

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES



**PROPAGACIÓN IN VITRO DE *ELAEIS*
GUINEENSIS JACQ. A PARTIR DE
EMBRIONES CIGÓTICOS.**

Presentado por:

Marisela Rocio Quispe Rojas

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO FORESTAL

Lima - Perú
2016

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos para calificar la sustentación del Trabajo de Tesis, presentado por la ex-alumna de la Facultad de Ciencias Forestales, Bach. **MARISELA ROCIO QUISPE ROJAS**, intitulado “**PROPAGACIÓN IN VITRO DE *ELAEIS GUINEENSIS* JACQ. A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS.**”.

Oídas las respuestas a las observaciones formuladas, lo declaramos:

.....

con el calificativo de

En consecuencia queda en condición de ser considerada APTA y recibir el título de INGENIERO FORESTAL.

La Molina, 05/09/201 de 05/09/201 de 05/09/201

.....
Dr. Carlos Reynel Rodríguez.
Presidente

.....
Dr. Alberto Julca Otiniano.
Miembro

.....
Ing. Luis Antonio Tovar Narváez.
Miembro

.....
Dr. Gilberto Domínguez Torrejón.
Asesor

Mg. Sc. Lourdes Tapia Y Figueroa.
Coasesor

DEDICATORIA

A Dios, por darme la dicha de vivir y estudiar.

A mis padres, Juan y Pelagia por su amor, esfuerzo, apoyo y comprensión.

A mis hermanos Juan Carlos y Álvaro por su apoyo y comprensión.

A la memoria de mi abuelo Fernandino Rojas Quispe.

A la memoria de Clara Vera la Rosa, por inculcarme el amor hacia mi alma máter.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos

A mi patrocinador Dr. Gilberto Domínguez Torrejón por su incondicional apoyo, paciencia, consejos y orientación brindada a lo largo del todo el período que comprendió elaborar la tesis.

A mi co patrocinadora Mg. Sc Lourdes Tapia Y Figueroa por su gran apoyo, orientación y sabios consejos para poder realizar la parte experimental de la tesis y redacción de la misma.

A la Ing. Angela Medina Vera por su apoyo durante la fase experimental de la tesis y consejos para la realización de la misma.

A las colaboradoras del IBT: Liliana Robles, Mercedes Velásquez, Andrea Carrión, Milagros y Gabriela Tapia por su gran apoyo durante la ejecución de la fase experimental.

Al Instituto de Biotecnología – Área de cultivo de tejidos por permitirme utilizar las instalaciones y facilitarme el uso de los equipos, insumos y materiales para la realización de la tesis.

A Marilia Del Castillo Santillana, mi buena y querida amiga, por su apoyo incondicional y ánimos durante la ejecución de la tesis y por su invalorable amistad.

A Franchesca Acevedo, Natali Mendoza, Lourdes Durand, Catherine Lázaro y Belidza Castillo, mis queridas y grandes amigas por sus ánimos y aliento para la realización y culminación de la tesis.

A los miembros del jurado de tesis por la amabilidad de brindarme parte de su valioso tiempo para poder revisar la tesis y hacerme notar sus observaciones a fin de mejorar la calidad del trabajo realizado.

A la empresa AGRO SELVA PERÚ SRL por el apoyo de los insumos y materiales durante la ejecución de la tesis.

A la empresa PALMAGRO SAC por el abastecimiento del material genético.

RESUMEN

El principal problema de la propagación de *Elaeis guineensis* Jacq. Es la germinación de esta especie, caracterizada por ser lenta y desuniforme. Este trabajo de investigación tiene como finalidad acelerar el tiempo de germinación de los embriones, para ello se recurre a la Introducción *in vitro*, técnica utilizada para favorecer la nutrición de embriones productos de cruces inter – específicos. Se ha estudiado el establecimiento de un protocolo de desinfección, la respuesta de embriones de diferentes estadios de desarrollo y la determinación del medio de cultivo adecuado para el desarrollo del embrión. Se realizaron 5 ensayos de desinfección más un testigo con compuestos y sustancias como NaClO (0,5%, 1%, 10%, 20% y 50%), Benopoint, tween 20, alcohol y agua destilada estéril. En el ensayo de desinfección se trabajó con embriones procedentes de semillas extraídas 80 y 110 días después de la polinización, los cuáles fueron introducidos en 5 medios de cultivo. Para el caso de la respuesta de embriones de diferentes estadios de desarrollo se utilizó embriones procedentes de semillas extraídas 90, 100 y 110 días después de la polinización. Se logró obtener un protocolo de desinfección con una eficacia del 90 %. Esta metodología permitirá disminuir la tasa de contaminación a causa de agentes patógenos, también comprende un menor gasto de reactivos y materiales, y mayor ahorro de tiempo en el establecimiento de los cultivos. Se determinó que los embriones correspondientes al período de 90 días tuvieron un mejor comportamiento, alcanzando el 57,14% de ellos el estadio de planta en un tiempo de 45 días. En cuanto al medio de cultivo, con el medio Murashige & Skoog se obtuvo el más alto porcentaje de germinación (64,29%), además de obtener los valores más altos de altura y longitud de raíz.

Palabras claves: Cultivo *In vitro*; Embriones vegetales; *Elaeis guineensis*; Desinfección; Medio de cultivo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. Introducción	1
II. Revisión de Literatura	3
1. Descripción de la especie	3
2. Distribución geográfica	3
3. Características dendrológicas	3
4. Ecología de la especie	4
5. Usos de la especie	6
6. Sistemas de producción	8
6.1. Monocultivo de la especie	8
6.2. Sistemas agroforestales.....	9
7. Características de la germinación	10
7.1. Embriones cigóticos.....	11
7.2. Embriogénesis cigótica.....	11
7.3. Latencia de semilla	11
7.4. Haustorio.....	12
7.5. Germinación de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	13
7.5.1. Proceso germinativo de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.....	13
7.5.2. Causas que afectan la germinación.....	14
8. Cultivo de tejidos	15
8.1. Importancia del cultivo de tejidos.....	16
8.2. Factores que intervienen en el cultivo de tejidos.	16
8.3. Tratamiento de desinfección en el cultivo de tejidos.....	18
8.3.1. Esterilización química	19
8.3.2. Proceso de desinfección	21
9. Cultivo de embriones	22
9.1. Factores que afectan el éxito del cultivo de embriones	23
9.2. Cultivo de embriones inmaduros	24
10. Medio de cultivo en el cultivo de embriones	25
III. Materiales y Métodos	27
1. Lugar de ejecución	27
2. Materiales	27
3. Métodos	30
3.1. Tratamiento de desinfección	30
3.1.1. Tratamiento 1	30
3.1.2. Tratamiento 2	31
3.1.3. Tratamiento 3	31
3.1.4. Tratamiento 4	31
3.1.5. Tratamiento 5	31
3.1.6. Tratamiento 6	31
3.1.7. Selección de tratamiento de desinfección.....	34
3.2. Caracterización de estadios de desarrollo posterior a la polinización de la planta madre. 34	
3.3. Preparación del medio de cultivo y su respectiva esterilización.....	36
3.4. Siembra de embriones inmaduros en el medio de cultivo.	37
3.5. Establecimiento de los ensayos in vitro.	39
3.6. Ensayos con medios de cultivo.	39

3.7.	Fase de desarrollo de los embriones inmaduros.....	40
3.8.	Parámetros evaluados.....	40
3.8.1.	Tratamientos de desinfección.....	40
3.8.2.	Respuesta al medio de cultivo.....	40
3.9.	Análisis estadístico	41
3.9.1.	Tratamiento de desinfección.....	41
3.9.2.	Estadio de desarrollo después de la polinización.....	42
3.9.3.	Respuesta de los embriones al medio de cultivo.....	42
IV.	Resultados y discusión	47
1.	Tratamiento de desinfección.....	47
1.1.	Desinfección de embriones de 80 días.....	47
1.2.	Desinfección de embriones de 110 días.....	50
2.	Efecto del estadio de desarrollo del explante en el desarrollo del embrión.....	57
2.1.	Medio de cultivo Murashige & Skoog.....	57
2.2.	Medio de cultivo Murashige & Skoog + 40 Gr. de azúcar.....	59
2.3.	Medio de cultivo Murashige & Skoog + hormonas.....	60
3.	Efecto de los medios de cultivo en el desarrollo del embrión	64
3.1.	Embriones de 90 días.....	64
3.2.	Embriones de 100 días.....	65
3.3.	Embriones de 110 días.....	66
V.	Conclusiones	71
VI.	Recomendaciones	73
VII.	Referencias bibliográficas	75
VIII.	Anexos.....	81

Índice de tablas

	Página
Tabla 1:	Características de tipos de frutos.5
Tabla 2:	Descripción de los Tratamientos de desinfección. 32
Tabla 3:	Codificación de los Tratamientos de desinfección..... 34
Tabla 4:	Codificación para Estadios de desarrollo. 36
Tabla 5:	Codificación para Medios de cultivo..... 40
Tabla 6:	Codificación para el procesamiento de información de Tratamientos de Desinfección. 41
Tabla 7:	Codificación para el procesamiento de información de Estadios de desarrollo y Medios de cultivo. 41
Tabla 8:	Fase de desarrollo de embriones. 42
Tabla 9:	Porcentaje de contaminación para “Embriones de 80 días”. 47
Tabla 10:	Diferencias entre los Tratamientos de Desinfección T3 y T4..... 48
Tabla 11:	ANVA para “Embriones de 80 días”..... 49
Tabla 12:	Comparación de medias de Tukey para “Embriones de 80 días”..... 50
Tabla 13:	Porcentaje de contaminación para “Embriones de 110 días”. 50
Tabla 14:	Diferencias entre los Tratamientos de Desinfección T2 y T4..... 51
Tabla 15:	ANVA para “Embriones de 110 días”..... 52
Tabla 16:	Comparación de medias de Tukey para “Embriones de 110 días”..... 53
Tabla 17:	Ventajas y Desventajas de los Tratamientos de Desinfección T2 y T4..... 53
Tabla 18:	Tabla de comparación del porcentaje de contaminación en los estadios de desarrollo evaluados. 56
Tabla 19:	Porcentaje de embriones que logran alcanzar las diferentes fases de desarrollo en el Medio Murashige & Skoog (MS)..... 58
Tabla 20:	Porcentaje de embriones que logran alcanzar las diferentes fases de desarrollo en el Medio Murashige & Skoog con 40 gramos de azúcar. 60
Tabla 21:	Porcentaje de embriones que logran alcanzar las diferentes fases de desarrollo en el Medio MS con hormonas..... 61
Tabla 22:	ANVA para “Estadios de Desarrollo”. 62
Tabla 23:	Comparación de medias de Tukey para “Estadios de Desarrollo”. 63
Tabla 24:	Porcentaje de fases de desarrollo para embriones de 90 días. 64
Tabla 25:	Porcentaje de fases de desarrollo para embriones de 100 días. 66
Tabla 26:	Porcentaje de fases de desarrollo para embriones de 110 días. 67

Tabla 27:	ANVA para “Medio de Cultivo”	68
Tabla 28:	Comparación de medias de Tukey para “Medio de Cultivo”	68
Tabla 29:	Altura y longitud de raíz para plántulas obtenidas de embriones de 90 días y desarrolladas en el medio de cultivo MS.....	69

Índice de figuras

	Página
Figura 1: Tipos de frutos de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	5
Figura 2: Semilla germinada y Plántula de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	13
Figura 3: Semilla de 70 días, con ausencia de endospermo.	35
Figura 4: Semilla de 110 días, con presencia de embrión y endospermo.	35
Figura 5: Cámara de flujo laminar preparada para la siembra de embriones.	39
Figura 6: Embrión inmaduro de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	42
Figura 7: Embrión de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. – fase callo.	43
Figura 8: Embrión de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. - fase brote.	43
Figura 9: Embrión en un estadio más desarrollado de “Brote”.	44
Figura 10: Planta de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	44
Figura 11: Embrión germinado, con raíz desarrollada y el haustorio.	45
Figura 12: Tasa de contaminación para “Embriones de 80 días”.	49
Figura 13: Tasa de contaminación para “Embriones de 110 días”.	52
Figura 14: Diagrama del Tratamiento de Desinfección T4.	55
Figura 15: Explantes que logran alcanzar las diferentes fases de desarrollo en diferentes estadios en el medio de cultivo MS.	59
Figura 16: Explantes que logran alcanzar las diferentes fases de desarrollo en diferentes estadios en el medio de cultivo MS con 40 gramos de azúcar.	60
Figura 17: Explantes que logran alcanzar las diferentes fases de desarrollo en diferentes estadios en el medio de cultivo MS con hormonas.	62
Figura 18: Porcentaje de explantes logrados en las diferentes fases de desarrollo para embriones de 90 días.	65
Figura 19: Porcentaje de explantes logrados en las diferentes fases de desarrollo para embriones de 100 días.	66
Figura 20: Porcentaje de explantes logrados en las diferentes fases de desarrollo para embriones de 110 días.	67
Figura 21: Altura y Longitud de raíz de plántulas obtenidas a partir de embriones de 90 días y desarrolladas en el medio de cultivo MS.	69

Índice de anexos

	Página
Anexo 1 Resultados del tratamiento de desinfección N° 1 para embriones de los períodos de 80 y 110 días.....	81
Anexo 2 Resultados del tratamiento de desinfección N° 2 para embriones de los períodos de 80 y 110 días.....	82
Anexo 3 Resultados del tratamiento de desinfección N° 3 para embriones de los períodos de 80 y 110 días.....	83
Anexo 4 Resultados del tratamiento de desinfección N° 4 para embriones de los períodos de 80 y 110 días.....	84
Anexo 5 Resultados del tratamiento de desinfección N° 5 para embriones de los períodos de 80 y 110 días.....	85
Anexo 6 Resultados del tratamiento de desinfección N° 6 para embriones de los períodos de 80 y 110 días.....	86
Anexo 7 Tabla de evaluaciones realizadas a embriones del período de 90 días en medio de cultivo MS.	87
Anexo 8 Tabla de evaluaciones realizadas a embriones del período de 90 días en medio de cultivo ms con 40 gr. de azúcar.	88
Anexo 9 Tabla de evaluaciones realizadas a embriones del período de 90 días en medio de cultivo ms con hormonas.	89
Anexo 10 Tabla de evaluaciones realizadas a embriones del período de 100 días en medio de cultivo ms.....	90
Anexo 11 Tabla de evaluaciones realizadas a embriones del período de 100 días en medio de cultivo ms con 40 gr. de azúcar.....	91
Anexo 12 Tabla de evaluaciones realizadas a embriones del período de 100 días en medio de cultivo ms con hormonas.	92
Anexo 13 Tabla de evaluaciones realizadas a embriones del período de 110 días en medio de cultivo ms.....	93
Anexo 14 Tabla de evaluaciones realizadas a embriones del período de 110 días en medio de cultivo ms con 40 gr. de azúcar.....	94
Anexo 15 Tabla de evaluaciones realizadas a embriones del período de 100 días en medio de cultivo ms con hormonas.	95
Anexo 16 Composición de los medios de cultivo.	96
Anexo 17 Tabla de comparación de medias de Tukey para estadios de desarrollo después de la polinización en el medio de cultivo MS – Evaluaciones 1, 2 y 3.	98

Anexo 18 Tabla de comparación de medias de Tukey para estadios de desarrollo después de la polinización en el medio de cultivo MS – con 40 gr. de azúcar Evaluaciones 1 y 2.....	100
Anexo 19 Tabla de comparación de medias de Tukey para estadios de desarrollo después de la polinización en el medio de cultivo MS – con hormonas Evaluaciones 1, 2 y 3.	101
Anexo 20 Tabla de comparación de medias de Tukey para medio de cultivo en el estadio de desarrollo de 90 días - Evaluaciones 1, 2 y 3.	103
Anexo 21 Tabla de comparación de medias de Tukey para medio de cultivo en el estadio de desarrollo de 100 días - Evaluación 1 y 2.....	105
Anexo 22 Tabla de comparación de medias de Tukey para medio de cultivo en el estadio de desarrollo de 90 días - Evaluaciones 1, 2 y 3.	106

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años *Elaeis guineensis* Jacq. O palma aceitera ha cobrado gran notoriedad por la deforestación de zonas boscosas o con aptitud de uso forestal - por parte de algunas empresas - para la instalación de plantaciones. Sin embargo, existen registros de que pequeños y medianos productores están instalando la especie en zonas intervenidas, donde antes predominaban cultivos ilícitos como la hoja de coca o habían sido degradadas para la instalación de pasturas destinadas a la ganadería.

Según el MINAGRI (2014) el Perú cuenta con 77 537 ha instaladas con palma aceitera, la cual se encuentra distribuida en los departamentos de San Martín (30 303 ha), Ucayali (29 652 ha), Loreto (14 263 ha) y Huánuco (3 320 ha), siendo Ucayali y Huánuco los departamentos que en los últimos años han incrementado la cantidad de superficie instalada.

La especie *Elaeis guineensis* Jacq. Puede ser utilizada en el establecimiento de sistemas agroforestales, acompañada de especies como *Inga edulis*, *Manihot esculenta*, *Tithonia diversifolia*, etc. Y que puede, según (Castellani et al. 2011) ofrecer una alternativa para disminuir los impactos medio ambientales, recuperación de áreas degradadas, y también generar nuevos ingresos económicos.

La práctica del establecimiento de sistemas agroforestales que tienen como uno de sus principales componentes a esta palmera puede ofrecer una alternativa para todas aquellas áreas degradadas que han sido destinadas a cultivos como la hoja de coca, que se calcula ha sido la causante de la deforestación de 2,5 millones de ha (UNODC 2011). FAO (s.f.) estimó para el período 2000 – 2010 que en nuestro país el 55% de las áreas deforestadas para la instalación de pastizales y cultivos fue destinado al establecimiento de pastizales.

La asociación de *Elaeis guineensis* Jacq. Con especies de arbustos y cultivos ofrece no solo beneficios económicos, sino también beneficios ecológicos como el de sumidero de carbono. Ribeiro de Carvalho et al. (2014) Cuantificaron y compararon la cantidad de stocks de carbono que pueden almacenar diferentes asociaciones agroforestales y zonas boscosas, encontrando que un sistema agroforestal con baja diversidad de especies puede fijar más cantidad de stocks

de carbono (91,8 Mg C/ ha) que un sistema agroforestal con mayor diversidad (87,6 Mg C/ ha), bosque en regeneración (71,0 Mg C/ ha) y un sistema agroforestal tradicional (68,4 Mg C/ ha). Además, los sistemas agroforestales brindan otros servicios como son el ciclo hidrológico, ciclaje de nutrientes y aumento de la biodiversidad (Miccolis 2012). También brinda beneficios sociales como el de seguridad alimentaria, práctica que puede ser de gran ayuda para mejorar la calidad de vida de muchas familias rurales asentadas en la Amazonía peruana.

Debido al potencial y beneficios que representa *Elaeis guineensis* Jacq. Es necesario desarrollar una metodología para solucionar los problemas de germinación característicos de la especie y que según Figueredo (1991) puede tomar hasta 4 años en germinar. Es por ello que se recurre a la técnica del cultivo *in vitro* para obtener embriones con una alta eficiencia en el menor tiempo posible.

Los objetivos específicos del presente trabajo de investigación son:

Obtener el protocolo de desinfección para minimizar la contaminación de los embriones de palma aceitera.

Determinar la respuesta a los medios de cultivo de embriones de diferentes estadios de desarrollo después de la polinización.

Determinar el medio de cultivo adecuado para el desarrollo del embrión.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Nombre Científico : *Elaeis guineensis* Jacq.

Nombre Común : Palma aceitera, Palma africana, Palma de aceite.

Familia : Arecaceae (Palmáceas).

Con respecto a su origen León (2010), menciona que el género *Elaeis* incluye tres especies: *E. guineensis* Jacq. De África Occidental; *E. oleifera* (*Elaeis melanococca*), de Centroamérica a Brasil, y *E. odora*, una especie poco conocida del Amazonas.

El MINAG (2011), menciona que la palma aceitera es originaria de la región del Golfo de Guinea, de ahí su nombre científico: *Elaeis guineensis* Jacq.

2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El Perú cuenta con 77 537 ha cultivadas con esta especie, encontrándose distribuida en 4 departamentos del país como San Martín (30 303 ha), Ucayali (29 652 ha), Loreto (14 263) y Huánuco (3 320 ha) (MINAGRI 2011).

3. CARACTERÍSTICAS DENDROLÓGICAS

Es una planta perenne, con vida útil de aproximadamente 25 años, monoica que produce inflorescencias masculinas y femeninas separadas en diferentes axilas de la misma, de polinización cruzada (alógama) (MINAG 2011).

Según Ortiz y Fernández (1994) el tronco puede alcanzar una altura entre los 15 y 20 metros, con un diámetro que oscila entre 30 y 50 cm. Las hojas son de forma pinnada, compuestas de raquis, foliolos lineales y espinas. MINAG (2011) menciona que una palma adulta tiene entre 30 y 40 hojas funcionales, que se componen de un pecíolo de 8,00 metros de largo. Ortiz y Fernández (1994) mencionan que estos pecíolos pueden pesar entre 5 a 8 Kg.

4. ECOLOGÍA DE LA ESPECIE

La distribución geográfica en su hábitat natural abarca la región guineana, hasta el Río Senegal (12°N); al sur hasta Loanda (16°S) y por el este hasta el lago Alberto (León 2010). El mismo autor menciona que esta especie se desarrolla en sitios húmedos y abiertos, tales como los bordes de ríos y pantanos, donde no pueden crecer árboles.

(Von Uexküll et al. 1991) señalan que *Elaeis guineensis* Jacq. Se desarrolla en zonas que tengan una precipitación anual entre los 2 500 a 3 500 mm uniformemente distribuido, está no deberá bajar de los 120 mm mensual. Werkhoven (1967) menciona que esta especie requiere de elevada humedad atmosférica relativa (media mensual mayor al 75%), sin períodos secos prolongados (3 meses como máximo). Henry, citado por Von Uexküll et al. (1991) indica que el rango de temperatura óptima se encuentra entre los 22 °C a 32° C. Para León (2010) la temperatura media se encuentra entre los 24°C a 26° C, con un mínimo de 18 °C.

Al igual que el cocotero, la palma de aceite es favorecida por suelos profundos, sueltos y con buen drenaje. Debido a que la expansión del sistema radicular no es muy amplia (León 2010).

Para Werkhoven (1967) el pH óptimo oscila entre 5,5 y 6,0 resistiendo la palma de aceite niveles bajos de acidez de hasta un PH 4.

Los frutos de la palma son una drupa sésil cuya forma varía desde casi esférica a ovoide de 3 a 6 centímetros de largo, con un peso aproximado de 5 a 30 gramos (MINAG 2011). León (2010) describe al color externo del fruto entre verdoso a negro o rojizo en la parte superior, siendo la parte inferior siempre amarilla.

Hartley (1977) menciona que los frutos crecen en manojos y consisten esencialmente en una capa externa o exocarpio que es suave y que al madurar es de color naranja rojiza y una capa fibrosa (mesocarpio) que cubre la semilla (endocarpio) y que a su vez está integrada por una cubierta (endospermo) y un núcleo que contiene el aceite de palma. Según MINAG (2011) el peso del racimo varía con la edad y el mantenimiento. Un racimo bien constituido contiene entre 500 a 4 000 frutos.

El endocarpio forma junto con la semilla (endospermo y epispermo) la nuez, su desarrollo, determina el tamaño del fruto.

Según Quesada, citado por Melado (2008), en la especie *Elaeis guineensis* Jacq. Se pueden encontrar tres tipos de fruto: dura, tenera y pisífera de las cuales, la variedad tenera es la que se utiliza con fines comerciales para la producción de aceite, esta resulta del cruce entre las dos restantes variedades. El MINAG (2011) coincide con Quesada (1967) y reconoce estos tres tipos de fruto para la especie *Elaeis guineensis* Jacq. (Tabla 1). Sin embargo, Surre y Ziller, citados por Melado (2008) sostienen que además de las tres variedades mencionadas, se puede nombrar una cuarta variedad llamada macrocarpus, que se caracteriza por tener una cáscara más gruesa que las mencionadas anteriormente.

Con respecto a los racimos, Saénz (2006) sostiene que la especie *Elaeis guineensis* Jacq. Produce entre 12 a 14 racimos por año, y que estos pueden pesar entre 20 a 30 kilogramos cada uno. (Ortiz et al. 1994) menciona que el peso de los racimos de las palmas jóvenes puede variar de 2 a 3 Kg y alcanzar hasta 100 Kg por racimo en adultos.

El MINAG (2011), señala que desde la fecundación de la inflorescencia hasta la maduración del racimo transcurren aproximadamente 6 meses.

Tabla 1: **Características de tipos de frutos.**

TIPO	SEMILLA (ENDOCARPIO)	PULPA (MESOCARPIO)
DURA	2 - 8 mm	35 - 65 %
PISIFERA	Sin semilla	100 %
TENERA	0,5 - 4 mm	60 - 96 %

FUENTE: MINAG (2011)



Figura 1: **Tipos de frutos de *Elaeis guineensis* Jacq.**

FUENTE: MINAG (2011)

5. USOS DE LA ESPECIE

Entre los tipos de uso que se pueden designar a *Elaeis guineensis* Jacq. Según (Orwa 2009) se encuentran:

- a) Alimenticio: La palma de aceite es popular en el oeste de África y en Malasia por su uso en la cocina. En los últimos años ha sido importado por la India para satisfacer las necesidades locales de aceite comestible, esto debido a su bajo costo, en comparación con otros aceites vegetales.

El aceite es utilizado para la preparación de sopas, salsas, snacks y cereales (se dice que aumenta considerablemente la densidad calorífica, el cual es ventajoso para los niños pequeños.)

Se dice que el 10% de su contenido de ácido linoleico contiene una excelente fuente de caroteno. Esto es importante para reducir la deficiencia de vitamina A y la ocurrencia de ceguera nutricional.

- b) Forraje: La torta prensada es usada como alimento de ganado.
- c) Apicultura: El jugo proveniente de la fermentación del fruto es colectado por las abejas para la elaboración de la miel, la cual es de un color ámbar oscuro y de sabor astringente.
- d) Combustible: En Togo, las frutas prensadas son secadas y convertidas en tortas (briquetas) que son utilizadas como combustible para cocinas. Las fibras provenientes de los frutos son secadas y utilizadas como combustible (Bergert 2000).
- e) Lípidos: De la almendra de palma aceitera se obtiene un 50% de aceite. Bergert (2000) señala que el aceite de almendra tiene un uso principalmente industrial, el cual es utilizado en la manufactura de glicerina, shampoo, velas, jabones y lámparas. También puede ser utilizado para la elaboración de margarina.
- f) Alcohol: El vino de palma es uno de los productos derivados del tallo, que se obtiene del xilema de la palmera (Bergert 2000). Recién servida, sin diluir y fría, el vino de palma es una bebida agradable y con un alto contenido de levadura. La venta del vino de palma es considerada como muy rentable a diferencia de la venta de productos como los frutos y aceite. Herzog et al, citados por Bergert (2000) señala que el vino de palma es una notable fuente de vitaminas (C y B₃) y minerales (potasio).

- g) Construcción: A pesar de tener una menor importancia económica a diferencia de los aceites, las hojas de palma son utilizadas para varios usos domésticos, además de su uso en la construcción.

Las hojas son utilizadas para la elaboración de cestas (útiles para el transporte de alimentos). También son usadas para la construcción de casas y estructuras de granjas. Las hojas enteras son utilizadas para la elaboración de estructuras de sombra, cubriendo la construcción de una estructura simple de madera (son puestas para cubrir las vigas de los techos). También son utilizadas para la elaboración de las puertas, escobas y gallineros.

Las bases de las hojas pueden ser colectadas (cuando secan) para ser usadas como combustible para cocinar o también para ser comercializadas en el mercado (Bergert 2000). Orwa (2009) menciona que la palma aceitera puede brindar los siguientes servicios:

- h) Recuperación de suelos: La palma aceitera es una buena especie que puede ser utilizada para la rehabilitación de áreas degradadas. En Sumatra, el establecimiento de la especie ha sido muy exitosa en la recuperación de áreas de cultivo abandonadas, tomadas por la especie invasora *Imperata cylindrica* (cisca).
- i) Cobertura: *Elaeis guineensis* Jacq. es una especie que provee de sombra a diferencia de otras especies cultivadas como el cacao y el caucho.
- j) Mejorador de suelos: Los residuos de la sales potash provenientes de las calderas, donde se procesan los frutos, son recicladas y utilizadas en las plantaciones para enriquecer el suelo. Esta es una práctica muy utilizada en Malasia.
- k) Agroforestal: El café y el cacao son especies que pueden ser plantadas entre los individuos de *Elaeis guineensis* Jacq. Sin embargo la sombra que esta pueda proveer a dichos cultivos puede presentar ciertas dificultades. Ya que esta solo es beneficiosa en plántones jóvenes.

6. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

6.1. MONOCULTIVO DE LA ESPECIE

En los últimos años se ha escuchado mucho acerca de la instalación de plantaciones de *Elaeis guineensis* Jacq. Diferentes grupos ambientales han manifestado su desacuerdo con el cultivo de la especie, ya que existen empresas que han deforestado bosques primarios y secundarios para la instalación de plántones (RSPO 2013). Entre los años 1990 – 2010, Malasia e Indonesia han perdido cerca de 3,5 Mha de cobertura boscosa (RSPO 2013).

Una de las principales razones para la instalación de plántones de *Elaeis guineensis* Jacq. Es el desarrollo de biocombustible (que no produce gases del efecto invernadero); sin embargo el principal motivo de la instalación de plantaciones de esta especie es la producción de alimentos (Savilaasko 2014). El aceite de palma es actualmente el aceite vegetal de mayor consumo en el mundo y representa más de un tercio de la producción mundial, esto se debe a su versatilidad ya que se le encuentra en forma de margarina, pastelería, alimentos procesados, cosméticos, jabones, lubricantes, velas, productos farmacéuticos, agroquímicos, pinturas y artefactos electrónicos (Rival y Levang 2014)

Además de proporcionar aceite de palma, aceite de palmiste, vino de palma y palmito, *Elaeis guineensis* Jacq. brinda una serie de materiales de construcción para la creación de artesanía tradicional que incluye techado de viviendas, construcción de cercos, fortalecimiento de materiales de construcción de barro, canastas, redes, cuerdas y escobas. (Rival y Levang 2014)

Savilaasko (2014) menciona que el biocombustible derivado de la palma aceitera representa un beneficio para la sociedad, ya que su producción ayuda a incrementar los ingresos rurales, reducir los niveles de pobreza, restaurar tierras degradadas y promover el desarrollo económico.

En un estudio donde se examinaba la riqueza de especies y la composición de la comunidad entre pequeños agricultores y plantaciones industriales se encontró que las tierras de los pequeños propietarios compuestas por individuos sembrados en diferentes momentos tenía una mayor riqueza de aves que las fincas de plantaciones industriales con individuos de edad uniforme (Savilaasko 2014).

Rival y Levang (2014) señalan que el cultivo de esta especie no requiere de deforestación y que existe potencial en la intensificación ecológica y también en sistemas de certificación como la Mesa Redonda de Aceite de Palma sostenible (RSPO).

6.2. SISTEMAS AGROFORESTALES

Según FAO (1984), el uso de especies arbóreas nativas y a veces introducidas es considerado vital para el desarrollo de la cuenca amazónica. También señala que en áreas de la cuenca Amazónica se empezó a combinar los sistemas de producción de cultivos con especies forestales que pueden producir comida, aceite o pulpa. Entre estas especies se encuentran *Guilielma gasipaes* (pijuayo) y *Elaeis guineensis* Jacq. (Palma de aceite).

(Buck et al. 1990) mencionaron que tanto *Elaeis guineensis* Jacq. Como *Cocos nucifera* L. son especies que abarcan la gama de sistemas agroforestales. Siendo ambas especies establecidas en plantaciones. Los mismos autores señalan que la palma africana es un componente de los agroecosistemas de los indígenas del oeste de África.

En un estudio realizado en Brasil por (Castellani et al. 2001) se establecieron diferentes sistemas agroforestales de *Elaeis guineensis* Jacq. Junto a otras especies, se encontró que en las asociaciones establecidas de *Elaeis guineensis* Jacq. Con *Inga edulis* (paca) y *Manihot esculenta* (yuca), se obtiene un considerable aporte de nitrógeno, de las asociaciones con *Tithonia diversifolia* (botón de oro) y *Cajanus cajan* (frijol de palo) se obtuvo una considerable fuente de fósforo, además la especie *Tithonia diversifolia* también sirve como suministro de potasio, mientras que la asociación junto a la especie *Crotalaria spectabilis* se encontró un considerable aporte de boro.

(Castellani et al. 2011), señalan que los sistemas agroforestales muestran una buena perspectiva para cumplir con una producción sostenible de la palma aceitera, combinando su producción de aceite y conservando la biodiversidad. Además de ofrecer una alternativa para disminuir los impactos medio ambientales, recuperación de áreas degradadas y generación de ingresos.

Miccolis (2012) menciona que en un sistema agroforestal la palma aceitera podría intercalarse con especies alimenticias, frutales y maderables. El mismo autor sostiene que en los primeros cuatro años de la asociación, la palma se debería alternar con cultivos anuales tales como yucas y leguminosas, pasado estos cuatro años, se puede alternar con los especies de frutales

como el cacao, açai (*Euterpe oleífera*), plátano, entre otras. También puede alternarse con lianas como *Piper nigrum* y *Passiflora sp.*

Entre los servicios ambientales que brindan estas asociaciones agroforestales se encuentran el de secuestro de carbono, y que según Miccolis (2012) es semejante a la de un bosque secundario y más alto que un sistema de monocultivo (100 – 120 mg/ha), contribución con el ciclo hidrológico, ciclaje de nutrientes y aumento de la biodiversidad. Mientras que entre los beneficios sociales se encuentra el de seguridad alimentaria.

En cuanto a la producción, Miccolis (2012) señala que la producción inicial de palma es más alta que en un sistema convencional de monocultivo (de la misma edad). Esta producción puede llegar a los 3 000 Kg/ha después de los 3 años de instalada la plantación.

7. CARACTERÍSTICAS DE LA GERMINACIÓN

La germinación de *Elaeis guineensis* Jacq. En forma natural es lenta y desuniforme, debido principalmente a aspectos fisiológicos, químicos y físicos que impiden una rápida y homogénea germinación. Este fenómeno es conocido como latencia de semilla, el cual en condiciones naturales, puede mantener la semilla viable hasta por más de dos años (Ortiz et al. 1994).

Figueredo (1991) señala que en condiciones naturales, la semilla puede permanecer con el embrión en estado de latencia o dormancia a través de estaciones húmedas y secas, ocurriendo la germinación solamente cuando se dan las condiciones favorables de alta temperatura, contenido de humedad óptimo y suficiente aireación.

La semilla puede tener el contenido de humedad óptimo pero si la temperatura ambiental es baja puede presentarse una muy baja germinación o, simplemente esta no ocurre.

Figueredo (1991) menciona que a altas temperaturas (38°C- 40°C) el proceso de germinación se acelera, incrementando marcadamente la tracción del oxígeno mediante buena aireación.

Ortiz et al. (1994) citan que se ha encontrado que con cambios controlados de temperatura y humedad en las semillas, se puede lograr una alta y homogénea germinación en un período menor a los tres meses.

7.1. EMBRIONES CIGÓTICOS

Los embriones cigóticos son formados en el interior del saco embrionario en un ambiente perfectamente controlado, estos se encuentran envueltos por otros tejidos como el endospermo y la testa de la semilla. El proceso está perfectamente controlado no solamente por la información genética del cigoto sino también por señales químicas provenientes de la planta madre (Canhoto 2010).

Purohit (2013) describe a los embriones cigóticos como comprimidos, aplanados y de distinto tamaño y forma (debido a la restricción física que le limita la cubierta de la semilla). Además de tener un desarrollo sincrónico. También menciona que los embriones cigóticos necesitan de reposo durante la maduración, ya que necesitarán de protección y nutrición, la cual es provista por los tejidos de la semilla.

En una etapa muy temprana de la embriogénesis, las sustancias nutritivas entran a los embriones cigóticos a través del suspensor o del cuerpo del embrión (Purohit 2013).

7.2. EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA

Es el proceso mediante el cual se forma la semilla. Comprende cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica que tienen lugar desde la formación del cigoto hasta el final del desarrollo y maduración del embrión. El cual podrá germinar cuando las condiciones endógenas y medioambientales sean las apropiadas (Azcón – Bieto y Talón 2000).

De la embriogénesis cigótica dependerá el éxito de la germinación y, por tanto, el desarrollo del nuevo individuo. Además de ser el período en el que se forma la semilla, la embriogénesis también constituye la fase de preparación para la germinación (Azcón – Bieto y Talón 2000).

7.3. LATENCIA DE SEMILLA

La latencia o dormición está restringido a la falta de germinación causada únicamente por factores internos. En ese sentido, una semilla latente es una semilla que no germina, debido a que una condición interna de alguna parte de ella impide su germinación, aunque los factores ambientales externos sean favorables (Sierra 2005).

(Curtis et al. 2008) coinciden con Sierra (2005) al señalar que la latencia es un estado fisiológico que restringe las posibilidades de germinación. (Curtis et al. 2008) mencionan que la germinación puede estar impuesta por los tejidos que rodean al embrión, tales como el endosperma y el tegumento. Señalando que los tegumentos pueden actuar como una barrera

mecánica que evita la entrada de agua y/o el intercambio de gases, o como reservorio de inhibidores de la germinación como el ácido abscísico (ABA).

La dormición puede deberse también a la inmadurez del embrión. Aunque el fruto este maduro, el embrión puede no haber completado la maduración, pero es capaz de hacerlo después de la cosecha de los frutos (Curtis et al. 2008).

Para (Curtis et al. 2008), el estado de latencia resuelve dos problemas, uno intrínseco a la planta misma y otro relacionado con factores ambientales. En primer lugar, si una semilla germinara mientras está encerrada todavía en un fruto y cuelga de un árbol o una guía, podría agotar las reservas de alimento antes de tocar el suelo. Además, si nacieran plántulas dentro de un fruto que contiene semillas crecerían en un cúmulo apretado, compitiendo entre sí por nutrimentos y luz. En segundo lugar, las condiciones ambientales que son apropiadas para el crecimiento de las plántulas como humedad y temperatura podrían no coincidir con la maduración de las semillas.

Los mismos autores señalan que en los Trópicos, la latencia de las semillas es mucho menos común que en las regiones templadas, esto porque las condiciones ambientales son apropiadas para la germinación durante todo el año.

7.4. HAUSTORIO

Es un órgano destinado a absorber nutrimentos de los tejidos del endospermo. Este crece en las primeras semanas hasta formar un cuerpo esférico, suave y carnosos llamado corrientemente “manzana”. Sus tejidos esponjosos están recorridos por haces vasculares que convergen en el poro y que trasladan a la plántula las sustancias nutritivas que el haustorio obtiene por digestión del endospermo. Cuando ha concluido con éste, el haustorio termina su función y se desintegra (León 1987). El mismo autor sostiene que se cree que el Haustorio absorbe también sustancias nutritivas del endocarpio.

En el caso de *Cocos nucifera* L. Robles (1991) menciona que el haustorio engrosa rápidamente una vez que ha digerido progresivamente el endospermo para nutrir a la plántula, ocupando en unas cinco semanas la cavidad interna de la semilla. Y diez meses después el endospermo estará completamente digerido, mientras el haustorio ha invadido toda la cavidad. Posteriormente se desarrolla la plúmula y varias semanas después la radícula. En la Figura 2 se puede observar el haustorio de una semilla germinada de *Elaeis guineensis* Jacq.

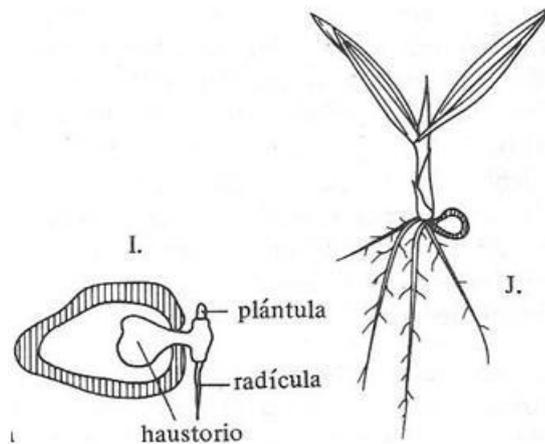


Figura 2: **Semilla germinada y Plántula de *Elaeis guineensis* Jacq.**

FUENTE: *Botánica de los cultivos tropicales* (León 1987).

7.5. GERMINACIÓN DE *ELAEIS GUINEENSIS* JACQ.

IICA (1971) considera a la germinación como la etapa más difícil en el establecimiento de una especie. Definiéndola como un proceso complejo que incluye la absorción de agua, digestión, respiración y asimilación de sustancias. Indicando también que esta consiste en la salida de la radícula y el desarrollo inicial del vástago de la planta.

El proceso de germinación depende básicamente de tres elementos ambientales: temperatura, humedad, oxígeno y a veces luz. Como acondicionador de estos elementos ambientales actúa por otra parte el sustrato y propiedades físicas del suelo (IICA 1971). Los elementos bióticos pueden sin embargo afectar la acción de los físicos en la germinación y así muchas semillas en germinación son atacadas por hongos e insectos.

Gran parte de las semillas de plantas tropicales germinan tan pronto se ponen en contacto con el suelo, incluso cuando se encuentran dentro del fruto (*Inga spp*). Pero hay también otras plantas tropicales y de gran parte de las regiones templadas que no germinan de inmediato al ponerse en contacto con el sustrato y pueden permanecer por largos períodos en estado de reposo. El estado de reposo puede tardar de varios días a muchos meses (IICA 1971).

7.5.1. PROCESO GERMINATIVO DE *ELAEIS GUINEENSIS* JACQ.

Cuando las condiciones de humedad, calor y aireación son óptimas, el embrión de la semilla se alarga y brota a través del poro germinativo, engrosándose para formar un punto blanco que es el primer signo visible de la germinación (Figueredo 1991). León (1987) señala que al

iniciarse el desarrollo del embrión, esta crece hacia afuera, empuja el opérculo y aparece fuera del endocarpio como un botón hemisférico, del cual brota la radícula y más tarde la plúmula.

El crecimiento del embrión va acompañado del desarrollo del haustorium o cotiledón, el cual se hincha a expensas de las reservas nutricionales que digiere del albumen o endospermo para, según Figueredo (1991) nutrir al embrión durante unos 3 meses. León (1987) menciona que el haustorio crece e inicia la digestión de sustancias nutritivas del endospermo, que pasan al embrión a través de dos fuertes haces vasculares.

El haustorium disuelve las células por medio de enzimas y se puede observar que hay entre él y el endospermo una zona activa de disolución celular. Una vez que ha absorbido todo el endospermo, el haustorio se seca y desaparece mientras que el centro de la semilla queda vacío, y con frecuencia penetran en él las raicillas de la plántula (León 1968). El desarrollo de éstas coincide con la disolución del haustorio, y de aquí en adelante la plántula obtendrá los nutrimentos por las raíces.

Figueredo (1991) señala que una vez que se produzca la germinación, el embrión se diferenciará en plúmula y radícula, esto a los 15 - 18 días después de brotar como punto blanco a través del poro germinativo cuando está a una temperatura de 18°C y a los 10 - 12 días cuando se encuentre a temperatura ambiente.

El mismo autor menciona que en condiciones naturales, la germinación de la semilla puede demorar de 1 a 4 años, esto dependiendo del medio ambiente en que se encuentre y, por lo general, es muy bajo el porcentaje de germinación, debido a que en algunos medios las semillas no se encuentran en condiciones ambientales requeridas para romper con la latencia del embrión. Además, que esta se encuentra expuesta a la incidencia de enfermedades y a daños ocasionados por insectos barrenadores y roedores. Mientras que en condiciones óptimas de calor, humedad y oxigenación la germinación se toma un tiempo de 6 a 10 semanas.

Es debido a las dificultades que representa la germinación de la semilla que autores como David Thurston (1989) indican que para obtener una buena germinación se deben realizar tratamientos pre – germinativos tales como la remoción de pulpa y tratamientos de calor.

7.5.2. CAUSAS QUE AFECTAN LA GERMINACIÓN

Algunas veces la diferenciación de las semillas no se logra debido a que estas presentan anomalías tales como embriones sin plúmula o radícula, con plúmula o radícula débil y

pérdida de geotropismo, por lo que deben eliminarse, al igual que aquellas que han sufrido daños mecánicos como quebradura del embrión, plúmula o radícula. En algunas ocasiones los embriones son afectados por enfermedades como el hongo blanco, hongo verduoso o azulado y el germen café, que puede llegar incluso a destruir el embrión (Ortiz et al. 1994).

8. CULTIVO DE TEJIDOS

Ovando (2004) define al cultivo de tejidos como una herramienta de la biotecnología vegetal que aísla partes de una planta y las hace crecer en un medio de cultivo artificial *in vitro* en condiciones de asepsia para obtener metabolitos, tejidos, órganos o plantas completas.

Rojas, García y Alarcón (2004) señalan que el cultivo de tejidos consiste en aislar una porción de la planta, a la cual se le llamará explante o propágulo y proporcionarle artificialmente, las condiciones físicas y químicas que requiera ante todo de procedimientos de asepsia para mantenerlos libres de contaminación microbiana.

Enríquez (1985) coincide con Ovando (2004) y Rojas et al. (2004) explicando que el cultivo de tejidos *in vitro* consiste en separar tejidos y órganos de una planta madre. Colocándolos en tubos de ensayo con un medio nutritivo artificial aséptico, al que se adicionan sustancias reguladoras de crecimiento.

Abdelnour - Esquivel y Vincent (1994) definen al cultivo de tejidos como un conjunto de técnicas con las cuales se puede ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio. Roca y Mogrinski (1991) concuerdan con Abdelnour - Esquivel et al. (1994) mencionando que el cultivo de tejidos permite tener un mejor control de las condiciones medioambientales de dicho cultivo, tales como luz, temperatura, hormonas y nutrientes facilitando el aprendizaje de los procesos biológicos involucrados en el desarrollo de las plantas.

El cultivo de tejidos, también conocido como Propagación *in vitro* se denomina así debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente (Abdelnour - Esquivel y Vincent 1994). Los mismos autores señalan que esta capacidad de regenerar no solamente tejidos y órganos, sino también una planta entera, es única en plantas.

Street, citado por Hurtado y Merino (1994) menciona que se pueden cultivar ápices de raíz y tallo, primordios de la hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros,

órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen.

8.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS.

El cultivo de tejidos puede utilizarse para diversos propósitos como son la micropropagación, obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, mejoramiento genético y conservación de germoplasma (Abdelnour - Esquivel y Vincent 1994).

CATIE (1993) explica que el cultivo de tejidos es una técnica que permite la obtención de grandes cantidades de plantas clonales a partir de un número reducido de material superior, en un espacio y tiempo reducido, independientemente de las condiciones ambientales.

En la actualidad, las técnicas de cultivo *in vitro* constituyen uno de los métodos biotecnológicos que han aportado al desarrollo de una nueva agricultura, basándose en la totipotencialidad celular, sean tejidos, ápices meristemáticos e incluso células aisladas, genéticamente idénticas a la planta madre en un período corto con el objetivo de multiplicar, mejorar y conservar a mediano y largo plazo diferentes especies como hortalizas, frutales, ornamentales y forestales de interés alimenticio, medicinal y/o económico para el ser humano.

8.2. FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO DE TEJIDOS.

Abdelnour - Esquivel et al. (1994) mencionan tres factores que intervienen en el cultivo de tejidos; estos son:

1) El explante.

Es el órgano, tejido o fragmento de tejidos, célula, etc. Extraído del material parental para iniciar el cultivo *in vitro*. La elección del explante adecuado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, éste variará de acuerdo al objetivo perseguido.

En general, factores como genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico son importantes a considerar.

Con respecto a la edad del explante, Rojas et al. (2004) mencionan que este factor es muy importante, ya que esto define su madurez o inmadurez. Además coincide con Abdelnour - Esquivel et al. (1994) al considerar que tanto las condiciones internas y externas en que

se encuentra la planta donante antes de iniciar el cultivo, puede influir en el desarrollo del explante.

2) Factores físicos.

Entre los factores físicos se encuentran:

a) PH: El grado de acidez o alcalinidad del medio de cultivo es importante y específico para cada tipo de planta. Por lo que se hace necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio. Sin embargo, el pH adecuado estará en un rango de 4,5 a 7.

Pierik (1990) señala que un rango de pH de 5 – 6,5 es apto para el crecimiento, con un máximo alrededor de 6. Un pH bajo (menor de 4,5), o alto (mayor que 7) generalmente frenaría el crecimiento y desarrollo *in vitro*.

b) Intercambio gaseoso: Los gases más corrientes son el oxígeno (O₂), dióxido de carbono (CO₂) y etileno (C₂H₄).

c) Humedad: En condiciones *in vitro* la humedad dentro de los recipientes es casi 100%. Por eso la planta *in vitro* en general no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica tales como cera, estomas, cutícula, etc.

d) La luz: En condiciones *in vitro* clásicas, la intensidad y calidad de luz es muy baja (10 Kw/m²) en comparación con las condiciones naturales de luz (900 W/m²). La calidad de luz también es muy baja y se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para tener diferentes longitudes de onda.

3) Factores Químicos.

a) El medio de cultivo: Consiste en una mezcla de determinadas sustancias sobre o dentro del cual crecen los explantes. Para su uso, el medio de cultivo es esterilizado ya sea en autoclave o a través de papel filtro (filtración).

Rojas et al. (2004) define al medio de cultivo como una sustancia nutritiva de diversa consistencia (sólida a líquida) que suministrará anclaje, nutrición y estimulación al desarrollo al explante.

8.3. TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN EN EL CULTIVO DE TEJIDOS.

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos tales como bacterias y hongos, los cuales pueden destruir dichos cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo (Roca y Mogrinski 1991).

Pierik (1990) menciona que existen cuatro fuentes de infección: la planta (exterior o interior), medio nutritivo (insuficientemente esterilizado), aire y el operario. Siendo la más importante de estas condiciones la planta misma, material vegetal que debería ser bien esterilizado antes de su aislamiento *in vitro*.

Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación (Roca y Mogrinski 1991).

Para establecer cultivos asépticos es conveniente:

- 1) Trabajar en ambientes adecuados.
- 2) Esterilizar los medios de cultivo.
- 3) Desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos.
- 4) Realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia.

Antes de empezar el proceso de esterilización, se debe retirar cualquier porción de suelo, porciones muertas, etc; que aún pudiesen quedar en las plantas o porciones de plantas con las que se trabaje. A continuación se debe realizar un lavado con agua si la contaminación externa es fuerte (Pierik 1990).

Después de retirar las porciones de suelo o porciones muertas que puedan estar presentes en el explante se inicia la esterilización, generalmente de la siguiente forma: Se sumerge el órgano en alcohol de 70% durante algunos segundos, para eliminar las burbujas de aire. Pierik (1990) menciona que el alcohol de 96% resulta demasiado fuerte, produciendo una excesiva

deshidratación. Luego se realiza una esterilización durante 10 – 30 minutos con NaOCL al 1%, conteniendo algunas gotas de tween 20 u 80, después se aclara en agua corriente estéril (para eliminar el hipoclorito), generalmente se hacen tres aclarados, durante 2, 5 y 15 minutos respectivamente después de comenzar a trocear el material vegetal, en condiciones estériles (cámara de flujo laminar), utilizando instrumentos estériles (bañados en alcohol de 96% y después flameados) (Pierik 1990). Roca y Mogrinski (1991) menciona que es aconsejable lavar los explantes con un volumen de por lo menos 10 a 20 veces mayor de agua estéril, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos.

El procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para estos (Roca y Mogrinski 1991).

Los explantes provenientes de vegetales que crecen en invernaderos o en cuartos climatizados son más fáciles de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo (Roca y Mogrinski 1991); también es más fácil la desinfección de explantes de órganos jóvenes que la de explantes provenientes de materiales adultos. Las aplicaciones de fungicidas o bactericidas, aplicadas previamente a las plantas, pueden ser de utilidad.

La elección del tiempo de esterilización y la concentración de lejía se pueden hacer en función de las circunstancias particulares de cada caso. No se puede generalizar sobre la concentración de lejía a utilizar, ya que cada especie y tipo de explante es un caso particular (Abdelnour - Esquivel et al. 1994). Sin embargo se puede decir que la concentración más liviana de desinfectante que sea efectiva contra la contaminación de determinado explante es la más adecuada; si es más diluida que esta, no se eliminarán los microorganismos y si es más concentrada que esta se quemará el explante (Abdelnour - Esquivel et al. 1994). Pierik (1990) menciona que la concentración depende en gran parte de si la superficie del explante que se esteriliza se va a conservar (esterilización suave) o si se va a cortar antes de la inoculación (esterilización vigorosa). Una esterilización prolongada puede producir efectos negativos sobre el explante, el tiempo y la concentración adecuada de lejía debe elegirse, cada vez en función del material experimental (Pierik 1990).

8.3.1. ESTERILIZACIÓN QUÍMICA

Para realizar el tratamiento de desinfección hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, entre ellos se encuentran el etanol y el Hipoclorito de sodio (NaOCL) del 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico

(Roca y Mogrinski 1991). En algunos casos resulta útil agregar algún agente tensoactivo como el tween 20 del 0,01% al 0,1%. Abdelnour - Esquivel et al. (1994) mencionan que es recomendable adicionar entre 2 a 4 gotas de tween 20 para romper la tensión superficial y permitir que el explante esté en mejor contacto con el químico (NaOCL). También es conveniente agitar (80-150 rpm) el explante conjuntamente con la solución desinfectante (Roca y Mogrinski 1991).

Murashige, citado por Roca y Mogrinski (1991) menciona que para la realización del tratamiento de desinfección se han empleado diferentes compuestos, siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y calcio, alcohol a diferentes porcentajes, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, cloro comercial y otros.

- 1) Alcohol: Para material vegetal se utiliza alcohol de 70%, ya que el alcohol de 96% deshidrata demasiado. Cuando se esterilizan mesas o instrumentos se debe utilizar alcohol de 96% ya que el de 70% deja una lámina de agua después de la evaporación. Cuando se esterilizan plantas, el sumergirlas en alcohol durante unos cuantos segundos no es suficiente para matar todos los microorganismos, y después de esto los tejidos son tratados generalmente con hipoclorito. Los frutos pueden ser esterilizados externamente, bañándolos en alcohol de 96%, y después flameándolos (Roca y Mogrinski 1991).
- 2) Lejía o hipoclorito de sodio: Si las plantas son especialmente sensibles a la lejía, es aconsejable utilizar hipoclorito cálcico para la esterilización (Roca y Mogrinski 1991).

El mismo autor menciona que la esterilización química puede ser más eficaz:

- 1) Lavando el material vegetal de forma intensiva, con agua muy limpia, antes de comenzar la esterilización y cambiando el agua de forma regular.
- 2) Colocando el material vegetal en alcohol al 70% durante algunos segundos, antes de la esterilización química, con lo que se eliminan las burbujas de aire, permitiendo al líquido esterilizante un mejor contacto con el material vegetal.
- 3) La adición de tween 20 u 80, al líquido esterilizante (concentración de 0,08% - 0,12%).
- 4) Agitando durante la esterilización de la lejía.

8.3.2. PROCESO DE DESINFECCIÓN

Es muy importante considerar las partes que comprende el proceso de desinfección, el mismo que involucra a explantes, medios de cultivo, instrumentos, cámara de transferencia de flujo laminar, etc (Abdelnour - Esquivel et al. 1994).

- 1) Material vegetal: El procedimiento de desinfección superficial del explante debe eliminar los microorganismos pero a la vez debe causar el menor daño posible al explante para su recuperación y desarrollo como organismo vivo.
- 2) Medio de cultivo: Esta por lo general se realiza en autoclave, a una temperatura de 121°C durante 20 minutos, sin embargo, el tiempo de esterilización dependerá del volumen de medio.
- 3) Materiales: El material de vidrio a utilizar debe lavarse con detergentes que se eliminen fácilmente con agua. Es recomendable que la cristalería que haya estado en contacto con altas concentraciones de hormonas se enjuague con etanol al 70% antes de lavarla con agua y detergente para asegurarnos de eliminar los residuos. Una vez finalizado el proceso de lavado es recomendable dar un último enjuague con agua destilada.
- 4) Instrumentos: La técnica comúnmente utilizada para esterilizar pinzas, bisturíes, tijeras es el flameo previa inmersión en el alcohol de 95%. Cuando se utilizan placas Petri o papel, estos deberán esterilizarse antes haciendo uso de la autoclave. También se recomienda asperjar el exterior de los frascos de cultivo, agua estéril, etc con etanol para así reducir las posibles fuentes de contaminación.

9. CULTIVO DE EMBRIONES

Delgado (1997) señala que el cultivo de embriones es una técnica mayormente utilizada en aquellas especies donde los problemas de incompatibilidad entre los progenitores frustran los objetivos de un plan de mejoramiento.

El cultivo *in vitro* de embriones se ha utilizado principalmente para favorecer la nutrición de embriones resultantes de cruces inter-específicos e inter-genéricos, los cuales están acompañados por un mal funcionamiento del endospermo y aborto después de la fecundación (Treviño et al. 1984).

Hu y Wang, citados por García et al. (2004) mencionan que los embriones producto de la fertilización del óvulo de una especie con el polen de otra no se desarrolla, entre otras cosas, debido a la falta de nutrientes. Si estos embriones permanecen en el ovario abortarán por lo que es necesario cultivarlos *in vitro* en un medio que contenga los nutrientes y reguladores necesarios para que germine. Esta metodología ha permitido obtener progenie de cruces amplias de un gran número de especies.

El cultivo de embriones cigóticos también ha sido aplicado en la conservación de germoplasma a mediano y largo plazo (Assy-Bah y Engelmann 1992). La aplicación de esta técnica requiere del establecimiento de protocolos eficientes de germinación, desenvolvimiento *in vitro* de embriones y aclimatación en condiciones *in vivo* para el desenvolvimiento de plantas adaptadas a las condiciones en campo (Da silva et al. 2007).

Ayerbe, citado por Puicón (1997) menciona que el cultivo *in vitro* de embriones es mejor cuando estos provienen de plantas crecidas bajo condiciones controladas en invernadero porque producen un mejor desarrollo del endospermo.

Suarez de Castro (1993) señala que el cultivo de embriones ha sido utilizado para acelerar la germinación en ciertas especies como palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.), cuyos embriones demoran hasta dos años en germinar bajo condiciones naturales.

El cultivo de embriones también ha sido utilizado para la colección e intercambio de germoplasma del cocotero (*Cocos nucífera* L.), porque sus semillas presentan grandes dimensiones, lo que aumenta drásticamente el volumen del material a ser colectado y conservado (Engelmann y Batugal 2002).

9.1. FACTORES QUE AFECTAN EL ÉXITO DEL CULTIVO DE EMBRIONES

A continuación se indican los factores de los que depende el desarrollo de una planta viable, a partir de un embrión (Pierik 1990).

- 1) Genotipo: En algunas especies vegetales los embriones son difíciles de cultivar, mientras que en otras resulta fácil. Se pueden encontrar incluso diferencias, entre los cultivares de una misma especie.
- 2) Estado de desarrollo del embrión en el momento del aislamiento: Generalmente los embriones muy pequeños, indiferenciados, son virtualmente imposibles de ser desarrollados *in vitro*. Jensen y Monnier, citados por Pierik (1990). Cuanto más desarrollado se encuentre un embrión *in vivo*, más fácil resulta su cultivo *in vitro*.
- 3) Las condiciones de crecimiento de la planta madre: Generalmente las plantas madres son cultivadas en invernadero, aunque a veces se utiliza material que se ha cultivado en el campo. La mejora del desarrollo de la planta madre, en condiciones controladas, generalmente produce un mejor desarrollo del endospermo, y por consiguiente, un mejor crecimiento de los embriones aislados. A veces se pueden tratar las plantas (inflorescencia), con giberelinas, antes de aislar los embriones; este tratamiento incrementa su tamaño, haciéndolos más fácil de manejar.
- 4) Composición del medio nutritivo: Los embriones inmaduros tienen unas necesidades más críticas, en cuanto a la composición del medio nutritivo, que los embriones maduros, los cuales se cultivan generalmente sobre un medio con sacarosa de 2 a 3 % mientras que los embriones inmaduros se comportan mejor en concentraciones más elevadas de 8 a 12% lo que indica que la demanda de azúcar disminuye con el tamaño del embrión. Sin embargo, tanto los embriones maduros como los inmaduros necesitan macronutrientes, micronutrientes y azúcar. Generalmente se usan PH de 5 a 6.
- 5) La sacarosa se utiliza generalmente como fuente de azúcar, aunque a veces se pueden utilizar también la glucosa y la fructosa. Rijven, citado por Pierik (1990) menciona que el azúcar es sobre todo una fuente de energía, aunque también tiene el papel de rebajar el potencial osmótico (negativo) de los medios nutritivos, sobre todo en el caso de embriones jóvenes.

- 6) Para Monnier, citado por Pierik (1990) la demanda de azúcar disminuye con el tamaño del embrión. Stolz, citado por Pierik (1990) sostiene que mientras el agar se utiliza a una concentración de 0,6 – 0,8%, produciéndose inhibiciones en el crecimiento si se deberían utilizar concentraciones más altas de azúcar.
- 7) Oxígeno: Se trata de un factor importante, siendo en algunas ocasiones, las necesidades de oxígeno de los cultivos de embriones, superiores a las concentraciones que normalmente se encuentran en el aire. Monnier, citado por Pierik (1990).
- 8) Luz: A veces los embriones aislados necesitan ser cultivados en la oscuridad durante unos 7-14 días, pudiendo luego ser transferidos a la luz, para permitir la formación de clorofila (Pierik 1990).
- 9) Temperatura: La temperatura depende de la especie vegetal que se usa. Normalmente se utiliza una temperatura relativamente alta (22- 28°C).

9.2. CULTIVO DE EMBRIONES INMADUROS

Camacho, citado por Romero (2004) señala que el cultivo de embriones se origina en semillas no acabadas de madurar, sin que se haya completado el desarrollo del embrión.

El mismo autor menciona que este tipo de cultivo se utiliza sobre todo para impedir la muerte prematura del embrión, con el fin de obtener una planta viable.

Uno de los atributos que distinguen a los embriones inmaduros de los maduros, es su falta de habilidad para crecer en medio de cultivo simple, es decir, sin reguladores de crecimiento (Treviño et al. 1984).

10. MEDIO DE CULTIVO EN EL CULTIVO DE EMBRIONES

Abdelnour - Esquivel y Escalant (1994) mencionan que el medio de cultivo es una combinación de sustancias químicas que han sido descritas después de numerosos experimentos y que permiten que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro*. Para mantener la viabilidad de un cultivo de tejidos, estimular la diferenciación y guiar el crecimiento, este requerirá de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas.

Entre los ingredientes que contiene un medio de cultivo vegetal se encuentran sales inorgánicas (minerales), compuestos orgánicos, preparaciones naturales complejas y materiales inertes.

El éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física (Roca y Mogrinski 1993). Sin embargo también se debe considerar el tipo de explante que será introducido.

En el caso de medio de cultivo para embriones, Roca et al. (1993) mencionan que en los primeros estudios relacionados con el cultivo de embriones aislados se usó la solución de Knop, que después sería considerada como no óptima.

El medio modificado de Murashige et al. (1962) parece estar más cerca del medio ideal, si se alteran las concentraciones de ciertos componentes. Monnier, citado por Roca et al. (1993).

Para embriones aislados de óvulos muy jóvenes se usan algunos medios relativamente complejos; los nutrimentos pueden incluir aminoácidos, vitaminas y varios extractos de plantas, además de componentes orgánicos y minerales del medio. Van Overbeek, citado por Roca et al. (1993) menciona que el agua de coco esterilizada por medio de filtración, ha sido muy benéfica para el cultivo de embriones de ciertas especies de plantas. Para Norstog (1961) la adición de glutamina al agua de coco aumenta su efecto.

Los extractos del endosperma de otras plantas o del mesocarpo de frutos también tienen un efecto estimulante en el crecimiento y desarrollo de los embriones (Roca et al. 1993).

En un experimento para inducir la embriogénesis somática mediante la producción de embriones de *Punica granatum* L. En medios de cultivo MS con 2,4 – D, a partir de explantes de tipo embriones cigóticos, hojas con meristemos axilares y raíces, se encontró que los tipos de explante influyeron en cuanto al tiempo y porcentaje de aparición de los embriones.

Obteniéndose con los embriones cigóticos la tasa más alta de embriones somáticos (81%) y en el menor tiempo posible (entre 15 y 30 días) a diferencia de los otros explantes como ápices intermedios (44%), hojas y raíces (2% - 7%) después de los 30 días (IIICA 1999).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de investigación fue ejecutado en las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) – Lima, Perú. El material madre proviene de una plantación instalada en el departamento de Ucayali.

2. MATERIALES

El material vegetal (embriones) proviene de una plantación de *Elaeis guineensis* Jacq. establecido en el fundo “El Refugio”, el cual se encuentra ubicado a 8 km del margen derecho del km 30 de la carretera Federico Basadre, en el distrito de Campo Verde, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali. A una altitud de 200 m.s.n.m.

El fundo es de propiedad de la empresa PALMAGRO SAC. Para la instalación de dicha plantación se utilizó semillas seleccionadas procedentes de países como Costa Rica, Benín y Ecuador. Las semillas fueron enviadas en bolsas de papel al laboratorio donde se realizó la extracción de los embriones cigóticos para la realización del experimento.

- 1) Materiales de laboratorio.
 - Vasos de precipitado de 500 ml
 - Tubos de ensayo de 50 ml
 - Probetas de 100 ml
 - Pipetas de 1 y 10 ml
 - Placas Petri de vidrio
 - Varillas de vidrio
 - Botellas de vidrio

- Frascos de vidrio de 250 ml
- Mechero de alcohol
- Pinza recta
- Pinza curva
- Mangos de bisturí
- Hojas de bisturí
- Cuchillas
- Platos de acero esterilizado
- Papel esterilizado
- Bandejas de plástico
- Jarras de plástico de 5 Litros
- Papel aluminio
- Etiquetas
- Cinta selladora

2) Equipos de Laboratorio.

- Autoclave
- Horno microondas
- Cámara de flujo laminar
- Balanza de precisión
- Potenciómetro
- Agitador magnético

- Vernier
- Refrigeradora

3) Reactivos.

- Sales de Murashige & Skoog
- Fuente de hierro
- Vitaminas
- Hormonas
- Sacarosa
- Agar
- Fungicida Benopoint
- Detergente
- Agua destilada
- Alcohol al 96%
- Hipoclorito de Sodio (NaOCL)
- Agente tensoactivo Tween 20
- Buffer ácido y alcalino

4) Materiales adicionales.

- Tijeras de podar
- Cíncel
- Bolsas de Papel
- Bolsas de plástico

- Regla milimetrada
- Cuaderno y lapicero

3. MÉTODOS

3.1. TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN

La adecuada desinfección del explante es muy importante para el éxito del cultivo *in vitro*, debido a que las condiciones físicas en las cuales se incuban estos cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos tales como hongos y bacterias, los cuales pueden llegar a competir con el explante por dicho medio o llegar, incluso a modificarlo (Roca y Mogrinski 1991).

Debido a que aún no se tiene un protocolo de desinfección establecido para la especie *Elaeis guineensis* Jacq. Se evaluó cinco tratamientos de desinfección tomados de diferentes estudios realizados para la misma especie, además del tratamiento testigo.

El tratamiento de desinfección fue desarrollado en frutos, llevándose a cabo fuera y dentro de una cámara de flujo laminar. Para la realización de dichos tratamientos se utilizaron materiales como detergente comercial, alcohol al 96%, Hipoclorito de sodio (NaOCL) en diferentes concentraciones, agente tensoactivo Tween 20, fungicida Benopoint y agua destilada (siendo algunos de estos materiales reemplazados del tratamiento de desinfección inicial). Se realizaron 5 repeticiones para los tratamientos 1, 2, 3 y 4; 6 repeticiones para el tratamiento 5 y 4 repeticiones para el tratamiento 6 para los embriones correspondientes al estadio de desarrollo de 80 días, mientras que en los embriones de estadio de desarrollo 110 días se realizaron 5 repeticiones para los tratamientos 1, 2, 3 y 4; 4 repeticiones para el tratamiento 5 y 6 repeticiones para el tratamiento 6.

3.1.1. TRATAMIENTO 1

Para la ejecución de dicho ensayo se tomó como referencia la investigación realizada por Muniran et al. (2008), el cual consistió en la Micropropagación de semilla dura de *Elaeis guineensis* Jacq. Esto al observar la baja tasa de germinación y las dificultades que presenta la variedad dura para el establecimiento de plántulas. Se tomó como referencia el tratamiento de descontaminación de frutos, que se describe en la Tabla 2.

3.1.2. TRATAMIENTO 2

Para la ejecución del tratamiento de desinfección 2, se tomó como referencia el estudio realizado por Villa et al. (2007) que consistió en establecer un protocolo de crioconservación para *Elaeis guineensis* Jacq. La descripción del tratamiento se observa en la Tabla 2.

Para la ejecución del tratamiento de desinfección, Villa et al. (2007) indican que se deben extraer las nueces de las semillas de *Elaeis guineensis* Jacq. Por lo que se procedió a retirar el exocarpio y el mesocarpio quedándose solo con el endocarpio. Siendo esta estructura (nuez) la que fue sometida al ensayo de desinfección 2.

3.1.3. TRATAMIENTO 3

Para el desarrollo del tratamiento de desinfección 3, se tomó como referencia los estudios realizados por el Área de cultivo de tejidos del IBT, esto para realizar la desinfección de los frutos de palmeras. Cabe señalar que el tratamiento todavía no ha sido publicado. En la Tabla 2 se describe el tratamiento.

3.1.4. TRATAMIENTO 4

Al igual que en el tratamiento de desinfección 3, se tomó como referencia los estudios realizados por el IBT para desarrollar el tratamiento de desinfección 4. Si bien es cierto estos tratamientos de desinfección son similares, su diferencia radica en la concentración de hipoclorito de sodio que se utilizará para desinfectar las semillas en la cámara de flujo laminar. Siendo la concentración de hipoclorito de sodio menor en el tratamiento 4 (20%) a diferencia de la utilizada en el tratamiento 3 (50%). (Obsérvese en la Tabla 2).

3.1.5. TRATAMIENTO 5

Al igual que en los dos últimos tratamientos de desinfección (3 y 4), se tomó como referencia los estudios realizados en el IBT; La metodología es la misma que en los tratamientos 3 y 4, diferenciándose en la concentración de hipoclorito de sodio a utilizar (10%), siendo esta menor en comparación con los anteriores tratamientos (Tabla 2).

3.1.6. TRATAMIENTO 6

Descontaminación superficial, se lavó las semillas con detergente comercial.

Tabla 2: **Descripción de los Tratamientos de desinfección.**

<i>Tratamiento</i>	<i>Descripción</i>
T1	<p>Desinfección:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Descontaminación superficial del fruto: Lavar con detergente comercial. - Enjuagar con abundante agua corriente. - Sumergir el fruto en Tween 20 por 10 minutos.
	<p>En cámara de flujo laminar:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Enjuagar entre 4 a 5 veces con abundante agua destilada. - Sumergir en alcohol al 96% por 10 minutos.
T2	<p>Desinfección:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sumergir las nueces en una solución de Hipoclorito de sodio al 1% + Tween 20 (4 gotas) durante 20 min (con intercambio de la solución cada 10 min). - Enjuagar una vez con agua destilada estéril. - Sumergir las nueces en una solución de Benopoint (4g/l) durante 16 horas. - Enjuagar tres veces con agua destilada estéril.
	<p>En cámara de flujo laminar:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Desinfectar las nueces con hipoclorito de sodio al 0,5% + 5 gotas de Tween 20 durante 15 min. - Lavar tres veces con agua destilada estéril 10 min cada enjuague.
T3	<p>Desinfección:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lavar las nueces con detergente comercial. - Enjuagar las nueces con agua de caño. - Sumergir las nueces en una solución de Benopoint (4g/l) durante 20 min. - Enjuagar las nueces con agua de caño.
	<p>En cámara de flujo laminar:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sumergir en alcohol al 96% por 5 seg. - Enjuagar 3 veces con agua destilada estéril. - Remojar las nueces en una solución de hipoclorito de sodio al 50% + tween 20 (4 gotas) por 10 min. - Enjuagar 3 veces con agua destilada estéril.

<i>Continuación:</i>	
Tratamiento	Descripción
T4	Desinfección: - Lavar las nueces con detergente. - Enjuagar las nueces con agua de caño. - Remojar las nueces en una solución de Benopoint (4g/l) durante 20 min. - Enjuagar las nueces con agua de caño.
	En cámara de flujo laminar: - Sumergir las nueces en alcohol al 96% por 5 seg. - Enjuagar 3 veces con agua destilada estéril. - Sumergir las nueces en una solución de hipoclorito de sodio al 20% + tween 20 (4gotas) durante 20 min. - Enjuagar 3 veces con agua destilada estéril.
T5	Desinfección: - Lavar las nueces con detergente. - Enjuagar las nueces con agua de caño. - Sumergir las nueces en una solución de Benopoint (4g/l) por 20 min. - Enjuagar las nueces con agua de caño.
	En cámara de flujo laminar: - Sumergir las nueces en alcohol al 96% por 5 seg. - Enjuagar 3 veces con agua destilada estéril. - Remojar las nueces en una solución de hipoclorito de sodio al 10% + tween 20 (4 gotas) por 30 min. - Enjuagar 3 veces con agua destilada estéril.
T6	Se lavó las nueces con detergente comercial.

Para la presentación de los resultados de los tratamientos de desinfección se asignará la siguiente codificación.

Tabla 3: **Codificación de los Tratamientos de desinfección.**

Número de Tratamiento de desinfección	Código
1	T1
2	T2
3	T3
4	T4
5	T5
6	T6

3.1.7. SELECCIÓN DE TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN

Se evaluó la respuesta de los embriones en cada uno de los tratamientos de desinfección establecidos para los embriones de 80 y 110 días, se identificó los dos mejores tratamientos por estadio y se seleccionó el tratamiento desinfección que tuvo el mismo patrón de comportamiento en ambos estadios de desarrollo y con el que se obtuvo la tasa más baja de contaminación de embriones.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE ESTADIOS DE DESARROLLO POSTERIOR A LA POLINIZACIÓN DE LA PLANTA MADRE.

Para determinar el adecuado estadio de desarrollo después de producida la polinización o antes se tomó como referencia el trabajo realizado por Muniran et al. (2008), quien utilizó frutos de la variedad dura, cosechados 70 días después de la polinización para la realización de ensayos de micropropagación.

Sin embargo, cuando se recibieron los racimos con frutos que fueron extraídos 70 días después de la polinización y se procedió a cortar algunos de estos con ayuda de una tijera de podar (por la parte media del fruto) no se encontró ningún embrión (Figura 3).

Debido a que *Elaeis guineensis* Jacq. Es una especie que presenta frutos climatéricos, es decir frutos que tienen la capacidad de madurar a pesar de estar separados de la planta, se dejó pasar unos días hasta esperar que estos maduraran, es así que se procedió a extraer frutos del racimo día tras día a la espera de poder visualizar el embrión, hasta que a partir del día 80 se empezó a observar (solo en algunos frutos) la presencia de embriones, también se observó que la parte correspondiente al endospermo tenía una textura muy blanda. Para la realización del ensayo

de desinfección se recibieron también, frutos que fueron extraídos 110 días después de la polinización (Figura 4) y que a diferencia de los frutos del período de 80 días estos si presentaban embrión y endospermo sólido. A pesar de que los frutos de 80 días tenían el endospermo muy blando se procedió a realizar la introducción del embrión, junto a los embriones pertenecientes a los frutos de 110 días. Esto para el ensayo de tratamiento de desinfección.

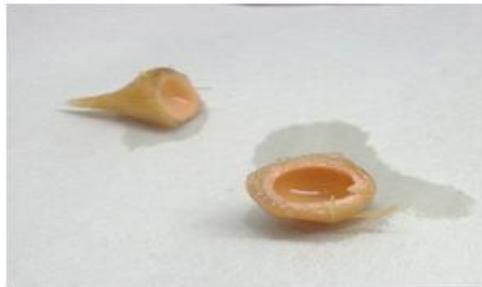


Figura 3: **Semilla de 70 días, con ausencia de endospermo.**

FUENTE: Elaboración propia.



Figura 4: **Semilla de 110 días, con presencia de embrión y endospermo.**

FUENTE: Elaboración propia.

Debido a que no todas las semillas que fueron extraídas 80 días después de la polinización presentaban embrión, se decidió estudiar aquellas semillas que correspondan al período entre 90 y 110 días después de producida la polinización. En ensayos preliminares de introducción se observó que el 100% de semillas de 90 días presentaban embrión y endospermo.

Se decidió no trabajar con semillas de 120 días debido a la dificultad que estos representaban para la introducción, en los ensayos preliminares se observó que apenas el 24% de los embriones pudieron ser sembrados con éxito, a pesar de que se tuvo mucho cuidado en la manipulación de los instrumentos. Mientras que el 76% de los embriones fueron dañados con

cortes al momento de intentar extraerlos con el bisturí o las semillas producto del esfuerzo de tratar de cortarlas salían fuera de la cámara de flujo laminar con lo que se perdían embriones, esto se debe a que a medida que la semilla va madurando el endospermo se endurece, es por ello que al momento de realizar la introducción era muy difícil hacer el corte con la tijera de podar.

Se trabajó con embriones procedentes de la parte central del racimo de la palma aceitera debido a su mayor viabilidad en comparación con embriones que provienen de la parte apical y basal del racimo. Se evaluó la respuesta de los embriones pertenecientes a los estadios de desarrollo entre 90 y 110 días después de la polinización.

Al igual que con los tratamiento de desinfección, para la presentación de resultados se asignará una codificación a los estadios de desarrollo (Tabla 4).

Tabla 4: **Codificación para Estadios de desarrollo.**

<i>Estadio de desarrollo</i>	<i>Código</i>
90 días	E90
100 días	E100
110 días	E110

3.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y SU RESPECTIVA ESTERILIZACIÓN.

Para la preparación de los medios de cultivo utilizados en la investigación, se necesitó de macronutrientes y micronutrientes (elaborados por separado y diluidos en agua destilada), así como también fuentes de Hierro, vitaminas, hormonas, sacarosa (diluidos en agua destilada) y agar. El pH de los medios de cultivo estuvo entre 5,7 y 5,8, estos fueron ajustados con la ayuda de compuestos como KOH y HCL, previo a la adición del agar. Posterior a la calibración y adición del agar, el medio fue calentado en horno microondas durante 15 minutos, después de 10 minutos en el microondas se retiró el medio de cultivo para ser removido con ayuda de una cuchara, luego se volvió a introducir en el microondas por un tiempo de 5 minutos más, para que el agar se diluyera en el medio de cultivo. Solo 4 de los 5 medios de cultivo preparados, fueron calentados en el microondas, a excepción del medio de cultivo líquido.

Los medios de cultivo fueron vertidos en tubos de ensayo de vidrio con capacidad de 18 cc, vertiendo en cada uno de los tubos 10 ml de medio. En el caso del medio de cultivo líquido, se colocó dentro de cada tubo de ensayo, una tira de papel filtro y se vertió el medio de cultivo líquido hasta una altura en la que una vez se realizara la siembra, el medio no pudiera estar en contacto con el embrión. Una vez llenos los tubos de ensayo se cubrieron la boca de estos con papel aluminio y se llevó a la autoclave para su respectiva esterilización, esta se realizó a 121 °C y 1,1 Kg/cm⁻² durante unos 30 minutos. Posterior a la esterilización, los tubos de ensayo fueron llevados a la sala de siembra y sellados con papel film en la cámara de flujo laminar. Luego fueron almacenados en anaqueles, estando listos para ser utilizados en la siembra luego de 7 días, a la espera de que el medio de cultivo se solidifique.

3.4. SIEMBRA DE EMBRIONES INMADUROS EN EL MEDIO DE CULTIVO.

Luego de realizar el tratamiento de desinfección de las semillas se procede a la siembra de los embriones en el medio de cultivo aséptico. La siembra debe realizarse en la cámara de flujo laminar y siguiendo los siguientes pasos:

- 1) Colocar en la cámara de siembra los siguientes materiales: 1 mechero, 3 pinzas (2 pinzas rectas y 1 pinza curva), 1 bisturí (adicionalmente de algunos repuestos), 1 tijera de podar (esterilizada), 2 platos, papel blanco, 3 frascos con alcohol (1 frasco para colocar la pinza que se usará en la siembra, 1 frasco para poner la pinza junto al bisturí y 1 frasco más grande para colocar la tijera de podar), tubos de ensayo debidamente rotulados, frascos con semillas desinfectadas. Todos estos materiales debieron ser rociados previamente con alcohol antes de su ingreso a la cámara de flujo laminar (Figura 5).
- 2) Con la ayuda de una pinza previamente flameada se retira una de las semillas y se pone sobre uno de los platos que contiene papel blanco esterilizado.
- 3) Flamear la tijera de podar que se encuentra sumergida en alcohol y con ayuda de la pinza que se usó para retirar la semilla del frasco se corta la nuez por la mitad.
- 4) Haciendo uso de otra pinza recta y del bisturí, se procede a retirar con mucho cuidado el endospermo. Una vez que se haya retirado se puede aislar el embrión.
- 5) Ubicado el embrión, se procede a retirarlo con ayuda de una pinza recta y del bisturí. En algunos casos solo es necesario realizar una ligera presión en el área circundante al embrión y este saldrá muy rápidamente (Si es un embrión de 90 días, que tiene el

endospermo suave), en el caso de embriones de 100 y 110 días, algunos tienen el endospermo más duro que embriones de 90 días, en estos casos se debe cortar parte del endospermo hasta que quede solo la parte circundante al embrión (así es más fácil sujetar el endospermo con la pinza recta), viendo la mejor forma de poder extraer sin producir ningún tipo de daño, se retira con cuidado la pequeña capa que cubre al embrión haciendo que la extracción sea más fácil. Un pequeño corte ocasionado al embrión hará que este pierda viabilidad.

- 6) Una vez extraído el embrión, se retira el papel film junto al papel aluminio, los cuales fueron utilizados para cubrir los tubos de ensayo (esterilizados). Una vez retirados, se debe flamear la boca de los tubos para poder realizar la siembra.
- 7) Utilizando una pinza recta o curva (de acuerdo a la comodidad del sembrador) se coge el embrión (sin ejercer mucha presión sobre el) y se coloca dentro del tubo de ensayo, procurando que la parte más delgada del embrión, por donde se desarrollará la radícula, se encuentre en contacto con el medio de cultivo. Para realizar la siembra se utiliza la pinza que fue usada para retirar el endospermo, esto a fin de disminuir las probabilidades de contaminación y con ello la pérdida del explante.
- 8) Una vez culminado la siembra del embrión, se debe flamear el tubo de ensayo nuevamente y tapar con el papel aluminio previamente flameado en el mechero.
- 9) Finalizada la siembra, se sella cada uno de los tubos de ensayo utilizando papel film.
- 10) Los tubos son ubicados para su evaluación.



Figura 5: **Cámara de flujo laminar preparada para la siembra de embriones.**

FUENTE: Elaboración propia.

3.5. ESTABLECIMIENTO DE LOS ENSAYOS IN VITRO.

Una vez terminada la siembra, los tubos se almacenaron en la sala de incubación a una temperatura de 28°C, 33% de humedad y recepción de luz blanca por un período de 16 horas diarias.

La evaluación del desarrollo de los embriones se realizó quincenalmente; en ese lapso de tiempo es posible observar cambios notorios en el desarrollo de estos.

3.6. ENSAYOS CON MEDIOS DE CULTIVO.

Para evaluar el desarrollo adecuado del embrión se ensayó con cinco medios de cultivo, estos fueron los medios Murashige & Skoog, Murashige & Skoog + 40 gramos de azúcar (el medio original solicita de 30 gramos de azúcar), Murashige & Skoog + Ácido Indol Butírico (IBA), N6 (Chu et al. 1975) y finalmente Murashige & Skoog adicionado con hormonas, el cual es un medio líquido. Tomando como referencia los trabajos realizados en Palma aceitera de los autores Muniran et al. (2007) se decidió probar con un medio de cultivo líquido preparado por el IBT, el cual tiene como base el medio de cultivo Murashige & Skoog enriquecido con hormonas del tipo auxina como el Ácido Naftalenacético (ANA) y citokinina como el Benzil amino purina (BAP). Este medio de cultivo es utilizado para realizar la introducción de otro cultivo tropical como *Ananas comosus* (piña). Se realizó la siembra de embriones en estos medios de cultivo, sin embargo en los días siguientes se observó que los embriones que fueron

sembrados en los medios de cultivo N6 y MS + IBA se contaminaron en su mayoría, quedándose solo con embriones de los otros tres medios de cultivo restantes. Por falta de material vegetal, no se pudo volver a realizar la introducción en los medios de cultivo que se contaminaron, trabajándose con los tres medios de cultivo restantes: Murashige & Skoog, Murashige & Skoog + 40 gramos de azúcar y Murashige & Skoog + Hormonas.

Al igual que en el tratamiento de desinfección y en los estadios de desarrollo, se asignó la siguiente codificación a los medios de cultivo (Tabla 5).

Tabla 5: **Codificación para Medios de cultivo.**

<i>Medio de cultivo</i>	<i>Código</i>
MS	M1
MS + 40 gramos de azúcar	M2
Ms + Hormonas	M3

3.7. FASE DE DESARROLLO DE LOS EMBRIONES INMADUROS.

Para evaluar la respuesta de los embriones a los medios de cultivo en el cual fueron sembrados se tomó como referencia el trabajo realizado en embriones inmaduros de *Elaeis guineensis* Jacq. Por Abdullah et al. (2005). Determinándose las fases de desarrollo que se describen en la Tabla 8. Se consideró como una de las fases de desarrollo al embrión, esto, debido a que no se tenía la certeza de que todos los embriones germinarían. En las Figuras 6,7, 8, 9, 10, y 11 se observan las diferentes fases de desarrollo que alcanza el embrión.

3.8. PARÁMETROS EVALUADOS.

3.8.1. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN.

Para esta primera fase de la investigación, se realizó 4 evaluaciones semanales. Se evaluó:

- El porcentaje de contaminación en el medio de cultivo.

3.8.2. RESPUESTA AL MEDIO DE CULTIVO.

En esta segunda etapa se realizaron 4 evaluaciones quincenales, realizándose una medición cuantitativa para cada una de los siguientes parámetros.

- Porcentaje de brotación.
- Altura de planta.

Las mediciones para la variable Altura de planta se realizaron con ayuda de un vernier, expresándose la unidad de medida en centímetros.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el trabajo de investigación se aplicó el Diseño completamente al azar (DCA) para el tratamiento de desinfección, estadio de desarrollo después de la polinización y la respuesta de los embriones al medio de cultivo. Además se realizó la prueba de Tukey y el Análisis de varianza (ANVA). Para la realización del Análisis estadístico se empleó el programa Statgraphics Centurión.

Para la realización del análisis estadístico con el programa Statgraphics se asignó la siguiente codificación para tratamiento de desinfección (Tabla 6), estadios de desarrollo y medio de cultivo (Tabla 7).

Tabla 6: **Codificación para el procesamiento de información de Tratamientos de Desinfección.**

<i>Código</i>	<i>Equivalencia</i>
1	Embrión no contaminado
2	Embrión contaminado

Tabla 7: **Codificación para el procesamiento de información de Estadios de desarrollo y Medios de cultivo.**

<i>Código</i>	<i>Equivalencia</i>
1	Embrión
2	Callo
3	Brote
4	Planta

3.9.1. TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN.

Para los 6 tratamientos de desinfección de los embriones pertenecientes a los estadios de desarrollo 80 y 110 días, se realizó el Análisis de varianza a un nivel de significancia del 95% y se sometió a una prueba de Tukey.

3.9.2. ESTADÍO DE DESARROLLO DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN.

La evaluación de los estadios de desarrollo se realizó para los tres estadios en estudio (90, 100 y 110 días), se realizaron 14 repeticiones por cada uno de ellos, con los que se hizo un ANVA a un nivel de significancia de 95% y se sometió a una prueba de Tukey.

3.9.3. RESPUESTA DE LOS EMBRIONES AL MEDIO DE CULTIVO.

Al igual que en los estadios se realizaron 14 repeticiones y también fue aplicado el ANVA a un nivel de significancia de 95%, también se hizo una prueba de Tukey.

Tabla 8: Fase de desarrollo de embriones.

FASE DE DESARROLLO	DESCRIPCIÓN
Embrión	Embrión inmaduro recientemente introducido en un medio de cultivo.
Callo	Embrión inmaduro que presenta características de diferenciación.
Brote	Embrión germinado, con presencia de plúmula poco desarrollada y haustorio O solamente con presencia de plúmula.
Planta	Embrión germinado, con presencia de la primera hoja y haustorio O con presencia de la primera hoja, haustorio y raíz.



Figura 6: Embrión inmaduro de *Elaeis guineensis* Jacq.

FUENTE: Elaboración propia.



Figura 7: **Embrión de *Elaeis guineensis* Jacq. – fase callo.**

FUENTE: Elaboración propia.



Figura 8: **Embrión de *Elaeis guineensis* Jacq. - fase brote.**

FUENTE: Elaboración propia.

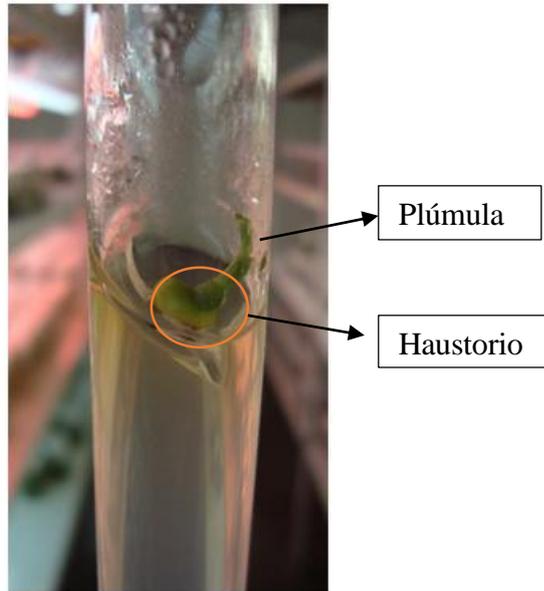


Figura 9: **Embrión en un estadio más desarrollado de “Brote”.**

FUENTE: Elaboración propia.

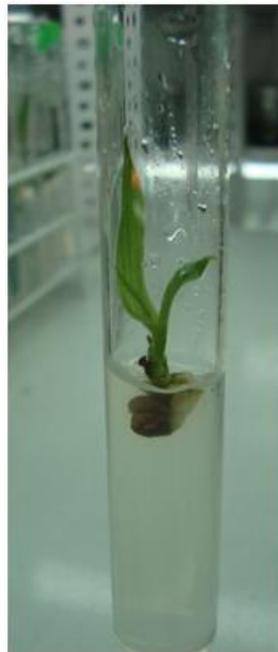


Figura 10: **Planta de *Elaeis guineensis* Jacq.**

FUENTE: Elaboración propia.



Figura 11: **Embrión germinado, con raíz desarrollada y el haustorio.**

FUENTE: Elaboración propia.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN.

1.1. DESINFECCIÓN DE EMBRIONES DE 80 DÍAS

En esta primera parte del experimento se trabajó con semillas correspondientes al estadio de desarrollo de 80 días (5 repeticiones para T1, T2, T3 y T4; 6 repeticiones para T5 y 4 repeticiones para T6)

En la Tabla 9 y Figura 12 se observa que T4 muestra el más bajo porcentaje de contaminación (20%), el cual se presentó 14 días después de realizada la introducción. El siguiente tratamiento eficaz fue T3, que presenta un porcentaje de contaminación de 60% siendo considerado como alto.

Tabla 9: **Porcentaje de contaminación para “Embriones de 80 días”.**

PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN (%)					
TRATAMIENTO	Evaluación 1	Evaluación 2	Evaluación 3	Evaluación 4	TOTAL
T1	0	60	60	100	100
T2	20	40	80	80	80
T3	0	0	60	60	60
T4	0	20	20	20	20
T5	0	0	83,33	100	100
T6	75	0	100	100	100

El procedimiento de los tratamientos de desinfección 3 y 4 es el mismo fuera de la cámara de flujo de laminar, sin embargo dentro de la cámara, el tratamiento 3 utilizó lejía al 50% y el tratamiento 4 al 20%. Los tiempos de inmersión en la mezcla de NaClO y el agente tensoactivo Tween 20 fueron de 10 minutos para el tratamiento 3 y 20 minutos para el tratamiento 4. La Tabla 10 muestra las diferencias en el proceso de desinfección entre los tratamientos T3 y T4.

Abdelnour - Esquivel et al. (1994) recomiendan adicionar entre 2 a 4 gotas de tween 20 para romper con la tensión superficial y permitir que el explante tenga el mejor contacto con el desinfectante.

Tabla 10: **Diferencias entre los Tratamientos de Desinfección T3 y T4.**

		T3	T4
Desinfección	Detergente comercial	x	x
	Enjuague con agua de caño	x	x
	Benopoint (4g/l)	x	x
	Tiempo de inmersión	20'	20'
Cámara de flujo laminar	Enjuague con agua de caño	x	x
	Alcohol 96%	x	x
	Tiempo de inmersión	5"	5"
	Cantidad de enjuagues (H2O estéril)	3	3
	Concentración de NaClO	50%	20%
	Tween 20 (4 gotas)	x	x
	Tiempo de inmersión	10'	20'
	Cantidad de enjuagues (H2O estéril)	3	3

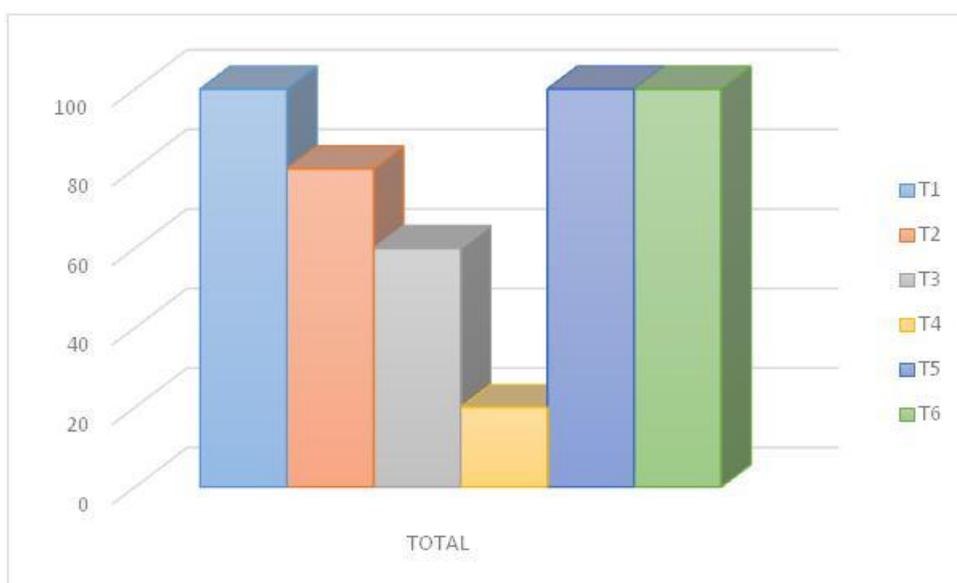


Figura 12: **Tasa de contaminación para "Embriones de 80 días"**.

En cuanto al análisis de varianza (Tabla 11) para la variable "Embriones de 80 días", realizada 28 días después del ensayo, este nos indica que existe una alta variabilidad entre los tratamientos, con un nivel de confianza de 95%, lo cual conlleva a la prueba de Tukey.

Tabla 11: **ANVA para "Embriones de 80 días"**.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de Libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Proporción F</i>	<i>Valor de P</i>
Entre grupos	2,56667	5	0,51333	4,40	0,0055*
Dentro del grupo	2,8	24	0,11667		
Total (Corr.)	5,36667	29			

*representa significancia.

En la comparación de medias de Tukey (Tabla 12) para determinar el protocolo de tratamiento de desinfección se comprueba que las medias son diferentes en los tratamientos evaluados, resultando los tratamientos 1, 5 y 6 los menos eficaces ya que estos obtuvieron una media de 2,0; que significa que todos los embriones sometidos a estos tratamientos se contaminaron, mientras que los embriones que fueron sometidos a los tratamientos 3 y 4 obtuvieron una media de 1,6 y 1,2 respectivamente a un nivel de confianza de 95%. Siendo los tratamientos más eficaces para este estadio de desarrollo.

Tabla 12: Comparación de medias de Tukey para “Embriones de 80 días”.

<i>TRATAMIENTO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T4	5	1,2	X
T3	5	1,6	XX
T2	5	1,8	XX
T6	4	2,0	X
T5	6	2,0	X
T1	5	2,0	X

1.2. DESINFECCIÓN DE EMBRIONES DE 110 DÍAS.

En la Tabla 13 y Figura 13 que corresponde a la evaluación realizada a los embriones del estadio de desarrollo de 110 días (5 repeticiones para T1, T2, T3 Y T4; 4 repeticiones para T5 y 6 repeticiones para T6) se observa que con el tratamiento de desinfección T4 se obtuvo el mejor resultado obteniéndose un porcentaje de desinfección de 100%. Este resultado coincide con lo observado en la evaluación que se realizó a los embriones del período de 80 días donde T4 fue el tratamiento que brindó los mejores resultados (80% de desinfección). Sin embargo para este estadio de desarrollo, también se encontró que T2 fue igual de efectivo, ya que registró el mismo porcentaje de desinfección (100%). Este comportamiento difiere del obtenido en la evaluación realizada a los embriones de 80 días, donde T2 registró un bajo porcentaje de desinfección (20%).

Tabla 13: Porcentaje de contaminación para “Embriones de 110 días”.

<i>PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN (%)</i>					
<i>TRATAMIENTO</i>	<i>Evaluación</i> <i>1</i>	<i>Evaluación</i> <i>2</i>	<i>Evaluación</i> <i>3</i>	<i>Evaluación</i> <i>4</i>	<i>TOTAL</i>
T1	0	0	0	60	60
T2	0	0	0	0	0
T3	0	40	40	60	60
T4	0	0	0	0	0
T5	0	0	100	100	100
T6	0	0	25	25	25

El procedimiento realizado para los tratamientos T2 y T4 es diferente fuera y dentro de la cámara de flujo laminar. Mientras que en T2 las semillas tuvieron que ser sumergidas en una

solución de NaClO al 1% con Tween 20 (4 gotas) durante unos 20 minutos en T4 las semillas fueron lavadas con detergente comercial. En ambos tratamientos se utilizó el fungicida Benopoint, la aplicación del fungicida es de mucha utilidad para la desinfección del explante que proviene de una zona de alta temperatura, precipitación y humedad, y en donde existe el ambiente propicio para la aparición de hongos. Además el explante proviene de material adulto establecido en campo, el mismo que se encuentra expuesto a muchos agentes patógenos a diferencia de las plantas que permanecen en invernadero. En la Tabla 14 se puede observar las diferencias entre los tratamientos de desinfección T2 y T4.

Tabla 14: **Diferencias entre los Tratamientos de Desinfección T2 y T4.**

		T2	T4
Desinfección	Inmersión en NaClO (1%) + Tween 20 (4 gotas)	x	
	Tiempo de inmersión	20'	
	Detergente comercial		x
	Enjuague con H2O destilada estéril	x	
	Enjuague con agua de caño		x
	Benopoint (4g/l)	x	x
	Tiempo de inmersión	16 h	20'
	Enjuague con H2O destilada estéril	x	
	Enjuague con agua de caño		x
	Cámara de flujo laminar	Enjuague con agua de caño	
Alcohol 96%			x
Tiempo de inmersión			5"
Cantidad de enjuagues (H2O estéril)			3
Concentración de NaClO		0,5%	20%
Tween 20		5 gotas	4 gotas
Tiempo de inmersión		20'	20'
Cantidad de enjuagues (H2O estéril)		3	3

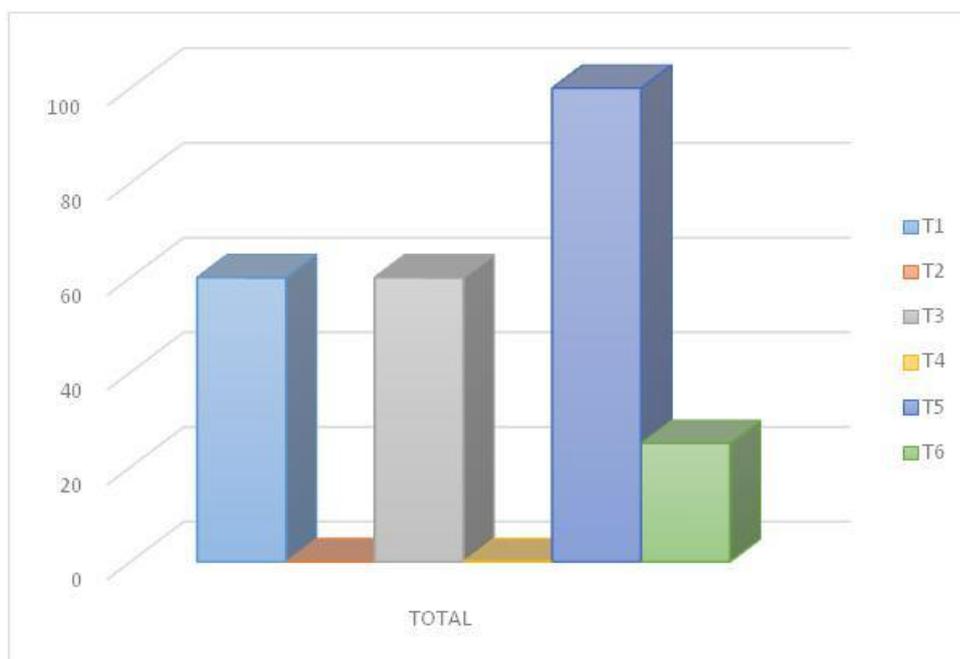


Figura 13: **Tasa de contaminación para "Embriones de 110 días".**

El análisis de varianza (Tabla 15) para la variable "Embriones de 110 días", realizada 28 días después del ensayo, nos indica que existe significancia entre los tratamientos, con un nivel de confianza de 95%.

Tabla 15: **ANVA para "Embriones de 110 días".**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Proporción F	Valor de P
Entre grupos	3,73333	5	0,74667	5,54	0,0016*
Dentro del grupo	3,23333	24	0,13472		
Total (Corr.)	6,96667	29			

*representa significancia.

En la comparación de medias de Tukey (Tabla 16) para determinar el protocolo de tratamiento de desinfección se comprueba que las medias son diferentes en los tratamientos evaluados, resultando los tratamientos T5, T1 y T3 los menos eficaces con medias de 2,0; 1,6; 1,6 respectivamente, que significa que la mayoría de los embriones que fueron sometidos a estos tratamientos se contaminaron, mientras que con los tratamientos T4 y T2 se obtuvo una media 1,0 a un nivel de confianza de 95% lo que demuestra que ninguno de los embriones tratados se contaminó.

Tabla 16: Comparación de medias de Tukey para “Embriones de 110 días”.

<i>TRATAMIENTO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T4	5	1,0	X
T2	5	1,0	X
T6	6	1,2	X
T3	5	1,6	XX
T1	5	1,6	XX
T5	4	2,0	X

Al comparar los resultados obtenidos en embriones de 80 días y 110 días se determinó que T2 y T4 fueron los mejores tratamientos para ambos estadios de desarrollo en comparación con los otros tratamientos aplicados. Sin embargo en el caso de embriones de 80 días solo se obtuvo el 20% y 80% de desinfección con los tratamientos T2 y T4 respectivamente; mientras que para embriones de 110 días se obtuvo el 100% de desinfección con ambos tratamientos. En la Tabla 17 se presentan las ventajas y desventajas de estos dos tratamientos de desinfección con la finalidad de poder determinar el mejor tratamiento.

Tabla 17: **Ventajas y Desventajas de los Tratamientos de Desinfección T2 y T4.**

T2	T4
Ventajas	Ventajas
Baja concentración de NaClO en cámara de flujo laminar (0,5%).	Más rápido, ya que las nueces deben sumergirse en Benopoint por 20 minutos y no 16 horas como en T2.
Ausencia de alcohol como agente desinfectante, resultando ser más económico que T4.	No depende del agua estéril ya que solo usa agua de caño para su ejecución, obteniendo los mismos resultados que T2.
Desventajas	Desventajas
Es un tratamiento que requiere de tiempo puesto las nueces deben sumergirse 16 horas en una solución de Benopoint.	Utiliza una mayor concentración de NaClO (20%) dentro de la cámara de flujo laminar.
Este tratamiento es dependiente del agua estéril, ya que sin la ausencia de este reactivo no puede ejecutarse.	La concentración de alcohol que utiliza es muy alta (96%) y que según Pierik (1990) podría deshidratar la semilla.

Comparando y analizando las ventajas y desventajas de los tratamientos de desinfección se determina que el tratamiento T4 es más ventajoso que el tratamiento T2 porque es más rápido en ejecutarse, ya que solo se debe sumergir las nueces durante 20 minutos en Benopoint para obtener un resultado mejor que el tratamiento T2 donde las semillas deben tratarse con Benopoint durante 16 horas, lo que representa un ahorro de tiempo. Así mismo para la realización de este tratamiento basta con utilizar agua de caño para poder desinfectar las nueces y obtener altos valores de desinfección. De esta manera no es necesario utilizar agua estéril, que además de ser costosa, también representa dependencia a este insumo para poder desarrollar el ensayo.

Si bien es cierto el tratamiento T4 utiliza una mayor concentración de NaClO (20%) que el tratamiento T2 (0,5%), se justifica por los resultados obtenidos; al parecer, someter las nueces a esta concentración de lejía y sumergirlas en alcohol fue más efectivo que lavar las semillas con agua destilada estéril y sumergirlas en Benopoint por 16 horas. Con respecto al riesgo de poder deshidratar las semillas debido a la concentración de lejía habrá de procurar que las semillas no deban sumergirse más del tiempo indicado en la Tabla 2. Una vez determinado el tratamiento T4 como el mejor tratamiento de desinfección se procedió a desinfectar las nueces (Figura 14) de donde se obtuvieron los embriones que fueron objeto de estudio y luego sembrados en los medios de cultivo.

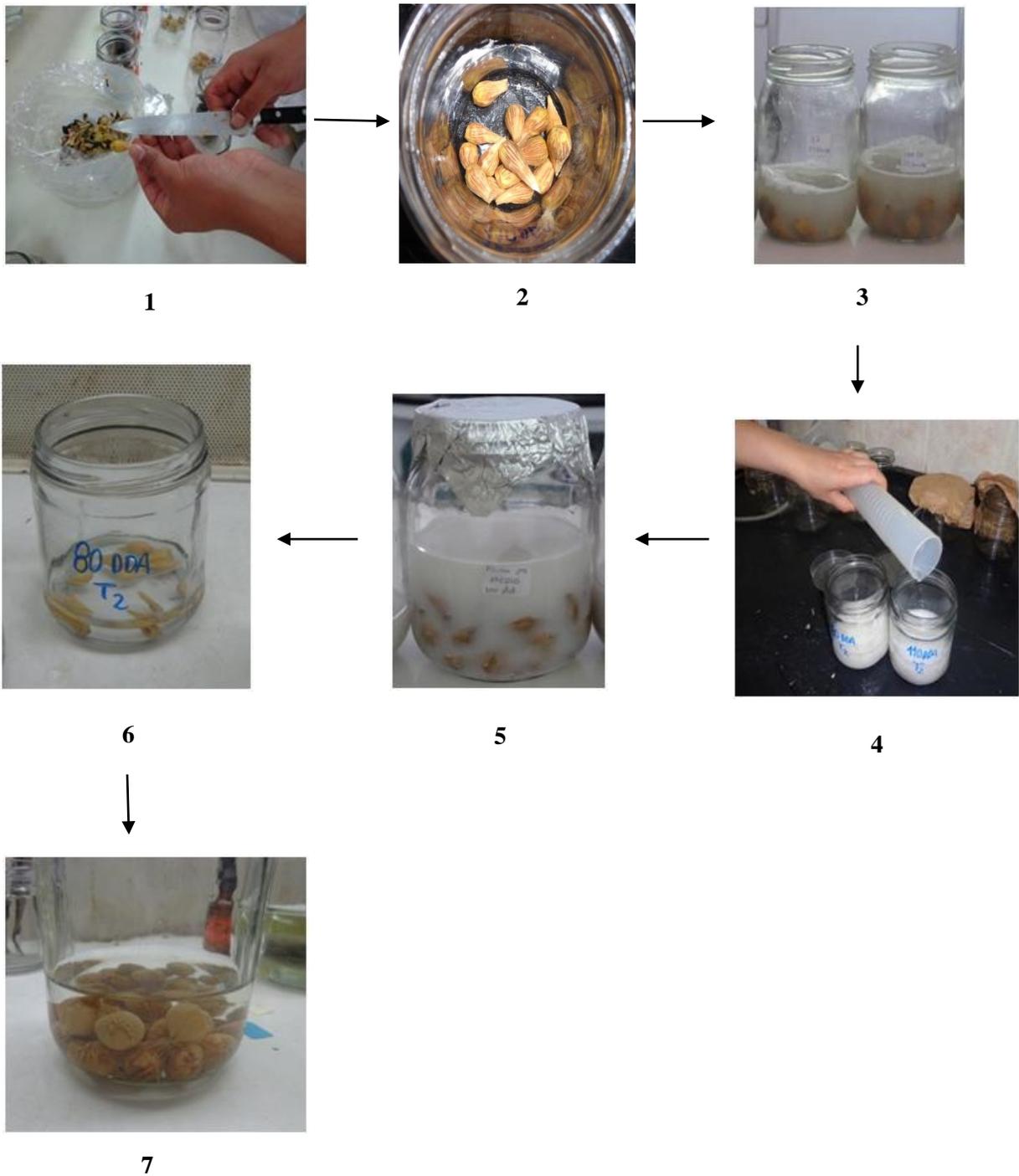


Figura 14: **Diagrama del Tratamiento de Desinfección T4.**

Mientras se analizaban los resultados obtenidos con los tratamientos de desinfección en los embriones de 80 y 110 días se observó que el porcentaje de contaminación de los tratamientos T1, T2, T4 y T6 tiende a disminuir a medida que el embrión madura. A pesar de que se realizaron los mismos tratamientos de desinfección en embriones de 80 días, los embriones de 110 días parecen estar contaminados en menor porcentaje. En cambio en los tratamientos T3 y T5 se observó que el porcentaje de contaminación fue el mismo para ambos estadios de

desarrollo (Tabla 18). El tratamiento T5 ha mostrado una mayor contaminación que T3 en ambos tipos de explante, a pesar de que T5 tiene un mayor tiempo de inmersión, pero una menor concentración del desinfectante NaClO. Los explantes más jóvenes han mostrado ser más susceptibles a la proliferación bacteriana lo que influenciará en la desinfección, en cambio los explantes con mayor tiempo de desarrollo muestran una mayor resistencia al ataque de cualquier agente patógeno.

Tabla 18: **Tabla de comparación del porcentaje de contaminación en los estadios de desarrollo evaluados.**

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN	
	80 días	110 días
T1	100	60
T2	80	0
T3	60	60
T4	20	0
T5	100	100
T6	100	25

Aguirre (2012) realizó ensayos de desinfección en distintos tipos de explantes de *Elaeis guineensis* Jacq. Tales como hoja, inflorescencia y embrión cigótico, en estos ensayos observó que los embriones cigóticos tuvieron un mejor comportamiento a la desinfección alcanzando la tasa más baja de contaminación (8%), seguida del explante tipo inflorescencia (19,33%) y finalmente del tipo hoja (26,67%). El autor indica que la contaminación de los embriones se debe a que estos se mostraron susceptibles a la contaminación bacteriana. De los resultados obtenidos con los embriones de 80 y 110 días que fueron sometidos al tratamiento 4 se obtienen los porcentajes de contaminación de 20 % y 0% respectivamente. De este resultado se puede observar que con embriones de mayor tiempo de desarrollo se ha mejorado lo observado por Aguirre (2012).

También se puede afirmar que la desinfección de embriones es más eficaz que la desinfección de cualquier otro tipo de explante que se encuentre expuesto a la intemperie, ya que el endospermo así como las otras capas de la semilla de *Elaeis guineensis* Jacq. Cumple la función de proteger al embrión.

2. EFECTO DEL ESTADIO DE DESARROLLO DEL EXPLANTE EN EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN.

2.1. MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE & SKOOG.

En la Tabla 19 y Figura 15 se muestran los resultados de la germinación de embriones y los diferentes estadios de desarrollo alcanzados en función al número de días, después de la polinización. Los resultados se expresan en porcentaje (%) de desarrollo logrado después de 45 días de la introducción de embriones en el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS).

En un inicio se sembraron 20 embriones correspondientes a cada estadio de desarrollo (es decir, obtenidos 90, 100 y 110 días después de la polinización), pero solo se evaluaron 14 embriones, debido a factores como la no germinación, contaminación del explante, malas técnicas de siembra en un medio de cultivo líquido lo cual conllevó a la evaluación de una muestra homogénea de 14 embriones.

En la Tabla 19 se observa también que los embriones con los cuales se obtuvo una mejor respuesta al medio de cultivo fueron los embriones de 110 días, ya que el 64.29% de ellos se convirtieron en plántulas en el tiempo de 45 días. Contrarrestando la latencia de semillas que según (Ortiz et al. 1994) hace que la germinación de la especie en estudio sea de forma natural lenta y desuniforme.

También se observa que el 35,71% de los embriones sembrados permanecen en la fase de desarrollo “Brote”, con lo cual se determina que el 100% de los embriones evaluados germinaron. Con respecto a los otros estadios de desarrollo (embriones de 90 y 100 días), se ha logrado que el mayor número de embriones alcancen solamente su desarrollo hasta la etapa de brote; sin embargo en ambos casos los embriones han germinado al 100%.

Muniran et al. (2007) logro aislar embriones de *Elaeis guineensis* Jacq. Procedente de frutos obtenidos 70 días después de producida la antesis para la regeneración directa y la inducción de callos. Los frutos fueron obtenidos de una plantación ubicada en el estado de Johore - Malasia. Mientras que para los frutos provenientes del departamento de Ucayali, obtenidos 80 días después de la polinización, se observó la ausencia de endospermo y embrión. Esto muestra que el desarrollo del embrión puede estar influenciado por efectos ambientales.

Tabla 19: **Porcentaje de embriones que logran alcanzar las diferentes fases de desarrollo en el Medio Murashige & Skoog (MS).**

<i>Fase de desarrollo</i>	<i>Tiempo de desarrollo del embrión</i>		
	<i>E90</i>	<i>E100</i>	<i>E110</i>
Embrión	0,00	0,00	0,00
Callo	0,00	0,00	0,00
Brote	42,86	57,14	35,71
Planta	57,14	42,86	64,29
TOTAL	100,00	100,00	100,00

Tal vez factores como temperatura y humedad, factores edáficos, procedencia de semillas influyan en que el embrión se desarrolle más rápido en semillas procedentes de plantaciones ubicadas en el continente asiático que en semillas procedentes de la plantación ubicada en Ucayali. (Von Uexküll et al. 1991) mencionan que la especie se desarrolla en zonas donde la precipitación mensual no debe bajar de 120 mm, para el caso de Johore se registra una precipitación de 140 mm en la temporada seca (Junio – Agosto) mientras que para Ucayali la precipitación durante la temporada seca (Julio) está entre los 25 – 35 mm. Con respecto a la temperatura, Johore presenta como mínimo 23 °C y alcanza valores superiores a los 30 °C, coincidiendo con lo citado por Von Uexküll et al. (1991) y León (2000), por otro lado Ucayali presenta entre 20 °C como mínimo y alcanza valores superiores a los 30 °C coincidiendo con lo dicho por León (2000).

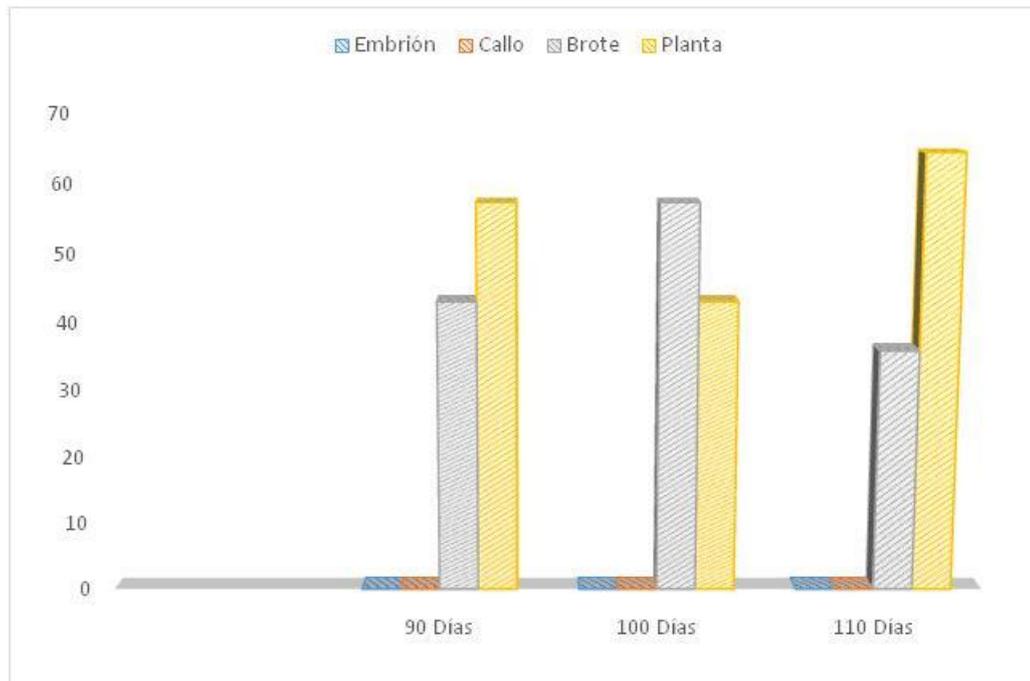


Figura 15: Explantes que logran alcanzar las diferentes fases de desarrollo en diferentes estadios en el medio de cultivo MS.

2.2. MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE & SKOOG + 40 GR. DE AZÚCAR.

En cuanto a los resultados obtenidos con los embriones sembrados en el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) con 40 gramos de azúcar (Tabla 20 y Figura 16), se observó que los embriones de 90 días presentaron un mayor porcentaje de embriones que lograron alcanzar la fase de plántulas (50%), a diferencia de los embriones de 100 y 110 días. Con respecto a los embriones de 100 días, el 100% de los embriones se detuvieron en el estadio de “Brote”, lo cual indica que estos embriones necesitarán de más tiempo para poder desarrollarse y convertirse en plántulas.

Pierik (1990) menciona que el desarrollo de una planta depende de muchos factores como el genotipo, estadio de desarrollo del embrión al momento del aislamiento, condiciones de crecimiento de la planta madre, etc. Entre ellos también considera la disposición de luz a la que han sido expuestos los embriones durante su desarrollo, puede ser que los embriones del estadio de desarrollo de 100 días no hayan recibido la misma intensidad de luz que los embriones de 90 y 110 días, puesto que los tubos que contenían a los embriones se encontraban en el centro de los tubos que contenían a los embriones de 90 y 110 días, quienes se encontraban en la misma rejilla porque todos habían sido sembrados en un mismo medio de cultivo (Ms con 40 gramos de azúcar).

Con respecto a los embriones de 110 días, los resultados obtenidos se parecen al de los embriones de 90 días, ya que el 42,86% de los embriones se desarrollaron.

Tabla 20: **Porcentaje de embriones que logran alcanzar las diferentes fases de desarrollo en el Medio Murashige & Skoog con 40 gramos de azúcar.**

<i>Fase de desarrollo</i>	<i>Estadio</i>		
	<i>E90</i>	<i>E100</i>	<i>E110</i>
Embrión	0,00	0,00	0,00
Callo	0,00	0,00	0,00
Brote	50,00	100,00	57,14
Planta	50,00	0,00	42,86
TOTAL	100,00	100,00	100,00



Figura 16: **Explantos que logran alcanzar las diferentes fases de desarrollo en diferentes estadios en el medio de cultivo MS con 40 gramos de azúcar.**

2.3. MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE & SKOOG + HORMONAS.

En el caso del medio de cultivo líquido Murashige & Skoog enriquecido con hormonas (ANA Y BAP), los resultados finales fueron muy diferentes a los obtenidos anteriormente con los otros medios de cultivo. Para los tres estadios de desarrollo que se observan en la Tabla 21 y Figura 17, el porcentaje de embriones que se encuentran en la fase “Brote” es mayor al porcentaje que se encuentra en la fase “Planta”. Los embriones de 110 días presentaron los

mejores resultados para alcanzar la etapa de desarrollo de planta ya que el 35,71% se desarrolló hasta alcanzar esta etapa, siendo seguido por los embriones de 90 días, donde el 28,57% de estos se desarrollaron en plantas. En cuanto a la fase de desarrollo “Brote”, el mayor porcentaje de estos se alcanzó con los embriones de 100 días (85,71%).

Al igual que en embriones que fueron sembrados en el medio de cultivo MS (Tabla 19), los embriones que pertenecen al estadio de 110 días son los que han alcanzado mejores resultados en su introducción en los medios de cultivo, con 64,29% y 35,71% de germinación para los medios de cultivo MS y MS enriquecido con hormonas respectivamente.

Con este resultado se confirma lo mencionado por Ziebur, Brink y William, citados por Pierik (1990) donde señalan que mientras más desarrollado esté un embrión *in vivo*, más fácil resulta su cultivo *in vitro*, lográndose el desarrollo de plantas viables.

Tabla 21: Porcentaje de embriones que logran alcanzar las diferentes fases de desarrollo en el Medio MS con hormonas.

<i>Fase de desarrollo</i>	<i>Estadio</i>		
	<i>E90</i>	<i>E100</i>	<i>E110</i>
Embrión	0,00	0,00	0,00
Callo	0,00	0,00	0,00
Brote	71,43	85,71	64,29
Planta	28,57	14,29	35,71
TOTAL	100,00	100,00	100,00

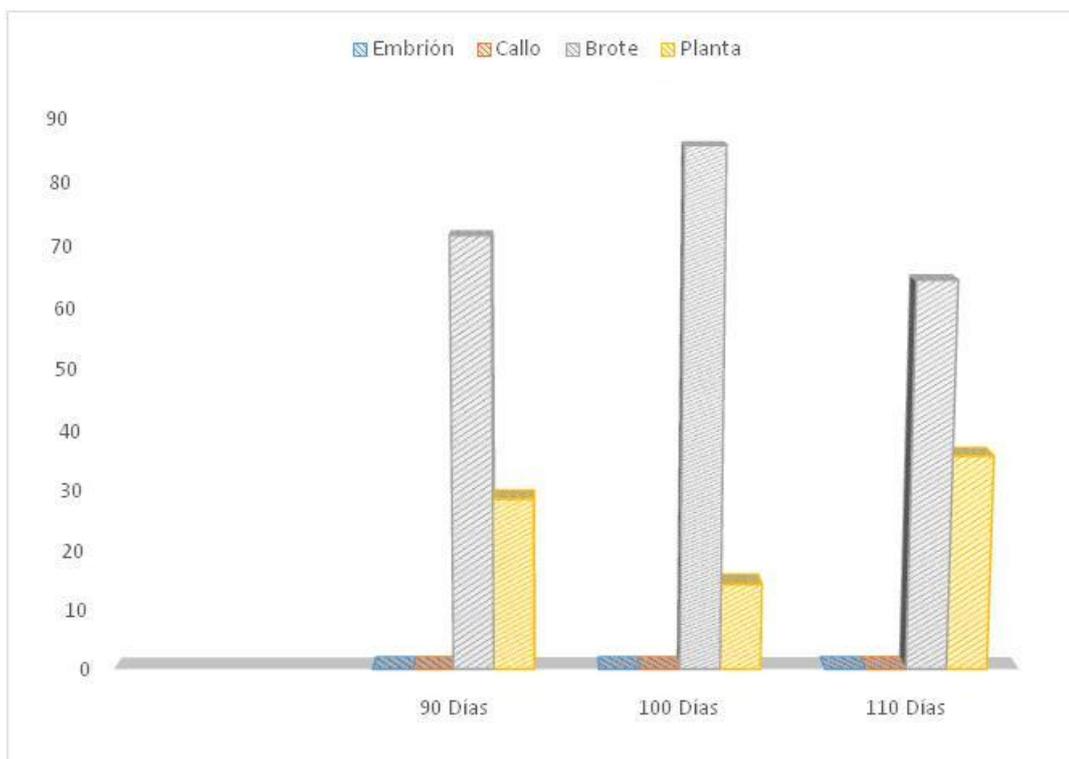


Figura 17: **Explantos que logran alcanzar las diferentes fases de desarrollo en diferentes estadios en el medio de cultivo MS con hormonas.**

El ANVA para la variable “Estadio de desarrollo” (Tabla 22), realizada 45 días después de la introducción, nos indica que entre los tratamientos existe significancia, con un nivel de confianza de 95%, lo cual conlleva a la prueba de Tukey. Este resultado se obtuvo para el caso del medio de cultivo N° 2 o Medio Ms con 40 gramos de azúcar.

Tabla 22: **ANVA para “Estadios de Desarrollo”.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Proporción F</i>	<i>Valor de P</i>
Entre grupos	2,04762	2	1,02381	5,76	0,0064*
Dentro del grupo	6,92857	39	0,17766		
Total (Corr.)	8,97619	41			

* *representa significancia*

En la comparación de medias de Tukey (Tabla 23) para determinar el efecto del estadio de desarrollo se comprueba que las medias son diferentes en los tres tratamientos evaluados, resultando los embriones de “90 días” en primer lugar con una media de 3,50, y que de acuerdo

a la codificación indicada en la Tabla 7 estos embriones se encuentran más próximos a la fase de desarrollo “planta” que los embriones de “110 días” que se encuentran en segundo lugar con una media de 3,43 y que los embriones de “100 días” con una media de 3,00 y que tienden más a la fase brote. Esto a un nivel confianza de 95%.

Tabla 23: **Comparación de medias de Tukey para “Estadios de Desarrollo”.**

<i>MEDIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100 D	14	3,0	X
110 D	14	3,43	X
90 D	14	3,5	X

Narváez et al. (1996) encontraron en un estudio realizado en el departamento de Nariño, al Suroeste de Colombia que el punto óptimo de maduración de los frutos de *Elaeis guineensis* Jacq. Se alcanzó entre 175 a 185 días después de la antesis.

Al momento de la extracción de embriones se observó que a mayor tiempo de desarrollo del embrión, el tamaño es más grande. En una prueba preliminar donde intentó sembrar embriones correspondientes al estadio de desarrollo de 120 días se observó que estos eran de un tamaño notable frente a los embriones de 90, 100 y 110 días lo que hizo suponer que a mayor estadio de desarrollo, los embriones necesitarían de un menor tiempo para poder desarrollarse, coincidiendo con Ziebur, Brink y Williams, citados por Pierik (1990) en que mientras más desarrollado esté un embrión in vivo, más fácil resulta su cultivo *in vitro*, lográndose el desarrollo de plantas viables. Sin embargo la prueba de Tukey no puede mostrar eso ya que el valor de la media de los embriones de 90 días (3,5) fue mayor que la media de los embriones de 110 días (3,43).

Villa et al. (2007) encontró que a pesar de que la longitud de los embriones de *Elaeis guineensis* Jacq. Puede ser la adecuada (2 a 5 mm), el estado fisiológico se puede afectar, puesto que es un material recalcitrante. Haciendo que las condiciones medio ambientales como temperatura superior a 30 °C y el proceso de beneficio comprendido por la cosecha y el despulpe afecten la viabilidad de los embriones produciendo daños severos e irreversibles

a nivel de la radícula y haustorio por la excesiva deshidratación, lo que disminuye la respuesta de germinación.

El factor tiempo es una de las ventajas del cultivo *in vitro*, ya que en condiciones normales de propagación vegetativa por semilla se debería esperar alrededor de unos 6 meses para poder sembrar las semillas en un sustrato adecuado y posteriormente desarrollar las plántulas (esto sino se ha aplicado algún tipo de tratamiento pre germinativo), en cambio con el cultivo *in vitro* se puede empezar a aislar los embriones procedentes de semillas obtenidas como mínimo 3 meses después de sucedida la polinización.

3. EFECTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EN EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN

3.1. EMBRIONES DE 90 DÍAS.

En cuanto a la introducción de embriones de 90 días en la Tabla 24 y Figura 18 se muestran que de los tres medios de cultivo en estudio, el medio de cultivo MS logró el mayor porcentaje de germinación (57,14%), seguido del medio de cultivo MS con 40 gramos de azúcar que alcanzó el 50% de germinación de los embriones. El resultado que se obtuvo con ambos medios de cultivo es muy diferente del obtenido con el medio líquido, donde el porcentaje de embriones que se encuentran en la fase de desarrollo “Brote” fue el triple del obtenido con los embriones que se encuentran en el fase de planta (71,43% contra el 28,57% respectivamente).

Tabla 24: **Porcentaje de fases de desarrollo para embriones de 90 días.**

Fases	MS	MS con 40 gramos de azúcar	MS con Hormonas
Embrión	0,00	0,00	0,00
Callo	0,00	0,00	0,00
Brote	42,86	50,00	71,43
Planta	57,14	50,00	28,57
TOTAL	100,00	100,00	100,00

Según IICA (1987) el medio de cultivo MS fue inicialmente desarrollado para el cultivo de callos en tabaco, este medio de cultivo ha probado ser exitoso en muchas especies con ligeras modificaciones.

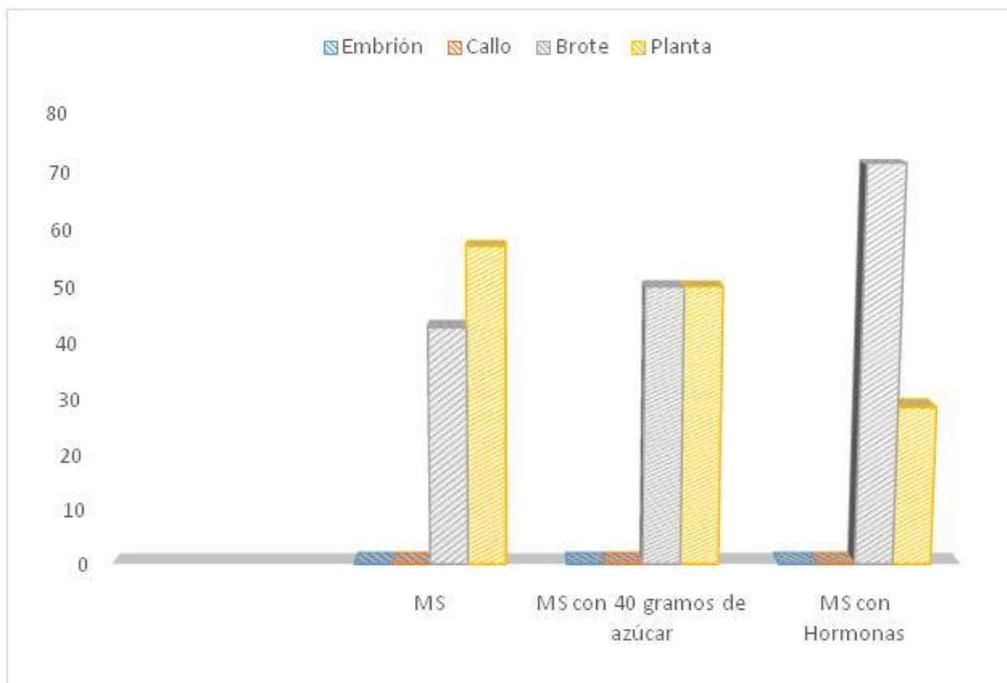


Figura 18: **Porcentaje de explantes logrados en las diferentes fases de desarrollo para embriones de 90 días.**

3.2. EMBRIONES DE 100 DÍAS.

Con respecto a los embriones que corresponden al estadio de desarrollo de 100 días, estos tuvieron un mejor comportamiento en el medio de cultivo MS, ya que el 42,86% de los embriones sembrados se desarrollaron en plantas, esto a diferencia del resultado que se obtuvo en el medio de MS con Hormonas donde apenas el 14,29% de los embriones llegaron a la fase de desarrollo planta. En tanto, los embriones que fueron sembrados en MS con 40 gramos de azúcar no lograron desarrollarse en plantas durante el período de evaluación, por lo que estas necesitarán de más tiempo para poder desarrollarse, enraizar y establecerse en vivero (Tabla 25 y Figura 19).

El comportamiento de los embriones es similar al observado en embriones de 90 días donde se aprecia que estos se desarrollaron mejor en el medio de cultivo MS.

Tabla 25: **Porcentaje de fases de desarrollo para embriones de 100 días.**

Fases	MS	MS con 40 gramos de azúcar	MS con Hormonas
Embrión	0,00	0,00	0,00
Callo	0,00	0,00	0,00
Brote	57,14	100,00	85,71
Planta	42,86	0,00	14,29
TOTAL	100,00	100,00	100,00

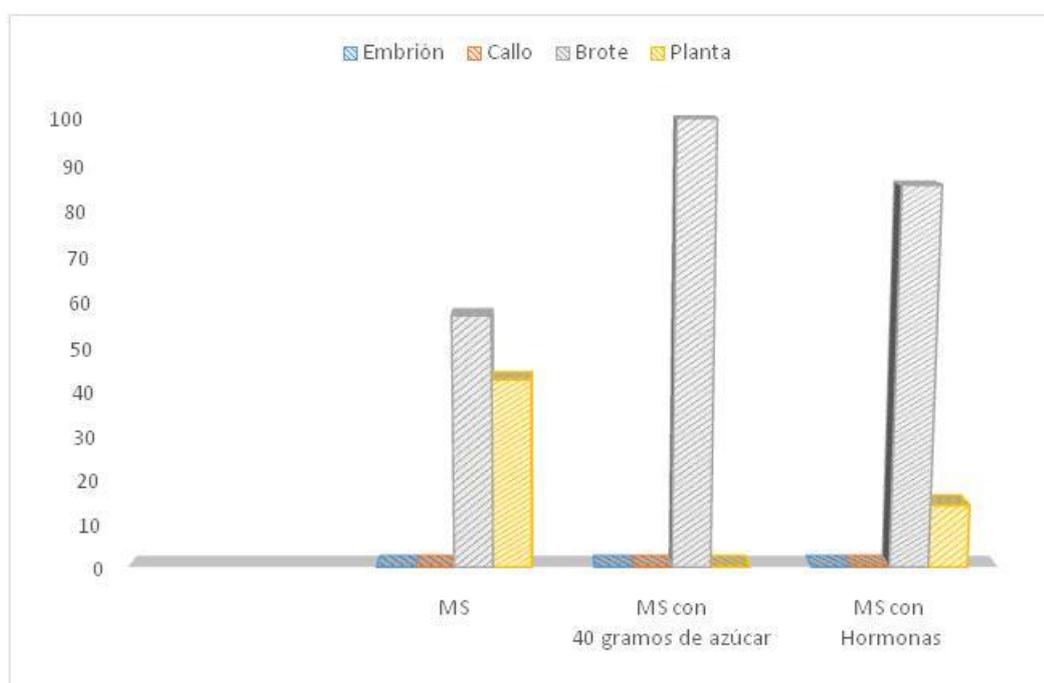


Figura 19: **Porcentaje de explantes logrados en las diferentes fases de desarrollo para embriones de 100 días.**

3.3. EMBRIONES DE 110 DÍAS.

En el caso de los embriones de 110 días (Tabla 26 y Figura 20), se observa que estos tuvieron un mejor comportamiento en el medio de cultivo MS, coincidiendo con lo observado en embriones de 90 y 100 días, donde el 64,29% de los embriones se convirtieron en plantas. Este resultado es superior a la respuesta obtenida con el medio MS con 40 gramos de azúcar donde el 42,86% de los embriones se desarrollaron en plantas.

Al igual que en los dos casos anteriores, los embriones que han sido establecidos en el medio de cultivo MS han mostrado un mejor respuesta para cada uno de los tres estadios de desarrollo en estudio (90, 100 y 110 días).

Tabla 26: **Porcentaje de fases de desarrollo para embriones de 110 días.**

<i>Fases</i>	<i>MS</i>	<i>MS con 40 gramos de azúcar</i>	<i>MS con Hormonas</i>
Embrión	0,00	0,00	0,00
Callo	0,00	0,00	0,00
Brote	35,71	57,14	64,29
Planta	64,29	42,86	35,71
TOTAL	100,00	100,00	100,00

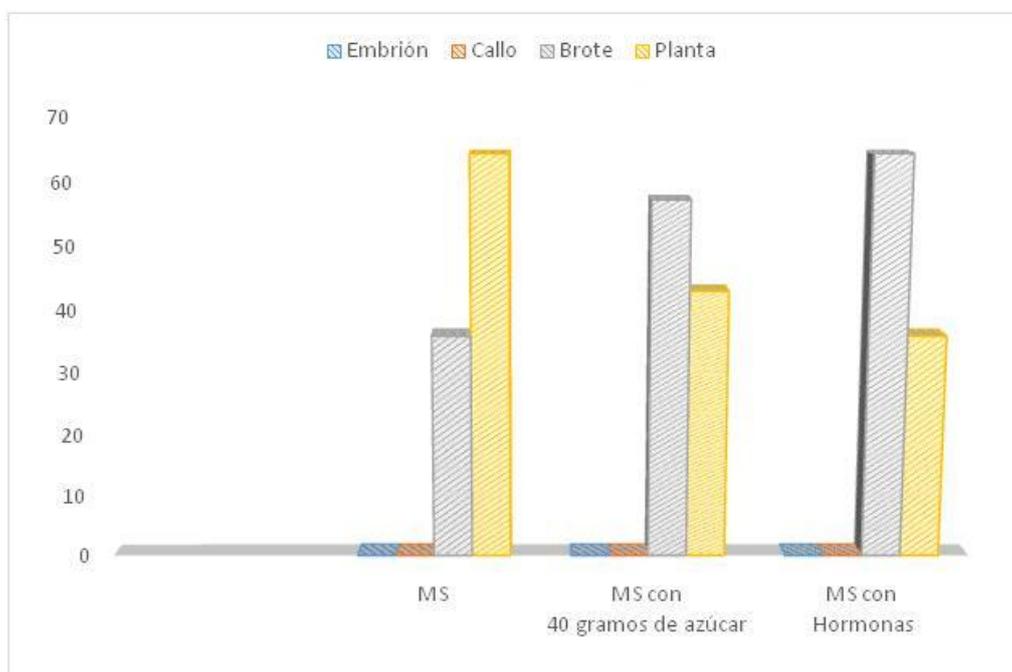


Figura 20: **Porcentaje de explantes logrados en las diferentes fases de desarrollo para embriones de 110 días.**

El Análisis de varianza para la variable “Medio de cultivo” nos indica que entre tratamientos si hay significancia, con un nivel de confianza de 95%, lo cual conlleva a la prueba Tukey. Este resultado se obtuvo para el caso de embriones de 100 días.

Tabla 27: ANVA para “Medio de Cultivo”.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de Libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Proporción F</i>	<i>Valor de P</i>
Entre grupos	1,33333	2	0,66667	5,06	0,0112*
Dentro del grupo	5,14286	39	0,13187		
Total (Corr.)	6,47619	41			

*representa significancia

En la comparación de medias de Tukey (Tabla 28) para determinar el medio de cultivo se comprueba que las medias son diferentes en los tres tratamientos evaluados, resultando el tratamiento M1 o medio de cultivo Ms en primer lugar con una media de 3,43, lo que significa, de acuerdo a la codificación explicada en la Tabla 7, estos embriones se encuentran próximos a la fase de desarrollo planta a diferencia de los tratamientos M5 o medio de cultivo MS con hormonas (Tipo ANA y BAP) y M2 o medio de cultivo MS con 40 gramos de azúcar que obtuvieron medias de 3,14 y 3,0 respectivamente, y que de acuerdo a la codificación permanecen en estadio de brote, estos resultados se obtuvieron a un nivel de confianza de 95%.

Tabla 28: Comparación de medias de Tukey para “Medio de Cultivo”.

<i>MEDIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M2	14	3,0	X
M5	14	3,14	XX
M1	14	3,43	X

En la Tabla 29 y Figura 21 se presentan los resultados en cuanto a la altura de planta y longitud de raíz obtenidos con los embriones que corresponden al período de 90 días, desarrollados en el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS).

Tabla 29: **Altura y longitud de raíz para plántulas obtenidas de embriones de 90 días y desarrolladas en el medio de cultivo MS.**

<i>N° DE REPETICIÓN</i>	<i>ALTURA (cm)</i>	<i>LONGITUD DE RAÍZ (cm)</i>
1	0,80	-
2	2,50	0,40
3	3,20	-
4	1,70	-
5	0,70	-
6	1,30	0,90
7	2,07	-
8	4,05	-

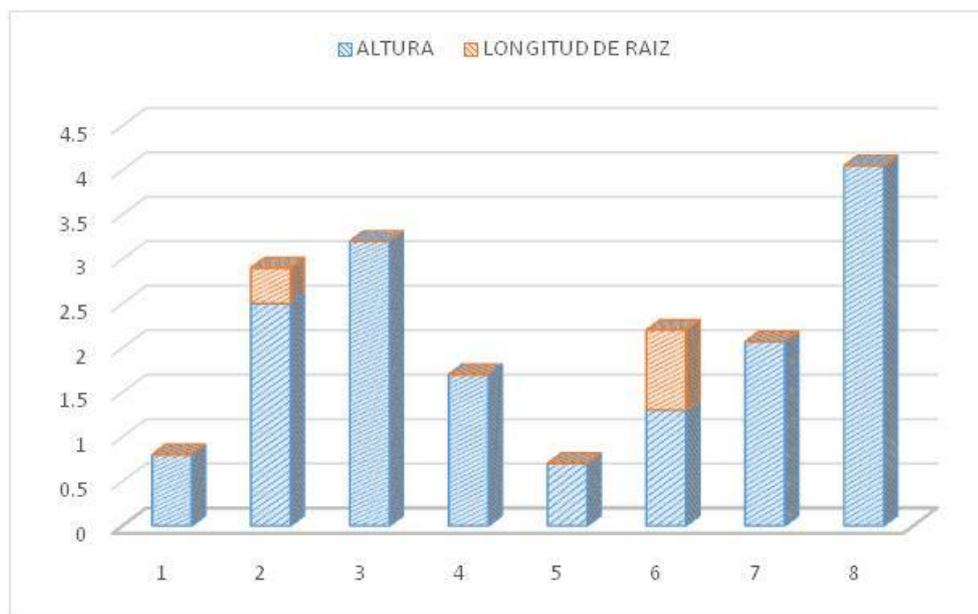


Figura 21: **Altura y Longitud de raíz de plántulas obtenidas a partir de embriones de 90 días y desarrolladas en el medio de cultivo MS.**

V. CONCLUSIONES

- 1) Se determinó que el protocolo de desinfección más adecuado para tratar embriones cigóticos de la especie *Elaeis guineensis* Jacq. es el tratamiento T4, debido a su alta tasa de efectividad (90%).
- 2) La eficacia del tratamiento de desinfección se encuentra relacionada a la edad del explante, embriones de 110 días de estado de madurez alcanzaron mayores niveles de desinfección que embriones más jóvenes.
- 3) Los embriones correspondientes al estadio de desarrollo de 90 días fueron los que obtuvieron una mejor respuesta al medio de cultivo, mostrando mayor número de embriones germinados en comparación a los otros estadios de desarrollo estudiados. Además, estos embriones son más fáciles de extraer del endospermo de la semilla.
- 4) El aislamiento de embriones para ser utilizados en ensayos de cultivo *in vitro* y otros puede iniciarse como mínimo a los 90 días después de la antesis, ya que en este estadio de desarrollo es más probable que el endospermo y embrión se encuentren formados.
- 5) Se determinó al medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) como el medio más adecuado para el desarrollo de embrión, ya que con este se logró los más altos porcentajes de germinación como 57,14%, 42,86% y 64,29% para estadios de desarrollo de 90, 100 y 110 días respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos considerando menores concentraciones de alcohol (96%) siguiendo la metodología del tratamiento de desinfección T4, con el fin de evitar la deshidratación de la semilla.
- Mejorar la técnica de extracción de embriones para disminuir la cantidad de pérdidas ocasionadas por daños mecánicos.
- La extracción de embriones es un proceso bastante delicado, durante su ejecución se debe procurar no causar ningún tipo de corte al embrión, caso contrario este perderá viabilidad.
- Realizar modificaciones al medio de cultivo MS para poder alcanzar mayores porcentajes de crecimiento y enraizamiento. Se podría considerar incrementar la cantidad de Tiamina HCL, vitamina importante para el buen crecimiento de los cultivos.
- En futuros ensayos de propagación *in vitro* para nuevas especies, se tienen que considerar como criterios mínimos la procedencia, el tipo, la edad del explante para el establecimiento de nuevos protocolos de desinfección.
- Entre los criterios que se tienen que considerar para determinar la respuesta a los medios de cultivo de nuevas especies se encuentran el tiempo y la etapa de diferenciación de los embriones.
- Para incrementar la tasa de germinación en palmeras se debería utilizar incubadoras, que brindan condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOUR - ESQUIVEL, A; ESCALANT, JV. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, CR.
- ABDULLAH, R; ZAINAL, A ; HENG, WY; LI, LC; BENG, YC; PHING, LM; SIRAJUDIN, SA; SOO PING, WY; JOSEPH, JL. 2005. Inmature embryo: A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. *Electronical Journal of Biotechnology* ISSN: 0717 – 3458.
- AGUIRRE, C. 2012. Inducción de callos embriogénicos en explantes INIAP de Palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) y Palma americana (*Elaeis oleífera*) con resistencia y/o tolerancia a la pudrición de cogollo. Informe técnico del proyecto de investigación. Escuela politécnica del ejército. Santo Domingo, Ec.
- ASSY – BAH, B; ENGELMANN, F. 1992. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucífera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *Cryo Letters* 13: 117 – 126.
- AZCÓN - BIETO, J; TALÓN, M. 2000. Fundamentos de Fisiología vegetal. 2 ed. Madrid, ES, McGraw – Hill.
- BERGERT, D. 2000. Management strategies of *Elaeis guineensis* Jacq. In response to localized markets in South Eastern Ghana, West Africa. Master of Science in Forestry. Michigan, US, Michigan Technological University. 120 p.
- BUCK, LE; LASSOIE, JP; FERNANDES, ECM. 1990. Agroforestry in Sustainable Agricultural Systems. CRC Press LLC, US.
- CANHOTO, JM. 2010. Biotecnología Vegetal. Da clonagem de plantas a transformação genética. Universidade de Coimbra. Coimbra, BR.

- CASTELLANI, DC; SILVA, AC; CAPELA, CB; DOMENICO, CI; SUGAYA, C; SUZUKI, E; TAKAMATSU, J. 2011. Natura Inovation and Products tecnology Ltda, Sustainable technologies – Bioagriculture y CAMTA – Mixed Agricultural Cooperative of Tomé Açú, BR.
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR). 1993. Programa Agricultura Tropical Sostenible P.A.T.S.- Área de Cultivos Tropicales. Biotecnología. Turrialba, CR.
- CURTIS, H; BARNES, S; SCHNEK, A; MASSARINI, A. 2008. Curtis Biología. 7 ed. Buenos Aires, ARG, Editorial médica Panamericana.
- DAVID THURSTON, H. 1989. Enfermedades de cultivos en el Trópico. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, CR.
- DA SILVA, A; PEREIRA, K; SANTA CRUZ, S; SERRA SECA, G; ALMEIDA, E; MENEZES DE ARAGAO, W. 2007. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. Pesq. Agropec 42 (2):147-154.
- DELGADO T, CECILIA A. 1997. Estandarización de la composición de un medio de cultivo para el desarrollo en condiciones *in vitro* de embriones inmaduros de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis Mag. Sc. Lima, PE, UNALM. 137p.
- ENGELMANN, F; BATUGAL, PA. 2002. Background on the development and implementation of the coconut embryo *in vitro* culture project. In ENGELMANN, F; BATUGAL, P.A; OLIVER, J. (Ed). Coconut embryo *in vitro* culture. Malaysia: IPGRIO – APO, 2002,2: 1-4.
- ENRÍQUEZ, G. 1985. Curso sobre el cultivo del cacao. Centro Agronómico tropical de investigación y enseñanza (CATIE). Turrialba, CR.
- FAO (Organización De Las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, IT).1984. Improved production systems as an alternative to shifting cultivation. FAO SOILS BULLETIN 53. Soils Resources, Management and Conservation Service. Land and Water Development Division. Roma, IT.

- FAO (Organización De Las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, IT). s.f. Ganadería y Deforestación. Políticas pecuarias 03. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-a0262s.pdf>
- FIGUEREDO V, P. 1991. Tecnología de la germinación de la semilla de Palma Aceitera Africana. XI curso corto Metodología Para La Producción De Semilla Comercial De Palma Aceitera Africana. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).
- GARCÍA G, R; QUINTERO R, R; LÓPEZ MUNGUÍA, A. 2004. Biotecnología alimentaria. México, DF, Limusa.
- HARTLEY, CW. 1977. La Palma de Aceite. Méx. Compañía Editorial Continental S.A. 958 p.
- HURTADO, D; MERINO, ME. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. México, DF, Editorial Trillas.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura, CR). 1971. Dinámica de la vegetación, migración y establecimiento. Seminario para profesores de Ecología de Facultades de Agronomía de Centroamérica, México y el Caribe. Dinámica de la vegetación, migración y establecimiento. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Centro Tropical de Enseñanza e Investigación y Dirección Regional para la Zona Norte. Turrialba, CR.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura, CR). 1999. Seminario Internacional Biotecnología Aplicada a la Micropropagación de Frutales - Memorias, 1994. Centro Regional Andino. Programa Cooperativo de Innovación Tecnológica Agropecuaria para la Región Andina. Red Andina de Frutihorticultura de Exportación. Maracay, VEN.
- LEÓN, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. 2 ed. San José, CR, IICA.
- LEÓN, J. 2010. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales - 1era Edición. Lima, PE, IICA.
- MARÍN G, RAFAEL. 2003. Físicoquímica y Microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas. Díaz de Santos. Madrid, ES.
- MELADO H, ANGELA. 2008. Modelo de cultivo de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Honduras. Trabajo de fin de carrera. Universidad Politécnica de Madrid, escuela técnica superior de ingenieros agrónomos.

- MICCOLIS, A. 2012. Producción sostenible de palma con sistemas Agroforestales: reconciliando productividad con medios de vida y servicios ambientales. Instituto Salvia – ISSA. II Congreso Internacional de Palma, Tingo María, Perú.
- MINAG. Nota de prensa. Constituyen el centro de innovación y transferencia de tecnología de la Palma aceitera, publicado el 5 de Abril del 2011. Disponible en <http://www.minag.gob.pe/portal/notas-de-prensa/notas-de-prensa-2011/5291-constituyen-el-centro-de-innovacion-y-transferencia-de-tecnologia-de-la-palma-aceitera->
- MUNIRAM, F; BHORE, SJ; SHAH, FH. 2008. Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq. “Dura”: Comparison of three basal media for efficient regeneration, Indian journal of Experimental Biology 46:79.
- NARVAÉZ, J; CHILITO, L; BASTIDAS, S. 1996. Determinación de la madurez óptima de cosecha para la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en la región de Tumaco, Nariño. Palmas, Volumen 17, N° 4. Nariño, COL.
- ORTIZ, RA; FERNÁNDEZ, O. 1994. El cultivo de la palma aceitera. Primera edición. San José, CR, Editorial Universidad estatal a distancia.
- ORWA. 2009. Agroforestry Database 4.0. World Agroforestry Centre (ICRAF). Nairobi, KE.
- OVANDO M, I. 2004. Manual de cultivo de tejidos vegetales para Ingenieros Biotecnólogos – Capítulo 1. Disponible en <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Manual%20c%20in%20v.pdf>
- PIERIK, RLM. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas Superiores. Ayerbe, Madrid, ES, Editorial Mundi – Prensa. 326 p.
- PUICÓN A, CA. 1997. Aplicación de técnicas *in vitro* en el mejoramiento genético del arroz (*Oryza sativa* L): Cultivo de anteras y embriones inmaduros. Tesis Mag. Sc. Lima, PE, UNALM. 115 p.
- PUROHIT SUNI, D. 2013. Introduction to Plant cell, Tissue and Organ Culture. Eastern Economy Edition. New Delhi, IN.

- RIBEIRO DE CARVALHO, W; SILVA, VS; RYOHEI K, O; BISPO, CJ; CASTELLANI, D. 2014. Short – term changed in the soil carbon stocks of young oil palm – based agroforestry systems in the eastern Amazon. *Agroforestry Systems* 88 (2): 357 – 368.
- RIVAL, A; LEVANG, P. 2014. La Palma de la controversia – La palma aceitera y desafíos de desarrollo. Bogor, ID, CIFOR.
- ROBLES S, R. 1991. Producción de Oleaginosas y Textiles.3 ed. México, DF, Editorial Limusa.
- ROCA, W; MOGRINSKI, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro internacional de agricultura tropical. Cali, COL. 968 p.
- ROJAS G, S; GARCÍA L, J; ALARCÓN R, M. 2004. Propagación Asexual de Plantas – Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. Bogotá, COL, CORPOICA.
- ROMERO M, MA. 2004. Factores que controlan la germinación en semillas de palma dulce, *Brahea dulcis* (H.B.K) Mart. Tesis Ing. Restauración Forestal. Estado de México, MX, Universidad Autónoma Chapingo.
- RSPO (Roundtable on Sustainable Palm Oil). 2013. Reports from the Technical Panels of the 2nd Greenhouse Gas Working Group of the Roundtable on Sustainable Palm Oil.
- SAÉNZ M, L. 2006. Cultivo de la palma africana. Guía técnica. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura. Managua, NI.27 p
- SAVILAASKO, S. 2014. Investigación sobre biocombustibles y biodiversidad. Programa de CGIAR sobre Bosques, Árboles y Agroforestería. Bogor, ID, CIFOR.
- SIERRA P, JO. 2005. Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros. 2 ed. Medellín, COL. Editorial Universidad de Antioquía.
- SUAREZ DE CASTRO, F. 1993. Agricultura, biotecnología y propiedad intelectual. IICA – programa II Generación y Transferencia de Tecnología. San José, CR.

- TREVIÑO, J; ENRÍQUEZ, G; ECHEVERRI, J; BERTHOULY, M. 1984. Estudios de las diferentes etapas de desarrollo de embriones de café (*Coffea arabica* L.) para el cultivo *in vitro*. VII Simposio sobre caficultura latinoamericana – IICA. San José, CR.
- VILLA, AL; JIMÉNEZ, PE; VALBUENA, RI. 2007. Estudio preliminar para el establecimiento de un protocolo de crioconservación para palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Agronomía colombiana 25 (2):215-223.
- VON UEXKÜLL, HR; FAIRHURST, TH. 1991. Fertilizing for high yield and quality; The Oil Palm. IPI Bulletin N° 12. International Potash Institute. Switzerland. 79 p.
- WERKHOVEN, J. 1967. Fertilización de la palma de aceite. Trad. L López.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1 RESULTADOS DEL TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN N° 1 PARA EMBRIONES DE LOS PERÍODOS DE 80 Y 110 DÍAS.

TRATAMIENTO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3	EV4	TOTAL
T1	1	-	contaminado			
T1	2	-	-	-	contaminado	
T1	3	-	-	-	contaminado	
T1	4	-	contaminado			
T1	5	-	contaminado			
TOTAL		0	3	0	2	5

FUENTE: Elaboración Propia.

TRATAMIENTO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3	EV4	TOTAL
T1	1	-	-	-	contaminado	
T1	2	-	-	-	contaminado	
T1	3	-	-	-	-	
T1	4	-	-	-	contaminado	
T1	5	-	-	-	-	
TOTAL		0	0	0	3	3

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 2
RESULTADOS DEL TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN N° 2 PARA
EMBRIONES DE LOS PERÍODOS DE 80 Y 110 DÍAS.

TRATAMIENTO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3	EV4	TOTAL
T2	1	-	-	contaminado		
T2	2	-	contaminado			
T2	3	contaminado				
T2	4	-	-	contaminado		
T2	5	-	-	-	-	
TOTAL		1	1	2	0	4

FUENTE: Elaboración propia.

TRATAMIENTO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3	EV4	TOTAL
T2	1	-	-	-	-	
T2	2	-	-	-	-	
T2	3	-	-	-	-	
T2	4	-	-	-	-	
T2	5	-	-	-	-	
TOTAL		0	0	0	0	0

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 3
RESULTADOS DEL TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN N° 3 PARA
EMBRIONES DE LOS PERÍODOS DE 80 Y 110 DÍAS.

TRATAMIENTO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3	EV4	TOTAL
T3	1	-	-	-	-	
T3	2	-	-	contaminado		
T3	3	-	-	contaminado		
T3	4	-	-	-	-	
T3	5	-	-	contaminado		
TOTAL		0	0	3	0	3

FUENTE: Elaboración propia.

TRATAMIENTO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3	EV4	TOTAL
T3	1	-	-	-	contaminado	
T3	2	-	contaminado			
T3	3	-	contaminado			
T3	4	-	-	-	-	
T3	5	-	-	-	-	
TOTAL		0	2	0	1	3

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 4
RESULTADOS DEL TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN N° 4 PARA
EMBRIONES DE LOS PERÍODOS DE 80 Y 110 DÍAS.

TRATAMIENTO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3	EV4	TOTAL
T4	1	-	-	-	-	
T4	2	-	contaminado			
T4	3	-	-	-	-	
T4	4	-	-	-	-	
T4	5	-	-	-	-	
TOTAL		0	1	0	0	1

FUENTE: Elaboración propia.

TRATAMIENTO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3	EV4	TOTAL
T4	1	-	-	-	-	
T4	2	-	-	-	-	
T4	3	-	-	-	-	
T4	4	-	-	-	-	
T4	5	-	-	-	-	
TOTAL		0	0	0	0	0

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 5
RESULTADOS DEL TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN N° 5 PARA
EMBRIONES DE LOS PERÍODOS DE 80 Y 110 DÍAS.

TRATAMIENTO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3	EV4	TOTAL
T5	1	-	-	contaminado		
T5	2	-	-	contaminado		
T5	3	-	-	-	contaminado	
T5	4	-	-	contaminado		
T5	5	-	-	contaminado		
T5	6			contaminado		
TOTAL		0	0	5	1	6

FUENTE: Elaboración propia.

TRATAMIENTO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3	EV4	TOTAL
T5	1	-	-	contaminado		
T5	2	-	-	contaminado		
T5	3	-	-	contaminado		
T5	4	-	-	contaminado		
TOTAL		0	0	4	0	4

FUENTE: Elaboración propia

ANEXO 6
RESULTADOS DEL TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN N° 6 PARA
EMBRIONES DE LOS PERÍODOS DE 80 Y 110 DÍAS.

TRATAMIENTO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3	EV4	TOTAL
T6	1	contaminado				
T6	2	contaminado				
T6	3	-	-	contaminado		
T6	4	contaminado				
TOTAL		3	0	1	0	4

FUENTE: Elaboración propia.

TRATAMIENTO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3	EV4	TOTAL
T6	1	-	-	-	-	
T6	2	-	-	-	-	
T6	3	-	-	contaminado	-	
T6	4	-	-	-	-	
T6	5	-	-	-	-	
T6	6	-	-	-	-	
TOTAL		0	0	1	0	1

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 7
TABLA DE EVALUACIONES REALIZADAS A EMBRIONES DEL PERÍODO
DE 90 DÍAS EN MEDIO DE CULTIVO MS.

MEDIO DE CULTIVO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3
M1	1	Embrión	Callo	Brote
M1	2	Callo	Brote	Planta
M1	3	Callo	Brote	Planta
M1	4	Embrión	Embrión	Brote
M1	5	Callo	Brote	Planta
M1	6	Embrión	Embrión	Brote
M1	7	Embrión	Embrión	Brote
M1	8	Callo	Brote	Planta
M1	9	Callo	Brote	Planta
M1	10	Embrión	Callo	Brote
M1	11	Callo	Brote	Planta
M1	12	Embrión	Embrión	Brote
M1	13	Callo	Planta	Planta
M1	14	Callo	Brote	Planta

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 8
TABLA DE EVALUACIONES REALIZADAS A EMBRIONES DEL PERÍODO
DE 90 DÍAS EN MEDIO DE CULTIVO MS CON 40 GR. DE AZÚCAR.

MEDIO DE CULTIVO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3
M2	1	Callo	Brote	Planta
M2	2	Embrión	Embrión	Brote
M2	3	Callo	Brote	Planta
M2	4	Callo	Planta	Planta
M2	5	Embrión	Embrión	Brote
M2	6	Callo	Callo	Brote
M2	7	Callo	Planta	Planta
M2	8	Embrión	Embrión	Brote
M2	9	Callo	Brote	Planta
M2	10	Embrión	Embrión	Brote
M2	11	Embrión	Embrión	Brote
M2	12	Embrión	Embrión	Brote
M2	13	Callo	Callo	Planta
M2	14	Embrión	Callo	Planta

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 9
TABLA DE EVALUACIONES REALIZADAS A EMBRIONES DEL PERÍODO DE 90 DÍAS EN MEDIO DE CULTIVO MS CON HORMONAS.

MEDIO DE CULTIVO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3
M5	1	Embrión	Embrión	Brote
M5	2	Callo	Brote	Planta
M5	3	Callo	Brote	Brote
M5	4	Embrión	Embrión	Brote
M5	5	Callo	Brote	Brote
M5	6	Callo	Brote	Brote
M5	7	Embrión	Callo	Brote
M5	8	Callo	Brote	Planta
M5	9	Callo	Brote	Brote
M5	10	Callo	Brote	Planta
M5	11	Embrión	Embrión	Brote
M5	12	Embrión	Embrión	Brote
M5	13	Callo	Callo	Brote
M5	14	Callo	Brote	Planta

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 10
TABLA DE EVALUACIONES REALIZADAS A EMBRIONES DEL PERÍODO
DE 100 DÍAS EN MEDIO DE CULTIVO MS.

MEDIO DE CULTIVO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3
M1	1	Embrión	Embrión	Brote
M1	2	Callo	Brote	Planta
M1	3	Embrión	Embrión	Brote
M1	4	Embrión	Callo	Planta
M1	5	Embrión	Embrión	Brote
M1	6	Callo	Planta	Planta
M1	7	Embrión	Embrión	Brote
M1	8	Callo	Brote	Planta
M1	9	Embrión	Embrión	Brote
M1	10	Embrión	Embrión	Brote
M1	11	Callo	Callo	Planta
M1	12	Callo	Brote	Brote
M1	13	Embrión	Embrión	Brote
M1	14	Callo	Brote	Planta

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 11
TABLA DE EVALUACIONES REALIZADAS A EMBRIONES DEL PERÍODO
DE 100 DÍAS EN MEDIO DE CULTIVO MS CON 40 GR. DE AZÚCAR.

MEDIO DE CULTIVO	Nº DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3
M2	1	Embrión	Embrión	Brote
M2	2	Callo	Callo	Brote
M2	3	Embrión	Callo	Brote
M2	4	Callo	Brote	Brote
M2	5	Embrión	Embrión	Brote
M2	6	Callo	Brote	Brote
M2	7	Embrión	Callo	Brote
M2	8	Embrión	Embrión	Brote
M2	9	Callo	Brote	Brote
M2	10	Embrión	Embrión	Brote
M2	11	Callo	Callo	Brote
M2	12	Embrión	Embrión	Brote
M2	13	Callo	Brote	Brote
M2	14	Embrión	Callo	Brote

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 12
TABLA DE EVALUACIONES REALIZADAS A EMBRIONES DEL PERÍODO DE 100 DÍAS EN MEDIO DE CULTIVO MS CON HORMONAS.

MEDIO DE CULTIVO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3
M5	1	Callo	Brote	Brote
M5	2	Callo	Brote	Planta
M5	3	Embrión	Embrión	Brote
M5	4	Embrión	Embrión	Brote
M5	5	Callo	Callo	Brote
M5	6	Embrión	Embrión	Brote
M5	7	Callo	Brote	Brote
M5	8	Embrión	Brote	Brote
M5	9	Embrión	Embrión	Brote
M5	10	Embrión	Callo	Brote
M5	11	Callo	Brote	Planta
M5	12	Embrión	Embrión	Brote
M5	13	Callo	Brote	Brote
M5	14	Callo	Brote	Brote

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 13
TABLA DE EVALUACIONES REALIZADAS A EMBRIONES DEL PERÍODO
DE 110 DÍAS EN MEDIO DE CULTIVO MS.

MEDIO DE CULTIVO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3
M1	1	Callo	Callo	Planta
M1	2	Callo	Brote	Planta
M1	3	Embrión	Callo	Brote
M1	4	Callo	Brote	Planta
M1	5	Callo	Planta	Planta
M1	6	Embrión	Embrión	Brote
M1	7	Callo	Brote	Planta
M1	8	Callo	Brote	Planta
M1	9	Callo	Callo	Brote
M1	10	Callo	Brote	Planta
M1	11	Callo	Brote	Brote
M1	12	Embrión	Callo	Planta
M1	13	Callo	Brote	Brote
M1	14	Callo	Brote	Planta

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 14
TABLA DE EVALUACIONES REALIZADAS A EMBRIONES DEL PERÍODO
DE 110 DÍAS EN MEDIO DE CULTIVO MS CON 40 GR. DE AZÚCAR.

<i>MEDIO DE CULTIVO</i>	<i>N° DE REPETICIÓN</i>	<i>EVI</i>	<i>EV2</i>	<i>EV3</i>
M2	1	Embrión	Callo	Brote
M2	2	Embrión	Embrión	Brote
M2	3	Callo	Brote	Planta
M2	4	Embrión	Callo	Brote
M2	5	Callo	Planta	Planta
M2	6	Embrión	Embrión	Brote
M2	7	Callo	Brote	Planta
M2	8	Embrión	Embrión	Brote
M2	9	Embrión	Callo	Brote
M2	10	Callo	Planta	Planta
M2	11	Embrión	Embrión	Brote
M2	12	Callo	Callo	Planta
M2	13	Embrión	Embrión	Brote
M2	14	Callo	Brote	Planta

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 15
TABLA DE EVALUACIONES REALIZADAS A EMBRIONES DEL PERÍODO DE 100 DÍAS EN MEDIO DE CULTIVO MS CON HORMONAS.

MEDIO DE CULTIVO	N° DE REPETICIÓN	EV1	EV2	EV3
M5	1	Callo	Brote	Planta
M5	2	Callo	Callo	Brote
M5	3	Embrión	Embrión	Brote
M5	4	Callo	Planta	Planta
M5	5	Callo	Brote	Brote
M5	6	Callo	Brote	Planta
M5	7	Embrión	Embrión	Brote
M5	8	Callo	Planta	Planta
M5	9	Embrión	Brote	Brote
M5	10	Callo	Brote	Brote
M5	11	Callo	Brote	Brote
M5	12	Callo	Planta	Planta
M5	13	Callo	Brote	Brote
M5	14	Embrión	Embrión	Brote

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 16
COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Reactivos	MEDIO DE CULTIVO				
	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento
	1	2	3	4	5
	MS	MS + 40 Gr de azúcar	MS + IBA	N6	MS + hormonas
Macronutrientes					
(mg/l)					
NH4NO3	1650	1650	1650	-	1650
KNO3	1900	1900	1900	2830	1900
MGSO4.7H2O	370	370	370	185	370
CACL2.2H2O	440	440	440	166	440
KH2PO4	170	170	170	400	170
(NH4)2SO4	-	-	-	463	-
Micronutrientes					
(mg/l)					
KI	0,83	0,83	0,83	0,8	0,83
H3BO3	6,2	6,2	6,2	1,6	6,2
MnSO4.4H2O	15,6	15,6	15,6	4,4	15,6
ZnSO4.7H2O	8,6	8,6	8,6	1,5	8,6
NaMO4.2H2O	0,25	0,25	0,25	-	0,25
CuSO4.6H2O	0,025	0,025	0,025	-	0,025
CoCl2.6H2O	0,025	0,025	0,025	-	0,025
Fuente de hierro					
(mg/l)					
NA2EDTA	37,3	37,3	37,3	37,25	37,3
FESO4.7H2O	27,8	27,8	27,8	27,85	27,8
Vitaminas					
(mg/l)					
Myo-inositol	100	100	100	100	100
Ác. Nicotínico	1	1	1	0,5	0,5
Glicina	2	2	2	-	2
Piridoxina - HCL	1	1	1	0,5	0,5
Tiamina - HCL	1	1	1	1	0,1
Hormonas					
(mg/l)					

Continuación

IBA	-	-	2	-	-
ANA	-	-	-	-	0,3
BAP	-	-	-	-	2,1
sacarosa	30	40	30	30	20
Agar	6	6	6	6	6
PH	5,7	5,7	5,7	5,8	5,7

ANEXO 17
TABLA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY PARA ESTADIOS DE
DESARROLLO DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN EN EL MEDIO DE CULTIVO
MS – EVALUACIONES 1, 2 Y 3.

<i>ESTADIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100 D	14	1,42857	X
90 D	14	1,57143	X
110 D	14	1,78571	X

FUENTE: Elaboración propia.

<i>ESTADIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100 D	14	1,92857	X
90 D	14	2,35714	X
110 D	14	2,64286	X

FUENTE: Elaboración propia.

Continuación:

<i>ESTADIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100 D	14	3,42857	X
90 D	14	3,57143	X
110 D	14	3,64286	X

FUENTE: *Elaboración propia.*

ANEXO 18
TABLA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY PARA ESTADIOS DE
DESARROLLO DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN EN EL MEDIO DE CULTIVO
MS – CON 40 GR. DE AZÚCAR EVALUACIONES 1 Y 2.

<i>ESTADIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
110 D	14	1,42857	X
100 D	14	1,42857	X
90 D	14	1,5	X

FUENTE: Elaboración propia.

<i>ESTADIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100 D	14	1,92857	X
90 D	14	2,07143	X
110 D	14	2,14286	X

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 19
TABLA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY PARA ESTADIOS DE
DESARROLLO DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN EN EL MEDIO DE CULTIVO
MS – CON HORMONAS EVALUACIONES 1, 2 Y 3.

<i>ESTADIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100 D	14	1,5	X
90 D	14	1,64286	X
110 D	14	1,71429	X

FUENTE: Elaboración propia.

<i>ESTADIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100 D	14	2,14286	X
90 D	14	2,28571	X
110 D	14	2,71429	X

FUENTE: Elaboración propia.

<i>ESTADIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100 D	14	3,14286	x
90 D	14	3,28571	x
110 D	14	3,35714	x

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 20
TABLA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY PARA MEDIO DE
CULTIVO EN EL ESTADIO DE DESARROLLO DE 90 DÍAS - EVALUACIONES
1, 2 Y 3.

<i>MEDIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M2	14	1,5	X
M1	14	1,57143	X
M5	14	1,64286	X

FUENTE: Elaboración propia.

<i>MEDIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M2	14	2,07143	X
M5	14	2,28571	X
M1	14	2,35714	X

FUENTE: Elaboración propia.

<i>MEDIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M5	14	3,28571	X
M2	14	3,5	X
M1	14	3,57143	X

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 21
TABLA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY PARA MEDIO DE
CULTIVO EN EL ESTADIO DE DESARROLLO DE 100 DÍAS - EVALUACIÓN 1
Y 2.

<i>MEDIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M2	14	1,42857	X
M1	14	1,42857	X
M5	14	1,5	X

FUENTE: Elaboración propia.

<i>MEDIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M2	14	1,92857	X
M1	14	1,92857	X
M5	14	2,14286	X

FUENTE: Elaboración propia.

ANEXO 22
TABLA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY PARA MEDIO DE
CULTIVO EN EL ESTADIO DE DESARROLLO DE 90 DÍAS - EVALUACIONES
1, 2 Y 3.

<i>MEDIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M2	14	1,42857	X
M5	14	1,71429	X
M1	14	1,78571	X

FUENTE: Elaboración propia.

<i>MEDIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M2	14	2,14286	X
M1	14	2,64286	X
M5	14	2,71429	X

FUENTE: Elaboración propia.

<i>MEDIO</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M5	14	3,35714	X
M2	14	3,42857	X
M1	14	3,64286	X

FUENTE: Elaboración propia.