

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**FORMACIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO EN PALMA
DATILERA (*Phoenix dactylifera* L.) A PARTIR DE
INFLORESCENCIAS FEMENINAS INMADURAS**

Presentada por:

DIANA GÓMEZ ZAMUDIO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO

Lima – Perú

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

FORMACIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO EN PALMA DATILERA

(*Phoenix dactylifera* L.) A PARTIR DE INFLORESCENCIAS

FEMENINAS INMADURAS

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO

Presentada por:

DIANA GÓMEZ ZAMUDIO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

M.Sc. Aldo Ceroni Stuva

PRESIDENTE

M.Sc. Mercedes Flores Pimentel

MIEMBRO

M.Sc. Viviana Castro Cépero

MIEMBRO

M.Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa

PATROCINADORA

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), quién financió este proyecto de acuerdo al contrato 227-FINCyT-IA-2013, al Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNALM, al Laboratorio de Dobles Haploides del Programa de Investigación y Proyección Social en Cereales y Granos Nativos de la UNALM, a mi familia y amigos.

I. ÍNDICE

	Pág.
I. ÍNDICE	1
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE ANEXOS	8
II. RESUMEN	9
III. INTRODUCCIÓN	11
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	13
4.1 TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	13
4.2 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	17
4.2.1 ORIGEN Y SIGNIFICADO DE LA PALMA DATILERA PARA LAS POBLACIONES	17
4.2.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	18
4.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y PRODUCCIÓN MUNDIAL	20
4.4 CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE PALMA DATILERA EN PERÚ	23
4.5 PROPAGACIÓN DE LA PALMA DATILERA	26
4.5.1 PROPAGACIÓN VEGETATIVA	26
4.5.2 PROPAGACIÓN IN VITRO	27
4.6. EMBRIOGÉNSIS SOMÁTICA	28
4.7 FACTORES QUE AFECTAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	30

4.7.1 EXPLANTE	30
4.7.2 MEDIO DE CULTIVO	31
4.7.3 REGULADORES DE CRECIMIENTO	33
V. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1 MATERIAL DE LABORATORIO	35
5.1.1 EQUIPOS DE LABORATORIO	35
5.1.2 INSTRUMENTOS DE LABORATORIO	35
5.1.3 REACTIVOS	35
5.1.4 ANTIBIÓTICO	36
5.1.5 MATERIAL VEGETAL PARA LA PROPAGACIÓN	37
5.1.6 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS	38
5.2 FASE DE INICIACIÓN DEL CULTIVO IN VITRO	39
5.2.1 DESINFECCIÓN EXTERNA E INTERNA	39
5.3 FASE DE INDUCCIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO	41
5.3.1 MEDIO I (ABUL-SOAD Y MAHDI, 2010)	41
5.3.2 MEDIO II (ABUL-SOAD, 2012)	42
5.3.3 MEDIO III (IBT, 2013)	42
5.4 FASE DE MADURACIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO	43
5.4.1 MEDIO I (ABUL-SOAD Y MAHDI, 2010)	43
5.4.2 MEDIO II (ABUL-SOAD, 2012)	44
5.4.3 MEDIO III (IBT, 2013)	44
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1 RESULTADOS	46

6.1.1 FASE DE INICIACIÓN DEL CULTIVO IN VITRO	46
6.1.2 FASE DE INDUCCIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO	49
6.1.3 FASE DE MADURACIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO	54
6.2 DISCUSIÓN	59
6.2.1 FASE DE INICIACIÓN DEL CULTIVO IN VITRO	59
6.2.2 FASE DE INDUCCIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO	62
6.2.3 FASE DE MADURACIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO	67
VII. CONCLUSIONES	71
VIII. RECOMENDACIONES	72
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
X. ANEXOS	80

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1:	Tipo de explante y reguladores de crecimiento utilizados en las diferentes etapas durante la Embriogénesis Somática en palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	34
Cuadro 2:	Macronutrientes y micronutrientes Murashige & Skoog (MS), Macronutrientes Gamborg et al. (G5)	38
Cuadro 3:	Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación	81
Cuadro 4:	Prueba de Tukey entre las zonas de la espiga (apical, media y basal) para el porcentaje de contaminación	81
Cuadro 5:	Prueba de Tukey entre los tratamientos de hipoclorito de sodio para el porcentaje de contaminación	81
Cuadro 6:	Prueba de Tukey para la interacción entre tratamientos y zonas de la espiga para el porcentaje de contaminación	82
Cuadro 7:	Análisis de varianza para el porcentaje de explantes fenolizados en la fase de iniciación	82
Cuadro 8:	Prueba de Tukey entre las zonas de la espiga (apical, media y basal) para el porcentaje de fenolización	82
Cuadro 9:	Prueba de Tukey entre los tratamientos de hipoclorito de sodio para el porcentaje de fenolización	82
Cuadro 10:	Prueba de Tukey para la interacción entre tratamientos y zonas de la espiga para el porcentaje de fenolización	83
Cuadro 11:	Análisis de varianza para el porcentaje de explantes que formaron callos en los medios de inducción	83
Cuadro 12:	Prueba de Tukey entre los tratamientos utilizados para la inducción de callos	83
Cuadro 13:	Prueba de Tukey entre las zonas de la espiga con respecto a la inducción de callos	83
Cuadro 14:	Prueba de Tukey para la interacción entre tratamientos y zonas de la espiga en la inducción de callos	84
Cuadro 15:	Análisis de varianza para el porcentaje de explantes fenolizados en la fase de inducción de callos	84
Cuadro 16:	Prueba de Tukey entre los tratamientos para el porcentaje de explantes fenolizados en la fase de inducción de callos	84

Cuadro 17:	Prueba de Tukey entre las zonas de la espiga para el porcentaje de explantes fenolizados en la fase de inducción de callos	85
Cuadro 18:	Prueba de Tukey para la interacción entre tratamientos y zonas de la espiga para el porcentaje de explantes fenolizados en la fase de inducción de callos	85
Cuadro 19:	Análisis de varianza para el porcentaje de maduración de callos embriogénicos	85
Cuadro 20:	Prueba de Tukey entre los medios utilizados para la maduración de callos	85
Cuadro 21	Análisis de varianza para el porcentaje de fenolización en la fase de maduración de callos embriogénicos	86
Cuadro 22	Prueba de Tukey para el porcentaje de fenolización en la fase de maduración de callos embriogénicos	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Esquema general <i>Phoenix dactylifera</i> L. (Galán y Castroviejo, 2008)	16
Figura 2:	Inflorescencia masculina y femenina cubiertas por la espata (Zaid y De Wet, 2002a)	17
Figura 3:	Distribución y niveles de producción de la palma datilera en el mundo (FAOSTAT, 2015)	20
Figura 4:	Mayores productores de dátil en el mundo y su producción en toneladas de los últimos 20 años (FAOSTAT, 2015)	22
Figura 5:	Producción de dátil por continente en los últimos 20 años (FAOSTAT, 2015)	23
Figura 6:	Producción promedio de dátil en Perú a partir del año 1993 hasta el 2013(FAOSTAT, 2015)	25
Figura 7:	Material Vegetal	37
Figura 8:	Procedimiento de desinfección	40
Figura 9:	Posición de explantes en el medio	41
Figura 10:	Explantes cultivados en el medio I	42
Figura 11:	Explantes cultivados en el medio II	42
Figura 12:	Explantes cultivados en el medio III	43
Figura 13:	Porcentaje de contaminación en cada zona de la espiga	46
Figura 14:	Porcentaje de contaminación de los explantes en dependencia del tipo de microorganismo	47
Figura 15:	Tipos de contaminación en el medio de cultivo durante el establecimiento un vitro de los explantes	47
Figura 16:	Porcentaje de fenolización por cada zona de la espiga	48
Figura 17:	Fenolización de los explantes en el cultivo	49
Figura 18:	Porcentaje de formación de callos con las diferentes formulaciones de medios	49
Figura 19:	Formación de callo en el medio de inducción I	50
Figura 20:	Formación de callo en el medio de inducción II	51
Figura 21:	Explantes en el medio de inducción III	52

Figura 22:	Porcentaje de fenolización de los explantes durante la formación de callos en los diferentes medio de inducción que se compararon	53
Figura 23:	Contaminación en el medio de cultivo durante la inducción <i>in vitro</i> de los explantes	53
Figura 24:	Porcentaje de maduración de callos con las diferentes formulaciones de medios	55
Figura 25:	Callos con estructuras embriogénicas en el medio de maduración I	56
Figura 26:	Callos con estructuras embriogénicas en el medio de maduración II	57
Figura 27:	Callos con estructuras embriogénicas en el medio de maduración III	58
Figura 28	Porcentaje de fenolización de en los medios de maduración	58
Figura 29	Acción de la PFO (polifenoloxidasas) sobre los compuestos fenólicos (García et al., 2006)	62

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 :	Datos Meteorológicos – Día de recolección	80
Anexo 2 :	Resultados Estadísticos	81

II. RESUMEN

Debido a la necesidad de recuperación de ecotipos nativos de la zona de Ica, Perú, se utilizaron las inflorescencias inmaduras femeninas con el objetivo de formación de callos con estructuras embriogénicas utilizando la embriogénesis somática como método de propagación clonal. Se evaluaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO), así como se comparó la eficiencia de tres formulaciones de medios de cultivo tomadas de los autores Abul-Soad y Mahdi (2010), Abul-Soad (2012) e IBT (2013) en la inducción y maduración de los callos. El porcentaje más alto de inducción de callos (43.8%) se obtuvo teniendo como base el medio de Murashige y Skoog (MS) complementado con 100 mg/l de la auxina 2,4-D, 3 mg/l 2-iP, 3 g/l carbón activado. Una alta concentración de auxina fue necesaria para la inducción de los explantes. Luego, los callos se cultivaron en un medio de maduración. La reducción de la dosis de auxina y la adición de nitrógeno orgánico en el medio promovió la maduración y aparición de estructuras embriogénicas. El mejor medio de maduración (24%) contiene sales MS modificado con 5 mg/l 2,4-D, 1 mg/l 2-iP, 1.5 g/l carbón activado.

Palabras claves: callos, embriogénesis somática, inflorescencias femeninas, palma datilera.

II. SUMMARY

Given the need for recovery of native ecotypes in the area of Ica, Peru, immature female inflorescences were used with the aim of callus formation with embryogenic structures using somatic embryogenesis as a method of clonal propagation. Different concentrations of sodium hypochlorite (NaClO) were evaluated, as well as the efficiency of three formulations of culture media for callus induction and maturation taken from Abul-Soad and Mahdi (2010), Abul-Soad (2012) and IBT (2013) were compared. The highest percentage of callus induction (43.8%) was obtained with the Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 100 mg/l of the auxin 2,4-D, 3 mg/l of 2-iP, 3 g/l of activated charcoal. A high concentration of auxin was required for induction of the explants. Then, the calli were cultured on maturation medium. The dose reduction of the auxin and the adding of organic nitrogen in the medium promoted the maturation and development of embryogenic structures. Best maturation medium (24%) contained MS salts supplemented with 5 mg/l of 2,4-D, 1 mg/l of 2-ip, 1.5 g/l of activated charcoal.

Keywords: calli, somatic embryogenic, feminine inflorescences, date palm.

III. INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula somática, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat et al., 1979). Esto no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia. Steward et al. (1958) describieron la embriogénesis somática en el año 1958. Este método, teóricamente, es uno de los más eficientes para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la i) naturaleza bipolar del embrión, ii) la posibilidad de ser automatizado todo el proceso productivo, iii) los altos coeficientes de multiplicación en cortos periodos de tiempo, iv) el poder aplicarse los principios de la cinética microbiana, y v) la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales. Sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aún limitado el número de especies en los cuales se describe una embriogénesis somática eficiente que permita un uso productivo del método (Yeung et al., 1996). La inducción exitosa de los embriones somáticos y su final conversión en plantas viables no es rutina eficiente para la mayoría de las especies (Merkle et al., 1995).

La palma datilera mantiene su valor porque da una serie de productos y servicios a los agricultores. El dátil, el principal producto de la palma, es rico en proteínas, vitaminas y sales minerales. Por eso es esencial en la dieta de los agricultores y sus animales. Los productos secundarios también son de uso.

La palma es un cultivo capaz de establecer un sistema sostenible en las áreas de agricultura y por eso juega un rol importante en el ámbito social ayudando a crear un área sostenible para una población grande y de esta manera logrando que se instalen en una zona rural en vez de migrar a zonas urbanas. Provee sombra y protección contra el viento. También previene la degradación del suelo y desertificación, protegiendo así el medio ambiente.

En tiempos recientes, ha renacido el interés en el dátil no sólo como fruto, sino como componente en la preparación de otros alimentos como dulces, confecciones, productos saludables (El-Juhany, 2010).

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una metodología para la formación de callos con estructuras embriogénicas en ecotipos nativos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) de la zona de Ica a partir de las inflorescencias femeninas inmaduras.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un protocolo para la desinfección de los explantes a partir de inflorescencias femeninas inmaduras.
- Evaluar la formulación de medios de tres protocolos en la inducción de callos con estructuras embriogénicas a partir de inflorescencias femeninas inmaduras.
- Evaluar la formulación de medios de tres protocolos en la maduración de los callos.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Según el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas III o su acrónimo APG (del inglés The Angiosperm Phylogeny Group), la palma datilera presenta la siguiente clasificación:

Clado: Monocotiledónea

Clado: Commeliínidas

Orden: Arecales

Familia: Arecaceae

Género: Phoenix

Especie: *Phoenix dactylifera* L.

La palma datilera también puede ser encontrada dentro de la familia de las Palmae (Zaid y De Wet, 2002a; Judd et al., 2008), antiguo nombre con el que se le conocía a la familia Arecaceae.

Phoenix dactylifera L. es una palmera de hoja perenne, capaz de vivir más de 100 años en producción (Al-Mssallem et al., 2013). Puede alcanzar una altura de más de 30 m. Las raíces crecen de la base del tronco, a veces 50 cm por encima del suelo; las raíces principales llegan alrededor de 1,5 cm de espesor. El tallo y las nuevas hojas crecen desde la yema terminal única en el ápice del tallo (Orwa et al., 2009). Dependiendo de la variedad, edad y condiciones ambientales, las hojas de la palma datilera tienen un largo de 3 a 6 m (la media de 4 m) y tienen un tiempo de vida de 3 a 7 años (Zaid y De Wet, 2002a). Las hojas (fig1.a) tienen un peciolo corto (50 cm) y entre 50-60 pares de folíolos largos y estrechos unidos a una vena central o raquis (Orwa et al., 2009). Una planta adulta tiene aproximadamente 100 a 125 hojas verdes, y una formación anual de 10 a 26 nuevas hojas (Zaid y De Wet, 2002a).

La palmera datilera es una monocotiledónea exocruza, por consecuencia heterocigota. Además de estas características, es dioica estricta, lo que significa que hay palmas masculinas y femeninas separadas. Las plantas serían por lo tanto aproximadamente 50% masculinas y 50% femeninas. Las plantas masculinas y femeninas no son identificables hasta la floración. En las plantaciones, sólo pocas palmas masculinas son necesarias como fuentes de polen para el desarrollo del fruto (Eke et al., 2005).

La inflorescencia se produce en la axila de una hoja de un año de edad (Orwa et al., 2009). La inflorescencia, también llamada el grupo de flores, en sus primeras etapas está encerrada en una cubierta dura conocida como la espata que se abre cuando las flores maduran para exponer toda la inflorescencia con fines de polinización (Zaid y De Wet, 2002a). Las palmeras florecen cuando la temperatura sombra aumenta a más de 18 °C, y forman fruto cuando es mayor a 25 °C (Chao y Krueger, 2007).

La espata protege las delicadas flores para evitar que se sequen con el intenso calor hasta que éstas están maduras y listas para realizar su función. La espata al principio es de color verdosa, convirtiéndose en marrón cuando está cerca de su apertura, la apertura es longitudinal. Las espatas masculinas son más cortas y más anchas que las femeninas (Zaid y De Wet, 2002a). Las flores cuelgan en un pedúnculo o raquis estrecho y plano, comúnmente conocido como el "tallo de la fruta" en las palmeras femeninas (Chao y Krueger, 2007). Cada espiguilla lleva un número de pequeñas flores, entre 8 000 a 10 000 en la palma femenina y más en la inflorescencia masculina (Zaid y De Wet, 2002a).

El promedio de producción anual de espatas por planta en un año es de 12 a más. El rango estimado en palma femenina varía aproximadamente entre cero y 25, para la palma masculina el rango es un poco más amplio (Zaid y De Wet, 2002a; Rieger, 2006).

La inflorescencia masculina es abundante en la zona apical del raquis, mientras que en las ramas de la inflorescencia femenina se observa menor densidad en esa zona. Estas características permiten el reconocimiento del sexo de la inflorescencia antes de su apertura (Zaid y De Wet, 2002a). Las flores tienen tres

brácteas triangulares, tienen tres sépalos obtusos y soldados en la base formando una cúpula, y tres pétalos agudos o redondeados, de longitud mayor que los sépalos. Los tres sépalos y tres pétalos están unidos para que sólo las puntas diverjan. (Galán y Castroviejo, 2008). La flor masculina es de dulce aroma, blanca cerosa y normalmente tiene seis estambres (Zaid y De Wet, 2002a; Galán y Castroviejo, 2008). Cada estambre se compone de dos pequeños sacos polínicos de color amarillento. Los sacos polínicos suelen abrirse después de una hora o dos de la explosión de la espata (Zaid y De Wet, 2002a). La flor femenina de color verde amarillento, gineceo tricarpelar, apocárpico, con estigmas curvados hacia fuera, tiene un rudimento seminal con placentación subbasal (Galán y Castroviejo, 2008).

El fruto (2.5-7.5 x 1.5-3.5 cm; Fig.1.c,d) es de un anaranjado amarillento que se torna rojo a castaño al madurar (Galán y Castroviejo, 2008). Se desarrolla normalmente después de la fertilización de uno de los tres carpelos dentro de cada flor pistilada (Chao y Krueger, 2007). Después de la polinización, toma entre 150-200 días alcanzar la madurez total del fruto (Siddiq y Greiby, 2013). La caída natural de la fruta se produce de 25 a 35 días después de la fisura de la espata (Chao y Krueger, 2007). El fruto dátil es una baya, con pericarpio carnoso y endocarpio membranoso. El peso de una semilla oscila entre menos de 0,5 a 4 g. La semilla (2-3 x 0.5-0.8 cm; Fig.11) es generalmente oblonga, con un pequeño embrión, y con un endospermo duro que contiene un depósito de celulosa en el interior de las paredes celulares (Zaid y De Wet, 2002a).

Los frutos de la palma datilera pasan a través de cuatro etapas de desarrollo a medida que maduran. *Kimri* es la primera etapa en la que el fruto es pequeño, verde, duro e inmaduro, también aumenta de tamaño y peso rápidamente. En la etapa *khalal*, el fruto permanece turgente y astringente, contiene una cantidad sustancial de taninos solubles en agua. Durante esta etapa la tasa de aumento de tamaño y peso disminuye ligeramente; el fruto alcanza su tamaño y peso final y adquiere una coloración superficial amarilla o roja, pero sigue siendo un poco duro. Al llegar a la etapa *rutab* el fruto comienza a ablandarse y adquiere un color ámbar o marrón. Disminuye la astringencia y aumentan los taninos insolubles. En la etapa de *tamar* la piel del fruto se arruga. El fruto pierde gran

parte de agua y la relación azúcar a agua es lo suficientemente alta para evitar la fermentación, similar a las pasas. (Chao y Krueger, 2007; Johnson et al, 2013).

El contenido de agua está entre 75 % a 80 % en los frutos jóvenes, al inicio de la maduración disminuye y se establece entre 40 % a 60 %, después continúa disminuyendo. El contenido de azúcar es aproximadamente 20 % de la materia seca de durante la etapa *Kimri*, aumentando de manera constante a 50 % de materia seca al comienzo de *Khalal*, y luego se acumula en un ritmo más rápido hasta alcanzar entre 72 % a 88 % de materia seca en la maduración. Los dátiles varían en tamaño y forma dependiendo del cultivar , la cultura y el medio ambiente (Chao y Krueger, 2007).

La palmera datilera produce un promedio de 40 kg de fruta al año, con rendimientos posibles de más de 100 kg con un manejo intensivo. Cuando se le cultiva con bajos niveles de insumos y de gestión agronómica, los dátiles pueden producir 20 kg de fruta o menos al año. Las plantas femeninas comienzan a producir los dátiles entre los 4 a 6 años de edad y alcanzan plena producción dentro de los 15 a 20 años (Chao y Krueger, 2007).

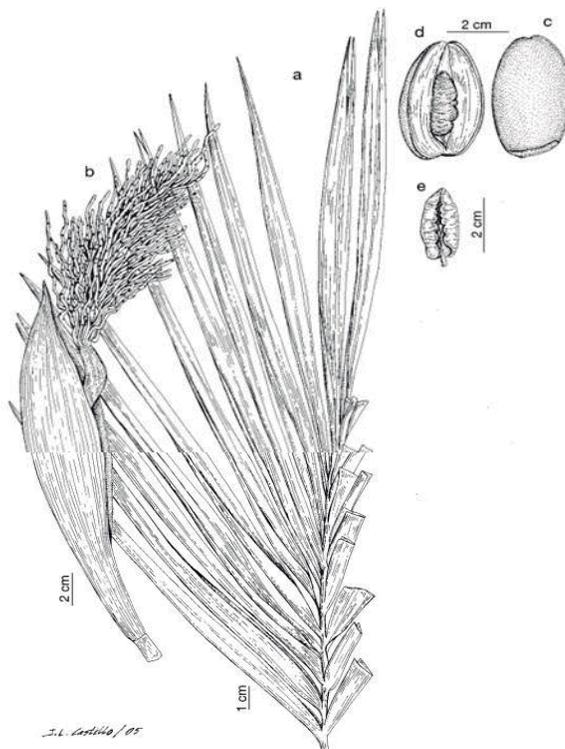


Figura 1. Esquema General *Phoenix dactylifera*.L. a) hoja; b) inflorescencia masculina, c) fruto; d) fruto sección longitudinal; e) semilla. (Galán y Castroviejo, 2008)

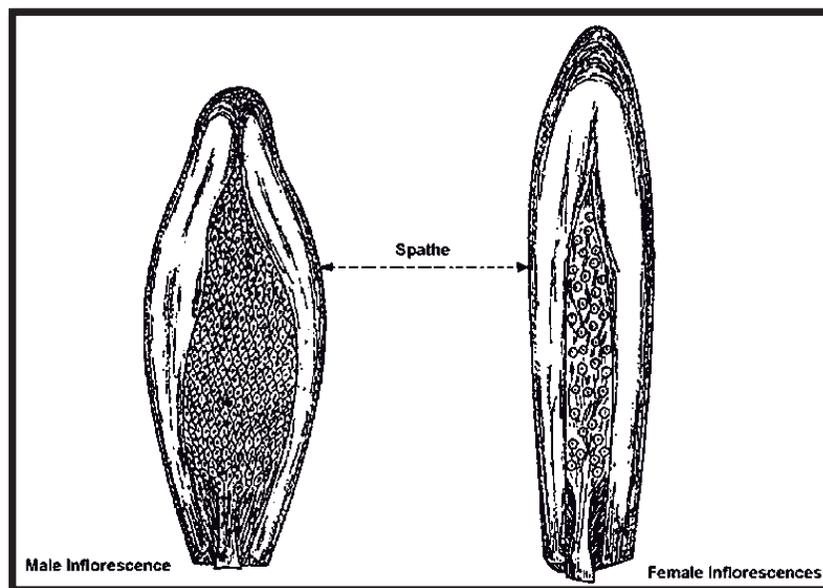


Figura 2. Inflorescencia masculina (izquierda) y femenina (derecha) cubiertas por la espata (Zaid y De Wet, 2002a)

4.2 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

4.2.1 ORIGEN Y SIGNIFICADO DE LA PALMA DATILERA PARA LAS POBLACIONES

El primer cultivo de *P. dactylifera* L. se registró en la zona comprendida entre los ríos Éufrates y Nilo (3700 aC). Se cree que es originaria de las regiones de la Península Arábiga, posiblemente procedentes de lo que hoy es el sur de Irak (Al-Mssallem et al. 2013). La palma datilera se cultiva desde el 4000 aC ya que se utilizó para la construcción del templo del dios de la luna cerca de Ur, en el sur de Irak – Mesopotamia (Zaid y De Wet, 2002b).

Una prueba más de la gran antigüedad de la palmera datilera se observó en el valle del Nilo en Egipto, donde la planta fue utilizada como símbolo de un año y su fronda como símbolo de un mes en los jeroglíficos egipcios. Las casas de los sumerios, babilonios y akadios fueron techadas con troncos y hojas de palma. Los usos del dátil para fines medicinales, además de su valor alimenticio, también fueron documentados (Zaid y De Wet, 2002b).

Los judíos consideran el dátil como uno de los siete frutos santos y con ella celebran el Domingo de Ramos. Pero ninguna otra religión ha hecho hincapié en la santidad de la palmera datilera y su fruto como la religión islámica. En el Corán, la palmera datilera y su fruto se mencionan en 17 Suras (capítulos) de los originales 114 Suras y en 20 versos de 6.263 (Zaid y De Wet, 2002b).

Fenicia, era el nombre por el cual parte de Levante (ahora parte de Israel), sobre todo la parte que incluye Tiro y Sidón, era conocido por los romanos y los griegos, y significaba "tierra de las palmas". Algunas de las antiguas monedas de Tiro y Sidón llevan la imagen de la palmera datilera, al igual que una moneda judía emitida en tiempo de Judas Macabeo, alrededor de 175 aC. Para conmemorar la conquista de los judíos y la destrucción de Jerusalén por Tito en el año 70 dC, el emperador romano Vespasiano emitió una moneda donde se mostraba a una mujer llorando sentada debajo de un árbol de palma (Zaid y De Wet, 2002b).

La palabra hebrea para la palmera datilera es "Tamar". Se convirtió en el símbolo judío de la gracia y la elegancia y a menudo fue otorgado por ellos a las mujeres, como por ejemplo, a la hermana de Absalón, en alusión a su agraciado. Incluso hoy en día, en Israel y en otros países "Tamar", "Tamara", y "Tamarah" se utilizan a menudo como nombres para niñas (Zaid y De Wet, 2002b).

El cultivo de dátil ha tenido una influencia muy importante en la historia del Medio Oriente. Sin dátiles, ninguna gran población humana podría haber sido mantenida en las regiones desérticas. Las rutas de las caravanas existieron durante siglos principalmente por el transporte de dátiles (Chao y Krueger, 2007).

4.2.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Las palmeras datileras pueden crecer en climas muy calurosos y secos, y son relativamente tolerantes a suelos salinos y alcalinos. Requieren un largo verano, intensamente caliente con poca lluvia y humedad muy baja durante el período de polinización hasta cosecha, pero con abundante agua subterránea cerca de la

superficie o el riego. Un viejo refrán describe a la palmera datilera como creciendo con "los pies en el agua y la cabeza en el fuego". Las palmeras datileras pueden crecer en temperaturas medias de 12,7 a 27,5 °C, soportando hasta 50 °C, y por cortos períodos de heladas temperaturas tan bajas como -5 °C. La temperatura ideal para su crecimiento es de 21 a 27 °C durante el período comprendido entre la polinización y la maduración del fruto (Chao y Krueger, 2007).

En un momento muy temprano, la palmera datilera fue introducida por el hombre hasta el norte de la India, el norte de África y el sur de España y tiene un papel económico importante en las zonas áridas. Arabia Saudita, uno de los países más importantes en cultivo de dátil, tiene >10% de los árboles de palma datilera (14% de la producción de dátil) y casi 340 de 2000 variedades registradas alrededor del mundo crecen ahí (Al-Mssallem et al., 2013).

Las palmeras datileras son críticas para la agricultura en muchas regiones cálidas y áridas, y los dátiles son el producto agrícola más importante de muchos países en el Golfo Pérsico (Al-Dous et al., 2011).

La palma datilera se encuentra tanto en el Viejo Mundo (Cercano Oriente y África del Norte) como en el Nuevo Mundo (Continente Americano), donde los dátiles se cultivan con fines comerciales en grandes cantidades (Zaid y De Wet, 2002b). En el continente americano, la producción exitosa de dátiles maduros sólo es posible en las regiones áridas de Perú, Chile, Baja California (México) y el suroeste de EE.UU. En otros lugares, la palma datilera se cultiva con fines ornamentales (Rivera et al., 2013).

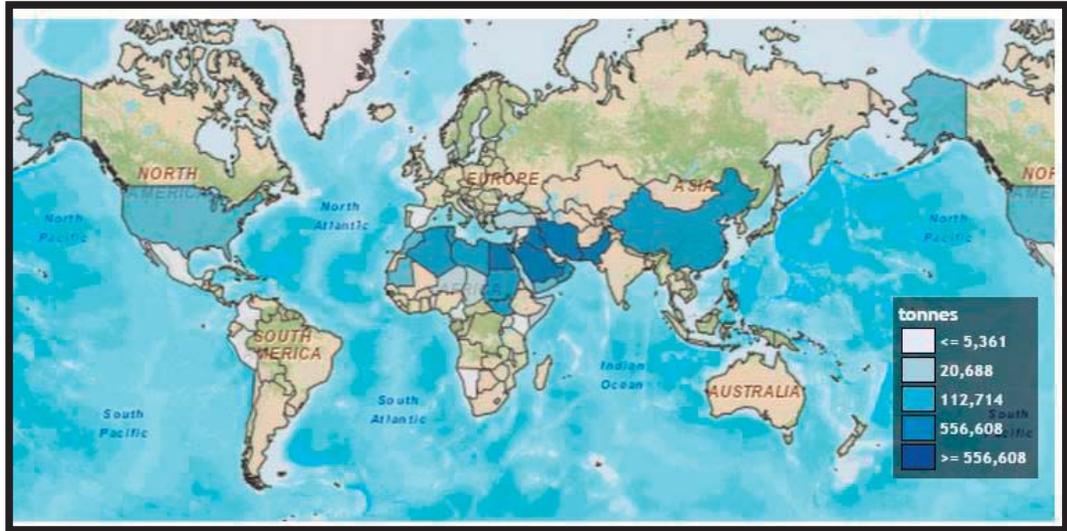


Fig.ura 3. Distribución y niveles de producción de la palmera datilera en el mundo (FAOSTAT, 2015).

4.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y PRODUCCIÓN MUNDIAL

En el listado basado en la importancia económica de las familias, la familia Arecaceae se ubica en tercer lugar detrás de la familia Poaceae y Fabaceae. Dentro de los cultivos de palmas, las tres palmeras domesticadas de mayor importancia en el mundo son la palma aceitera africana (*Elaeis guineensis*), el coco (*Cocos nucifera*) y la palma datilera (*Phoenix dactylifera*). La utilidad económica de estas palmas son múltiples, incluyendo alimentos básicos, bebidas, plantas ornamentales, madera, y materiales industriales (Al-Mssallem et al., 2013).

El dátil por sí mismo es un alimento de alta energía (El-Juhany, 2010). Es fuente de hierro y potasio, de 16 aminoácidos y de las vitaminas A, B1, y B2; una fuente razonable de calcio, cloro, cobre, magnesio y azufre; y una fuente menor de fósforo. (Chao y Krueger, 2007). Desde tiempos antiguos, los dátiles han sido una fuente de alimentación para los habitantes de los países árabes, probando ser el mejor recurso para asegurar la seguridad alimentaria durante una crisis (El-Juhany, 2010).

Los dátiles pueden ser utilizados en panadería y confitería industrial, para preparar cereales, budines, pan, tortas, galletas, dulces, helados, batidos. (Chao y Krueger, 2007; Siddiq y Greiby, 2013). Por lo general, los dátiles de baja calidad se utilizan

para producir jarabe de dátil ya que la fruta es una buena fuente de glucosa y fructosa. Estos jarabes poseen mayores cantidades de fructosa que glucosa. La fructosa se conoce como el azúcar natural más dulce y se considera como el azúcar dietético ideal. Así, también puede realizarse la separación de azúcares en dátiles, el cual es uno de los métodos para producir productos con valor agregado (Siddiq y Greiby, 2013).

Por su contenido en taninos, el fruto se utiliza en medicina como astringente en problemas intestinales. En forma de infusión, decocción, jarabe o en pasta, se administra como tratamiento para el dolor de garganta, resfriados. Se toma para aliviar la fiebre, la gonorrea, el edema, el hígado. Se dice que contrarresta la intoxicación por alcohol. La goma que exuda el tallo herido se emplea en la India para el tratamiento de la diarrea. Las raíces se utilizan contra el dolor de muelas (El-Juhany, 2010).

La savia se puede beber fresca, fermentada y como ponche, o destilada como aguardiente. También puede ser hervida y convertida en azúcar sin refinar (Orwa et al., 2009).

Los tallos son fuertes y resistentes a las termitas, proporcionando madera de construcción muy valiosa. También se puede utilizar como leña (Orwa et al., 2009). La fibra del tallo y las hojas se puede convertir en bolsas, cestas, sillas de montar en camello, cables, cajas, abanicos, muebles. Con las hojas secas se pueden hacer pequeñas alfombras, techos, paredes de separación, y recintos (Chao y Krueger, 2007).

Las semillas se muelen y suavizan por inmersión en agua y se utilizan para la alimentación de camellos, cabras y caballos. Con éxito han sido utilizados como alimento de aves de corral (Orwa et al., 2009). El aceite de las semillas se puede utilizar en la fabricación de jabón (Chao y Krueger, 2007).

Los palmerales son nichos ambientales importantes para la vida silvestre local y desempeñan un papel central en el sistema ecológico del desierto. Las palmeras datileras han sido eficaces para el control de la desertificación y la recuperación de tierras en la Península Arábiga, especialmente en los Emiratos Árabes Unidos

(Chao y Krueger, 2007). Las hojas se aplican en la estabilización de dunas (control de la erosión). Al ser una especie halófila, *P. dactylifera* L. se ha utilizado durante décadas para la revegetación de tierras afectadas por la salinidad en la región mediterránea. En muchos lugares, las palmeras se encuentran en campos de cultivo como cultivos de intercalado. Cuando es joven, la *P. dactylifera* L. ocupa mucho espacio, por lo que la decisión de introducirla en los campos de cultivo debe tomarse con cuidado. Una vez madura, su amplia corona crece muy por encima de los cultivos de campo, y afecta poco el rendimiento de cultivos. El género *Phoenix* es uno de los grupos más cultivados de palma, siendo sus especies ampliamente utilizadas para la siembra paisajista, como especímenes individuales, para la siembra en avenidas, y en menor medida, como plantas en maceta (Orwa et al., 2009).

Los mayores productores de dátil a nivel mundial son los países asiáticos y africanos (Egipto, Irán, Emiratos Árabes, Pakistán, Turquía, Túnez, Argelia, etc), entre ellos producen el 98% de los dátiles que se dan al mundo (MINCETUR, 2009). Según el diagrama presentado por FAOSTAT 2015, los mayores productores de dátil en el mundo son Egipto, Irán, Arabia Saudita, Irak y Pakistán.

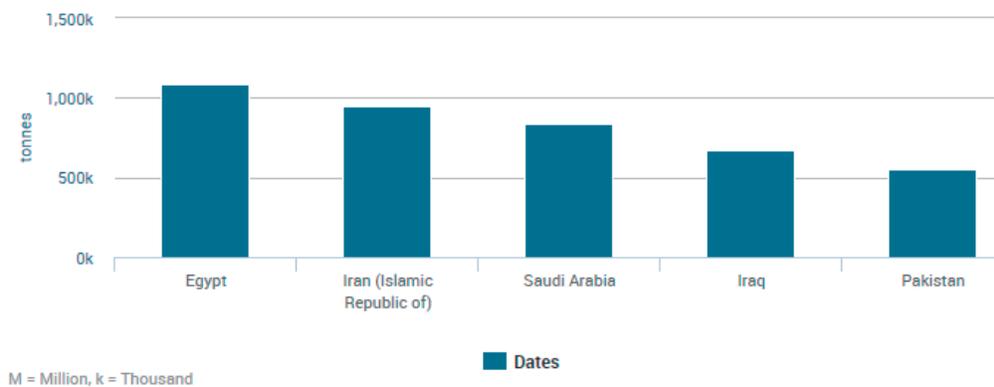


Figura 4. Mayores productores de dátil en el mundo y su producción en toneladas en los últimos 20 años (FAOSTAT, 2015).

La producción por continente en los últimos 20 años, tiene como mayor productor a Asia seguido de África, América y Europa. Entre los países

americanos, Estados Unidos lidera con 20 688 tn, México 3268 tn, Perú 257 tn, Colombia 23 tn (FAOSTAT, 2015; Fig.5).

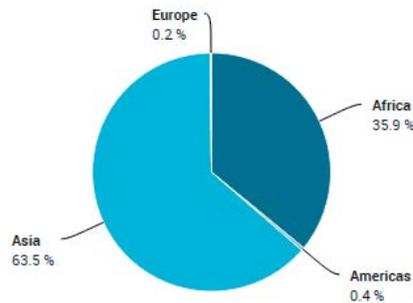


Figura 5. Producción de dátil por continente en los últimos 20 años (FAOSTAT, 2015).

Además Emiratos Árabes Unidos tiene la instalación más grande de cultivo de tejidos de dátil, donde se producen más de 100 000 plantas por cultivos de tejido al año, porque la producción con hijuelos no satisface la demanda de nuevos árboles para plantar (Chao y Krueger, 2007).

4.4 CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE PALMA DATILERA EN PERÚ

Las palmeras datileras llegaron a las costas de Perú y Chile a fines del siglo XVI, y en algunos lugares todavía se producen dátiles comestibles (Rivera et al., 2013).

En la costa central de Perú las palmas datileras han crecido durante cuatro siglos. En 1612, el jesuita estudioso Bernabé Cobo observó dátiles maduros en el Valle del Río Pisco, sobre las que redactó en 1653 y los comparó con los traídos de la costa Berberisca de África, actualmente los países del este de Marruecos a Libia, lo que sugiere esta región como nuestra fuente inicial de semillas (Johnson et al., 2013; Rivera et al., 2013). Lima fue fundada en 1535; es decir que las semillas de dátil habrían llegado de España a más tardar a finales del siglo XVI. (Johnson et al., 2013). Además, a finales del siglo XIX, los hijuelos se introdujeron de Irak y el norte de África directamente a América, especialmente a los Estados Unidos (Rivera et al., 2013).

En los valles cálidos y secos de estas llanuras, como en los valles de la provincia de Ica, sobre todo en la de Nazca y Pisco, los frutos maduran a la perfección (Rivera et al., 2013). Se ha estimado que en la zona de Pisco e Ica, hay 50 000 palmas productoras; sin embargo, 90% de ellas están abandonadas y son silvestres. La mayor parte de los frutos se consumen localmente, una pequeña cantidad llega a los mercados en las ciudades cercanas a Lima. Cabe señalar que las plantas en Perú no reciben poda, riego, polinización asistida o control de plagas (Johnson et al., 2013). Algunos lugares donde se ubican las escasas plantas que subsisten sin cuidado son los desiertos de Lanchas y Villacurí; lugares aislados del valle de Ica, principalmente Cachiche y Ocucaje y en los valles de Sta. Cruz, Río Grande, Palpa, Ingenio y Nazca, e incluso Acarí en Arequipa (MINCETUR, 2009).

En el Perú se han realizado algunos esfuerzos para valorizar el dátil, así como para establecer plantaciones de cultivares modernos, pero hasta el momento se ha logrado muy poco. Las condiciones climáticas, el suelo y el agua en varias zonas del país son muy favorables para la producción a gran escala. Por otra parte, en el país las palmas datileras están libres de las principales plagas y enfermedades que atacan este cultivo (Johnson et al., 2013).

Las variedades más importantes que se conocen y existen en nuestro país son: Medjool, mencionada por los productores californianos como "el Cadillac de los dátiles", es sin duda la mejor de todas, que alcanza los más altos precios aunque por el tipo de azúcares que contiene sus frutos son más delicados y su conservación requiere refrigeración. Por esta razón se recomienda realizar su comercialización antes de los tres meses. Sus dátiles son extremadamente largos, de pulpa suave y dulce, de color marrón con tonalidades variables según la zona de cultivo y con un peso por unidad que varía entre 15 y 23 gr. Es originaria de Marruecos y se le encuentra entre los palmares silvestres de los desiertos de Ica. Otra variedad, Deglet Noor, literalmente "dátil de luz", es una variedad muy popular por su abundancia y excelente sabor, siendo de color igualmente variable. Por tener la pulpa firme acepta cierto grado de mecanización en la cosecha y es el preferido de los procesadores porque empacado con protección contra la humedad puede conservarse hasta un año sin necesitar refrigeración.

Sus frutos pesan entre 8 y 11 gr por unidad y su cosecha se da en períodos muy amplios. También se le encuentra entre los palmares de Ica (MINCETUR, 2009).

Las frutas se cosechan en las etapas *khalal* tardía o *rutab* temprana; los racimos son cortados y trasladados para su almacenamiento en un recinto de adobe. No hay tradición de comer dátiles en la etapa *tamar* en el Perú, pero los dátiles secos son alimento para el ganado. La mayor parte de los frutos se consumen a nivel local, una pequeña cantidad llega a los mercados en las ciudades cercanas o a Lima, pero los dátiles como frutas frescas son prácticamente desconocidas en Perú (Johnson et al., 2013).

La producción nacional de dátil al 2008 según datos del Ministerio de Agricultura y Riego (MINAG), fue de 426 t, en un área de 80 ha, siendo Ica la única Región donde existen plantaciones de este frutal. La superficie agrícola no ha presentado significativas variaciones en esta década. La costa peruana por ubicación geográfica, recibe a lo largo del año mayor radiación solar que el norte de África y el Medio Oriente, acumulando más grados de temperatura, factores que determinan en el cultivo del dátil mayor precocidad para la entrada en producción comercial con fines de exportación, por lo cual corresponde promover la adopción de la tecnología productiva apropiada para la obtención de cosechas rentables y competitivas y un potencial de productividad inigualables con países de tecnología de avanzada. Con un eficiente manejo agronómico y con buen uso de riego tecnificado, se puede llegar a obtener rendimientos entre 10 000 y 12 000 kg/ha (MINCETUR, 2009).

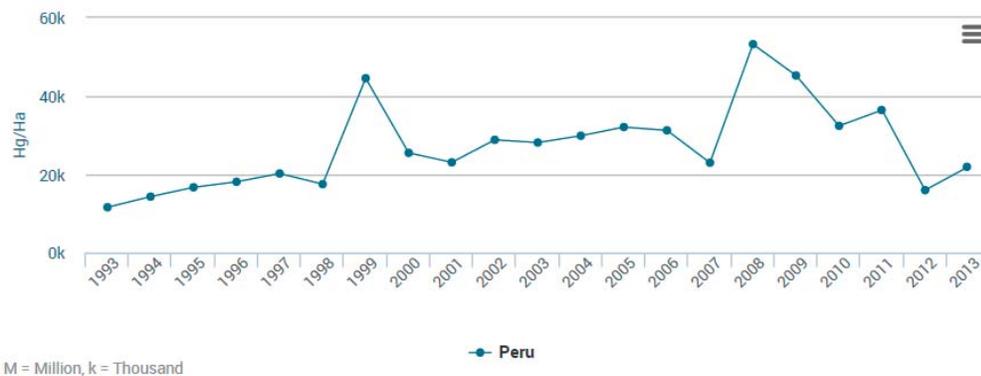


Figura 6. Producción promedio de dátil en Perú a partir del año 1993 hasta el 2013 (FAOSTAT, 2015).

En nuestro país, la ventana comercial es en los meses de octubre a febrero, en contrarrestación, lo cual favorece la comercialización del producto en el mercado exterior en los meses de desabastecimiento en la Unión Europea (UE). Los principales mercados para los dátiles son Francia, Reino Unido, Alemania, Italia, Holanda y España. Francia es el conductor de las importaciones de la UE del dátil, es también uno de los principales surtidores de otros países de la UE a través de re-exportaciones (MINCETUR, 2009).

4.5 PROPAGACIÓN DE LA PALMA DATILERA

4.5.1 PROPAGACIÓN VEGETATIVA

La palma datilera se propaga por semillas e hijuelos. La propagación de semillas, también llamada propagación sexual, aunque útil para la reproducción del cultivo, no es un método adecuado para la propagación de la palma datilera ya que no es posible por esta vía obtener plantas idénticas. Debido a su diversidad, las semillas sólo pueden ser útiles para fines de mejoramiento genético. Por ejemplo, si se conociera que las condiciones de reproducción de las palmas datileras son desfavorables (caso de las zonas marginales), la siembra de semillas de dátil, para una futura selección de calidad de la fruta, sería la forma más económica de seleccionar los clones que tienen caracteres deseables, tales como tolerancia a la lluvia o salinidad (Zaid y de Wet, 2002c).

La propagación por hijuelos, llamada propagación asexual, es otra forma de obtener plantas. Los hijuelos se desarrollan a partir de yemas axilares en el tronco de la planta madre y en consecuencia la fruta producida será de la misma calidad que la palma madre. Así se asegura la uniformidad de los productos. El hijuelo forma frutas 2 - 3 años antes que las plantas obtenidas de semillas (Zaid y de Wet, 2002c).

El tiempo desde que la yema se diferencia hasta el momento en que crece hacia el exterior de la planta madre, toma hasta tres años (18 a 36 meses). Se le agregan otros tres a cuatro años antes de que alcance el tamaño deseado para su separación y siembra. Los hijuelos son producidos en un número limitado (20 a 30 como máximo) durante la vida temprana de la palma (10 a 15 años a partir de la fecha de su plantación), dependiendo de la variedad, el tratamiento de fertilización y el riego. A

pesar de que se produce un alto número de hijuelos por palma, sólo tres o cuatro son adecuados para plantar (Zaid y de Wet, 2002c).

Esta metodología permite mantener la pureza varietal, asegurando el sexo de la planta que se va a obtener. Sin embargo, la propagación de hijuelos es una técnica muy laboriosa y no logra satisfacer las necesidades de material vegetal para el escalamiento (1 planta madre tardaría 37 años para lograr 1 ha comercial de palmas datilera 150 plantas/ha). Adicionalmente, Asemota et al. (2007) afirman que incluso algunos genotipos de palma dátíl nunca producen hijos basales.

4.5.2 PROPAGACIÓN *IN VITRO*

La aplicación de técnicas de cultivo de tejidos en palmas presenta ventajas en comparación con las técnicas anteriores, ya que permite propagar clonalmente plantas femeninas sanas, seleccionar cultivares y multiplicar plantas genéticamente uniformes (Von Arnold et al., 2002).

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. La aplicación de estas técnicas se pueden resumir en: estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines; bioconservación y producción de compuestos útiles; incremento de la variabilidad genética; obtención de plantas libres de patógenos; propagación de plantas y conservación e intercambio de germoplasma (Roca y Mroginski, 1993).

Teniendo en cuenta la forma de crecimiento *in vitro* existen dos formas de crecimiento: el crecimiento organizado y no organizado. El crecimiento organizado contribuye a la creación o mantenimiento de una estructura definida. El crecimiento desorganizado ocurre con frecuencia cuando partes de plantas se cultivan *in vitro*. Los agregados de células, que luego se forman, carecen de cualquier estructura reconocible y contienen sólo un número limitado de células diferenciadas. Una célula diferenciada es aquella que ha desarrollado una forma especializada (morfología) y/o

función específica (fisiología). Uno de los cultivos que en la práctica se reconoce como de crecimiento desorganizado son los callos (George et al., 2008).

El objetivo de la propagación de plantas vía cultivo de tejido, denominado micropropagación, es propagar plantas como clones (George et al., 2008). Un solo explante se puede multiplicar en varios miles de plantas en un período de tiempo relativamente corto y en un espacio de condiciones controladas, independientemente de la estación y el tiempo del año (Hussain et al., 2012). Esta técnica apunta a una rápida y gran producción de plantas genéticamente idénticas a una planta madre que se escoge por su alto vigor (Neuman, 2006). En la producción de la palma datilera, la multiplicación *in vitro* es particularmente útil, ya que proporciona un medio para superar las dificultades de producción masiva de plántulas femeninas relativamente homogéneas (Asemota, et al. 2007).

La regeneración de plantas directamente de los explantes, o a partir de callos, por medio de la organogénesis o de la embriogénesis somática se ha utilizado como una alternativa en los métodos de propagación (Roca y Mroginski, 1993).

Sin embargo, la metodología de micropropagación convencional vía organogénesis demanda muchos recursos, requiere grandes espacios en el laboratorio, los costos de producción de las plántulas son altos y las tasas de multiplicación son limitadas. Una innovación en la técnica de micropropagación convencional para superar estas limitaciones es el uso de la embriogénesis somática (Von Arnold et al., 2002).

4.6 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática (ES) es un proceso que implica la formación de embriones a partir de células somáticas vegetales (Von Arnold et al., 2002). Roca et al. (1993) definieron como embriones somáticos a los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos. Además son estructuras bipolares con un eje radical-apical; no poseen conexión vascular con el tejido materno; y deben ser capaces de crecer y formar plantas normales.

La técnica depende principalmente del concepto de totipotencia de las células vegetales (Hussain et al., 2012). La derivación de nuevas plantas a partir de células, que normalmente no han participado en el proceso de regeneración, muestra que las células vivas diferenciadas de plantas pueden expresar totipotencia, es decir, cada una de ellas conserva una capacidad latente para producir toda una planta. La totipotencia es una característica especial de las células en los tejidos jóvenes y meristemas (George et al., 2008). Junto con el potencial totipotente de célula de la planta, la capacidad de las células para alterar su metabolismo, el crecimiento y el desarrollo también es igualmente importante y fundamental para regenerar la planta entera (Hussain et al., 2012).

La embriogénesis somática tiene que ser inducida por condiciones especiales, las cuales pueden darse *in vitro* (Neuman, 2006). De esta manera, las células del explante (porción de la planta donante cultivada *in vitro*) cambian su patrón de expresión y generan los embriones somáticos iniciales.

De acuerdo con Viñas y Jiménez (2011), los embriones somáticos *in vitro* pueden provenir de células que pasaron por un proceso de desdiferenciación, como en callos o suspensiones celulares, en lo que se conoce como embriogénesis indirecta o, sin pasar por ese proceso de desdiferenciación, en lo que se denomina embriogénesis directa. Las cuatro etapas generales de la embriogénesis indirecta (proceso más común en palmas) son:

- Callo proembriogénico (CP): donde se establece el estímulo celular para que inicie la embriogénesis somática y se forme la masa de células proembriogénicas. La etapa de CP implica una división asimétrica de las células en respuesta a reguladores de crecimiento, usualmente auxinas. Además, se caracteriza por una acidificación del citoplasma y de la pared celular en las células con capacidad embriogénica.
- Desarrollo proembriogénico (DP): se fomenta el crecimiento de la masa proembriogénica formada anteriormente.
- Histodiferenciación y Maduración de proembriones (MP): se estimula la conversión de proembriones a embriones, pasan por las etapas características de su desarrollo (globular, escutelar y coleoptilar). Durante

esta etapa los embriones somáticos comienzan a acumular productos de reserva.

- Desarrollo de embriones (DE): se estimula el crecimiento de los embriones, hasta que se convierten en pequeñas plantas completas (germinación de embriones).

Un tipo de respuesta positiva durante la embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras es la formación de una estructura globular brillante. El color normalmente es cremoso y, a veces de color blanco brillante. En un principio, la mayoría de los botones de las espiguillas produce masas pro-embriónicas, que son cristales de color blanco o amarillo pardo menudo. Estas pequeñas masas se multiplican y aumentan en número y se hacen más organizadas. Luego prevalecen las estructuras globulares que más adelante desarrollan brotes verdes o embriones somáticos en el medio de diferenciación. Estas estructuras globulares son como gránulos que son diferentes en tamaño; cada uno es 1-3 mm de diámetro y por lo general existe en agrupaciones. Cada grupo surgió de un botón (Abul-Soad, 2011).

Según Gueye et al. (2009), citado por Viñas y Jiménez (2011), la formación de callo es un prerequisite indispensable en palma datil para la inducción de la embriogénesis somática. Se define “callo embriogénico” como el callo con la habilidad de iniciar un embrión somático en un medio específico (Kunitake and Mii, 1998).

4.7 FACTORES QUE AFECTAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

4.7.1 EXPLANTE

Se ha estimulado el desarrollo de callos embriogénicos a partir de varios tipos de explantes obtenidos en palmas; entre ellos están los embriones cigóticos, las hojas jóvenes, las inflorescencias, los ápices radicales y los ápices de los retoños de palma datilera (Roca y Mroginski, 1993).

Desde 1973, varios investigadores intentaron cultivar *in vitro* inflorescencias de palma. Explantes de inflorescencias masculinas y femeninas de palma aceitera fueron cultivados en una variedad de medios y desarrollaron pero no obtuvieron

callos. Se especuló que se necesitaba una alta cantidad de auxina para interrumpir el desarrollo ya direccionado de los explantes. Posteriormente fue confirmado en palma datilera con la investigación de Euwens (1976) Además se observó que todo tipo de explante obtenido de inflorescencias se tornaban marrón y moría después de unas semanas de estar en el medio de cultivo (Zaid y de Wet, 2002c).

Para lograr la regeneración de embriones somáticos en plantas monocotiledóneas es muy importante la selección de explantes que contengan regiones meristemáticas. Es por ello que en palmas comúnmente se utiliza tejido somático inmaduro, como es el caso de inflorescencias, ápices y secciones basales de hojas. Las inflorescencias de palmas adultas contienen células meristemáticas y son fuente de explantes importante ya que pueden ser obtenidas sin dañar a la planta donadora (Viñas y Jiménez, 2011).

Es importante tener en cuenta que la respuesta embriogénica del callo depende también del genotipo de la planta. Algunos cultivares se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros cultivares no responden en el mismo medio. Además, el estado de desarrollo de la planta madre afecta la respuesta morfológica del explante (Roca y Mroginski, 1993). Incluso, se ha observado que la respuesta embriogénica puede variar, aun en una misma especie de palma, según el tipo de tejido utilizado. Por ejemplo, en algunas especies la mejor respuesta se logra con inflorescencias mientras que en otras, se logra con el uso de hojas (Viñas y Jiménez, 2011).

4.7.2 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento normal y el desarrollo de las plantas. Se compone principalmente de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, otros componentes orgánicos, reguladores de crecimiento, fuente de carbono y algunos agentes gelificantes en caso de medio sólido. El pH de los medios también es importante ya que afecta tanto el crecimiento de las plantas como la actividad de los reguladores del crecimiento. Dentro de la composición del medio, las hormonas y la fuente de

nitrógeno tiene efectos profundos en la respuesta inicial del explante (Hussain et al., 2012).

Generalmente para la embriogénesis somática se ha utilizado el medio desarrollado por Murashige y Skoog (1962) o la modificación de esta formulación. La concentración alta de sales de este medio parece ser muy benéfica para el crecimiento de embriones somáticos (Roca y Mroginski, 1993).

En el caso de la palma datilera, el medio de cultivo más utilizado incluye las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS). Recientemente, se indicó que es importante realizar variaciones en el medio de cultivo según la etapa de embriogénesis somática (ES), ya que se observó que un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de callo embriogénico no necesariamente coincide con el medio de cultivo óptimo para la regeneración de los embriones (Viñas y Jiménez, 2011).

La fuente de carbono es importante ya que afecta la producción de embriones somáticos de palma datilera. La sacarosa ha sido utilizada como fuente de carbono para la inducción exitosa de embriogénesis somática en plantas. Los investigadores, Veramendi y Navarro (1996) y Badawy (2005), ambos citados por Viñas y Jiménez (2011) encontraron que la concentración óptima de sacarosa para la formación de embriones somáticos en palma dátil fue de 30 g/l. Cuando se redujo la concentración a 15-20 g/l o se aumentó a 40-60 g/l, el número de embriones obtenidos se redujo considerablemente. También en esta especie y similar a los resultados anteriores, Asemota et al. (2007) mostraron que una concentración de sacarosa de 30 g/l era suficiente para una inducción adecuada de callo embriogénico. Además, se observó que las plántulas obtenidas de la embriogénesis somática con medio elevado de sacarosa tenían mejores oportunidades de aclimatización y exitoso vigor de crecimiento (Viñas y Jiménez, 2011).

Otros factores de interés del medio de cultivo son el nitrógeno, hierro y el carbón activado. El nitrógeno suministrado como nitrato o como ion amonio es esencial, también el nitrógeno orgánico provisto por la glutamina y la alanina es beneficioso y puede reemplazar el nitrógeno inorgánico en el medio. El hierro es

también esencial para la embriogénesis somática ya que en ausencia de ese elemento, los embriones somáticos globulares no son capaces de desarrollarse hasta la madurez. El carbón activado se ha usado para superar problemas específicos de oxidación, los cuales se asocian con el cultivo de tejidos de palmas (Roca y Mroginski, 1993).

4.7.3 REGULADORES DE CRECIMIENTO

En todas las familias de plantas, incluyendo Arecaceae, el aspecto más importante durante el cultivo *in vitro* es la selección adecuada de los reguladores de crecimiento que se incorporan en el medio de cultivo. Al respecto, es muy importante tener en cuenta que los explantes se encuentran bajo el control de reguladores de crecimiento tanto endógenos como exógenos y que el balance de estos es el que determina el resultado final (Viñas y Jiménez, 2011).

Tanto en palmas como en otras familias de plantas, las auxinas son los reguladores de crecimiento más ampliamente utilizados para inducir callo con potencial embriogénico. De las auxinas disponibles, la más utilizada es el 2,4-D (Viñas y Jiménez, 2011).

Algunos autores han utilizado, además de auxina, citoquininas como la BAP (6-bencilaminopurina) (22,2 μM) y la 2ip (N6-(2-isopenteniladenina)) en bajas concentraciones (15 μM) también con buenos resultados (Viñas y Jiménez, 2011).

La inducción de callos *in vitro*, crecimiento y diferenciación son controlados por el tipo y concentración de los reguladores añadidos al medio basal, así como la interacción entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo. También se ha observado que las respuestas no son influenciadas solo por los reguladores de crecimiento, sino que los reguladores pueden interactuar con otros componentes del medio como sacarosa y nitrógeno (Asemota et al., 2007).

En el Cuadro 1 se resume la información disponible sobre los tipos de explantes y los principales reguladores de crecimiento utilizados en las diferentes etapas durante la embriogénesis somática en palma datilera desarrollados hasta el presente.

Cuadro 1. Tipo de explante reguladores de crecimiento utilizados en las diferentes etapas durante la embriogénesis somática en palma datilera (*Phoenix dactylifera L.*).

Explante	Etapa de la embriogénesis somática						Referencia
	Callo Pro embriogénico		Desarrollo Pro embriogénico		Desarrollo de Embriones		
	Nombre	Concentración (μM)	Nombre	Concentración (μM)	Nombre	Concentración (μM)	
Ápice	2,4-D	453	ANA	54	Sin información disponible		Al-Khayri (2001)
	2ip	15	2ip	7			
Inflorescencias	2,4-D	45,2	2,4-D	4,5			Al-Khayri (2005, 2007)
Hojas	2,4-D	2,3	2,4-D	4,5			
Ápice	2,4-D	452,5	ANA	53,7			
Ápice, Primordio foliar, Yema axilar	2ip	14,8	2ip	29,5			ANA
	2,4-D	452,5	ANA	0,54	2ip	14,8	
Ápice	2,4-D	453	ANA	0,54	ANA	0,27-0,54	Eke <i>et al.</i> (2005)
	2ip	15	2ip	24,6	2ip	4,9	
Hojas	2,4-D	45,2	2,4-D	0,45	ABA	3,8	Othmani <i>et al.</i> (2009)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

La fase experimental de la investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

5.1 MATERIAL DE LABORATORIO

5.1.1 EQUIPOS DE LABORATORIO

- Balanza analítica de 4 decimales
- Autoclave Vertical
- Microondas
- Cámara de Flujo Laminar
- Incubadora
- Estereoscopio

5.1.2 INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

- Jarra 2000ml
- Probeta 1000ml, 100ml
- Frascos
- Beakers 250ml
- Espátulas
- Papel Aluminio
- Placas Petri
- Bisturí estéril

5.1.3 REACTIVOS

- **Sales**
Sales Macronutrientes MS (Murashige & Skoog, 1962) y G5 (Gamborg, et al., 1976)

Sales Micronutrientes MS (Murashige & Skoog, 1962)

- **Vitaminas**
 - Tiamina
 - Ácido nicotínico
 - Piridoxina
- **Aminoácidos**
 - Glutamina
 - Glicina
- **Carbohidratos**
 - Sacarosa
- **Reguladores de Crecimiento**
 - Auxinas: 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), AIA (ácido indolacético), ANA (ácido naftalenacético)
 - Citoquininas: 2-iP (2-isopentiladenina), Kinetina (6-furfurilaminopurina)
- **Antioxidantes**
 - Ácido cítrico
 - Cisteína
- **Agente Gelificante**
 - Agar
- **Otros Reactivos**
 - Sulfato de Adenina
 - Myo-inositol
 - Carbón activado
 - Detergente
 - Solución de fungicida sistémico
 - Alcohol 70%
 - Solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5%, 1%, 1.5%
 - Tween 20
 - Agua destilada estéril

5.1.4 ANTIBIÓTICO

Carbenicilina 200000 ppm

5.1.5 MATERIAL VEGETAL PARA LA PROPAGACIÓN

Para la presente investigación se utiliza como material de estudio las inflorescencias inmaduras femeninas de espatas cerradas de la palma datilera. Se recolectan del Fundo Rocío, dueño Richard Navarrete, provincia de Ica, departamento de Ica (latitud: -13.933160, longitud: -75.931382, Fig.7).

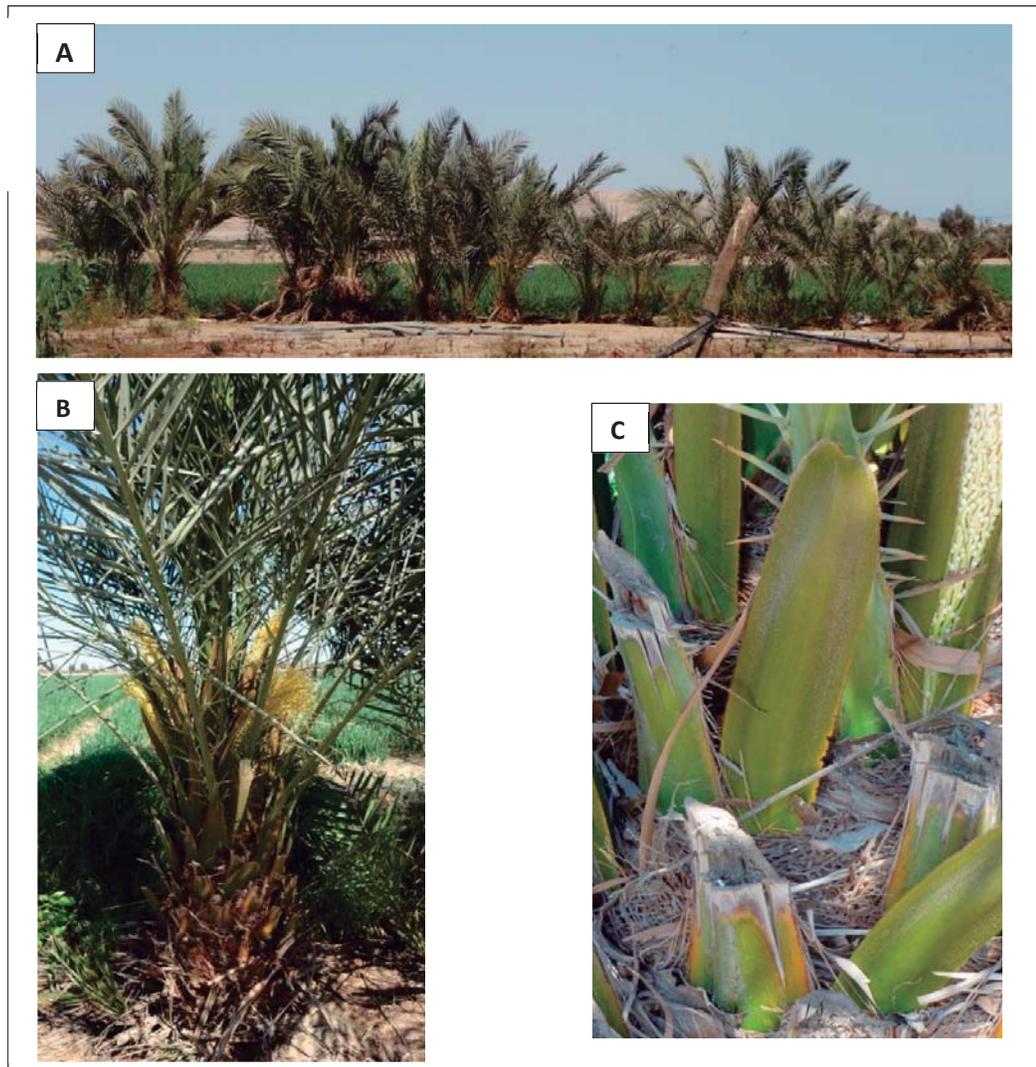


Figura 7. Material Vegetal A. Plantación de palma datilera de la zona de Ica. B. Palma datilera femenina. C. Espatas femeninas cerradas y abiertas. D. Ver Anexos.

5.1.6 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Los medios base utilizados en esta investigación presentaban en su composición macronutrientes y micronutrientes de Murashige & Skoog (MS), y macronutrientes de Gamborg et al. (G5).

Cuadro 2. Macronutrientes y Micronutrientes Murashige & Skoog (MS), Macronutrientes Gamborg et al. (G5)

Componentes del medio (mg/L)	MS	G5
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	1650	
KNO ₃	1900	2500
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250
KH ₂ PO ₄	170	
(NH ₄) ₂ SO ₄		134
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O		150
Micronutrientes		
KI	0.83	
H ₃ B ₃	6.2	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	
Na ₂ EDTA	37.3	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	

5.2 FASE DE INICIACIÓN DEL CULTIVO *IN VITRO*

En un primer experimento se determinó el procedimiento más eficiente en la desinfección de las inflorescencias inmaduras de palma dátíl, para lo cual se diseñó un experimento bifactorial, en donde el factor 1 es la concentración de hipoclorito de sodio (0.5, 1.0 y 1.5 %), y el factor 2 es el tipo de explante en la espiga (apical, medio y basal).

En un segundo experimento se evaluó el efecto de la posición del explante (horizontal y vertical) en la fenolización.

5.2.1 DESINFECCIÓN EXTERNA E INTERNA

Se lavó la espata con agua y detergente. Luego se sumergió en una solución de fungicida sistémico por 30 segundos. Se llevó la espata a la cámara de flujo laminar para evitar en lo posible contaminación al abrir la misma. La superficie de trabajo y las paredes de la cámara fueron previamente limpiadas con alcohol de 70%, además se encendió el ventilador para permitir el flujo del aire. En la cámara de flujo laminar se abrió la espata con un bisturí estéril (Fig 2.B y C), y se cortaron las espigas en tres segmentos iguales (zona apical, zona media y zona basal; Fig. 2.D). Las espigas cortadas se introdujeron en una solución de alcohol al 70% por 1 minuto. Después cada segmento de la espiga se colocó durante 20 minutos ya sea en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, 1% o 1.5%, formándose así 9 tratamientos (Fig. 2.E). La solución contenía 0.1 ml de Tween 20 por cada 100 ml de desinfectante. Posteriormente para cada tratamiento se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril para eliminar gradualmente el cloro. El agua contenía el antioxidante ácido cítrico 200mg/L.

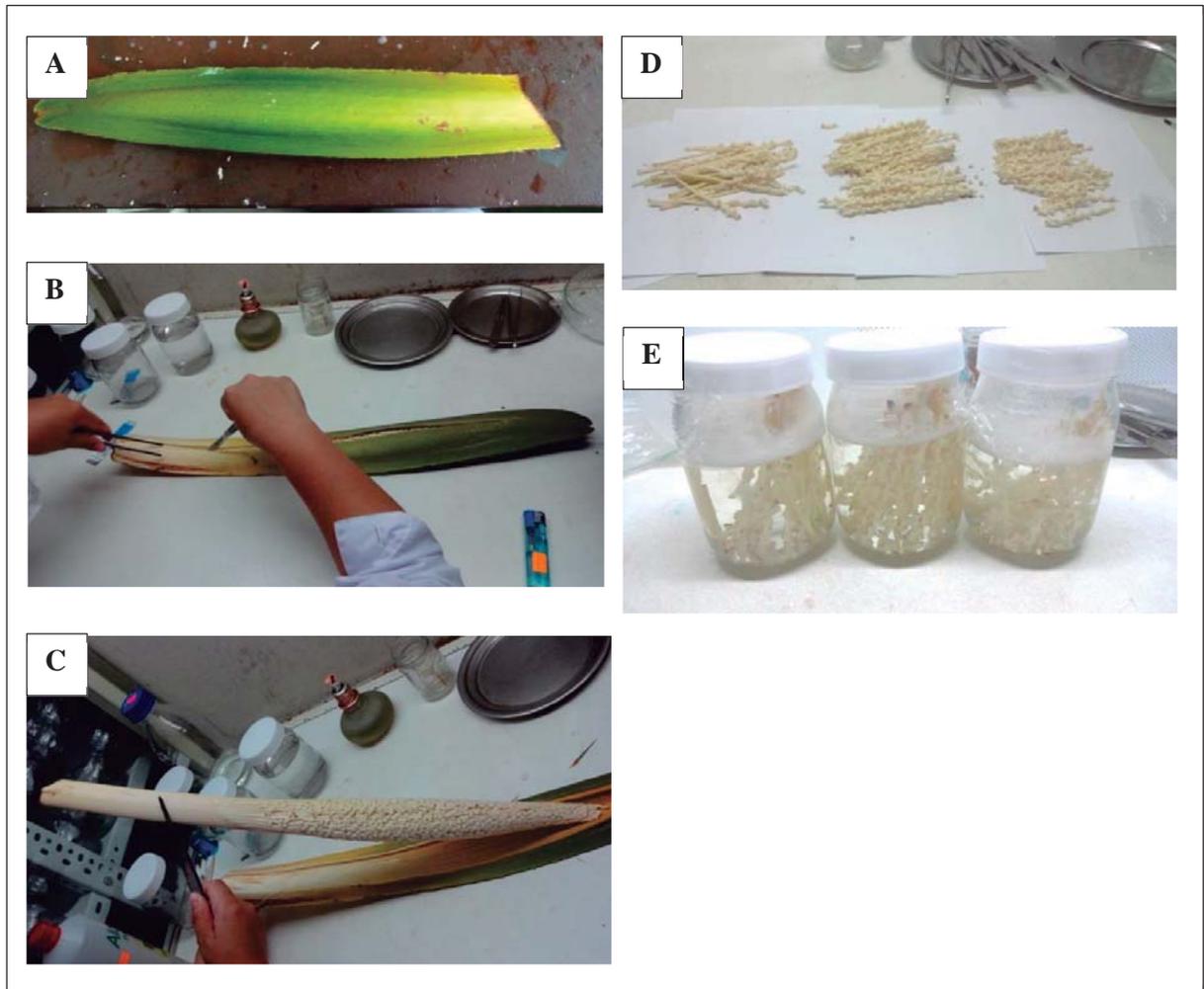


Figura 8. A-B-C-D-E Procedimiento de desinfección. A. Espata femenina. B-C. Apertura de la espata. D. Corte de las espigas en tres segmentos iguales. E. Lavado de segmentos de espigas en solución de hipoclorito de sodio.

Se continuó la manipulación de los explantes dentro de la cámara de flujo laminar. Para la inoculación en el medio de cultivo se realizaron cortes en cada zona de la espiga (apical, media y basal), obteniéndose segmentos con dos pares de botones florales. El medio en el cual se introdujeron fue el medio Murashige & Skoog (MS) modificado para palma con 170 mg/L NaH_2PO_4 , 125 mg/L mioinositol, 200mg/L glutamina, 5 mg/L tiamina, 1mg/L ácido nicotínico, 1 mg/L piridoxina, sacarosa 30g/L y agar 6.6g/L (Fig.9):

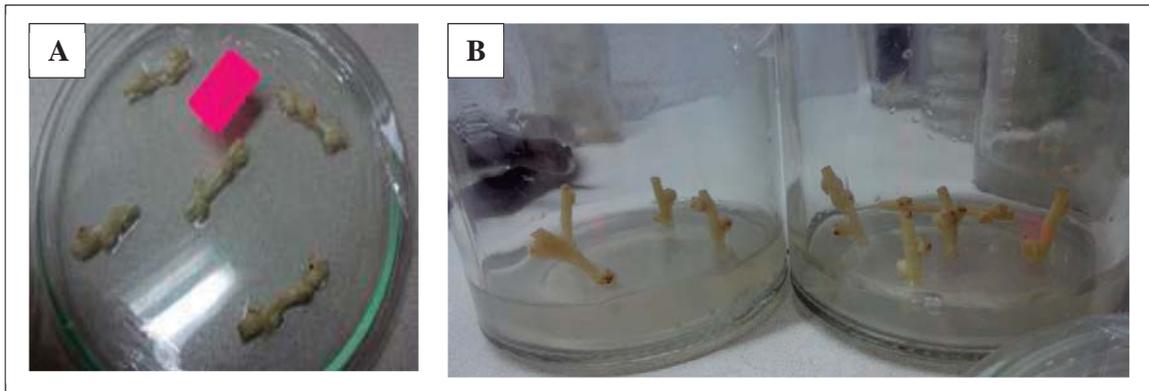


Figura 9. Posición de explantes en el medio. A. Cultivo de explantes en forma horizontal en medio MS. B. Cultivo de explantes en forma vertical en medio MS.

Se evaluaron cada 7 hasta los 28 días el número de explantes contaminados, fenolizados y la posición de los mismos en el medio.

5.3 FASE DE INDUCCIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO

Los explantes que sobrevivieron en la fase de desinfección fueron utilizados en esta siguiente fase. En este experimento se compararon 3 formulaciones de medios de cultivo. Medio I: Abul-Soad y Mahdi (2010), Medio II: Abul-Soad (2012), Medio III: IBT (2013).

Para la siembra de los explantes se tuvo el mismo cuidado que en la Fase de Iniciación con respecto a la desinfección de la cámara y materiales de trabajo. A continuación se describe la composición de cada uno de ellos.

5.3.1 MEDIO I: (Abul-Soad y Mahdi, 2010)

Está compuesto por los macronutrientes de medio G5 (Gamborg, et al. 1976), micronutrientes y vitaminas del medio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con 170 mg/l KH_2PO_4 , 100 mg/l glutamina, 40 mg/l sulfato de adenina, sacarosa 30g/l y agar 6.6g/l, como antioxidante cisteína 50 mg/l, como auxinas 0.1 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l AIA, 5.0 mg/l ANA. El pH fue de 5.6. Los cultivos fueron incubados en la oscuridad y a temperatura de 26°C con intervalos de cultivo al mismo medio cada 15 días (Fig.10).

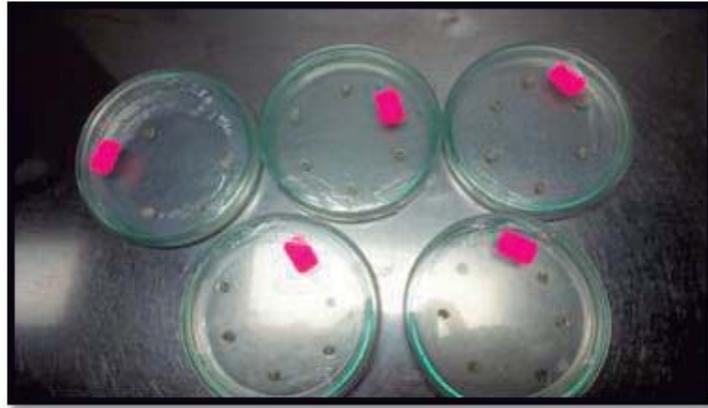


Figura 10. Explantes cultivados en el medio I.

5.3.2 MEDIO II: (Abul-Soad, 2012)

Contiene los macronutrientes y micronutrientes del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 100 mg/l mioinositol, 0.4 mg/l tiamina, 0.5 mg/l ácido nicotínico, 0.5 mg/l piridoxina, 2 mg/l de glicina, 30g/l sacarosa y 6.6g/l agar, como antioxidante cisteína 50 mg/l, 3 g/l carbón activado, junto con los reguladores de crecimiento en cantidades de 100 mg/l 2,4-D y 3mg/l 2iP. El pH fue de 5.6. Los cultivos fueron incubados en la oscuridad y a temperatura de 26°C con intervalos de cultivo al mismo medio cada 15 días (Fig.11)

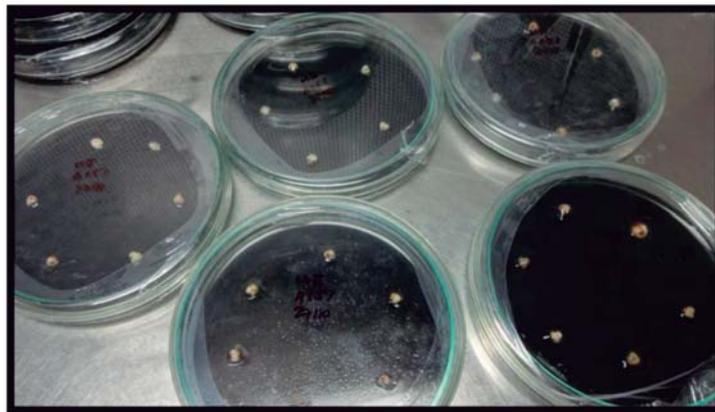


Figura 11. Explantes cultivados en el medio II.

5.3.3 MEDIO III: (IBT, 2013)

Está compuesto por los macronutrientes y micronutrientes del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 100 mg/l mioinositol, vitaminas MS,

30 g/l sacarosa, 6,6 g/l agar, 2 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l AIA, 50 mg/l ácido ascórbico, 50 mg/l ácido cítrico, 25 mg/l sulfato de adenina. Los cultivos fueron incubados en la oscuridad y a temperatura de 26°C con intervalos de cultivo al mismo medio cada 15 días (Fig.12)

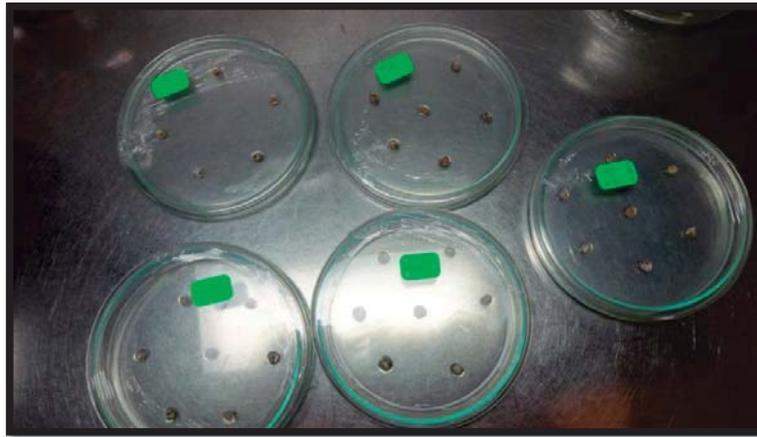


Figura 12. Explantes cultivados en el medio III.

Cada medio tuvo 9 repeticiones. Se evaluó los explantes que formaron callos, y el tiempo de iniciación del callo. Las evaluaciones fueron una vez por semana. Se expresó en porcentaje la formación de callos.

5.4 FASE DE MADURACIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO

Los explantes que formaron callos en la fase de Inducción fueron transferidos a medios de maduración de callo embriogénico al azar, teniendo en consideración la misma técnica de siembra que en la fase de inducción de callos. Los medios para la maduración del callo embriogénico se detallan a continuación.

5.4.1 MEDIO I: (Abul-Soad y Mahdi, 2010)

Presenta en su composición macronutrientes del medio G5, micronutrientes y vitaminas del medio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con 170 mg/l KH_2PO_4 , 100 mg/l glutamina, 40 mg/l sulfato de adenina, sacarosa 30g/l y agar 6.6g/l, como antioxidante cisteína 50 mg/l, junto con los reguladores de crecimiento 5.0 mg/l 2,4-D, 1.0 mg/l 2iP, 1.5 g/l carbón activado. El pH fue de 5.6. Los cultivos fueron incubados en la oscuridad y a temperatura de 26°C con intervalos de subcultivo al mismo medio cada 15 días.

5.4.2 MEDIO II: (Abul-Soad, 2012)

Está compuesto de macronutrientes y micronutrientes del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 100 mg/l mioinositol, 0.4 mg/l tiamina, 0.5 mg/l ácido nicotínico, 0.5 mg/l piridoxina, 2 mg/l de glicina, 30g/l sacarosa y 6.6g/l agar, como antioxidante cisteína 50 mg/l, 1.5 g/l carbón activado, 10 mg/l 2,4-D y 3 mg/l 2ip. El pH fue de 5.6. Los cultivos fueron incubados en la oscuridad y a temperatura de 26°C con intervalos de subcultivo al mismo medio cada 15 días.

5.4.3 MEDIO III: (IBT, 2013)

En su composición se encuentran macronutrientes y micronutrientes del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 2.5 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l AIA, 0.25 mg/l kinetina. Se incubaron con un fotoperíodo de 14h y temperatura de 26°C con intervalos de subcultivo cada 15 días.

Cada medio tuvo 5 repeticiones Se evaluó la presencia de estructuras embriogénicas.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental empleado fue completamente aleatorio. El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó con el paquete MINITAB versión 16,0 para Windows. Para la comparación entre las medias se utilizó la prueba de Tukey.

Se trabajó el diseño factorial $p \times q$ con dos factores en DBCA. El modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

i =tratamientos= T1,T2,T3

j =zona de la inflorescencia de la que proviene el explante= apical(a), media(m), basal(b)

k =bloques= 1,2,...,9

donde:

Y_{ijk} = número de callos observados con el nivel i del factor tratamiento, nivel j del factor zona de la inflorescencia de la que proviene el explante en el bloque k .

μ = es el efecto de la media general del número de callos observados.

α_i = es el efecto del tratamiento i .

β_j = es el efecto de la zona de la inflorescencia j de la que proviene el explante.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = es el efecto de la interacción del tratamiento i con la zona de la inflorescencia j de la que proviene el explante.

γ_k = es el efecto del bloque k .

ϵ_{ijk} = es el efecto del error experimental con el tratamiento i , la zona de la inflorescencia j de la que proviene el explante y el bloque k .

Las hipótesis propuestas son las siguientes:

H_0 : Es posible la formación de callo embriogénico a partir de inflorescencias femeninas inmaduras de ecotipos de palma datilera a través de la evaluación de diferentes condiciones de cultivo.

H_1 : No es posible la formación de callo embriogénico a partir de inflorescencias femeninas inmaduras de ecotipos de palma datilera a través de la evaluación de diferentes condiciones de cultivo.

Para la investigación se propuso un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 RESULTADOS

6.1.1 FASE DE INICIACIÓN DEL CULTIVO *IN VITRO*

Respecto a la morfología, no hubo cambios significativos, pero se observó en algunos explantes los carpelos.

Se evalúa el porcentaje de contaminación de los explantes después de 28 días en el medio Murashige y Skoog (1962). Según el Análisis de Varianza (Cuadro 3) realizado no hay diferencias significativas en el uso de hipoclorito de sodio a las concentraciones de 0.5%, 1% y 1.5% para la desinfección de las espigas. No obstante, se observa diferencias significativas entre los porcentajes de contaminación de las zonas de la espiga (basal, media y apical), y la prueba de Tukey muestra la agrupación respectiva (Cuadro 4). En la Figura 13 se muestra que los explantes provenientes de la zona basal de la espiga son los más afectados, obteniendo el mayor porcentaje de contaminación (46.5%). Además no hay diferencias significativas entre la interacción de cada concentración de hipoclorito de sodio con cada zona de la espiga.

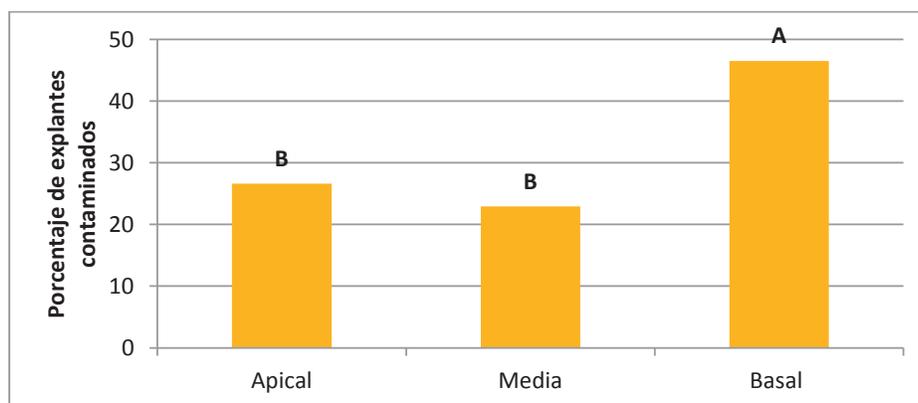


Figura 13. Porcentaje de contaminación en cada zona de la espiga. Letras diferentes indican significación (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$). La variable porcentaje de contaminación se transformó acorde a $y = \arccos(x)$.

Al analizar los principales contaminantes en el cultivo, las bacterias fueron las principales, donde el 86.11% de los explantes estuvieron afectados por estos microorganismos (Fig. 14).

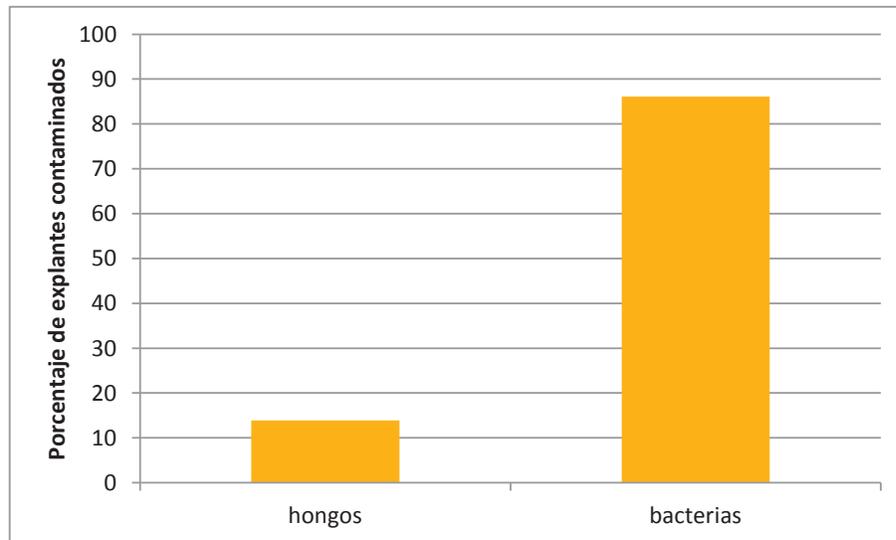


Figura 14. Porcentaje de contaminación de los explantes por tipo de microorganismos

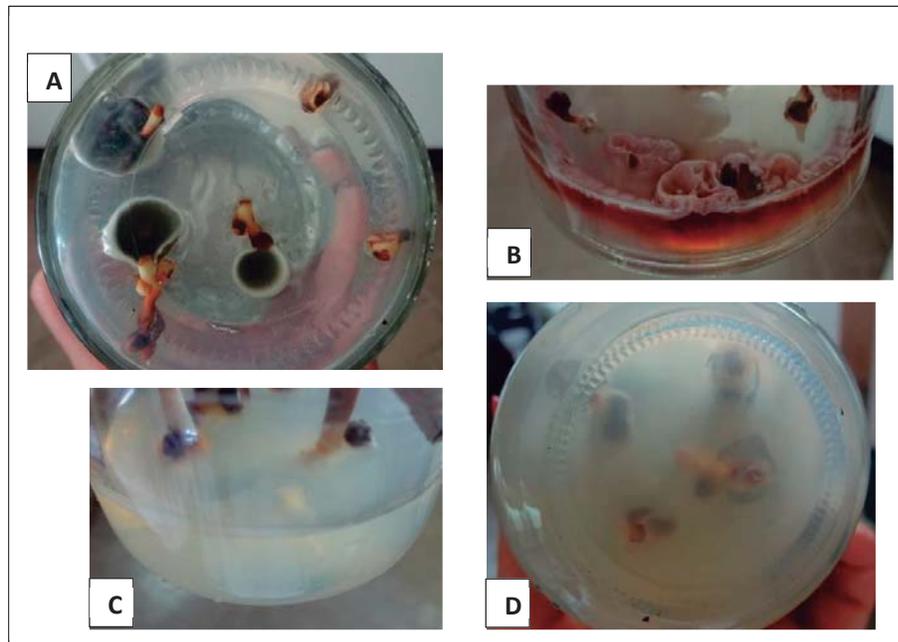


Figura 15. Tipos de contaminación en el medio de cultivo durante el establecimiento *in vitro* de los explantes. A-B. Contaminación por hongo. C-D. Contaminación por bacteria.

Se procede a evaluar el oscurecimiento del explante. Según el Análisis de Varianza (Cuadro 7) no hay diferencias significativas en relación a la fenolización de los explantes cuando se trabajó con hipoclorito de sodio a las concentraciones de 0.5%, 1% y 1.5% para la desinfección de las espigas. Si se encuentran diferencias significativas entre las zonas de la espiga, y la prueba de Tukey muestra la agrupación respectiva (Cuadro 8). Se evidencia una alta fenolización del material trabajado en las tres zonas de la espiga, sin embargo la zona basal de la espiga es la más afectada con un total de 91.4% (Fig. 16). No hay diferencias significativas entre la interacción de cada concentración de hipoclorito de sodio con cada zona de la espiga.

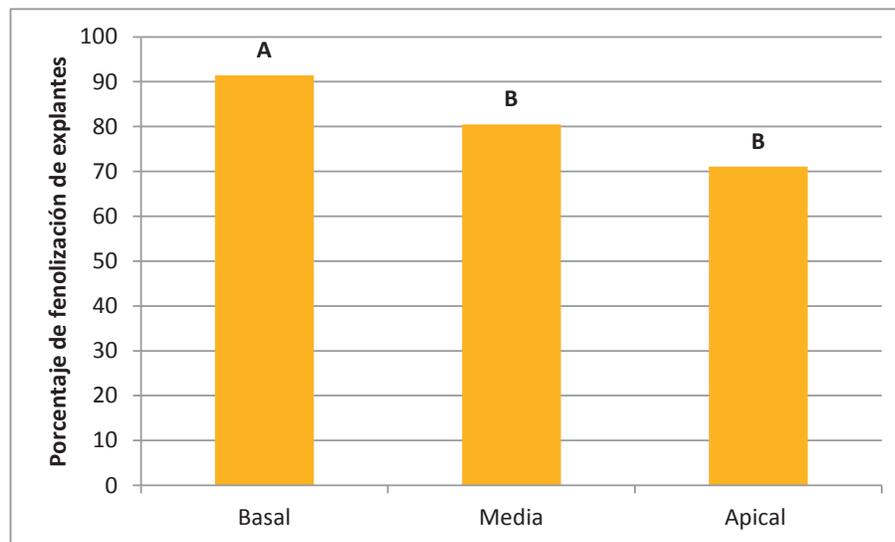


Figura 16. Porcentaje de fenolización de explantes por cada zona de la espiga. Letras diferentes indican significación (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$). La variable porcentaje de fenolización se transformó acorde a $y = \arccos(x)$.

Además se observó que las partes de los explantes que estuvieron insertados completamente en el medio tendieron a mantenerse blancos, y la mayoría de los que estuvieron en la superficie se tornaron marrones (Fig. 17).

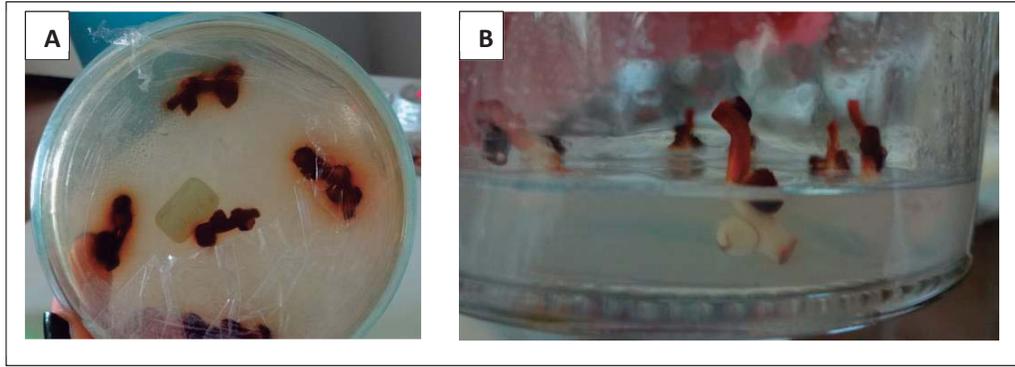


Figura 17. Fenolización de los explantes en el cultivo. A. Máxima fenolización observada. B. Explante mantiene su coloración blanca en la parte insertada en el medio.

6.1.2 FASE DE INDUCCIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO

En la figura 18 se muestra que el medio de inducción con el que se logró la mayor cantidad de callos fue el medio II (43.8%) con diferencias significativas del resto de los medios. Además el Análisis de Varianza (Cuadro 11) nos indica que no hay diferencias significativas entre las zonas de la espiga, ni entre la interacción tratamiento y zona de la espiga. La prueba de Tukey muestra la agrupación respectiva (Cuadro 12).

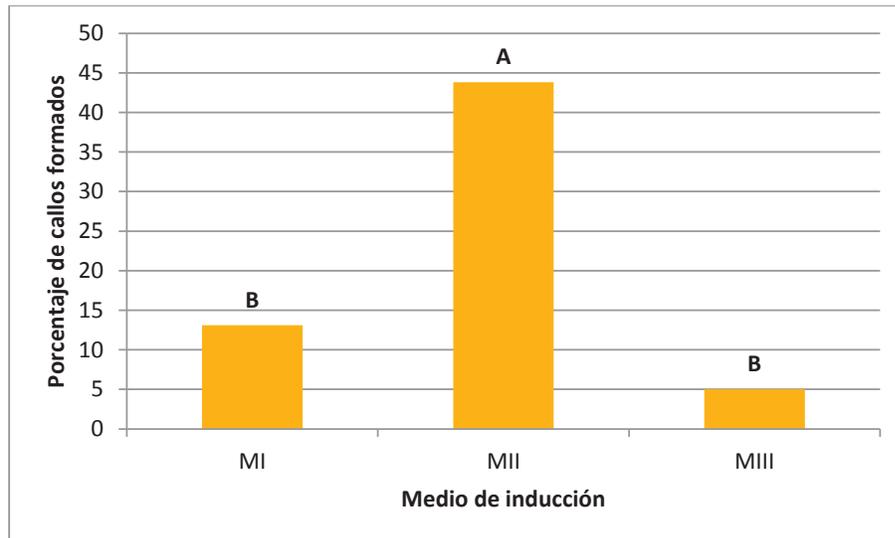


Figura 18. Porcentaje de formación de callos con las diferentes formulaciones de medios. Letras diferentes indican significación (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$).

A la sexta semana del cultivo de los explantes en el medio de inducción I (Medio I) se observaron los primeros signos de formación de callos en explantes provenientes de la zona media y apical de la espiga. (Fig. 19. A y B). También se divisó el engrosamiento de los explantes (Fig. 19. C). Durante las siguientes semanas de evaluación, los callos formados no aumentaron su volumen y algunos de ellos tendieron a fenolizar.



Figura 19. Formación de callo en el medio de inducción I. A-B. Explantes en la sexta semana de cultivo, las flechas señalan los primeros callos observados. C. Crecimiento de carpelos.

Mientras que en el medio de inducción II se divisaron a la quinta y sexta semana de la siembra de los explantes las primeras masas callosas propiamente dichas en las bases de los explantes provenientes de la zona basal, media y apical de la espiga. En algunos explantes se observó engrosamiento de los explantes. Durante la séptima y octava semana, las masas callosas aumentaron en volumen. Luego, el crecimiento de la masa callosa se mantuvo en un volumen fijo durante tres semanas, sin cambios aparentes, oscureciendo algunas zonas de la masa callosa, y volviendo formarse nuevas masas (Fig. 20).

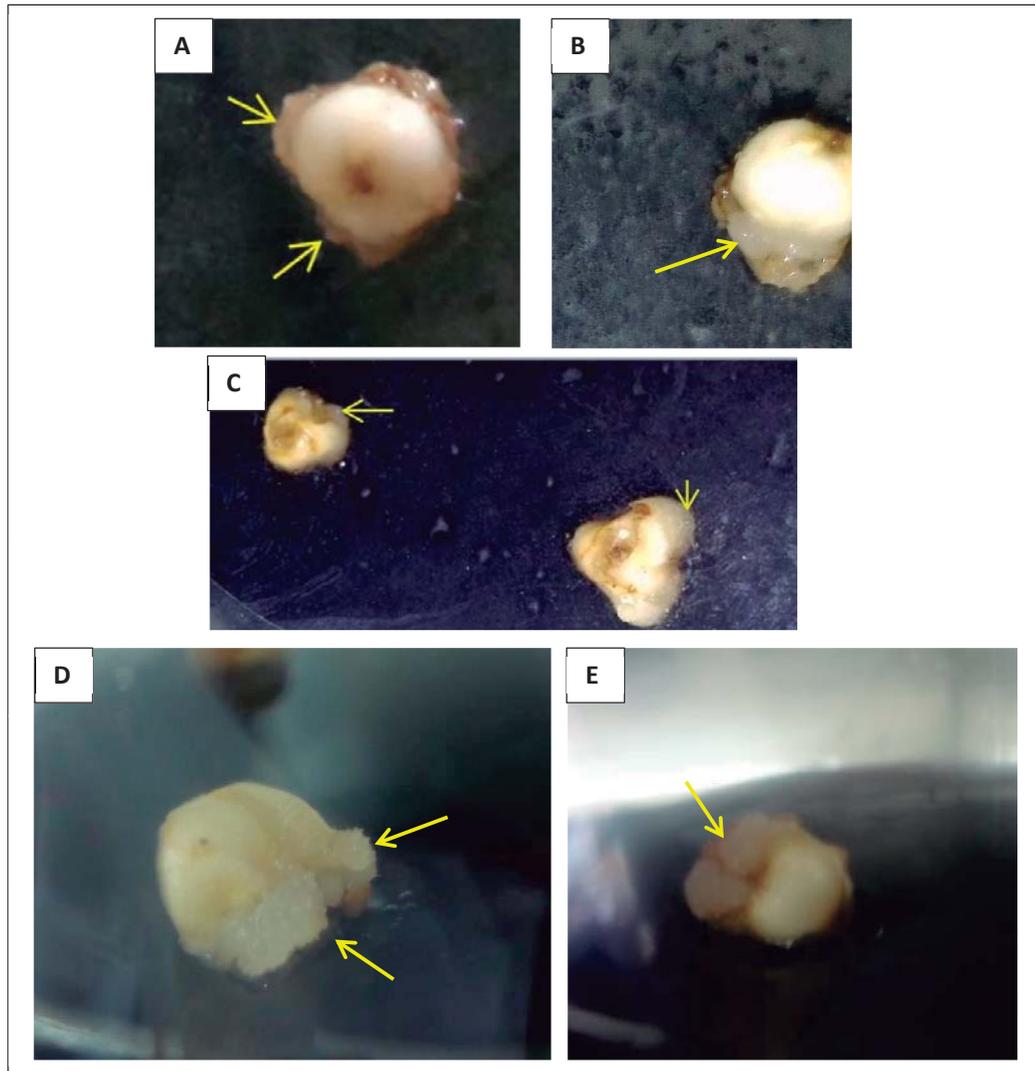


Figura 20. Formación de callo en el medio de inducción II. A. Explante en la quinta semana. B. Explante en la sexta semana. C. Explantes con mayor engrosamiento. D-E. Explantes en la novena semana. Flechas indican callos.

En el medio de inducción III, a la sexta semana de la siembra de los explantes se observó en algunos casos el crecimiento y desarrollo de los callos provenientes de la zona basal, media y apical de la espiga. A la séptima semana de la siembra de los explantes en el medio de inducción III (Medio III) se observó en algunos casos la aparición de callos. Nótese como en este medio se observó más el crecimiento de tejido que la formación de callos, los pocos que formaron callos presentaron menor tamaño (Fig. 21).

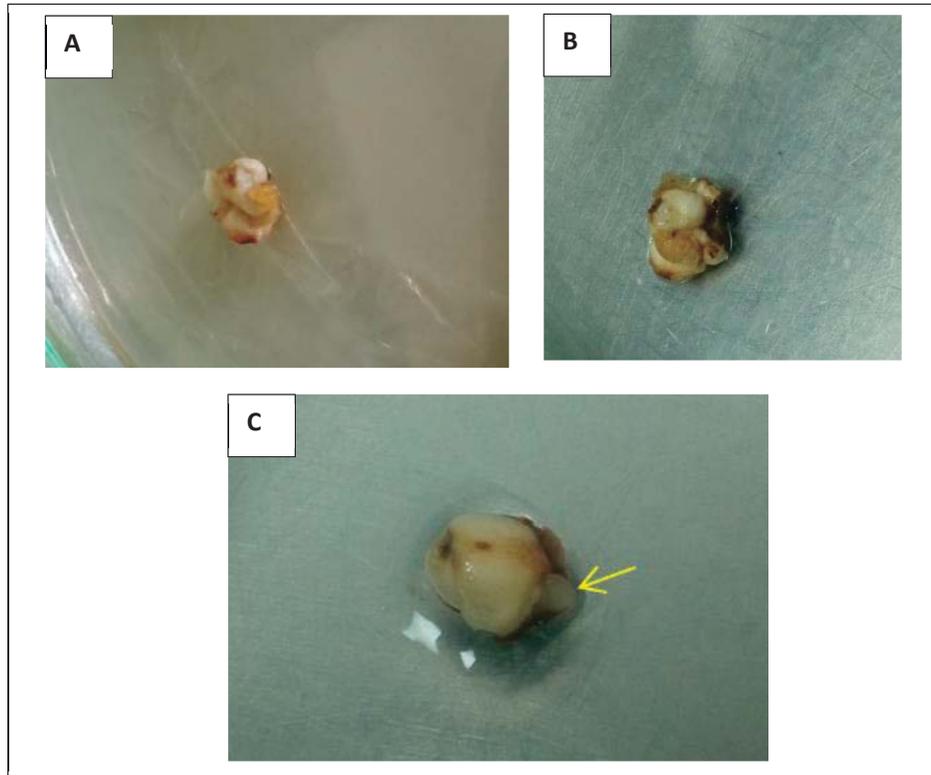


Figura 21. Explantes en el medio de inducción III. A-B. Explantes con desarrollo de tejido. C. Explante con callos.

Al analizar los niveles de fenolización de los callos en la etapa de inducción de callos se encontró que los explantes que se cultivaron en los medios I y III presentaron fenolización alrededor del explante. En estos tratamientos se lograron un 39.0% y 38.2% de fenolización respectivamente. Mientras que aquellos callos que se vieron en el medio de inducción II presentaron un 22.9% de fenolización (Fig. 22).

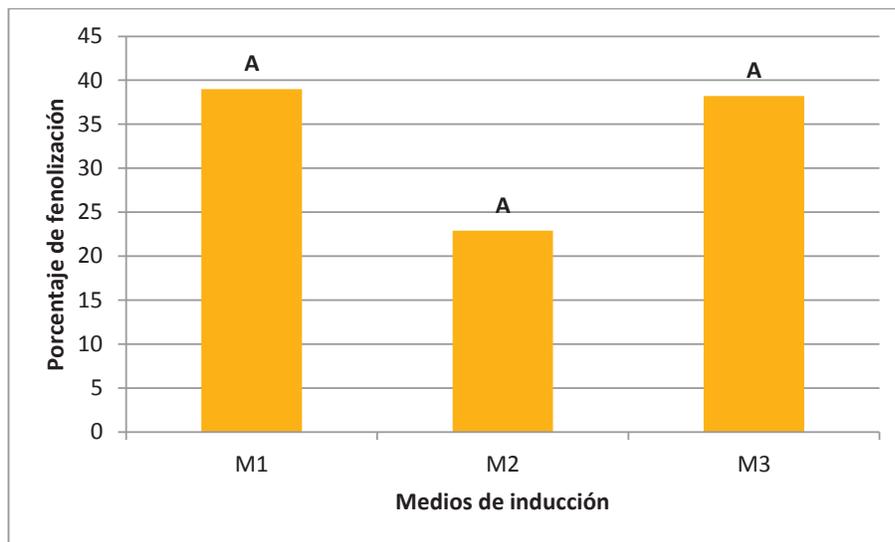


Figura 22. Porcentaje de fenolización de los explantes durante la formación de callos en los diferentes medios de Inducción que se compararon.

En esta etapa de inducción de callo se percibió también una crítica contaminación de explantes independientemente de los medios. Se observó una especie de nata blanca (Fig. 23).

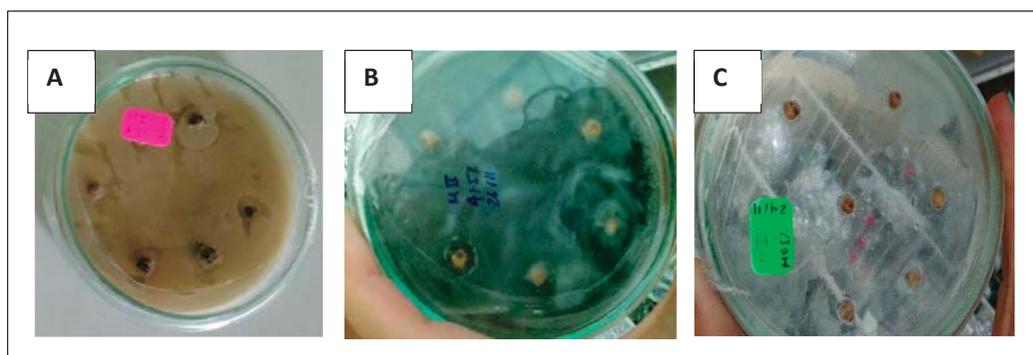


Figura 23. Contaminación en el medio de cultivo durante la inducción *in vitro* de los explantes. A-C. Contaminación por bacteria en los tres medios de inducción.

6.1.3 FASE DE MADURACIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO

En la Fase de Maduración se utilizaron los botones florales en los cuales se observó el crecimiento de agrupaciones de callos en la Fase de Inducción de callos. Es decir, los que lograron la formación de masas pro-embriónicas.

En esta etapa se buscaba observar la primera etapa de los callos embriogénicos. Así es como se observaron callos embriogénicos de un color blanco cremoso, ya no tan cristalinos como en la Fase de Inducción. Se identificaron formas globulares, una especie de gránulos dentro de la masa callosa, formas que son detalladas como primera de etapa de los callos embriogénicos o también conocidos como embriones somáticos de estadio I. A partir de estas estructuras es que se desarrollan los embriones somáticos.

Además del crecimiento lateral en masa, en el medio I se observó también crecimiento hacia arriba. Algunas veces es posible encontrar en el mismo medio que los callos embriogénicos se diferencien a sus siguientes etapas. En el medio I y II se observaron estructuras alargadas, probablemente en estadios más avanzados del desarrollo embrionario, además particularmente en el medio I se observó lo que podría ser una raíz (Fig. 25 y 26). En el medio II y III, se identificaron unos brotes verdes que desarrollaron a partir de las estructuras globulares (Fig. 26 y 27).

Con los subcultivos en el mismo medio durante un mes, se observó la continua producción de masas de callos embriogénicos sin perder este potencial.

A partir del Análisis de Varianza (Cuadro 19) realizado, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de maduración de callo embriogénico. El medio I logró un 24% de maduración de callos, el medio II un 16% y el medio III un 4%.

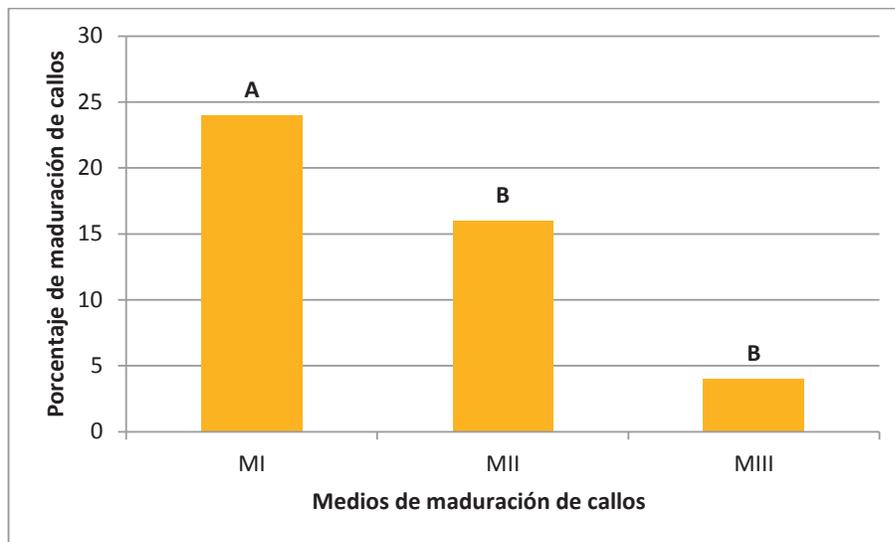


Figura 24. Porcentaje de maduración de callos con las diferentes formulaciones de medios. Letras diferentes indican significación (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$).

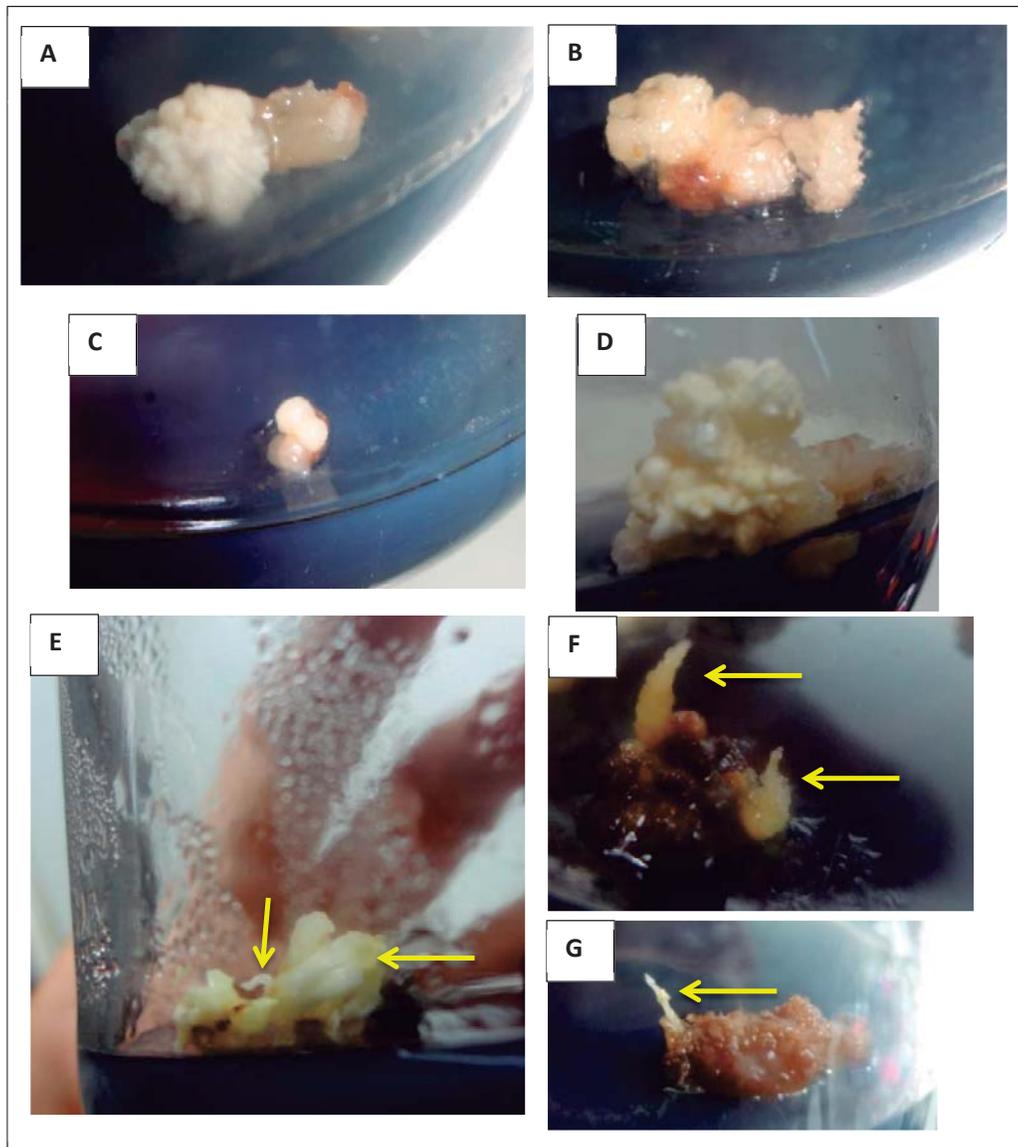


Figura 25. Callos con estructuras embriogénicas en el medio de maduración I. Fig. A-B-C-D Fotos tomadas a la semana de cultivarse en el medio de maduración. A. Nótese el cambio de color de la masa de callos. B-D. Véase el aumento de la masa callosa. C. Obsérvese un estado globular más definido. E-F-G. Fotos tomadas la última semana en el cultivo de maduración. Se pueden apreciar estructuras diferenciadas dentro de la masa callosa, lo que vendrían a ser las estructuras embriogénicas. Las flechas señalan dichas estructuras. F. Muestra un estado de escutelo tardío. G. Posiblemente una raíz.

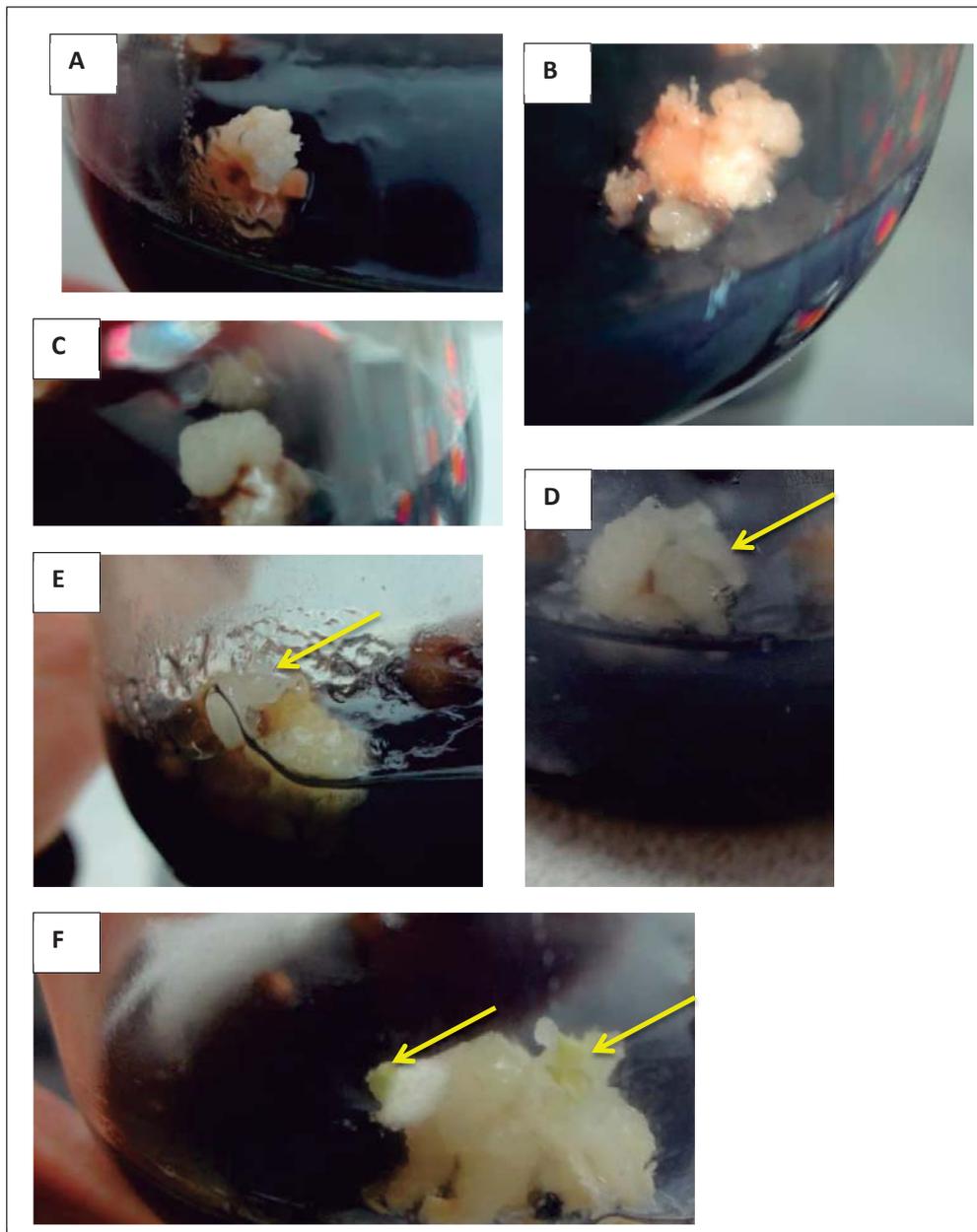


Figura 26. Callos con estructuras embriogénicas en el medio de maduración II. Fig. A-B-C Fotos tomadas a la semana de cultivarse en el medio de maduración. A. Nótese el cambio de color de la masa de callos. B. Véase el aumento de la masa callosa. C. Obsérvese la uniformidad del estado globular. D-E-F. Fotos tomadas la última semana en el cultivo de maduración. Se pueden apreciar estructuras diferenciadas dentro de la masa callosa, lo que vendrían a ser las estructuras embriogénicas. Las flechas señalan dichas estructuras. F. Muestra pigmentos verdes, flechas ayudan a la observación de los dos sectores verdosos.

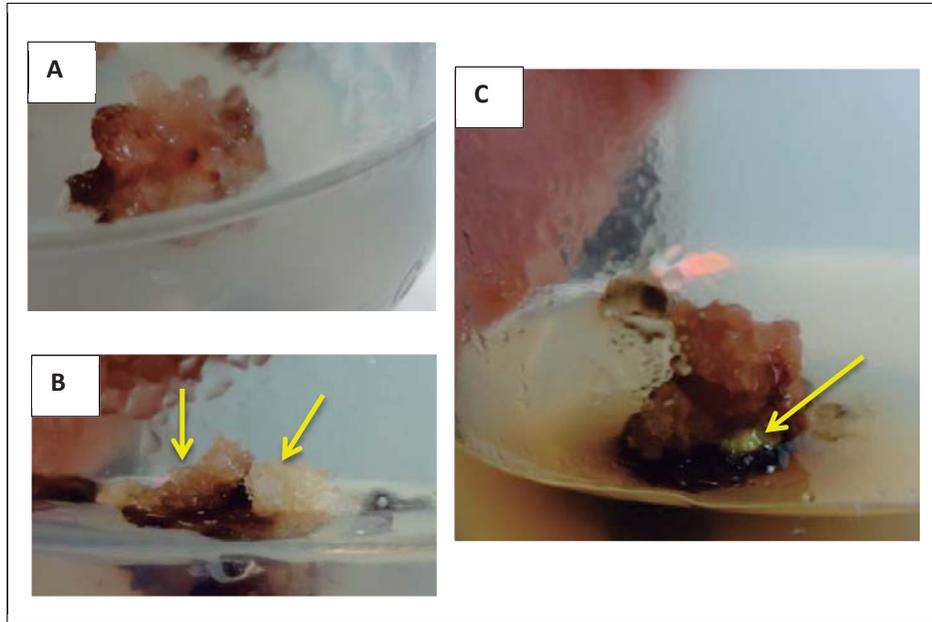


Figura 27. Callos con estructuras embriónicas en el medio de maduración III. Fig. A Fotos tomada a la semana de cultivarse en el medio de maduración. Nótese el aumento de la masa callosa, y las diferentes tonalidades en el mismo, se aprecia rejuvenecimiento de la masa callosa B-C. Fotos tomadas la última semana en el cultivo de maduración. B. Se observa al parecer un estado globular. C. Muestra pigmentos verdes, flechas ayudan a la observación.

En esta etapa también se evalúa la fenolización. Según el Análisis de Varianza (Cuadro 21) no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, en el medio III se observó una coloración más prominente, algunas veces llegando al ennegrecimiento (Fig. 27C).

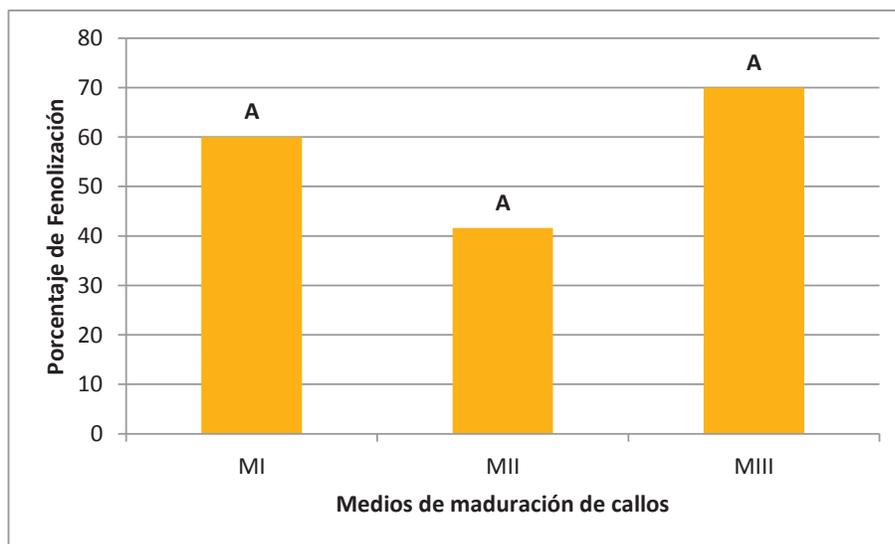


Figura 28. Porcentaje de fenolización de en los medios de maduración. (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$).

6.2 DISCUSIÓN

6.2.1 FASE DE INICIACIÓN DEL CULTIVO *IN VITRO*

En las inflorescencias femeninas, después de cuatro semanas de la siembra, los carpelos se hacen evidentes (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012). Esto se observó en algunos de los explantes en estudio.

Según el análisis de varianza no hubo diferencias significativas en el uso de hipoclorito de sodio cuando se desinfectaron las espigas a las concentraciones de 0.5%, 1% y 1.5% (Cuadro 3). De acuerdo a los resultados, el uso de las tres concentraciones de hipoclorito de sodio nos genera el mismo efecto desinfectante. Basándose en las observaciones de los explantes después del proceso de desinfección y antes de la siembra en el medio MS, se percibió que los explantes desinfectados con una concentración de 1.5% presentaban pequeños daños superficiales, unas rayas marrones. Por lo tanto, sería preferible no usar la concentración de 1.5% de hipoclorito de sodio para evitar algún daño superficial. Como medida para el ahorro en materiales, se utilizaría el tratamiento de 0.5% de hipoclorito de sodio como solución de desinfección, no obstante es mejor asegurar la desinfección del material vegetal que viene del campo, por lo tanto se recomienda el tratamiento de 1% de hipoclorito de sodio. En la literatura se ha encontrado el empleo de una concentración de 1% de hipoclorito de sodio para la esterilización de los explantes provenientes de diferentes partes de la planta en la palma datilera (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012); y cuando se trabaja con las inflorescencias de la palma datilera (Abul-Soad, 2012).

Cuando se comparan los porcentajes de contaminación con relación a las zonas de las espigas (zona basal, media y apical) si se encontraron diferencias significativas entre las mismas (Cuadro 4). El porcentaje de contaminación de las zona basal de la espiga fue la más afectada con un 46.5%, seguida de las zonas apical y media con porcentajes de 26.6% y 22.9%, respectivamente (Fig. 13). La desigualdad en contaminación en zonas de la espiga podría deberse a la edad de los explantes, siendo las zonas basales de mayor edad y las apicales las más jóvenes.

La contaminación microbiana es un problema constante, que a menudo compromete el desarrollo exitoso de las técnicas *in vitro* y pone en grave peligro un programa de cultivo de tejidos (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012). Debido a que la contaminación es un problema persistente en el cultivo de tejidos y para lograr trabajar con explantes ‘limpios’ cuando se iniciara la fase de inducción de callos, se realizó una fase previa de desinfección con un agente desinfectante y además se evaluó los explantes durante 28 días para descartar los contaminados. Los explantes contaminados se vieron afectados mayormente por bacterias (86,1%), mientras que la contaminación por hongos fue menor (13.9%) (Fig.14).

Cerca de treinta y uno microorganismos de diez variedades diferentes de plantas que crecen en la micropropagación han sido aislados, identificados y caracterizados, siendo las más predominantes las levaduras, *Corynebacterium spp.* y *Pseudomonas spp.* También se han encontrado *Bacillus sp.* (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012).

Generalmente en el cultivo *in vitro* la presencia de bacterias endógenas es un problema. Se han empleado diferentes estrategias para contrarrestarlo, sin embargo el establecimiento y control adecuado de las plantas donantes de explante ha sido el más exitoso. No obstante para el dátil resulta bastante difícil crear un banco de plantas madres bajo condiciones controladas. Es por ello que en un futuro el empleo de agentes desinfectantes más potentes como el Hg_2Cl_2 (bicloruro de mercurio) podría atenuar este efecto. Othmani et al. (2009) emplearon el Hg_2Cl_2 (0.01%) por 1h para la desinfección superficial de hojas jóvenes adyacentes al ápice de hijuelos de palma dátil cv. Deglet Bey. También el empleo de antibióticos en el cultivo de palma datilera podría ser utilizado.

En el cultivo *in vitro* de algunas especies de plantas como la palma datilera cv. Deglet Bay, los explantes de hojas jóvenes se tornaron marrones y la mayoría murió especialmente durante la etapa inicial del cultivo. Este resultado sugiere que los componentes más letales del oscurecimiento de los explantes se presenta en esta etapa. Esta coloración marrón del explante y de su medio adyacente se asume que es debido a la oxidación de compuestos fenólicos y la formación de quininas, las cuales son tóxicas para el tejido (Othmani et al., 2009).

Agentes reductores tales como ascorbatos, citratos y glutationatos se puede utilizar para evitar el ennegrecimiento. Adición de agentes quelantes como EDTA y la disminución del pH del medio con ácido ascórbico y ácido cítrico puede también inhibir la actividad de fenol oxidasa y por lo tanto reducir el oscurecimiento (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012). Durante la fase de desinfección los explantes fueron cultivados en el medio Murashige & Skoog, el cual presenta EDTA en su composición. Incluso se agregó ácido cítrico como antioxidante al medio. A pesar de las medidas tomadas, la fenolización de los explantes de inflorescencia después de 28 días en el medio fue de 71.1% para la zona apical, 80.5% para la zona media y 91.4% para la zona basal (Fig.16). Se puede decir que el EDTA y el ácido ascórbico no son suficientes para reducir el oscurecimiento de los explantes. A pesar de que los porcentajes de contaminación por zona de la espiga no son tan altos como los de fenolización, se mantuvo la tendencia de ser la zona basal la más afectada, seguida de la zona apical y media. La fenolización puede haber propiciado en cierta medida la contaminación de los explantes. El contenido de fenoles en los tejidos es proporcional al nivel de diferenciación del mismo. Esto podría justificar que la zona basal sea la más afectada, ya que las células que conforman ese tejido al ser menos juveniles se contaminan más, así como se ven más afectadas por la fenolización.

El alto nivel de contaminación en la zona basal también pudo ser afectado por la posición del explante en el medio (horizontal o vertical), ya que se observó que los explantes que estuvieron inmersos en el medio se mantuvieron blancos, mientras que los que no estuvieron en contacto con el medio fenolizaron rápidamente (Fig.17 B.) En cuanto a la posición del explante en el medio de cultivo, es mejor colocar los explantes en forma horizontal ya que así se asegura el contacto de los explantes con el medio que contiene EDTA y ácido cítrico como antioxidante. Las superficies que no están en contacto con el medio están expuestas al oxígeno molecular, sustrato importante de la polifenol oxidasa, enzima que cataliza la oxidación de los fenoles (Fig 29).

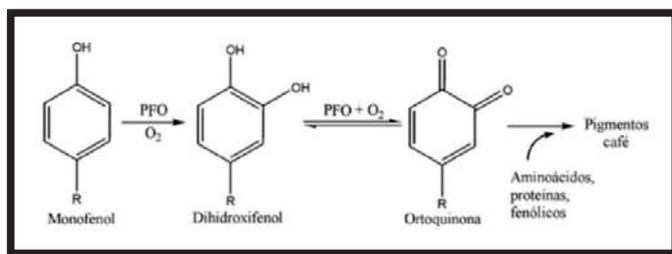


Figura 29. Acción de la PFO (polifenoloxidasasa) sobre los compuestos fenólicos. (García et al., 2006)

De acuerdo a lo discutido se redacta el siguiente Protocolo de Desinfección:

1. Lavar la espata con agua y detergente.
2. Sumergir la espata en una solución de fungicida sistémico por 30 segundos.
3. Encender la cámara de flujo laminar, limpiar la superficie de trabajo y paredes de la cámara con alcohol de 70%.
4. Abrir la espata con un bisturí estéril.
5. Cortar las espigas en tres segmentos iguales.
6. Introducir las espigas cortadas en una solución de alcohol al 70% por 1 minuto.
7. Colocar las espigas cortadas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% con 0.1 ml de Tween 20 por cada 100 ml de desinfectante durante 20 minutos.
8. Realizar tres enjuagues con agua destilada estéril (ácido cítrico 200mg/L).
9. Cortar segmentos para obtener explantes con dos pares de botones florales.
10. Sembrar en posición horizontal en el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) modificado para palma con 170 mg/L NaH₂PO₄, 125 mg/L mioinositol, 200mg/L glutamina, 5 mg/L tiamina, 1mg/L ácido nicotínico, 1 mg/L piridoxina, sacarosa 30g/L y agar 6.6g/L durante 1 mes en oscuridad.
11. Descartar los explantes contaminados y fenolizados.

6.2.2 FASE DE INDUCCIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO

Las bacterias han sido detectadas en una amplia gama de tejidos de la planta, y en tejidos cultivados que pueden aparecer con frecuencia o en etapas posteriores después de una serie de subcultivos (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012). En la presente investigación, a pesar de que durante la fase de desinfección se tuvo a los explantes en un medio base durante un mes para separar los explantes contaminados

de los no contaminados y así continuar con un proceso de experimentación más limpio y con un riesgo menor de contaminación en las fases futuras, se halló contaminación durante la fase de inducción de callos. La contaminación era persistente por lo cual se decidió agregar un antibiótico de amplio espectro (carbenicilina) a los tres medios (medio I, II, III), con lo cual se pudo continuar la investigación sin pérdida de material de interés, en este caso los explantes que empezaban a dar indicios de inicio de formación de callos. Al-Khalifah y Shanavaskhan (2012), indican que para tener un control eficaz de las bacterias, la esterilización de la superficie no es suficiente y es necesario el uso de antibióticos en el medio. La selección del adecuado antibiótico y la fijación de la concentración adecuada en el medio requieren de futuras investigaciones.

En la fase de inducción de callos, en los tres medios nuevamente estuvo presente el EDTA, incluido con los micronutrientes del medio Murashige y Skoog, y el ácido cítrico, como antioxidante. Comparando los resultados con respecto a la fenolización entre los tres medios de inducción, se puede observar claramente que el medio II fue el que presentó el menor porcentaje de fenolización entre los tres medios con un porcentaje de 22.9%, mientras que el medio I alcanzó un porcentaje de 39.0% y el medio III de 38.2% (Fig. 22).

Una diferencia clave entre los medios fue que uno de los medios (medio II) contenía además carbón activado en su composición. Los compuestos producto de la oxidación de los fenoles excretados al medio se puede eliminar mediante la adición de carbón activado en el medio (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012). Se puede observar en este caso la importancia del carbón activado para reducir la fenolización de los explantes de la espiga en la palma datilera.

El carbón activado es utilizado comúnmente para disminuir los problemas de oxidación durante el proceso de embriogénesis somática en palma (Viñas y Jiménez, 2011). Desempeña un papel importante en la micropropagación de palmeras datileras mediante la disminución de metabolitos tóxicos, exudaciones fenólicas y la acumulación del exudado marrón en los medios de cultivo. Durante la micropropagación, la exudación de fenol es muy común y a menudo influye en el resultado (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012). Se debe tener en cuenta también que

este compuesto puede adsorber ciertos componentes importantes del medio de cultivo, como los reguladores de crecimiento y otros compuestos orgánicos, lo que podría afectar la respuesta morfogénica. Los investigadores Ebert y Taylor (1990), citados por Viñas y Jiménez (2011) encontraron que el 2,4-D es adsorbido por el carbón activado en forma dependiente de la consistencia del medio de cultivo. Othmani et al. (2009) realizaron un pretratamiento a sus explantes de hojas antes de la esterilización superficial, en el que combinaron una solución de antioxidantes (150 mg/l ácido cítrico y 150 mg/l de ácido ascórbico) y luego cultivaron sus explantes en medio con 0.3 mg/l de carbón activado. Encontraron que este procedimiento es el mejor para evitar el oscurecimiento de los explantes, sin embargo bajo estas condiciones no se formaron callos. También, Abohatem y Baaziz (2014) hallaron que el carbón activado era el mejor agente que evitaba la formación de productos de la oxidación de los fenoles especialmente durante los primeros meses del cultivo de suspensión. Estos autores trabajaron con callos embriogénicos en suspensión obteniendo en su análisis bioquímico que el carbón activado reducía significativamente los compuestos fenólicos (0,12 mg /g de peso fresco) en comparación con un medio sin carbón vegetal (0,33 mg /g de peso fresco).

La exudación fenólica es un tema que genera grave preocupación en la micropropagación de palmeras datileras. En la siembra del explante para la inducción de callo, la incorporación de carbón activado en el medio es inevitable; de lo contrario puede llevar a pérdidas considerables. (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012). Sugimura y Salvaña (1989) y Samosir *et al.* (1998), citados por Viñas y Jiménez (2011), trabajaron con inflorescencias de coco e informaron que cuando no agregaron carbón activado a su medio de cultivo, se observó oxidación en todos los explantes.

Además se puede observar que al estar en contacto todos los explantes con el medio, los porcentajes de fenolización en la fase de inducción disminuyen notablemente con respecto a los porcentajes de fenolización en la fase de desinfección, en la cual no todo el explante en su totalidad estaba en contacto con el medio.

En la fase de inducción de la embriogénesis la composición del medio juega un papel esencial. Dentro de la composición del medio, las hormonas y la fuente de nitrógeno

tiene efectos importantes en la respuesta inicial del explante en la inducción de la embriogénesis (Hussain et al., 2012).

El análisis de varianza nos indica que hay diferencias significativas entre los tratamientos utilizados para la inducción de callos (Cuadro 11). El tratamiento con mejor respuesta fue el medio II, protocolo tomado del trabajo de Abul-Soad (2012), logrando al menos un 30.7% de formación de callos más que los medios de inducción I y III.

Al mes y medio se divisaron las masas callosas brillantes en los explantes cultivados en el este medio (Fig. 20 A.) En su estudio, Abul-Soad y Mahdi (2010) encontraron a los dos meses estructuras cremosas brillantes y globulares.

Comparando las tres formulaciones de medio, el medio II era el único que presentaba carbón activado. Este compuesto además de asistir en la reducción de la fenolización de los explantes como ya se explicó en párrafos anteriores, según Abohatem y Baaziz (2014), el carbón activado utilizado a 150mg/l mejoró la tasa de crecimiento de los embriones somáticos de palma datilera. El carbón activado se ha utilizado en los medios de cultivo de tejidos para mejorar el crecimiento celular del cultivo y promover la morfogénesis en una amplia variedad de especies (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012).

En todas las formas de embriogénesis en plantas, ciertos criterios deben cumplirse antes de la iniciación. La especie o genotipo tiene que tener el potencial genético para formar embriones de células somáticas, y una o unas pocas células de la planta o explante tienen que ser el receptor de una señal (endógena o exógena) que desencadena la vía del desarrollo embriogénico, dando lugar a la formación de embriones. Entre todas las auxinas, el 2,4- D se ha encontrado eficaz para desencadenar esa vía (Abul-Soad, 2012). Con respecto a las citoquininas acompañantes: algunos autores han utilizado, además de auxina, citoquininas como la 2ip (2-isopentiladenina), en bajas concentraciones con buenos resultados (Viñas y Jiménez, 2011).

Los tres medios de inducción utilizados incluían en su composición 2,4-D como una de las auxinas, sin embargo la proporción en cada medio no fue la misma. En el medio I la cantidad que se utilizó fue de 0.1 mg/l, en el medio II fue de 100 mg/l, y en el medio III fue de 2mg/l. Se observa que el medio II tenía al menos 98% más de 2,4-D que los otros dos medios. Ya que el medio II generó la mayor cantidad de masas callosas, podría decirse que la alta concentración de la auxina 2,4-D en comparación a los medios I y III favoreció la formación de los callos. Además el medio II, era el único que tenía en su composición una citoquinina como acompañante de la auxina 2,4-D. El medio I y III utilizaron aparte del 2,4-D, otras auxinas como acompañantes. No cabe duda que la relación auxina citoquinina en el medio II favoreció la formación de callos.

Según Von Arnold *et al.* (2002), citado por Viñas y Jiménez (2011), dentro de los reguladores de crecimiento las auxinas juegan un papel muy importante en la transducción de señales para desencadenar un patrón de expresión génica determinado, y la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), es la más utilizada para la inducción de embriogénesis somática.

En palma datilera, Othmani *et al.* (2009) determinaron que la aplicación exógena de reguladores de crecimiento es indispensable para la producción de callo embriogénico y para la etapa de estímulo celular la cual inicia la embriogénesis somática: en palmas, la auxina utilizada con más frecuencia es el 2,4-D. (Viñas y Jiménez, 2011). A su vez, Abul-Soad (2012), confirma que la palma datilera necesita un alto nivel de auxina para interrumpir el desarrollo normal de las células. Al-Khalifah y Shanavaskhan (2012) recomiendan para inducir el potencial embriogénico y formar callos en palma datilera, transferir las células a un medio MS modificado con alta concentración de auxina, optando por el ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4- D), además de 3 mg/l 2iP y 1,5 g/l carbón. Los resultados que se obtuvieron con el empleo del medio de inducción II están en concordancia con los resultados expuestos por otros autores.

Eke *et al.* (2005) realizaron embriogénesis somática en palma datilera con tejido del meristema apical con medios MS que tenían 100 mg/l 2,4-D y 3 mg/L 2-ip y obtuvieron resultados positivos. El mismo año, Badawy *et al.* (2005) en palma

datilera reportaron obtener la mayor formación de callos con un medio MS suplementado con 100 mg/l 2, 4-D + 3 mg/l 2iP a partir de explantes del meristema apical.

6.2.3 FASE DE MADURACIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO

En esta primera etapa del proceso de diferenciación, se visualizan los callos generalmente blancos, con apariencias granulares, algunos friables, en el medio se observa en su mayoría estructuras globulares cremosas brillantes (Zayed y Elbar, 2015, Jatoi, et al., 2015; Bhaskaran y Smith, 1992). Estas observaciones concuerdan con las obtenidas en este trabajo. Además se puede ver en el medio pro-embriones en distintos estadios.

En el resultado del presente trabajo, el análisis de varianza nos indica que hay diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 19). El tratamiento con mejor respuesta fue el medio I, con explantes de la zona media de la espiga, protocolo tomado del trabajo de Abul-Soad y Mahdi (2010), logrando un 24% de maduración, el medio II obtuvo un 16% de maduración de callos, que se expresa como la formación de masa callosa compacta con estructuras embriogénicas en la masa.

El medio de maduración I tiene una concentración de 5.0 mg/l de la auxina 2,4-D, el medio de maduración II tiene una concentración de 10mg/l de 2,4-D y el medio de maduración III tiene una concentración de 2.5 mg/l de 2,4-D. Las masas callosas de los diferentes tipos de explante que se utilizaron en esta etapa provenían del mejor medio de inducción que contenía 100 mg/l de 2,4-D. Por consiguiente, se advierte una reducción de 97.5% por parte del medio III, 95% por parte del medio I y de un 90% por parte del medio II.

En esta etapa de maduración de callos se fomenta el crecimiento de la masa proembriogénica y las estructuras embriogénicas. Viñas y Jiménez (2011) nos indican que en esta etapa generalmente se elimina por completo del medio de cultivo la auxina utilizada durante la etapa previa o bien se reduce su concentración. Fki et al. (2003) trabajaron con palma datilera, y reducir el 2,4-D después de la inducción

de callos les dio como resultado la diferenciación de un gran número de embriones somáticos. Verdeil et al. (1994), en inflorescencias de coco, después de la transferencia a los medios que contenían baja concentración de 2,4-D, los callos produjeron más masa blanca, translúcida, perlada o con estructuras de difícil clasificación. Además, durante el subcultivo, experimentaron organogénesis compleja que incluye: diferenciación de estructura frondosa, formación similar a estructuras florales o formación de desarrollo similar al embrión.

En la maduración el medio I, a diferencia del medio II y III tenía como uno de sus componentes la glutamina. El nitrógeno orgánico, particularmente, en la glutamina, es conocido por su efecto positivo en la embriogénesis somática. En el cultivo *in vitro* ha demostrado ser importante en el mantenimiento de la división celular y el aumento del número de embriones somáticos. Además, utilizada como suplemento al nitrógeno inorgánico presente en el medio de cultivo, los resultados se duplican. En palma datilera, el ácido glutámico, la arginina, alanina y asparagina mostraron los mayores valores de masa fresca y tasa de crecimiento como aminoácidos suplementos en la desarrollo de callos (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012). Zouine y El Hadrami (2007), citados por Viñas y Jiménez (2011) trabajaron con distintas concentraciones de glutamina para observar el efecto en la embriogénesis somática y concluyeron que 0.67mM de glutamina (~ 97.82mg) incrementó la producción de embriones somáticos. Según Abohatem y Baaziz (2014), La aplicación de glutamina (100 mg /l) al medio de cultivo de los embriones somáticos llevó a la disminución de la actividad de peroxidasa (35,6 UE / g de peso fresco) en comparación con un medio sin proteínas de glutamina (56,8 UE / g de peso fresco) y al aumento del contenido de proteínas de 75,6 mg /g de peso fresco a 87,84 mg /g de peso fresco. Estos resultados corroboran la importancia de la glutamina en la formación de callos embriogénicos.

Cuando se realizaron los subcultivos durante la fase de maduración de callos, partes de las masas callosas tendieron a adquirir un color marrón. Al-Khalifah y Shanavaskhan (2012) nos indican que los daños mecánicos a los tejidos estimulan la producción de compuestos fenólicos, por ejemplo, cuando se extirpan los explantes de plantas madres o durante subcultivos. Él último vendría a ser nuestro caso (Fig.27).

Los callos que se cultivaron en el medio III presentaron una fenolización superior a la de los medio I y II. Probablemente esto no se deba solamente al subcultivo de las masas callosas. Se debería tomar en cuenta que los callos establecidos en el medio III (Fig.27) fueron los únicos que estuvieron recibiendo luz, con un fotoperiodo de 14h, lo cual pudo contribuir a una coloración marrón más fuerte en comparación con los callos establecidos en los medios I y II, los cuales permanecieron en total oscuridad en esta etapa. En esto puede incidir el tiempo de exposición a la luz. Tal vez en los estadíos más avanzados de la maduración, el estrés lumínico podría favorecer una mayor diferenciación de las estructuras embriogénicas en los callos.

El uso de las inflorescencias inmaduras en la palma datilera como base para la micropropagación de la planta a partir de la embriogénesis somática con fines de producción comercial fue publicado por primera vez por Abul-Soad y Mahdi en el 2010, quienes trabajaron en Pakistán. Los resultados obtenidos al utilizar diferentes estados de desarrollo de las inflorescencias varían de acuerdo con la especie. En el caso de coco (*Cocos nucifera*), las inflorescencias con mayor respuesta embriogénica fueron aquellas con un mayor desarrollo (tamaño de espata = 45 cm); mientras que en pejibaye (*Bactris gasipaes*) fueron las inflorescencias con menor desarrollo (tamaño de espata = 5-8 cm), lo cual refuerza el papel del genotipo en la respuesta embriogénica. (Viñas y Jiménez, 2011). Las inflorescencias con las que se trabajó en este estudio midieron aproximadamente 40.5cm.

La capacidad que posee una célula o grupo de células para convertirse en embriogénica también depende de su estado fisiológico y de diferenciación. Los tejidos maduros, por ejemplo, presentan un mayor grado de metilación del ADN, lo que provoca una baja capacidad de desdiferenciación (Viñas y Jiménez, 2011).

En palma dátil el número de embriones somáticos formados fue significativamente diferente en dos cultivares expuestos a los mismos tratamientos de concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento. Los siguientes investigadores, citados por Viñas y Jiménez (2011), obtuvieron los siguientes resultados: en coco, Verdeil *et al.* (1994) encontraron respuesta diferencial al 2,4-D durante la etapa callo proembriogénico (CP) en los tres genotipos utilizados; en palma dátil la etapa CP depende en gran

medida del genotipo (Gueye *et al.* 2009). Esta sería la principal limitante para la propagación de genotipos importantes de esta especie. Eshraghi *et al.*, (2005) demostraron que dos cultivares iraníes de palma dátíl respondieron de diferente manera en todas las etapas. Por otro lado, Zouine y El Hadrami (2004) mostraron que dos genotipos de palma dátíl respondieron de forma significativamente diferente ante distintas dosis de sacarosa durante la etapa Desarrollo Proembriogénico (DP). Mientras que Aslam *et al.* (2011) y Al-Khayri (2011) mostraron que la respuesta durante todas las etapas de la ES fue diferente entre los genotipos de palma dátíl evaluados.

VII. CONCLUSIONES

1. Se estableció un protocolo para la desinfección de los segmentos de inflorescencias inmaduras de ecotipos nativos de palma datilera procedentes de Ica. El uso del hipoclorito de sodio al 1.0% en la desinfección superficial de segmentos apicales y medios fue el mejor, con un 70-75% de explantes libres de contaminantes endógenos visibles.
2. Para la inducción de callo embriogénico, el medio II (Abul-Soad, 2012) resultó ser el más efectivo independientemente de la posición del explante con un 43.8% de formación de callos. En esta formulación, las altas concentraciones de 2,4-D en balance con la citoquinina 2-iP y el carbón activado fueron los que mayor incidencia presentaron.
3. En la etapa de maduración de los callos, el empleo del medio I (Abul-Soad y Mahdi, 2010) permitió la formación de callos con estructuras embriogénicas en un 24%.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar el uso de bicloruro de mercurio como estrategia para mejorar el protocolo de desinfección de ecotipos de palma en la zona de Ica.
2. Utilizar un antibiótico de amplio espectro en los tres medios de cultivo de inducción y maduración como la carbenicilina.
3. Repetir el experimento incluyendo el gel (Gellan Gum) en los medios I (Abul-Soad y Mahdi, 2010) y II (Abul-Soad, 2012).
4. Estudiar el efecto del tamaño de la inflorescencia, como indicativo del grado de madurez, en la formación de callo embriogénico de estos ecotipos.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOHATEM, M. y BAAZIZ, M. (2014). Multiplication and germination of somatic embryos obtained from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera L.*). In: Proceedings of the Fifth International Date Palm Conference. P.231

ABUL-SOAD, A.A. (2012). Influence of inflorescence explant age and 2,4-D incubation period on somatic embryogenesis of date palm. Emir. J. Food Agric. 2012. 24 (5): 434-443

ABUL-SOAD, A.A. (2011). Chapter 6. Micropropagation of Date Palm using Inflorescence explants. In: Date Palm Biotechnology edited by Shri Mohan Jain, Jameel M. Al-Khayri, Dennis V. Johnson. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.

ABUL-SOAD, A.A. y MAHDI, S.M. (2010). Commercial production of tissue culture date palm (*Phoenix dactylifera L.*) by inflorescence technique. JGEB Vol. 8, No. 2.

AL-DOUS, E.K., BINU, G., AL-MAHMOUD, M.E., AL-JABER, M.Y., WANG, H., SALAMEH, Y.M., AL-AZWANI, E.K., CHALUVADI, S., PONTAROLI, A.C., DEBARRY, J., ARONDEL, V., OHLROGGE, J., SAIE, I.J., SULIMAN-ELMEER, K.M., BENNETZEN, J.L., KRUEGGER, R.R., MALEK, J.A. (2011). “De Novo Genome Sequencing and Comparative Genomics of Date Palm (*Phoenix dactylifera*).” Nature Biotechnology 29 (6): 521–27.

AL-KHALIFAH, N.S., SHANAVASKHAN A.E. (2012). Micropropagation of Date Palms. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB) and Association of Agricultural Research Institutions in the Near East and North Africa (AARINENA).p.54

AL-MSSALLEM, I.S., HU, S., ZHANG, X., LIN, Q., LIU, W., TAN, J., YU, X., LIU, J., PAN, L., ZHANG, T., YIN, Y., XIN, C., WU, H., ZHANG, G., ABDULLAH, M.M.B., HUANG, D., FANG, Y., ALNAKHLI, Y.O., JIA, S., YIN, A., ALHUZIMI, E.M., ALSAIHATI, B.A., AL-OWAYYED, S.A., ZHAO, D., ZHANG, S., AL-OTAIBI, N.A., SUN, G., MAJRASHI, M.A., LI, F., TALA, WANG, J., YUN, Q., ALNASSARI, N.A., WANG, L., YANG, M., AL-JELAIFY, R.F., LIU, K., GAO, S., CHEN, K., ALKHALDI, S.R., LIU, G., ZHANG, M., GUO, H., YU, J. (2013). "Genome Sequence of the Date Palm *Phoenix dactylifera* L." Nature Communications. 4:2274.

ASEMOTA, O., EKE, C.R., ODEWALE, J.O. (2007). "Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) in Vitro Morphogenesis in Response to Growth Regulators, Sucrose and Nitrogen." African Journal of Biotechnology 6 (20). p.2353-2357.

BADAWY, E.M., HABIB, A.M.A., EL-BANA, A., YOSRY, G.M. (2005). Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants by using tissue culture technique. Arab J. Biotech. 8 (2): 343-354.

BHASKARAN, S. y SMITH, R.H. (1992). Somatic embryogenesis from shoot tip and immature inflorescence of *P. dactylifera* cv. Barhee. Plant Cell Reports 12:22-25.

CHAO, C.T. y KRUEGER, R.R. (2007). "The Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.): Overview of Biology, Uses, and Cultivation." HortScience 42 (5): 1077-82.

EKE, C.R., AKOMEAH, P., ASEMOTA, O. (2005). "Somatic Embryogenesis in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) from Apical Meristem Tissues from 'zebia' and 'loko' landraces." African Journal of Biotechnology 4 (3): 244-46.

EL-JUHANY, L. (2010). "Degradation of Date Palm Trees and Date Production in Arab Countries: Causes and Potential Rehabilitation." Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 4(8): 3998-4010

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* 36: 23-28

.FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2015. FAOSTAT.

FKI, L., MASMOUDI, R., DRIRA, N., RIVAL, A. (2003). An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Rep.*21(6):517-24.

GALÁN, A. y CASTROVIEJO, S. (2008). *Phoenix dactylifera* L. (Real Jardín Botánico). Castroviejo & al. (eds), Flora ibérica Vol. 18, Pag(s). 271,272,275,276,277,278

GAMBOURG, O.L., MURASHIGE, T., THORPE, T.A., VASIL, I.K. (1976). Plant tissue culture media. *In vitro* 12:473-478.

GARCÍA, C.L., GIRALDO, G.A., HURTADO, H., MENDIVIL, C.O. (2006). Cinética Enzimática de la Polifenol Oxidasa del Banano Gros Michel en diferentes estados de maduración. *VITAE*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia. págs. 13-19

GEORGE, F.E., HALL, M.A., DE KLERK, G-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition. Volume 1. The Background. Springer.

GUEYE, B., MORCILLO, F., COLLIN, M., GARGANI, D., OVERVOORDE, P., ABERLENC-BERTOSSI, F., TRANBARGER, T. J., SANE, D., TREGGAR, J. W., BORGEL, A. AND VERDEIL, J-L. (2009). Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 35-45

HUSSAIN, A., QARSHI, I.A., NAZIR, H. ULLAH, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities, Recent Advances in Plant in vitro Culture, Dr. Annarita Leva (Ed.), ISBN: 978-953-51-0787-3, InTech, DOI: 10.5772/50568.

JATOI, M.A., ABUL-SOAD, A.A., MARKHAND, G.S., SOLANGI, N. (2015). Establishment of an Efficient Protocol for Micropropagation of Some Pakistani Cultivars of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) using novel Inflorescence Explants. Pak. J. Bot., 47(5): 1921-1927.

JOHNSON, D.V., AL-KHAYRI, J.M., JAIN, S.M. (2013). "Seedling Date Palms (*Phoenix dactylifera* L.) as Genetic Resources." *Emirates Journal of Food and Agriculture* 25 (11). doi:10.9755/ejfa.v25i11.16497.

JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F., DONOGHUE, M.J. (2008). Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. China.

KUNITAKE, H. y MII, M. (1998). "Somatic Embryogenesis and its Application for Breeding and Micropropagation in Asparagus (*Asparagus Officinalis* L.)." *15(2)*, 51–61.

MERKLE, S. A., PARROTT, W.A., FLINN, B.S. (1995). "Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis." In: In Vitro Embryogenesis in Plants, edited by Trevor A. Thorpe, 155–203. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture 20. Springer Netherlands.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO (MINCETUR). (2009). Informe Final: Estudio para La Selección de 10 Nuevos Productos, Su Adaptabilidad al Territorio Nacional, su Viabilidad en Europa e Identificar Potenciales Clientes - Fase V: Estudio para la Selección de 10 Nuevos Productos con Potencial Exportador, su Adaptabilidad al Territorio Nacional, su Viabilidad en Europa e Identificar Potenciales Clientes. PROYECTO UE-PERU/PENX ALA/2004/016-913

MURASHIGE, T. y SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

NEUMANN, K. H. (2006). Some studies on somatic embryogenesis: a tool in plant biotechnology. In: Kumar and Roy (eds) *Plant biotechnology and its applications in tissue culture*. I.K. International, New Delhi. pp 1-14

ORWA, C., MUTUA, A., KINDT, R., JAMNADASS, R., SIMONS, A. (2009). “*Phoenix Dactylifera*.” *Agroforestry Database: A Tree Reference and Selection Guide Version 4.0*. World Agroforestry Centre, Kenya.

OTHMANI, A., BAYOUDH, C., DRIRA, N., TRIFI, M. (2009). In vitro Cloning of Date Palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Bey by using embryogenic suspension and temporary immersion bioreactor (TIB). *Biotechnol. & Biotechnol. EQ*.

RIEGER, M. (2006). “Date - *Phoenix dactylifera* L.” *Fruit Crops*. Available in: <http://www.fruit-crops.com/date-phoenix-dactylifera/>.

RIVERA, D., JOHNSON, D., DELGADILLO, J., CARRILLO, M.H., OBÓN, C., KRUEGER, R., ALCARAZ, F., RÍOS, S., CARREÑO, E. (2013). Historical Evidence of the Spanish Introduction of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L., *Arecaceae*) into the Americas. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60, no. 4: 1433–52.

ROCA, W.M. y MROGINSKI, L.A. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Publicación CIAT N°.151. Colombia

Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI). 2008. Available in: http://www.senamhi.gob.pe/main_mapa.php?t=dHi

SIDDIQ, M. y GREIBY, I. (2013). Chapter 1: Overview of Date Fruit Production, Postharvest handling, Processing, and Nutrition. In: *Dates: Postharvest Science*,

Processing Technology and Health Benefits. p.1-28. Available in:
http://media.johnwiley.com.au/product_data/excerpt/75/11182923/1118292375-9.pdf

STEWART, F. C., MAPES, M.O., SMITH, J. (1958). "Growth and Organized Development of Cultured Cells. I. Growth and Division of Freely Suspended Cells." *American Journal of Botany* 45 (9): 693.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161:105–121.

TISSERAT, B., ESAN, E.B., MURASHIGE, T. (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1:1-78.

VERAMENDI, J. y NAVARRO, L. (1996). Influence of physical conditions of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 159-164.

VERDEIL, J-L., HUET, C., GROSDÉMANGE, F., BUFFARD-MOREL, J. (1994). Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 13:218-221.

VIÑAS, M. y JIMÉNEZ, V.M. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 13, 229–242.

VON ARNOLD, S., SABALA, I., BOZHOKOV, P. DYACHOK, J., FILONOVA, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 69, no. 3, p. 233-249.

YEUNG, E.C., RAHMAN, M.H, THORPE, T.A. (1996). Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. cv. Topas. I. Histodifferentiation. *Intl. J. Plant Sci.* 157:27–39

ZOID, A. y DE WET, P.F. (2002a). "CHAPTER I: BOTANICAL AND SYSTEMATIC DESCRIPTION OF THE DATE PALM." *FAO Corporate Document Repository*.

———. (2002b). "CHAPTER II: ORIGIN, GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION AND NUTRITIONAL VALUES OF DATE PALM." *FAO Corporate Document Repository*.

———. (2002c). "CHAPTER V: DATE PALM PROPAGATION". *FAO Corporate Document Repository*.

ZAYED, E.M.M., ELBAR, O.H.A. (2015). Morphogenesis of immature female inflorescence of date palm in vitro. *Annals of Agricultural Sciences*. Vol 60:1.113-120.

X. ANEXOS

ANEXO 1: DATOS METEOROLÓGICOS – DÍA DE RECOLECCIÓN

Estación : HACIENDA BERNALES , Tipo Convencional - Meteorológica												
Departamento : ICA			Provincia : PISCO			Distrito : HUMAY			Ir : 2014-09 ▾			
Latitud : 13° 45' 45"			Longitud : 75° 57' 57"			Altitud : 294						
Día/mes/año	Temperatura Max (°c)	Temperatura Min (°c)	Temperatura Bulbo Seco (°c)			Temperatura Bulbo Humedo (°c)			Precipitación (mm)		Dirección del Viento 13h	Velocidad del Viento 13h (m/s)
			07	13	19	07	13	19	07	19		
01-Sep-2014	20.8	14	14.5	20	15.7	14.2	17.4	14.4	0	0	NW	6
02-Sep-2014	19.6	13.8	14.5	17	15	14	15	14.2	0	0	NW	6
03-Sep-2014	24.4	13	14.7	23	16	13.6	18.6	14.4	0	0	NW	6
04-Sep-2014	22.2	11.8	13.5	20.6	15.5	13	17.2	14.4	0	0	NW	6
05-Sep-2014	22	12.4	14	21.4	16	13.4	17.4	14.4	0	0	NW	6
06-Sep-2014	21.6	12.2	13.7	20.5	15.2	13	16.2	14	0	0	NW	6
07-Sep-2014	24.6	13.4	14.6	17.5	15.5	14.2	15.8	13.8	0	0	NW	4
08-Sep-2014	23.6	11	13.7	17	16	13.2	15.2	13.8	0	0	NW	6
09-Sep-2014	22	12.2	13.2	21.6	14.5	12.4	16.6	13	0	0	NW	6
10-Sep-2014	21.8	11.8	13	22	14.5	12.2	18	13.2	0	0	NW	2
11-Sep-2014	24	11.2	13.5	23	15.2	12.8	18.2	14	0	0	NW	6
12-Sep-2014	23	13.8	14.2	22	16.7	14	17.4	15	0	0	SW	8
13-Sep-2014	27.6	13.8	16	27.5	19.2	14.8	20	16.8	0	0	SW	8
14-Sep-2014	26.4	14.4	16.5	26	17	15.4	19.8	15.6	0	0	NW	4
15-Sep-2014	22.2	12.6	13	21	15.7	13.4	17.4	15	0	0	NW	6
16-Sep-2014	22.4	14.4	15	20.7	16	14.8	17.8	15	0	0	NW	2
17-Sep-2014	22.2	13.8	15	21.7	16	14.6	18.2	15	0	0	C	
18-Sep-2014	23.4	14	15.5	22.7	15.5	14.6	18	14.4	0	0	NW	2
19-Sep-2014	23.4	11.4	14	22.5	16	13.6	18.2	14.8	0	0	NW	4
20-Sep-2014	21.6	13.8	15.2	20	15.7	14.6	17	14.6	0	0	NW	6
21-Sep-2014	20.4	13.4	14	16.7	15	13.8	15.2	13.8	-888	0	NW	2
22-Sep-2014	19.2	11.4	13	18.5	15.5	12.6	15.8	14.4	0	0	NW	6
23-Sep-2014	25.6	11	12.5	25	18.7	12.4	18.6	15.6	0	0	NW	6
24-Sep-2014	24.8	12.4	14	23.5	16.5	12.8	18.4	14.4	0	0	NW	6
25-Sep-2014	24.2	11.8	13	23	16	12.6	17.4	14.2	0	0	NW	4
26-Sep-2014	23.2	12.8	14.5	21.7	16	13.6	17.6	14.2	0	0	NW	2
27-Sep-2014	22.4	12.6	14.5	22	15.2	14	17.8	14	0	0	NW	6
28-Sep-2014	23	13.4	14.5	22	16.7	13.8	17.6	14.6	0	0	NW	6
29-Sep-2014	25.8	13	14.5	25	18.2	13.6	18.6	15.4	0	0	NW	4
30-Sep-2014	23.6	13	14	22.2	16	13.6	18.8	15	0	0	NW	4

Figura 7.D. Captura de pantalla tomada del Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI). La estación Hacienda Bernales (13°45'45"; 75°57'57") es la más cercana y en funcionamiento del punto donde se recolectó el material vegetal (13°55'59.4"; 75°55'53.0"). La temperatura en el día y hora de recolección aproximada es 21°C.

ANEXO 2: RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Cuadro 3. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación.

FUENTE	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Bloque	2	7621.2	7621.2	3810.6	19.03	0.000
Tratamiento	2	155.2	155.2	77.6	0.39	0.685
Zona	2	2894.4	2894.4	1447.2	7.23	0.006
Tratamiento*Zona	4	29.4	29.4	7.3	0.04	0.997
Error	16	3204.6	3204.6	200.3		
Total	26	13904.7				

Se obtuvo un R^2 de 0.7695 y un coeficiente de variabilidad de 14.30263.

Cuadro 4. Prueba de Tukey entre las zonas de la espiga (apical, media y basal) para el porcentaje de contaminación.

Zona	N	Media	Agrupación
Apical	9	26.6	B
Media	9	22.9	B
Basal	9	46.5	A

Cuadro 5. Prueba de Tukey entre los tratamientos de hipoclorito de sodio para el porcentaje de contaminación.

Tratamiento	N	Media	Agrupación
0.5% NaClO	9	33.9	A
1% NaClO	9	33.5	A
1.5% NaClO	9	28.6	A

Cuadro 6. Prueba de Tukey para la interacción entre tratamientos y zonas de la espiga para el porcentaje de contaminación.

Tratamiento	Zona	N	Media	Agrupación
1% NaClO	Basal	3	49.2	A
0.5% NaClO	Basal	3	46.3	A
1.5% NaClO	Basal	3	44.0	A
1% NaClO	Apical	3	29.0	A
0.5% NaClO	Apical	3	28.0	A
0.5% NaClO	Media	3	26.2	A
1% NaClO	Media	3	23.6	A
1.5% NaClO	Apical	3	23.0	A
1.5% NaClO	Media	3	18.9	A

Cuadro 7. Análisis de varianza para el porcentaje de explantes fenolizados en la fase de iniciación

FUENTE	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Bloque	2	1895.0	1895.0	947.5	5.83	0.013
Tratamiento	2	349.6	349.6	174.8	1.08	0.364
Zona	2	1858.6	1858.6	929.3	5.72	0.013
Tratamiento*Zona	4	175.9	175.9	44.0	0.27	0.893
Error	16	2600.0	2600.0	162.5		
Total	26	6879.0				

Se obtuvo un R^2 de 0.622847 y un coeficiente de variabilidad de 15.75870.

Cuadro 8. Prueba de Tukey entre las zonas de la espiga (apical, media y basal) para el porcentaje de fenolización.

Zona	N	Media	Agrupación
Basal	9	91.4	A
Media	9	80.5	B
Apical	9	71.1	B

Cuadro 9. Prueba de Tukey entre los tratamientos de hipoclorito de sodio para el porcentaje de fenolización.

Tratamiento	N	Media	Agrupación
1.5% NaClO	9	85.0	A
1% NaClO	9	81.7	A
0.5% NaClO	9	76.2	A

Cuadro 10. Prueba de Tukey para la interacción entre tratamientos y zonas de la espiga para el porcentaje de fenolización.

Tratamiento	Zona	N	Media	Agrupación
1.5% NaClO	Basal	3	93.4	A
1% NaClO	Basal	3	90.6	A
0.5% NaClO	Basal	3	90.1	A
1.5% NaClO	Media	3	83.7	A
1% NaClO	Media	3	80.5	A
1.5% NaClO	Apical	3	77.8	A
0.5% NaClO	Media	3	77.2	A
1% NaClO	Apical	3	74.1	A
0.5% NaClO	Apical	3	61.4	A

Cuadro 11. Análisis de varianza para el porcentaje de explantes que formaron callos en los medios de inducción

FUENTE	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Bloque	2	102.7	102.7	51.3	0.13	0.876
Tratamiento	2	7517.1	7517.1	3758.6	9.74	0.002
Zona	2	766.7	766.7	383.4	0.99	0.392
Tratamiento*Zona	4	934.5	934.5	233.6	0.61	0.664
Error	16	6172.0	6172.0	385.8		
Total	26	15493.1				

Se obtuvo un R^2 de 0.6016 y un coeficiente de variabilidad de 19.6406.

Cuadro 12. Prueba de Tukey entre los tratamientos utilizados para la inducción de callos

Tratamientos	N	Media	Agrupación
Medio II	9	43.8	A
Medio I	9	13.1	B
Medio III	9	5.0	B

Cuadro 13. Prueba de Tukey entre las zonas de la espiga con respecto a la inducción de callos

Zona	N	Media	Agrupación
Apical	9	26.9	A
Media	9	21.1	A
Basal	9	13.9	A

Cuadro 14. Prueba de Tukey para la interacción entre tratamientos y zonas de la espiga en la inducción de callos

Tratamiento	Zona	N	Media	Agrupación
Medio II	Media	3	48.7	A
Medio II	Basal	3	41.7	A
Medio II	Apical	3	41.3	A
Medio I	Apical	3	30.6	A
Medio III	Apical	3	8.9	A
Medio I	Media	3	8.9	A
Medio III	Media	3	6.1	A
Medio III	Basal	3	0.0	A
Medio I	Basal	3	0.0	A

Cuadro 15. Análisis de varianza para el porcentaje de explantes fenolizados en la fase de inducción de callos.

FUENTE	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Bloque	2	3367.4	3367.4	1683.7	4.44	0.029
Tratamiento	2	1480.3	1480.3	740.1	1.95	0.174
Zona	2	330.7	330.7	165.3	0.44	0.654
Tratamiento*Zona	4	679.4	679.4	169.9	0.45	0.772
Error	16	6062.2	6062.2	378.9		
Total	26	11920.0				

Se obtuvo un R^2 de 0.4914 y un coeficiente de variabilidad de 19.4650.

Cuadro 16. Prueba de Tukey entre los tratamientos para el porcentaje de explantes fenolizados en la fase de inducción de callos.

Tratamientos	N	Media	Agrupación
Medio I	9	39.0	A
Medio III	9	38.2	A
Medio II	9	22.9	A

Cuadro 17. Prueba de Tukey entre las zonas de la espiga para el porcentaje de explantes fenolizados en la fase de inducción de callos.

Zona	N	Media	Agrupación
Basal	9	38.2	A
Apical	9	31.6	A
Media	9	30.2	A

Cuadro 18. Prueba de Tukey para la interacción entre tratamientos y zonas de la espiga para el porcentaje de explantes fenolizados en la fase de inducción de callos.

Tratamiento	Zona	N	Media	Agrupación
Medio III	Media	3	42.0	A
Medio I	Basal	3	41.0	A
Medio I	Apical	3	40.4	A
Medio III	Basal	3	37.3	A
Medio II	Basal	3	36.5	A
Medio I	Media	3	35.7	A
Medio III	Apical	3	35.3	A
Medio II	Apical	3	19.1	A
Medio II	Media	3	13.0	A

Cuadro 19. Análisis de varianza para el porcentaje de maduración de callos embriogénicos

FUENTE	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Bloque	4	373.33	373.33	93.33	1.27	0.356
Tratamiento	2	1013.33	1013.33	506.67	6.91	0.018
Error	8	586.67	586.67	73.33		
Total	14	1973.33				

Se obtuvo un R^2 de 0.7027 y un coeficiente de variabilidad de 8.56349.

Cuadro 20. Prueba de Tukey entre los medios utilizados para la maduración de callos

Tratamiento	N	Media	Agrupación
Medio I	5	24.0	A
Medio II	5	16.0	B
Medio III	5	4.0	B

Cuadro 21. Análisis de varianza para el porcentaje de fenolización en la fase de maduración de callos embriogénicos

FUENTE	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Bloque	4	3980.4	3980.4	995.1	1.70	0.242
Tratamiento	2	2075.2	2075.2	1037.6	1.77	0.230
Error	8	4680.8	4680.8	585.1		
Total	14	10736.4				

Se obtuvo un R^2 de 0.5640 y un coeficiente de variabilidad de 24.1888.

Cuadro 22. Prueba de Tukey para el porcentaje de fenolización en la fase de maduración de callos embriogénicos

Tratamiento	N	Media	Agrupación
Medio III	5	70.0	A
Medio I	5	60.0	A
Medio II	5	41.6	A