concentración de NaOCl (D)	2	0,08 N S
Interacción (CxD)	4	0,21 *
Error	24	0,07
C V (%)		35,65

(**) : Diferencia altamente significativa (alfa < 0,01)

(*) : Diferencia significativa (alfa = 0,034)

(+) : Los porcentajes fueron transformados mediante la fórmula $\text{arc sen } \sqrt{X/100}$, donde X = % de contaminación

Cuadro 2A Pruebas de Duncan del porcentaje de contaminación de ápices caulinares (*) (Experimentos 1a y 1b)

Tamaño de vástago (Experimento 1a)			Desinfectantes (Experimento 1a)	
Grande	40,91	(a)	Saniclor	71,98 (a)
Mediano	70,69	(b)	HTH	65,14 (a)
Pequeño	94,26	(c)	Savlon	68,68 (a)

Concentración de NaOCl (Experimento 1b)			Tamaño tej sub-apical (Experimento 1b)	
1 %	53,17	(a)	3 mm	65,00 (a)
2 %	45,87	(a)	1 mm	61,50 (a)
3 %	41,90	(a)	1 mm (+)	14,37 (b)

- (*) : Las diferencias entre promedios con igual letra no son significativamente diferentes (alfa = 0,05)
- (+) : Doble desinfección

Cuadro 3A Cuadrados medios estimados para diámetro, número de protuberancias, número de brotes y longitud de raíces de ápices caulinares de pejibaye después de siete meses de cultivo (Experimento 2)

F. V.	G. L.	Diámetro de ápices (mm)	Número de protuberancias (+) (+)	Número de brotes (+) (+)	Longitud de raíces (cm)
Dosis de BA	3	8,12 NS	0,81 *	0,32 NS	1,98 *
Bloque	10	32,40 *	0,17 NS	0,24 NS	0,90 NS
Error	30	11,60	0,27	0,25	0,47
C. V. (%)		34,70	38,21	42,56	53,41

(*) : Diferencia significativa (alfa = 0,05)

(+) : Los datos fueron transformados con la fórmula $\sqrt{X+1}$ donde X = valor original

Cuadro 4A Cuadrados medios estimados para oxidación y peso de espigas en función de su estado de desarrollo, consistencia del medio y presencia de luz después de dos meses de cultivo (Experimento 3a)

	G L	Oxidación (+)	Peso (mg)
Tamaño de espiga (A)	2	2,04 **	196,49 **
Consistencia del medio (B)	1	33,72 **	146,16 *
Presencia de luz (C)	1	0,04 NS	126,10 *
<u>Interacciones</u>			
AB	2	5,52 **	6,27 NS
AC	2	0,85 *	156,52 **
BC	1	0,35 NS	29,8 NS
ABC	2	0,57 NS	4,6 NS
Error		0,22	27,16
C V (%)		37,23	52,44

(**) Diferencia altamente significativa (alfa < 0,01)

(*) : Diferencia significativa (alfa < 0,05)

(+) : Los datos fueron transformados con la fórmula $\sqrt{X+1}$ donde X = calificación de la oxidación (0 a 4)

Cuadro 5A. Cuadrados medios estimados para peso (mg) de flores masculinas después de dos meses de cultivo (Experimento 4a)

	G. L	Peso (mg)
Nivel BA (A)	2	401,67 **
Nivel AIB (B)	2	149,89 **
Nivel 2.4-D (C)	1	108,47 NS
<u>Interacciones</u>		
AB	4	79,17 *
AC	2	15,10 NS
BC	2	373,76 **
ABC	4	53,58 NS
Error	340	
<u>Contrastes</u>		
A-lineal	1	798,27 **
A-cuadrático	1	4,14 NS
B-lineal	1	8,20 NS
B-cuadrático	1	287,77 **
C-lineal	1	260,83 **

(**) : Diferencia altamente significativa (alfa = 0,01)

(*) : Diferencia significativa (alfa < 0,05)

C V = 72,24 %

Quadro 6A Pruebas de Duncan de la oxidación y peso de espigas por efecto del tamaño de espigas, consistencia del medio y presencia de luz después de dos meses de cultivo (Experimento 3a)

	Oxidación (+)	Peso (mg)
<u>Tamaño de espiga</u>		
Grande	1,48 (a)	13,46 (a)
Mediana	1,19 (b)	9,94 (ab)
Pequeña	1,08 (b)	6,42 (b)
<u>Consistencia del medio</u>		
Líquido	1,73 (a)	8,19 (a)
Gelificado	0,76 (b)	11,68 (b)
<u>Presencia de luz</u>		
Luz	1,27 (a)	11,56 (a)
Oscuridad	1,23 (a)	8,32 (b)

- (*) Las diferencias entre valores que tengan igual letra no son significativamente diferentes (alfa = 0,05)
- (+) Los datos fueron transformados con la fórmula $\sqrt{X+1}$ donde X = calificación de la oxidación (0 a 4)

Cuadro 7A. Pruebas de Duncan de la oxidación y peso de espigas por efecto de medios basales y antioxidantes después de dos meses de cultivo (Experimento 3b)

	Oxidación (+)	Peso (mg)
MS, líquido con caseína	2,00 (a)	3,75 (a)
Y3, líquido con caseína	1,88 (a)	3,63 (a)
Y3, líquido sin caseína	1,87 (a)	2,38 (a)
MS, CA 0,1 %	1,11 (b)	13,08 (a)
MS, CA 0,2 %	0,62 (c)	10,96 (b)
MS, CA 0,3 %	0,20 (d)	48,45 (a)

(*) : Las diferencias entre valores que tengan igual letra no son significativamente diferentes (alfa = 0,05)

(+) : Los datos fueron transformados con la fórmula $\sqrt{X+1}$ donde X = calificación de la oxidación (0 a 4)