

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES



**“CONSERVACIÓN *in vitro* DE EMBRIONES DE PALMA
DATILERA (*Phoenix dactylifera* L.) BAJO CONDICIONES DE
CRECIMIENTO LENTO”**

Presentada por:

LUIS ANGEL MÁRQUEZ CHÁVEZ

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO

MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIAS AMBIENTALES

Lima – Perú

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**“CONSERVACIÓN *in vitro* DE EMBRIONES DE PALMA
DATILERA (*Phoenix dactylifera* L.) BAJO CONDICIONES DE
CRECIMIENTO LENTO”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

LUIS ANGEL MÁRQUEZ CHÁVEZ

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg.Sc. Abelardo Calderón Rodríguez
PRESIDENTE

Mg.Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa
ASESOR

Ph.D. Alfredo Rodríguez Delfín
MIEMBRO

Dr. Jorge Jiménez Dávalos
MIEMBRO

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Gladys y Angel, a mis hermanos Liz y Orlando y en especial a mis tíos Rossana y Zenón; así como todos mis primos, por ser mi inspiración y motivación frente a toda adversidad; por su inmenso amor, ayuda y consejos que me ayudan y guían en todas mis decisiones día a día.

AGRADECIMIENTOS

Primero deseo expresar mi agradecimiento incondicional a Dios por haberme dado fortaleza y voluntad para cumplir una de mis metas frente a toda adversidad. ¡No fue nada fácil!

Segundo dar mi más sincero agradecimiento al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) por el financiamiento de la maestría y esté proyecto con el contrato (N°036-2017-INIA-PNIA-MAESTRÍA). Gracias por su confianza.

Un especial agradecimiento a mi patrocinadora la profesora Lourdes Tapia directora del Instituto de Biotecnología por haberme ayudado y permitido desarrollar este importante proyecto, haciendo posible la ejecución.

Tercero nunca me cansare de agradecer a mis padres Gladys y Angel quienes me siguen brindando su apoyo incondicional, me motivan y creen en mí. Con este grado les digo: ¡lo logre! estoy preparado para conseguir lo que me proponga aun cuando sacrifique muchas cosas.

De la misma manera agradezco haber conocido y formar parte del Instituto de Biotecnología, gracias Sra. Milagritos, Sra. Olga, Andrea, Rossana, Sra. Gaby, Raquel por toda la ayuda y apoyo en el desarrollo de esta tesis desarrollada en la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Gracias a mí enamorada Gretta Suárez por creer en mí y apoyarme incondicionalmente pese a la distancia; como te dije el tiempo pasa rápido y por fin logré acabar la maestría; gracias a mis amigas tesistas Fabiola Casanova, Deysi Huayllacallan, por el apoyo y consejos.

Por último agradezco a mis amigos incondicionales Daniela Delgado, Karla Chávez y Christian Zevallos por sus palabras de aliento, amistad sincera durante todos estos años pese a que ya no estamos cerca.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos generales del género <i>Phoenix dactylifera</i> L.	3
2.2. Taxonomía	3
2.3. Distribución geográfica y origen	4
2.4. Descripción botánica	5
2.5. Propagación de la palma datilera.....	8
2.6. Cultivo de tejidos vegetales.....	8
2.7. Medios de cultivo <i>in vitro</i>	8
2.8. Cultivo de Embriones somáticos <i>in vitro</i>	9
2.9. Fases de la embriogénesis somática	10
2.9.1. Iniciación a Callo embriogénico y formación del embrión	10
2.9.2. Desarrollo de embriones somáticos y maduración	11
2.9.3. Formación de Plántula	11
2.9.4. La aclimatación de plántula.....	11
2.10. Factores que afectan la embriogénesis somática	12
2.10.1. Genotipo	12
2.10.2. Explante	12
2.10.3. Medio de cultivo	12
2.10.4. Reguladores de crecimiento.....	13
2.11. Conservación de recursos filogenéticos	13
2.11.1. Bancos de germoplasma <i>in vitro</i>	15
2.12. Tipos de conservación <i>in vitro</i>	15
2.12.1. Conservación por corto - mediano plazo y principales factores involucrados	16
2.12.2. Almacenamiento por largo plazo y principales factores involucrados.....	18
2.13. Conservación <i>in vitro</i> de palma datilera	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Lugar de ejecución.....	21
3.2. Materiales	21
3.2.1. Material vegetal	21

3.3. Materiales y equipos de laboratorio.....	23
3.3.1. Material de vidrio y plástico.....	23
3.3.2. Equipos e instrumentos.....	23
3.3.3. Otros materiales.....	23
3.3.4. Compuestos químicos.....	24
3.4. Métodos.....	25
3.4.1. Formación de callo de Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	25
3.4.2. Proliferación de callo <i>in vitro</i> de Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L)....	26
3.4.3. Formación de callo embriogénico de Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L)	28
3.4.4. Inducción de embriones somáticos de Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L)	29
3.4.5. Preparación de los medios de cultivo <i>in vitro</i>	31
3.4.6. Tratamientos de conservación <i>in vitro</i> : crecimiento lento de Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	33
3.4.7. Recuperación de embriones de palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L) después de la conservación <i>in vitro</i> a 2, 4, 6 y 8 meses.....	34
3.5. Parámetros evaluados.....	34
3.5.1. Tratamiento de formación de callo de Palma datilera.....	34
3.5.2. Tratamientos de proliferación de callo indiferenciado de Palma datilera....	35
3.5.3. Tratamientos de formación de callo embriogénico de Palma datilera.....	35
3.5.4. Tratamientos de inducción de embriones somáticos de Palma datilera.....	36
3.5.5. Tratamientos de conservación <i>in vitro</i> de embriones somáticos de Palma datilera.....	36
3.6. Análisis estadísticos.....	37
3.6.1. Tratamientos de medios de cultivo.....	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1. Formación de callo de Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	39
4.1.1. Viabilidad de explante.....	39
4.1.2. Formación de callo.....	42
4.2. Proliferación de callo <i>in vitro</i> de Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	45
4.2.1. Viabilidad de explante.....	45
4.2.2. Formación de callo.....	48
4.3. Formación de callo embriogénico de Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L)....	51
4.3.1. Viabilidad de callo embriogénico.....	51
4.3.2. Formación de callo embriogénico.....	55

4.4. Inducción de embriones somáticos de Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L) ..	57
4.4.1. Viabilidad de embriones somáticos	58
4.4.2. Formación de embriones somáticos	60
4.5. Tratamientos de conservación <i>in vitro</i> de embriones somáticos de Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	63
4.5.1. Viabilidad de embriones somáticos de Palma datilera	64
4.5.2. Regeneración de embriones somáticos de Palma datilera	77
V. CONCLUSIONES	92
VI. RECOMENDACIONES	93
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
VIII. ANEXOS	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Especies del género "Phoenix" y su distribución geográfica	4
Tabla 2: Medio basal Murashige y Skoog (1962)	9
Tabla 3: Composición del medio para la formación de callo de palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	26
Tabla 4: Composición del medios para proliferación de callo de palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	27
Tabla 5: Codificación para los medios de proliferación de callo de palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	28
Tabla 6: Composición del medios para formación de callo embriogénico de palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	29
Tabla 7: Codificación para los medios de formación de callo embriogénico de palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	29
Tabla 8: Composición del medio para formación de embriones somáticos de palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	31
Tabla 9: Codificación para el medio de formación de embriones somáticos de palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	31
Tabla 10: Composición de Medios de cultivo para conservación <i>in vitro</i> de palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	33
Tabla 11: Codificación para el medio de conservación de embriones somáticos de palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	34
Tabla 12: Valores de las variables cualitativas.....	37
Tabla 13: Porcentaje de viabilidad de explantes de palma datilera.....	40
Tabla 14: Presencia de callos en los explantes de Palma datilera	43
Tabla 15: Porcentaje de viabilidad de explantes de palma datilera.....	46
Tabla 16: Proliferación de callos en los explantes de palma datilera.....	49
Tabla 17: Porcentaje de viabilidad de explantes de palma datilera.....	52
Tabla 18: Formación de callos embriogénicos de palma datilera	55
Tabla 19: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de palma datilera	58
Tabla 20: Formación de embriones somáticos de palma datilera.....	61
Tabla 21: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de palma datilera al cabo de 2, 4, 6 y 8 meses	65

Tabla 22: Porcentaje de regeneración de embriones somáticos de palma datilera al cabo de 2, 4, 6 y 8 meses.....	78
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Partes de la Palma Datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L)	7
Figura 2: Fruto de la Palma Datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L) el Dátil.....	7
Figura 3: Embriones somáticos de Palma Datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L) estadio globular y oblongo.....	22
Figura 4: Meristemo de Palma Datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L) en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina	22
Figura 5: Callo indiferenciado de Palma Datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L)	25
Figura 6: Hojas del meristemo de Palma Datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L) empleados en la obtención de callo indiferenciado	26
Figura 7: Callo indiferenciado PD-ECO2 en proliferación a las 3, 6, 9, 12, 15 y 18 semanas de Palma Datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L)	27
Figura 8: Callo embriogénico PD- ECO1 de Palma Datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L) .	28
Figura 9: Embriones somáticos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 de Palma Datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	30
Figura 10: Preparación de medios de cultivo <i>in vitro</i> de Palma Datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L)	32
Figura 11: Porcentaje de viabilidad de explantes de ecotipos de Palma datilera.....	40
Figura 12: Gráfico de barras de porcentaje de viabilidad de callo de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera por el tratamiento MFC	41
Figura 13: Imágenes de los explantes de ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 después de 30 días	42
Figura 14: Gráfico de barras de porcentaje de formación de callo de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera por el tratamiento MFC	44
Figura 15: Formación de callo en el ecotipo PD-ECO3 a las seis semanas.....	45
Figura 16: Porcentaje de viabilidad de proliferación de callo de ecotipos de Palma datilera	46
Figura 17: Gráfico de barras de porcentaje de viabilidad en la proliferación de callo de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera por los tratamientos MPC1 y MPC2.....	47

Figura 18: Imagen A donde aprecia tejido de Palma datilera PD-ECO2 necrosado; Imagen B donde se aprecia callo PD-ECO2 en proliferación después de seis semanas	48
Figura 19: Gráfico de barras de porcentaje de proliferación de callo de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera en los medios MPC1 y MPC2	50
Figura 20: Porcentaje de viabilidad de callo embriogénico de ecotipos de Palma datilera	53
Figura 21: Gráfico de barras de porcentaje de viabilidad en la formación de callo embriogénico de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera por los tratamientos MCE1 y MCE2	53
Figura 22: Imagen donde se observa callo embriogénico del ecotipo PD-ECO1 en medio MCE2 después de 30 días	54
Figura 23: Gráfico de barras de porcentaje de formación de callo embriogénico de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera en los medios MCE1 y MCE2	56
Figura 24: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de ecotipos de Palma datilera	59
Figura 25: Gráfico de barras de porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera por el tratamiento MES1	59
Figura 26: Imagen A donde aprecia embriones somáticos estadio globular de Palma datilera PD-ECO3 vivos; Imagen B donde se aprecia embriones somáticos PD-ECO3 muertos en después de cuatro semanas	60
Figura 27: Gráfico de barras de porcentaje de formación de embriones somático de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera por el tratamiento MES1	62
Figura 28: Imagen A embriones somáticos estadio globular; Imagen B embriones somáticos estadio oblongo; Imagen C embriones somáticos estadio corazón del ecotipo PD-ECO3 después de cuatro semanas	63
Figura 29: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de ecotipos de Palma datilera después de 2 meses	66
Figura 30: Gráficos de barras de porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera en los 8 tratamientos después de 2 meses	67

Figura 31: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de ecotipos de Palma datilera después de 4 meses	69
Figura 32: Gráficos de barras de porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera en los 8 tratamientos después de 4 meses.....	70
Figura 33: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de ecotipos de Palma datilera después de 6 meses	72
Figura 34: Gráficos de barras de porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera en los 8 tratamientos después de 6 meses.....	73
Figura 35: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de ecotipos de Palma datilera después de 8 meses	74
Figura 36: Gráficos de barras de porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera en los 8 tratamientos después de 8 meses.....	75
Figura 37: Imagen A embriones somáticos vivos PD-ECO2 en medio MC8; Imagen B embriones somáticos muertos PD-ECO2 en medio MC6 después de 8 meses.....	76
Figura 38: Porcentaje de regeneración de embriones somáticos de ecotipos de Palma datilera después de 2 meses	79
Figura 39: Gráficos de barras de porcentaje de regeneración de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera en los 8 tratamientos después de 2 meses	80
Figura 40: Porcentaje de regeneración de embriones somáticos de ecotipos de Palma datilera después de 4 meses	82
Figura 41: Gráficos de barras de porcentaje de regeneración de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera en los 8 tratamientos después de 4 meses	83
Figura 42: Porcentaje de regeneración de embriones somáticos de ecotipos de Palma datilera después de 6 meses	84
Figura 43: Gráficos de barras de porcentaje de regeneración de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera en los 8 tratamientos después de 6 meses	86
Figura 44: Porcentaje de regeneración de embriones somáticos de ecotipos de Palma datilera después de 8 meses	87

Figura 45: Gráficos de barras de porcentaje de regeneración de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado (Arcos%/100) de Palma datilera en los 8 tratamientos después de 8 meses	88
Figura 46: Imagen A embrión somático PD-ECO2 estadio escutelar; Imagen B embrión somático PD-ECO4 estadio coleptilar; Imagen C conjunto de embriones somáticos PD-ECO1 en medio de regeneración después de 6 meses en conservación; Imagen D conjunto de embriones somáticos PD:ECO3 en medio de regeneración después de 8 meses en conservación	90
Figura 47: Imagen A embriones somáticos PD-ECO1 estadio escutelar; Imagen B embriones somáticos PD-ECO2 estadio coleptilar en medio de maduración; Imagen C conjunto de plantas PD-ECO3 en medio de maduración después de 8 meses en conservación; Imagen D palma PD:ECO4 en medio de maduración después de 8 meses en conservación	91
Figura 48: Imagen de las Palmas datileras de los ecotipos PD-ECO1 y PD-ECO2 de la región Ica	103
Figura 49: Imagen de las Palmas datileras de los ecotipos PD-ECO3 y PD-ECO4 de la región Ica	104
Figura 50: Imagen A corte histológico de callo inicial de Palma datilera vista a 100X; Imagen B callo embriogénico de Palma datilera vista 40X.....	104
Figura 51: Imagen A corte histológico de embrión somático estadio globular de Palma datilera vista a 40X; Imagen B embrión somático estadio oblongo de Palma datilera vista a 40X	105
Figura 52: Imagen A corte histológico de embrión somático estadio escutelar de Palma datilera vista a 40X; Imagen B embrión somático estadio coleoptilar de Palma datilera vista a 40X	105
Figura 53: Imágenes de Palma datilera en medio de maduración después de 3 semanas	133
Figura 54: Imágenes de Palma datilera con raíces listas para ser aclimatadas en invernadero	134
Figura 55: Imagen de plantas de Palma datilera aclimatadas en bandeja después de cuatro semanas.....	134

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Caracteres georreferenciales y morfológicos de las plantas de Palmas datileras seleccionadas	103
Anexo 2: Ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 de la región Ica ...	103
Anexo 3: Cortes histológicos a callos embriogénicos y embriones de Palta datilera ..	104
Anexo 4: Protocolo para la obtención de cortes histológicos en callos embriogénicos y embriones de Palta datilera.....	106
Anexo 5: ANOVA para la viabilidad de callo de palma datilera (SC tipo III).....	108
Anexo 6: Prueba de Tukey para la viabilidad de callo de palma datilera	108
Anexo 7: ANOVA para la formación de callo de palma datilera (SC tipo III)	108
Anexo 8: Prueba de Tukey para la formación de callo de palma datilera.....	109
Anexo 9: ANOVA para la viabilidad de callo de palma datilera (SC tipo III).....	109
Anexo 10: Prueba de Tukey para la viabilidad de callo de palma datilera	110
Anexo 11: ANOVA para la proliferación de callo de palma datilera (SC tipo III)	110
Anexo 12: Prueba de Tukey para la proliferación de callo de palma datilera	111
Anexo 13: ANOVA para la viabilidad de callo embriogénico de palma datilera (SC tipo III).....	111
Anexo 14: Prueba de Tukey para la viabilidad de callo embriogénico de palma datilera	112
Anexo 15: ANOVA para la formación de callo embriogénico de palma datilera (SC tipo III).....	113
Anexo 16: Prueba de Tukey para la formación de callo embriogénico de palma datilera	113
Anexo 17: ANOVA para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera (SC tipo III).....	114
Anexo 18: Prueba de Tukey para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera	114
Anexo 19: ANOVA para la formación de embriones somáticos de palma datilera (SC tipo III).....	115
Anexo 20: Prueba de Tukey para la formación de embriones somáticos de palma datilera	115

Anexo 21: ANOVA para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 2 meses (SC tipo III).....	115
Anexo 22: Prueba de Tukey para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 2 meses.....	116
Anexo 23: ANOVA para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 4 meses (SC tipo III).....	116
Anexo 24: Prueba de Tukey para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 4 meses.....	117
Anexo 25: ANOVA para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 6 meses (SC tipo III).....	117
Anexo 26: Prueba de Tukey para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 6 meses.....	118
Anexo 27: ANOVA para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 8 meses (SC tipo III).....	119
Anexo 28: Prueba de Tukey para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 8 meses.....	119
Anexo 29: ANOVA para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 2 meses (SC tipo III).....	120
Anexo 30: Prueba de Tukey para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 2 meses.....	120
Anexo 31: ANOVA para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 4 meses (SC tipo III).....	121
Anexo 32: Prueba de Tukey para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 4 meses.....	121
Anexo 33: ANOVA para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 6 meses (SC tipo III).....	122
Anexo 34: Prueba de Tukey para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 6 meses.....	122
Anexo 35: ANOVA para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 8 meses (SC tipo III).....	123
Anexo 36: Prueba de Tukey para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 8 meses.....	123
Anexo 37: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la viabilidad después de 2 meses.....	125

Anexo 38: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la viabilidad después de 4 meses	126
Anexo 39: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la viabilidad después de 6 meses	127
Anexo 40: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la viabilidad después de 8 meses	128
Anexo 41: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la regeneración de embriones somáticos después de 2 meses	129
Anexo 42: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la regeneración de embriones somáticos después de 4 meses	130
Anexo 43: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la regeneración de embriones somáticos después de 6 meses	131
Anexo 44: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la regeneración de embriones somáticos después de 8 meses	132
Anexo 45: Figuras complementarias del proyecto de la Palma datilera (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	133

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó, la capacidad de embriones somáticos de Palma Datilera (*Phoenix dactylifera* L.) a ser conservados *in vitro*, como una alternativa viable de ser implementada para la conservación *ex situ* de esta especie. Este estudio fue realizado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Se usó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial (4x8), un análisis de varianza para comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) previa transformación angular ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos. En los resultados; la viabilidad después de 8 meses obtuvo promedios hasta un 90% de embriones somáticos de Palma Datilera. En la conservación *in vitro* se probaron ocho tratamientos con componentes osmóticos y fitohormonas de MS modificadas en cuatro ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4, estos fueron colocados a 4000 luz, fotoperiodo 12h luz y $26 \pm 4^\circ\text{C}$. La mejor respuesta de los embriones fue encontrada, luego de ocho meses de conservación *in vitro*; con el medio MC8, compuesto por sales de MS con 40g/L de Sacarosa, 2g/L ABA, 2ml/L de ppm y 7g/L de agar. Para la regeneración de embriones somáticos *in vitro* de Palma Datilera, se obtuvieron promedios de hasta 85%. Los mejores resultados en los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 se obtuvieron a las ocho semanas de cultivo y bajo las mismas condiciones de laboratorio; la regeneración de embriones somáticos de Palma Datilera obtuvieron promedios de 90%, 85%, 90% y 90% respectivamente. En conclusión, se estableció un medio adecuado para la conservación *in vitro* de Palma Datilera debido a los resultados obtenidos sin afectar la viabilidad y regeneración de los embriones somáticos.

Palabras clave: Embriones somáticos, conservación *in vitro*, regeneración *in vitro*, Palma Datilera.

ABSTRACT

In the present study was evaluated the ability of somatic embryos of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) to be conserved in vitro as a viable alternative be implemented for the conservation ex situ of this species. This study was conducted in the laboratory of cultivation of tissue plant of the Institute of biotechnology (IBT) of the Universidad Nacional Agraria La Molina. An experimental design was used completely at random in accordance with factorial (4 x 8), an analysis of variance for means comparison of Tukey ($p \leq 0.05$) on angular transformation ($\text{Arcos}\sqrt{(\%/100)}$) to establish the significant differences between the treatments. In the results; viability after 8 months obtained averages up to 90% of somatic embryos of Palm. Eight treatments with osmotic components and phytohormones of MS modified in four ecotypes PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 and PD-ECO4 were tested conservation in vitro, these were placed to 4000 light, photoperiod 12 h light and $26 \pm 4^\circ \text{C}$. The best response of the embryos was found, after eight months of in-vitro conservation; the average MC8, composed by MS salts with 40 g/L sucrose, 2 g/L ABA, 2 ppm ml/L and 7g/L agar. Regeneration of somatic embryos in vitro of Palm, up to 85% averages were obtained. The best results in the ecotypes PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 and PD-ECO4. were obtained at eight weeks of cultivation and under the same laboratory conditions; the regeneration of somatic embryos of Palma Datilera obtained averages 90%, 85%, 90% and 90% respectively. In conclusion, settled an appropriate way for the conservation in-vitro of Palm due to the results obtained without affecting the viability and regeneration of somatic embryos.

Key words: Somatic embryos, conservation in-vitro, regeneration in vitro, Palm date.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los integrantes de la familia *Arecaceae*, es la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.); esta es originaria de Mesopotamia y el Viejo Mundo; su llegada a América se dio por medio de la conquista española (Al-Yahyai y Manickavasagan, 2012). La palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) pertenece al género *Phoenix*, es una palmera frutal dioica, perenne y monocotiledónea (Barrow, 1998). En el Perú la palma datilera se encuentra ubicada en la costa central particularmente en la Región Ica (Cobo, 1882). También se encuentra dispersa en el desierto costero desde Piura (5°S) hasta Pica en Chile (20°S), donde existen poblaciones de más de 400 años (Arana et al., 2013).

La propagación de la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) se realiza por semillas, brotes o retoños radicales, posteriormente esto permite seleccionar las palmas femeninas que son las productoras de dátiles (Hoyos y Braun, 2001). En la última década, mediante las técnicas de cultivo de tejidos vegetales y embriogénesis somática ha sido posible multiplicarlas masivamente; ya que no es común la siembra a partir de semilla, debido a que representa un riesgo muy grande para el agricultor al desconocer su género. Para conocer si la Palma datilera es hembra o macho, se espera la primera floración, la cual ocurre entre los 5 y 8 años de vida (Bekheet y Hanafy, 2011).

La investigación en los últimos 18 años sobre el cultivo de tejidos *in vitro* de Palma datilera ha recibido un interés creciente (Al-Khayri, 2001). La tecnología más utilizada es la embriogénesis somática. Al utilizar embriones somáticos *in vitro* se facilita el manejo y se puede conservar germoplasma elite (Rai et al., 2009; Sandoval- yugar et al., 2009). En el 2016 se logró progresos significativos en el desarrollo y optimización de la regeneración de palmas datileras (*Phoenix dactylifera* L.) empleando células embriogénicas (Naik y Al khayri, 2016). Un gran problema del cultivo de tejidos vegetales es el mantenimiento de grandes colecciones de germoplasma *in vitro*, que implica el subcultivo en intervalos de tiempo para renovar el medio de cultivo, esto genera riesgos de contaminación y variación somaclonal (Engelmann, 2011; Sarasan, 2011).

Una alternativa es la conservación *in vitro* bajo condiciones de crecimiento lento, además existe una amplia gama de herramientas de conservación que son empleadas para preservar la biodiversidad vegetal (Reed et al., 2011). Los métodos utilizados para el almacenamiento de germoplasma *in vitro* deben cumplir dos objetivos básicos; mantenimiento durante un período prolongado y estabilidad de las propiedades genéticas (Ashmore, 1997). El principal objetivo de la conservación *in vitro* es el crecimiento lento; consiste en extender el subcultivo de un período normal (2 a 6 semanas) a uno mucho más largo (3 a 12 meses) (Gupta y Mandal, 2003). El crecimiento lento puede lograrse mediante modificaciones físicas o químicas del medio de cultivo de tejidos, como reduciendo la temperatura, bajando la intensidad de luz u oscuridad, alterando el medio como disminuir el suministro de nutrientes inorgánicos, también adicionando agentes osmóticos o inhibidores del crecimiento (Hassan et al., 2004; Tyagi et al., 2009). En el presente estudio la conservación *in vitro* de germoplasma de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) se logró a partir de embriones somáticos *in vitro* y bajo condiciones de crecimiento lento; empleando reguladores de crecimiento, se formó callo embriogénico, el cual es el único que forma embriones somáticos; para saber el estado celular y la morfología del callo embriogénico se realizaron tinciones a cortes histológicos de tejido de callos de palma datilera. Se verificó el estadio de los embriones somáticos (globular, oblongo y corazón) y finalmente se comprobó el efecto de distintos tipos de agentes osmóticos e inhibidores de crecimiento en la conservación *in vitro* de los embriones previamente obtenidos evaluando su viabilidad y la capacidad de regenerar una nueva palma datilera luego de dos, cuatro, seis y ocho meses que permanecieron conservados. Debido a la erosión genética, el aumento de la contaminación ambiental, la extinción de especies, podemos centrar esfuerzos en investigar la conservación *in vitro* de especies amenazadas en el Perú como es el caso de la palma datilera; empleando la conservación *in vitro*.

El objetivo principal de esta investigación es conservar *in vitro* embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) bajo condiciones de crecimiento lento.

Los objetivos específicos fueron: 1) Evaluar la formación de callo embriogénico de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) de la Provincia de Ica; 2) Formar embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) de la Provincia de Ica; 3) Evaluar el efecto de diferentes agentes osmóticos e inhibidores de crecimiento en la conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) de la Provincia de Ica.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales del género *Phoenix dactylifera* L.

La palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.), perteneciente a las Angiospermas Monocotiledóneas, se encuentra dentro de la familia *Palmaceae* que tiene aproximadamente 200 géneros y 1, 500 especies (Dowson, 1982). *Phoenix* es uno de los géneros que contiene especies, todas nativas de las regiones tropicales o subtropicales de África o el sur de Asia, incluyendo a *Phoenix dactylifera* L. (Munier, 1973).

El género *Phoenix* contiene aproximadamente 12 especies las cuales son interfértiles. Posiblemente un único progenitor de *Phoenix dactylifera* debe haber hibridizado naturalmente con otras especies silvestres. Este es el caso en África de palmas datileras cultivadas con *P. reclinata* en el Este y *P. atlantica* en el Noreste. En India y Pakistan, *P. dactylifera* es infértil con *P. silvestris*. En España y Norte de África *P. dactylifera* hibridiza con *P. canariensis* (Benbadis, 1992).

2.2. Taxonomía

Según Dransfield y Uhl (1986) la palma datilera se clasifica de la siguiente manera:

- Grupo: Spadiciflora
- Orden: Palmae
- Familia: Palmaceae
- Subfamilia: Coryphoideae
- Tribu: Phoeniceae
- Género: Phoénix
- Especie: *P. Dactylifera* L.

El nombre botánico de la palmera datilera, *Phoenix dactylifera* L. Se deriva presumiblemente de un nombre fenicio "phoenix", que significa palmera datilera, y "dactylifera" derivado de una palabra griega "daktulos" que significa un dedo, ilustrando la forma de la fruta (Keaney, 1906).

Tabla 1: Especies del género "Phoenix" y su distribución geográfica

Especies	Nombre común	Distribución
<i>Phoenix dactylifera</i> L.	Palmera datilera	Países mediterráneos, África y parte de Asia; introducido en América del Norte y Australia
<i>P. atlantica</i> A. Chev.	-	Occidental África y Islas Canarias
<i>P. canariensis</i> chabeaud.	Palma canaria	Islas Canarias y Cabo Verde
<i>P. reclinata</i> Jacq.	Palma enana	África tropical (Senegal y Uganda) y Yemen (Asia)
<i>P. sylvestris</i> Roxb.	Palmera datilera o azucarera	India y Pakistán
<i>P. humilis</i> Royle.	-	India, Birmania y China
<i>P. hanceana</i> Naudin.	-	Meridional China y Tailandia
<i>P. robelinic</i> O'Brein.	-	Sri Lanka, Toukin, Annam, Laos y Tailandia
<i>P. farinifera</i> Roxb.	Pigmy Palm	India, Ceilán y Annam
<i>P. rupicola</i> T. Anders.	Rocky Date Palm	India
<i>P. acaulis</i> Roxb.	Palma enana	Bengaladesh y la India
<i>P. paludosa</i> Roxb.	Hental o Juliana Palm	Bengaladesh, Tenasherim, Andaman, Nikobaren y Tailandia

Fuente: Chevalier (1952)

2.3. Distribución geográfica y origen

La palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) es un integrante de la familia *Arecaceae*; esta es originaria de Mesopotamia y el Viejo Mundo, donde culturas muy antiguas como los sumerios, asirios, babilonios, egipcios, griegos y romanos la cultivaron; esta palmera es cultivada en regiones áridas del Medio Oriente desde Arabia hasta el Golfo Pérsico donde conforma la vegetación característica de los oasis. (Benbadis, 1992). Tiempo después su cultivo se extendió llegando al norte de África, seguidamente al sur de Asia central y al sur de Europa; finalmente su llegada a América se dio por medio de la conquista española (Al-Yahyai y Manickavasagan, 2012).

En Perú la palma datilera se encuentra ubicada en la costa central particularmente en la Región Ica (Cobo, 1882). También se encuentra dispersa en varias localidades del desierto costero desde Piura (5°S) hasta Pica en Chile (20°S), donde existen poblaciones de más de 400 años con características genéticas diferentes a los países de origen (Arana et al., 2013). El dátil, fruto de esta palmera es muy poco conocido en nuestro medio, mayormente solo se consumen en la Región Ica, donde existen pocas plantas que subsisten sin cuidado alguno en los desiertos de Lanchas, Villacuri y también en algunos lugares del valle de Ica (Cobo, 1882).

2.4. Descripción botánica

La palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) pertenece al género *Phoenix*, es una palmera frutal dioica, perenne y monocotiledónea (Barrow, 1998). La planta es una palma solitaria, cubierta por los restos de las hojas viejas. Posee hojas de hasta 6 m de longitud, con folíolos de 30 a 40 cm de longitud, de color verde (Hoyos y Braun, 2001).

El tronco de la palmera datilera, también llamado tallo o estúpite, es vertical, cilíndrico y columnar de la misma circunferencia hasta arriba. Es de color marrón, lignificado y sin ninguna ramificación. Su circunferencia promedio es de aproximadamente 1 a 1.10 m. El tronco está compuesto por haces vasculares fibrosos y duros unidos entre sí en una matriz de tejido celular que está muy lignificada cerca de la parte externa del tronco. Al ser una monocotiledónea, la palmera datilera no tiene una capa de cambium. El tronco está cubierto con las bases de las viejas hojas secas, lo que lo hace áspero, pero con la edad estas bases hacen clima y el tronco se vuelve más liso con cicatrices visibles de estas bases. El crecimiento vertical de la palmera datilera está garantizado por su yema terminal, llamada filóforo, y su altura puede alcanzar los 20 metros (Mason, 1915; Milne, 1918).

Dependiendo de la variedad, la edad de la palma y las condiciones ambientales, las hojas de una palmera datilera tienen de 3 a 6 m de largo (4 m de promedio) y tienen una vida normal de 3 a 7 años. La palma datilera es una especie dioica con flores masculinas y femeninas producidas en racimos en palmas separadas. Estos grupos de flores se producen con axilas de hojas del crecimiento del año anterior (Mason, 1915 y Milne, 1918). Las palmas que llevan flores unisexuales y hermafroditas son conocidas como polígamas. Las flores unisexuales son pistiladas (femeninas) y estaminadas (masculinas) en su carácter; nacen en

un gran racimo (inflorescencia) llamado espádice o espiga, que consiste en un tallo central llamado raquis y varias hebras o espiguillas (generalmente 50 - 150 ramas laterales).

La inflorescencia, también llamada racimo de flores, en sus primeras etapas está encerrada en una envoltura dura conocida como spa, que se abre cuando las flores maduran y exponen toda la inflorescencia con fines de polinización. La spathe protege las flores delicadas de ser marchitadas por el intenso calor hasta que estén maduras y listas para realizar su función. La espata al comienzo es de color verdoso y se vuelve marrón cuando está casi dividida; la división es longitudinal. Las espatas masculinas son más cortas y más anchas que las femeninas. Cada espiguilla porta una gran cantidad de pequeñas flores de hasta 8,000 a 10,000 en la hembra y más en la inflorescencia masculina (Chandler, 1958).

La flor femenina tiene un diámetro de aproximadamente 3 a 4 mm y tiene estambres rudimentarios y tres carpelos estrechamente comprimidos entre sí y el ovario es superior. Al abrir, las flores femeninas muestran más color amarillo, mientras que las masculinas muestran polvo de color blanco, producido al agitar. Dependiendo de la variedad, las condiciones ambientales y la atención técnica brindada (fertilización, polinización, adelgazamiento), las características de la fruta varían enormemente. La semilla es alargada y posee un gran surco longitudinal profundo. Los dátiles alcanzan una completa maduración a temperaturas muy elevadas (40° C) y disponibilidad de agua. En las regiones de gran cultivo, los frutos son muy usados como fuente alimenticia por su alto valor nutritivo (FAO, 1993). Por ejemplo en Ica se comercializa 230 toneladas y la época de cosecha se da en los meses de mayo a julio (MINAGRI, 2013). En varias regiones del mundo, los frutos son muy usados como fuente alimenticia por su alto valor nutritivo (FAO, 1993). En la actualidad la palma datilera también se usa como un adorno ornamental, ya sea en grupos formando palmerales o en alineaciones en avenidas, parques, plazas y jardines.

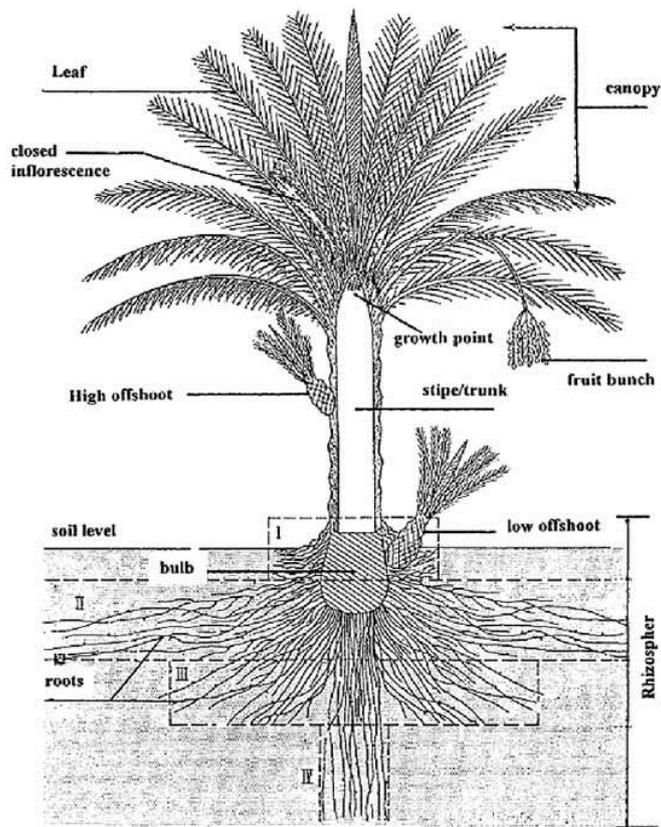


Figura 1: Partes de la Palma Datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Fuente: (Murier, 1973; Oihabi, 1991).



Figura 2: Fruto de la Palma Datilera (*Phoenix dactylifera* L) el Dátil

Fuente: (Olivo y Vielma, 1991).

2.5. Propagación de la palma datilera

La propagación de la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) se realiza por semillas, brotes o retoños radicales, posteriormente esto permite seleccionar las palmas femeninas que son las productoras de dátiles (Hoyos y Braun, 2001). En la última década, mediante las técnicas de cultivo de tejidos vegetales como es la embriogénesis somática ha sido posible multiplicarlas masivamente en especial variedades elite; ya que no es común la siembra a partir de semilla, debido a que representa un riesgo muy grande para el agricultor al desconocer su género. Para conocer si la palma datilera es hembra o macho, se espera la primera floración, la cual ocurre entre los 5 y 8 años de vida (Bekheet y Hanafy, 2011).

2.6. Cultivo de tejidos vegetales

En 1902 el científico Haberlandt fue el primero en intentar el cultivo de tejidos empleado tejidos y células en soluciones de sales y azúcar, además propuso que las células de las plantas son totipotentes y puede desarrollar una planta igual a la original. La técnica de cultivo de tejidos es un método que consiste en aislar cualquier parte de la planta para cultivarlo en un medio nutritivo artificial aséptico. Con las ventajas de obtener gran cantidad de plántulas en corto tiempo (Murashige, 1962).

A grandes rasgos, la micropropagación implica la selección de una planta y el aislamiento de una parte de ella, llamada inóculo, el cual, después de someterse a una desinfección, se coloca en un medio de cultivo en donde dará origen a embriones o brotes y finalmente a plantas completas. Una vez que se obtienen las plantas, se colocan en condiciones *in vitro* y se trasplantan a un sustrato para adaptarlas a condiciones ambientales para su comercialización o utilización (Pierik, 1990).

2.7. Medios de cultivo *in vitro*

La adecuada selección de los medios de cultivo es fundamental para el éxito en el cultivo *in vitro* de los tejidos vegetales. El medio básico utilizado no puede suplir el desarrollo de todas las células; es necesario realizar cambios para obtener las respuestas requeridas en el crecimiento de un explante. Generalmente, los medios de cultivo contienen sales inorgánicas, reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas, carbohidratos y un agente gelificante, aunque no siempre este último es indispensable (Perea y Tirado, 2011). Uno de

los medios de cultivo más usados en la actualidad es el medio de cultivo MS propuesto por (Murashige y Skoog, 1962).

Tabla 2: Medio basal Murashige y Skoog (1962)

Solución	Reactivo – Fórmula	Concentración (mg/L)
Macronutrientes	Nitrato de amonio - NHNO_3	1650
	Nitrato de potasio - KNO_3	1900
	Cloruro de calcio dihidratado - $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$	440
	Sulfato de magnesio heptahidratado - $\text{MgSO}_4\text{7H}_2\text{O}$	370
	Fosfato de potasio monobásico - KH_2PO_4	170
Micronutrientes	Yoduro de potasio – KI	8.3
	Ácido trioxobórico - H_3BO	62
	Sulfato de manganeso monohidratado - $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$	11.8
	Sulfato de zinc heptahidratado - $\text{ZnSO}_4\text{7H}_2\text{O}$	8.6
	Molibdato de sodio - $\text{Na}_2\text{MoO}_4\text{2H}_2\text{O}$	2.5
	Sulfato de cobre pentahidratado - $\text{CuSO}_4\text{5H}_2\text{O}$	0.025
	Cloruro de cobalto hexahidratado - $\text{CoCl}_2\text{6H}_2\text{O}$	0.025
Quelatos de Hierro	Sulfato ferroso heptahidratado - $\text{FeSO}_4\text{7H}_2\text{O}$	27.8
	Etilen diamino tetra acetato - Na_2EDTA	37.3
Vitaminas y aminoácidos	My-inositol	100
	Ac. Nicótico	0.5
	Piridoxina	0.5
	Tiamina	0.1
	Glicina	2

Fuente: (Murashige y Skoog, 1962).

2.8. Cultivo de Embriones somáticos *in vitro*

La embriogénesis somática es una de las tantas técnicas de la propagación *in vitro* y nos permite obtener plántulas completas. Consiste en la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat et al., 1979).

La embriogénesis somática es una poderosa herramienta para la mejora y recuperación de la palmera datilera, así como para la propagación masiva (Diab, 2008; Abo Elfadl, 2008). La tecnología de embriones somáticos *in vitro* se ha convertido en un activo importante para la micropropagación y conservación *in vitro* de plantas (Naik y Chand, 2006). Por ello, se ha desarrollado protocolos en base a la utilización de embriones somáticos ya que poseen la capacidad de convertir toda una planta bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* (Gray, 1987; Sharma et al., 2013).

La embriogénesis somática puede ser definida como el desarrollo de embriones somáticos a partir de células somáticas, que experimentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos (Quiroz, 2006). Embriogénesis somática incluye una serie de etapas: iniciación de callo embriogénico, la formación de embriones somáticos, desarrollo del embrión somático, la maduración y la formación de la plántula. En palma datilera la embriogénesis somática se considera como el instrumento más poderoso para lograr la producción a gran escala. El cultivo de embriones es una alternativa eficaz a los medios convencionales de propagación. Embriogénesis somática y organogénesis son las dos principales modalidades de micropropagación de palmera datilera, que son ampliamente aceptados en el cultivo de tejidos en el mundo (Bhansali, 2010).

Las ventajas de utilizar embriones somáticos *in vitro* incluyen un fácil manejo, conservación de germoplasma de elite y de plantas amenazadas comercialmente importantes. Mediante el uso de esta técnica se facilita el almacenamiento, se reducen costos y hay mejores respuestas en campo (Rai et al., 2009; Sandoval- yugar et al., 2009).

2.9. Fases de la embriogénesis somática

2.9.1. Iniciación a Callo embriogénico y formación del embrión

El proceso de iniciación de callos embriogénicos en la palma datilera es muy lento; esto es debido principalmente a la naturaleza del árbol de la planta. La iniciación y proliferación de callo embriogénico es un proceso que depende de varios parámetros, como el tipo de genotipo, fuente de explantes, fitohormonas y condiciones de cultivo. Para inducir la formación de callo embriogénico en la mayoría de los casos se emplea las inflorescencias y una alta concentración de auxinas. La mayoría de los investigadores sugieren que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), es el más eficaz para inducir la formación de callo embriogénico utilizado concentraciones de 100 mg/L (Al-Khayri, 2005; Al-Khayri, 2010;

Al-Khayri et al., 2015). Además Fki (2011) informó que las altas concentraciones de 2,4-D causan variación somaclonal.

La embriogénesis somática es un sistema de regeneración eficiente, sin embargo la inducción exitosa de los embriones somáticos y su siguiente conversión en plantas viables no es eficiente para la mayoría de las especies en los momentos actuales (Merkle et al., 1996). Se han descrito cuatro estadios para el mismo, las fases 0, 1, 2 y 3 pueden ser reconocidas desde los estados tempranos de la embriogénesis para dicotiledóneas (Gómez, 1998), en el caso de las monocotiledóneas existen los estadios 0, 1, y 2; pero no la fase 3, pues no se diferencia el estado de corazón y torpedo, ya que el embrión globular sufre un proceso de transición en el cual se alarga (denominado estado oblongo) hasta llegar a formarse el embrión maduro, pasando por el estadio de escutelo y coleoptilar (Dodeman, 1997).

2.9.2. Desarrollo de embriones somáticos y maduración

Varios factores son responsables del desarrollo de embriones somáticos y su maduración. La palma datilera tiene la capacidad de desarrollarse como un embrión maduro, tanto en medio líquido y semisólido. Los autores informan que la palmera datilera en 1 mes de suspensión líquida produce 200 embriones a partir de 100 mg de peso fresco callo, por otro lado produce 10 embriones en medio semisólido (Fki, 2003). La aplicación de tiamina y biotina mostraron un aumento en el número de embriones y también ayuda en el proceso de elongación (Al-Khayri, 2001). Los callos embriogénicos tienen mejores resultados con la desecación parcial mejora significativamente la maduración del embrión (Othmani, 2009).

2.9.3. Formación de Plántula

La germinación de embriones somáticos o formación de plántulas depende de diferentes factores. Al-Khayri (2005) indicó que el tamaño de los embriones somáticos influye en el porcentaje de germinación de palma datilera también informó que la germinación de embriones somáticos está influenciado por el medio y concentración de hormonas.

2.9.4. La aclimatación de plántula

El éxito de la aclimatación está oculto en la naturaleza del sustrato que debe ser alto en materia orgánica, debe poseer una óptima capacidad de retención de agua y aireación adecuada (Hegazy, 2008). Las plántulas derivadas de embriones somáticos de palmeras han

sido exitosamente aclimatadas. Kurup (2014) reportó en su trabajo que obtuvo casi el 60% de supervivencia de palmas. Othmani (2009) informó que cuando las plantas son transferidas a macetas con turba/vermiculita mezcla de 2:1 casi el 60 y 80% de la tasa de supervivencia de las palmeras. Y Al-Khayri (2010) observó el 72-84% de supervivencia de la palma datilera para después transferir las plántulas *ex vitro*.

2.10. Factores que afectan la embriogénesis somática

2.10.1. Genotipo

Estudios demuestran que genotipos provenientes de una misma especie, pueden diferir en cuanto a su capacidad para formar embriones somáticos, lo cual está dado por las diferentes habilidades para activar las rutas embriogénicas (Parrott, 2002). Varios artículos científicos reflejan la baja eficiencia de formación de callos con estructuras embriogénicas; así como la influencia del genotipo en la producción de callos y en la regeneración de plantas *in vitro* (Jogeswar et al., 2007).

2.10.2. Explante

En distintas investigaciones se reporta que la respuesta de diferentes tipos de explantes a la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en la mayoría de las especies depende de la edad del explante y la concentración de auxina.

2.10.3. Medio de cultivo

Para el establecimiento de un cultivo intervienen varios factores, los cuales pueden ser modificados al variar algunos componentes del medio de cultivo como son los reguladores del crecimiento, las sales minerales como el calcio y el hierro, los azúcares y las vitaminas. Samoylov et al. (1998), determinaron que son cuatro los factores que afectan la formación de embriones somáticos en cultivos embriogénicos: el contenido de carbohidratos, la presión osmótica, el contenido de nitrógeno total y el índice amonio/nitrato en el medio de cultivo (Malinowski y Filipecki, 2002). De igual forma, Zaidi et al. (2000) mencionan que el nitrógeno en el medio de cultivo es importante, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo en la inducción de la embriogénesis somática. Mashayekhi (2000) señala que el requerimiento de nitrógeno reducido en la inducción de los embriones somáticos se debe a que estos carecen de la nitrato reductasa, la cual reduce el nitrato a nitrito.

2.10.4. Reguladores de crecimiento

Las fitohormonas o reguladores de crecimiento son necesarios para obtener embriones somáticos depende del tipo de células que formen el explante, ya sea la adición de citoquinina al medio de cultivo es suficiente, porque las células ya son embriogénicas y simplemente necesitan dividirse; pero al utilizar tejidos, es necesario el empleo de auxinas para inducir el estado embriogénico (Parrott, 2002).

Las auxinas desempeñan un importante papel en el proceso de embriogénesis somática. La acción auxínica produce severos cambios, lo cual reprograma a la célula para un estado embriogénico. Uno de los eventos iniciales es la terminación del patrón genético general, que puede variar y permitir la expresión de un programa embriogénico. Un posible mecanismo para la baja regulación de la expresión génica es la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN), lo cual está correlacionado con la cantidad de auxina exógena (Kintzios et al., 2002).

El papel de las citoquininas en el medio de cultivo primario o inductor no ha sido bien definido, aunque normalmente se incluye en su composición; alguna de ellas como es el 6-bencilaminopurina (6-BAP) o la Kinetina. Las citoquininas pueden ser esenciales para la maduración y germinación de embriones somáticos. La incorporación de estas durante la fase de histodiferenciación compensa el efecto negativo inducido por la auxina sobre el desarrollo (Barbón, 2001).

Muchos de los protocolos para la embriogénesis somática omiten una o más etapas, usan reguladores de crecimiento innecesarios, o condiciones subóptimas de cultivo. Lo que provoca que los embriones somáticos requieran el empleo de reguladores de crecimiento (generalmente citoquinina o giberelina) antes de germinar y convertirse en plantas (Parrott, 2002).

2.11. Conservación de recursos filogenéticos

Los recursos filogenéticos son la base de la seguridad alimentaria mundial. Por ello es de suma importancia mantener la diversidad genética de las variedades tradicionales y regionales, de los cultivares mejorados y de plantas silvestres (Rao, 2004).

El concepto de conservación de los recursos filogenéticos en bancos de germoplasma incluye la utilización de métodos que capturen la máxima diversidad de genotipos, así como el uso de técnicas de conservación y posterior regeneración que mitiguen sus pérdidas a través del tiempo (Rao, 2004).

La conservación de germoplasma de cultivos tropicales se ha tratado de realizar *ex situ* e *in situ* (Rao, 2004). La vía *ex situ* se realiza en repositorios especiales (sitios fuera del centro de origen de la especie) que proveen las condiciones adecuadas para la conservación de material propagativo por largo tiempo (Withers et al., 1990). Los métodos de conservación *ex situ* incluyen el almacenamiento de semillas, bancos de genes en campo, colecciones *in vitro* y jardines botánicos (Soengas et al., 2009).

El método más utilizado en la vía *ex situ* son los bancos de semillas. Estos presentan la ventaja de que se pueden almacenar muchos genotipos en espacios reducidos y es apto para la conservación de especies con semillas ortodoxas (semillas que pueden deshidratarse y almacenarse entre 0 y -20 °C por largo tiempo) (Soengas et al., 2009).

Esto es crítico porque muchos de los cultivos tropicales de importancia económica, como palma aceitera (*Elaeis guineensis*), cacao (*Theobroma cacao*), coco (*Cocos nucifera*), aguacate (*Persea americana*), mango (*Mangifera indica*) y café (*Coffea* spp.), poseen este tipo de semilla (Withers et al., 1990).

Una desventaja del uso de semillas en programas de conservación por medio de bancos de germoplasma es la dificultad para obtener este tipo de estructuras en algunas especies que tienen un largo periodo juvenil (Matsumoto et al., 2001). Por otro lado, existen plantas que se propagan principalmente de forma vegetativa, como yuca (*Manihot* spp.), papa (*Solanum* spp.), ñame (*Colocasia esculenta*), cebolla y ajo (*Allium* spp.), y banano o plátano (*Musa* spp.), en las cuales no es tan fácil la obtención de semillas sexuales (Sant et al., 2008).

Los bancos de genes y los jardines botánicos presentan los inconvenientes de tener altos costos de mantenimiento, de necesitar de condiciones especiales para ciertas plantas que se encuentran fuera de su hábitat natural (por ejemplo, plantas tropicales que son llevadas a jardines botánicos en climas templados, donde es necesario proveerles de condiciones con alta humedad y regulación de la temperatura). Esto implica un riesgo por pérdida de

materiales a causa de factores ambientales. (Wang et al., 2005). La vía de conservación *in situ* involucra el mantenimiento de los recursos genéticos en el centro de origen o cultivo en campos de productores agrícolas en sistemas de agricultura tradicional (Rao, 2004). Sus requerimientos, en cuanto a espacio y mantenimiento, son similares a los indicados para los bancos de genes en campo.

Para solucionar los inconvenientes de las vías mencionadas anteriormente se puede recurrir a la conservación de especies tropicales en condiciones *in vitro*. En esta revisión bibliográfica se presentan las técnicas para la conservación *in vitro* de germoplasma en el corto y en largo plazo, que permiten el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales.

2.11.1. Bancos de germoplasma *in vitro*

Los bancos de germoplasma *in vitro* son sitios para la conservación de los recursos genéticos en condiciones controladas de laboratorio y que involucran diversas técnicas de cultivo y almacenamiento *in vitro*. En los mismos se busca maximizar la diversidad de ejemplares recolectados de poblaciones en campo o en su centro de origen. La unidad de colección que se mantiene en condiciones controladas puede ser la semilla botánica o explantes vegetativos (Rao, 2004; Wang et al., 2005).

Para proveer a los explantes y semillas las condiciones adecuadas de almacenamiento *in vitro* se han desarrollado técnicas que permiten mantener una alta diversidad en espacios reducidos, en condiciones asépticas y a salvo de los riesgos ambientales que podrían provocar su pérdida (Tyagi et al., 2007). Por ejemplo, embriones y cotiledones de *Arachis retusa* fueron conservados *in vitro* para superar los problemas de baja viabilidad en el almacenamiento de la semilla sexual, debido al alto contenido lipídico (Gagliardi et al., 2007).

2.12. Tipos de conservación *in vitro*

La conservación *in vitro* se puede clasificar, según su duración, en “almacenamiento por corto plazo” (conocido en inglés como “short-term storage”) y en “almacenamiento por largo plazo” (conocido en inglés como “long-term storage”). En el primer tipo, generalmente se utilizan técnicas de cultivo *in vitro* que fomenten el crecimiento reducido, mientras que en el segundo se utiliza principalmente la crioconservación (Cousins y Adelberg, 2008).

2.12.1. Conservación por corto - mediano plazo y principales factores involucrados

En el almacenamiento por corto plazo los explantes permanecen *in vitro* hasta por 12 meses, manejando condiciones de cultivo para retrasar el crecimiento y aumentar los intervalos entre subcultivos (Cousins y Adelberg, 2008).

Como parte de las estrategias empleadas para disminuir el crecimiento de los explantes y aumentar los intervalos entre subcultivos, está el reducir la temperatura de los cuartos de crecimiento, modificar los medios de cultivo y otros factores ambientales que se deben tomar en cuenta para optimizar el almacenamiento (Engelmann, 1991).

A continuación se hará referencia a los principales factores que se deben tomar en consideración para el almacenamiento por corto plazo.

Temperatura

Produce una reducción en la actividad metabólica y, en consecuencia, el crecimiento de los explantes, al disminuir la temperatura de cultivo (Engelmann, 1991). Generalmente se utilizan temperaturas alrededor de los 4 °C para cultivos de clima templado y entre 10 y 15 °C para el germoplasma tropical. El control de la temperatura se combina usualmente con otros factores para lograr un crecimiento reducido. En banano, temperaturas reducidas se han combinado con reducción en la intensidad lumínica o la completa supresión de luz. La propagación vegetativa de los tallos de banano normalmente se realiza a 22 °C con una intensidad lumínica de 3000 lux. Sin embargo, para su almacenamiento por corto plazo, se colocan a 15 °C bajo una intensidad lumínica de 1000 lux (Keller et al., 2006).

Si se mantienen los explantes a temperaturas bajas (inferiores a 4 °C) por períodos prolongados, pueden presentarse daños fisiológicos, causados por el frío, que inciden en cambios en el metabolismo, en el contenido de proteínas, y en la composición y funcionamiento de las membranas (Engelmann, 1991). Estos problemas pueden ser reversibles cuando no hay exposición prolongada a esta condición. Generalmente, las plantas tropicales son sensibles a daños por frío y la temperatura de almacenamiento depende de la sensibilidad particular de cada especie (Engelmann, 1991).

Gangopadhyay et al. (2005) determinaron que la temperatura de almacenamiento óptima para microtallos encapsulados de piña (*Ananas comosus* L.) era de 8 °C para un periodo de 45 a 60 días. En las especies no tropicales, la reducción de temperatura actúa, muchas veces, como señal para romper el estado de reposo de los explantes e inducir la activación de su crecimiento. Además, en ese trabajo, el manejo de la temperatura se combinó con una reducción de los nutrientes disponibles en el medio de cultivo, aspecto que también es de gran importancia, como se discutirá a continuación. Ambas medidas permitieron retardar el proceso de crecimiento y prolongar el almacenamiento.

Medio de cultivo para conservación *in vitro*

La reducción en la concentración de elementos minerales y carbohidratos metabolizables (por ejemplo, sacarosa) en el medio de cultivo puede ser una estrategia importante para la reducción del crecimiento del explante (Engelmann, 1991; Rao, 2004). Otras medidas pueden ser el aumentar el potencial osmótico del medio (especialmente mediante el uso de carbohidratos no metabolizables, como el manitol), el uso de concentraciones mayores de gelificantes, la adición de ciertos reguladores de crecimiento (como el ácido abscísico [ABA]), o de otras sustancias (como el cloruro de magnesio) para reducir daños en el explante. Como consecuencia de las medidas anteriores, el explante absorbe los nutrientes más lentamente y ocurre una reducción en el crecimiento (Engelmann, 1991).

Recipiente de cultivo

El volumen del recipiente de cultivo puede ser determinante para definir la frecuencia de subcultivos y el almacenamiento óptimo de los explantes (Engelmann, 1991; Keller et al., 2006).

Modificación del ambiente gaseoso

La reducción del crecimiento se puede lograr también al disminuir el nivel de oxígeno disponible para los explantes. Sin embargo, bajo esas condiciones de almacenamiento, a menudo se desarrollan tejidos hiperhídricos, necróticos y con crecimiento más lento (Engelmann, 1991). Cabe mencionar que la necrosis de explantes, a causa de la reducción de oxígeno, se ha logrado disminuir al adicionar nitrato de plata, giberelinas, fructuosa, calcio, ácido ascórbico y carbón activado al medio de cultivo (Engelmann, 1991).

Un método para la modificación del ambiente gaseoso consiste en bajar la presión parcial del oxígeno usando atmósferas controladas o disminuyendo la presión atmosférica de la cámara. Esto ha permitido el almacenamiento *in vitro* de especies tropicales sensibles a bajas temperaturas (Engelmann, 1991). Otro método para limitar el nivel de oxígeno disponible es el uso de una capa de aceite mineral o medio líquido para cubrir los explantes (Rao, 2004).

Encapsulación

En la técnica de encapsulación se recubren embriones somáticos, yemas o ápices, con una cubierta gelatinosa, como por ejemplo de alginato de calcio, para formar “semillas sintéticas”. La protección que provee el encapsulamiento confiere, a la vez, resistencia contra la deshidratación y las bajas temperaturas durante el almacenamiento por corto plazo (Mallón et al., 2007).

Por ejemplo, embriones somáticos encapsulados de *Citrus reticulata* Blanco cv. Mandarino Tardivo di Ciaculli se mantuvieron viables por 60 días a 4 °C. En el caso de la papaya (*Carica papaya* L.), la encapsulación de embriones somáticos para el almacenamiento de germoplasma, la producción y la propagación de clones, el fácil manejo, y la facilidad para implementar la automatización a gran escala (Castillo et al., 1998).

2.12.2. Almacenamiento por largo plazo y principales factores involucrados

El almacenamiento por largo plazo es muy seguro por lo que se usa extensivamente en agricultura, horticultura, y forestería para la investigación y el monitoreo ambiental (Benson et al., 2006). Esta técnica permite almacenar semillas (Dussert et al., 2000), meristemas y ápices (Escobar et al., 2000), polen (Inagaki, 2000), células (Reinhoud et al., 2000), callos y suspensiones celulares (Panis et al., 2000). Además, requiere de poco espacio y mantenimiento (Wang et al., 2005).

Se considera que el almacenamiento por largo plazo es una práctica útil para evitar la variación somaclonal en plantas con propagación vegetativa y permite mantener los explantes sin alteración alguna bajo estas condiciones, prácticamente por tiempo indefinido (Engelmann, 1991). Es por esto que el almacenamiento por largo plazo es una alternativa adecuada. Los embriones de café pueden preservarse en nitrógeno líquido (NL) hasta por un año, sin que estos sufran pérdida de viabilidad o alteraciones por variación somaclonal (Kumar et al., 2006). Para el almacenamiento por largo plazo, generalmente se utiliza la

crioconservación, aunque existe también la posibilidad de utilizar otras técnicas de cultivo *in vitro* en condiciones de crecimiento reducido.

La crioconservación permite el almacenamiento de células, tejidos u órganos vegetales vivos a temperaturas extremadamente bajas (-80 °C). Esta técnica permite el almacenamiento durante períodos prolongados (mayores a un año) utilizando NL, el cual normalmente se encuentra a -196 °C. En algunas ocasiones, se combina el NL con otros gases inertes (como el helio y el argón) (Benson et al., 2006).

El nitrógeno líquido se utiliza porque detiene todas las actividades metabólicas, inmediatamente al hacer contacto con el explante (Withers et al., 1990; Engelmann, 1991) y, a la vez, permite que los tejidos conserven la viabilidad sin que ocurran alteraciones fisiológicas (Benson et al. 2006).

El proceso de crioconservación se inicia con el acondicionamiento criogénico, que incluye el enfriamiento (como se describió anteriormente con el uso de temperaturas bajas durante el almacenamiento por corto plazo) y la aplicación de sustancias crioprotectantes, luego el almacenamiento a -80 °C y por último el proceso de recuperación (Pennycooke y Towill, 2000).

El tratamiento con sustancias crioconservantes o crioprotectantes previene el daño por frío en los tejidos al desplazar el agua que se encuentra intra e intercelularmente. Esta remoción de agua evita la ruptura de las membranas en las células (Sant et al., 2008). Estas sustancias crioprotectantes contienen concentraciones altas de sacarosa (0,4 M), glicerol (15%), dimetil sulfóxido (DMSO) (15%), etilenglicol y/o polivinil alcohol (Zhao et al., 2005). Sin embargo, el choque osmótico también pueden tener efectos negativos sobre el tejido, provocando daños después de la descongelación y durante la regeneración (Wang et al., 2005).

Como se destaca en esta revisión de literatura, los bancos de germoplasma *in vitro* son una herramienta útil para la conservación de recursos genéticos de cultivos tropicales de importancia agrícola y alimenticia (Sanchez y Jimenez, 2009).

2.13. Conservación *in vitro* de palma datilera

La conservación *in vitro* contribuye a la conservación de las poblaciones naturales a través de la reintroducción de materiales conservados a su hábitat original (Pence, 2011). Las técnicas de conservación *in vitro*, la crioconservación o almacenamiento en frío, son un excelente sistema para la conservación de los recursos genéticos como por ejemplo para árboles forestales y cultivos hortícolas (Jain, 2011). Además las plántulas *in vitro* están disponibles en cualquier momento del año para su uso o distribución (Hashish et al., 2015).

Una amplia gama de herramientas de conservación están disponibles para la conservación de la biodiversidad vegetal (Reed et al., 2011). Los métodos utilizados para el almacenamiento de germoplasma *in vitro* deben cumplir dos objetivos básicos; mantenimiento durante un período prolongado y la estabilidad de las propiedades genéticas del material almacenado (Ashmore, 1997). El principal objetivo del procedimiento de conservación *in vitro* es el crecimiento lento, consiste en extender el subcultivo desde el período normal (2 a 6 semanas) a un periodo mucho más largo (3 a 12 meses) (Gupta y Mandal, 2003). La supresión del crecimiento puede lograrse mediante distintas modificaciones físicas o químicas del medio de cultivo de tejidos. Puede realizarse mediante la reducción de la temperatura, bajando la intensidad de luz u oscuridad, alterando el medio de cultivo como disminuir el suministro de nutrientes inorgánicos o adicionando agentes osmóticos o con inhibidores del crecimiento (Hassan et al., 2004; Tyagi et al., 2009).

El crecimiento lento lleva a conservar los genotipos vegetales, siendo el germoplasma fácilmente disponible para la regeneración, la multiplicación y además nos permite reducir el número de subcultivos lo cual conduce a un ahorro de dinero (Nogueira et al., 2014).

Varias investigaciones sobre la conservación de germoplasma de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) a partir de embriones somáticos *in vitro* en condiciones de crecimiento lento indican buenos resultados en el almacenamiento de material vegetal (Hassan, 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El estudio se llevó a cabo en los ambientes del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina y con el financiamiento del Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) contrato (N°036-2017-INIA-PNIA-MAESTRÍA).

3.2. Materiales

3.2.1. Material vegetal

El material vegetal empleado (Figura 3) fue embriones somáticos de *Phoenix dactylifera L.* (palma datilera) obtenidos del meristemo (Figura 4) de 4 ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 de hijuelos recolectados por Carrión (2018) de plantas de palma datilera provenientes de la provincia de Ica (Anexo 1).

De acuerdo a las características morfológicas de los 4 ecotipos de la planta se determinó como *Phoenix dactylifera L.* (palma datilera). Debido a que las características morfológicas son similares al ser comparadas con 16 descriptores para palma datilera (Carrión, 2018).

Para la obtención de los embriones somáticos se empleó hijuelos de PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 de 2 a 3 años de edad (Anexo 2), y se empleó el protocolo de introducción *in vitro* y el protocolo de formación de callo *in vitro* obtenido por Carrión (2018).



Figura 3: Embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L) estadio globular y oblongo



Figura 4: Meristemo de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L) en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina

Fuente: Registro de la Investigación.

3.3. Materiales y equipos de laboratorio

3.3.1. Material de vidrio y plástico

- Baguetas
- Botellas de vidrio de 1 L.
- Encendedor
- Jeringa de 1 mL.
- Jarra con medida
- Mechero
- Pipeta de 5 mL.
- Placas Petri
- Probeta de 25, 50 y 1000 mL.
- Frascos de vidrio
- Plástico film

3.3.2. Equipos e instrumentos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fotográfica
- Termo-higrómetro
- Timer (Regulador de fotoperiodo)
- pH-metro
- Micrótopo

3.3.3. Otros materiales

- Agua destilada
- Alcohol 96°
- Benlate

- Detergente Comercial
- Fluorescentes
- Guantes quirúrgicos
- Hipoclorito de sodio
- Hojas Bond
- Guardapolvos
- Mascarillas
- Papel toalla
- Papel Aluminio
- Pinza recta
- Pinza Curva
- Platos metálicos
- Bisturí
- Tijeras

3.3.4. Compuestos químicos

- Macronutrientes de MS (Murashige y Skoog 1962).
- Micronutrientes de MS (Murashige y Skoog 1962).
- Citoquininas (BA, Kinetina, 2ip)
- Auxinas (ANA, 2-4D)
- Tiamina HCL
- Piridoxina
- Ácido Nicotínico
- Glicina
- Myo inositol
- Azúcar
- Manitol
- Carbón activado

- Agar-agar
- Plant Preservative Mixture (PPM)

3.4. Métodos

3.4.1. Formación de callo de palma datilera (*Phoenix dactylifera L*)

Se seleccionó callos de los 4 ecotipos, estos fueron obtenidos de las hojas tiernas que rodean el ápice del meristemo de *Phoenix dactylifera L.* (palma datilera) con las mejores características fenotípicas. Para la obtención del callo indiferenciado (Figura 5), se empleó segmentos de 8-10 mm de longitud aproximadamente (Figura 6) se sembró en el medio de formación de callo *in vitro* obtenido por Hassan et al. (2016) descritos en la Tabla 3. Luego se separó los callos con ayuda de pinzas y bisturí estériles, seguidamente se incubaron por nueve meses en oscuridad total a 27 ± 1 °C, el medio se renovó cada cuatro semanas para producir callos indiferenciados suaves y blancos.



Figura 5: Callo indiferenciado de palma datilera (*Phoenix dactylifera L*)



Figura 6: Hojas del meristemo de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L) empleados en la obtención de callo indiferenciado

Tabla 3: Composición del medio para la formación de callo de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Código	Tratamiento	Componentes
MFC	Medio de formación de callo	Sales y vitaminas de MS + 40g/L de Sacarosa + 2g/L de Carbón activado + 40mg/L de Adenina + 2ml/L de PPM + 10mg/L de 2,4-D + 3mg/L de 2iP + 6g/L de Agar

Fuente: Hassan et al. (2016).

3.4.2. Proliferación de callo *in vitro* de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Para la proliferación de callos *in vitro* (Figura 7) se empleó dos tratamientos y de esta forma se obtuvo la cantidad necesaria de callo indiferenciado de los 4 ecotipos seleccionados, estos medios MPC 1 y MPC2 (Tabla 5) fueron propuestos por Kurup et al. (2014) y Hassan et al. (2016) descritos en la Tabla 4. Para cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones, como se obtuvieron resultados aceptables no fue necesario utilizar una mayor cantidad de explantes.



Figura 7: Callo indiferenciado PD-ECO2 en proliferación a las 3, 6, 9, 12, 15 y 18 semanas de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Tabla 4: Composición del medios para proliferación de callo de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Código	Tratamiento	Componentes
MPC1	Medio de proliferación callo 2 Kurup et al. (2014)	Sales y vitaminas de MS + 30g/L de Sacarosa + 3g/L de Carbón activado + 200mg/L de Caseína hidrolizada + 100mg/L de NaH ₂ PO ₄ + 2ml/L de PPM + 6.7g/L de Agar
MPC2	Medio de proliferación callo 1 Hassan et al. (2016)	Sales y vitaminas de MS + 30g/L de Sacarosa + 1.5g/L de Carbón activado + 100mg/L de L-glutamina + 40mg/L de Adenina + 2ml/L de PPM + 10mg/L de 2,4-D + 3mg/L de 2iP + 6.7g/L de Agar

Fuente: Hassan et al. (2016); Kurup et al. (2014).

Tabla 5: Codificación para los medios de proliferación de callo de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Medio de Cultivo	Código
Kurup et al. (2014) Medio de proliferación callo 2	MPC1
Hassan et al. (2016) Medio de proliferación callo 1	MPC2

3.4.3. Formación de callo embriogénico de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Para la formación de callos embriogénicos se empleó dos tratamientos, se obtuvo callo embriogénico (Figura 8) de los 4 ecotipos seleccionados, estos medios MCE 1 y MCE2 (Tabla 6 y 7) fueron propuestos por Kurup et al. (2014) y Hassan et al. (2016). Para cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones. De la misma forma se realizaron cortes histológicos (Anexo 3) para comprobar el estado de los callos, el protocolo de obtención de las figuras relacionadas a cortes histológicos mostradas en la presente investigación se encuentran en el Anexo 4.

Los callos fueron subcultivados durante tres meses (un mes de intervalo) para renovar el medio MS fresco como la mitad de su composición NH_4NO_3 y las tres cuartas partes de los demás nutrientes importantes, fueron suplementos de sales y se redujo el 2,4-D a 5,0 mg/l para formar una mayor cantidad callos embriogénicos.



Figura 8: Callo embriogénico PD- ECO1 de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Tabla 6: Composición del medios para formación de callo embriogénico de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Código	Tratamiento	Componentes
MCE1	Medio de formación de Callo embriogénico 2 Kurup et al. (2014)	Sales y vitaminas de MS + 30g/L de Sacarosa + 3g/L de Carbón activado + 200mg/L de Caseína hidrolizada + 100mg/L de NaH ₂ PO ₄ + 0.5mg/L de ANA + 0.25mg/L de BAP + 2ml/L de PPM + 6.7g/L de Agar
MCE2	Medio de formación de Callo embriogénico 1 Hassan et al. (2016)	Sales y vitaminas de MS modificadas + 45g/L de Sacarosa + 1.5g/L de Carbón activado + 100mg/L de L-glutamina + 40mg/L de Adenina + 2ml/L de PPM + 5mg/L de 2,4-D + 3mg/L de 2iP + 6.7g/L de Agar

Fuente: Hassan et al. (2016); Kurup et al. (2014).

Tabla 7: Codificación para los medios de formación de callo embriogénico de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Medio de Cultivo	Código
Kurup et al. (2014) Medio de formación de Callo embriogénico 2	MCE1
Hassan et al. (2016) Medio de formación de Callo embriogénico 1	MCE2

3.4.4. Inducción de embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Los callos embriogénicos de los 4 ecotipos se transfirieron al mismo medio (Tabla 8) compuesto por MS como la mitad de su composición y las tres cuartas partes de los demás nutrientes sin la adición de reguladores de crecimiento y se incubó a 27±2 °C en oscuridad total durante dos meses y de esta forma se logró obtener embriones somáticos de palma datilera. Los embriones somáticos (Figura 9) fueron subcultivados en MES (Tabla 9) con la mitad de componentes del medio MS con la adición de 0,5 mg/l de BA, 0.5 mg/L de kinetina, 40 g/l de sacarosa, 1,0 g/l de carbón activado con 6,0 g/l de agar y se realizaron tres

subcultivos (tres semanas de intervalo). Después de este período, se obtuvo la cantidad necesaria de embriones somáticos *in vitro* de los 4 ecotipos estos fueron empleados para los ensayos experimentales de conservación *in vitro* y de esta forma inducir su crecimiento lento. De la misma forma se realizaron cortes histológicos para evaluar los estadios de los embriones se trabajó con 3 estadios (globular, oblongo y corazón). El protocolo de obtención de los cortes histológicos se encuentra en el Anexo 4.

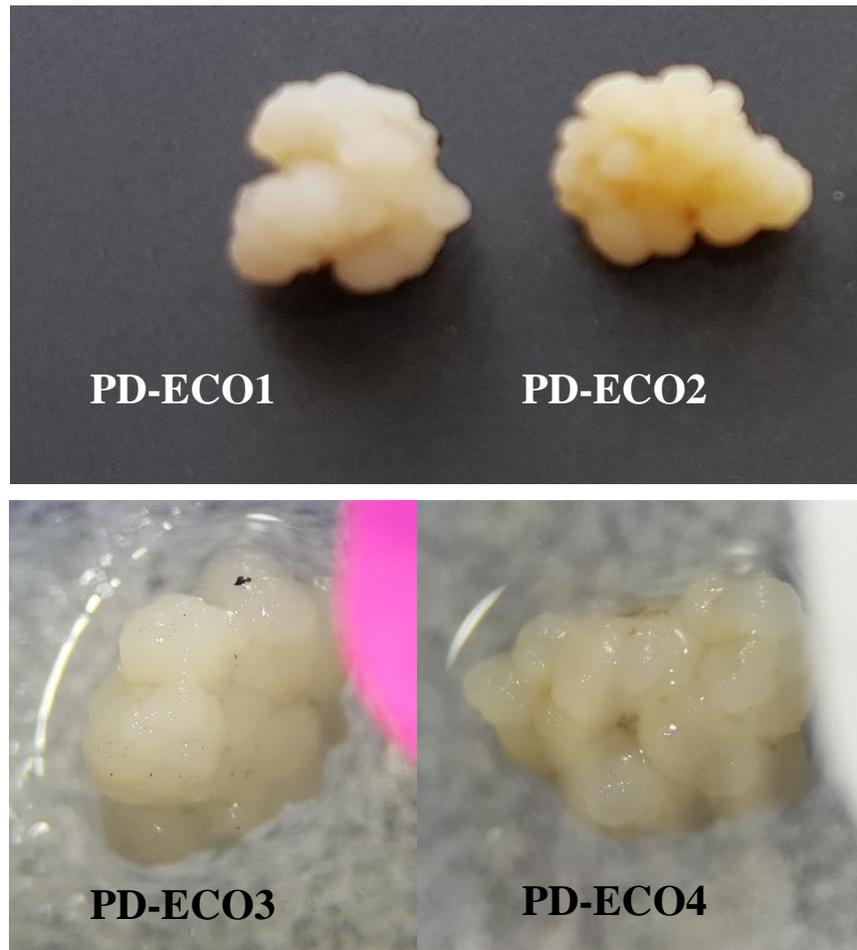


Figura 9: Embriones somáticos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Tabla 8: Composición del medio para formación de embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Código	Tratamiento	Componentes
MES1	Medio de embriones somáticos 1 Hassan et al. (2016)	Sales y vitaminas de 1/2MS + 45g/L de Sacarosa + 1g/L de Carbón activado + 100mg/L de L-glutamina + 40mg/L de Adenina + 2ml/L de PPM + 0.5mg/L de BA + 0.5mg/L de Kinetina + 6.7g/L de Agar

Fuente: Hassan et al. (2016).

Tabla 9: Codificación para el medio de formación de embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Medio de Cultivo	Código
Hassan et al. (2016) Medio de embriones somáticos 1	MES1

3.4.5. Preparación de los medios de cultivo *in vitro*

Cada uno de los diferentes tratamientos propuestos en la presente investigación fue preparado en la Sala de medios del laboratorio del Instituto de biotecnología – Área de cultivo de Tejidos Vegetales utilizando macronutrientes y micronutrientes requeridos por cada tratamiento. Cada uno de los macro y micronutrientes fueron pesados y diluidos en agua destilada, al igual que las vitaminas, hormonas y sacarosa.

El pH de los medios fue calibrado en el pHmetro a 5.7. Se utilizaron Hidróxido de potasio (KOH) y Ácido clorhídrico (HCL) para la calibración. Esta se hizo previa a la adición del agar. Luego de haber sido calibrados, se agregó el agar y se calentó en microondas por 10 minutos, después se removió con una bagueta y se volvió a calentar en microondas por 5 minutos hasta que el agar este bien disuelto.

Los medios de cultivo fueron vertidos en la cámara de flujo laminar en placas Petri (Figura 10) luego de ser esterilizados en botellas de vidrio pirex tapadas con papel aluminio. Una vez llenas las botellas se llevaron a la sala de autoclavado para la respectiva esterilización, ésta se hizo a 125°C y 15psi por un tiempo de 25 minutos. Posterior a la esterilización se sellaron con papel film y se almacenaron en la sala de medios de cultivo.

Se esperó mínimo 7 días para poder utilizar los medios de cultivo, Se realizó esto para observar si aparecía algún agente patógeno que podría interferir y perjudicar las evaluaciones o al medio de cultivo.



Figura 10: Preparación de medios de cultivo *in vitro* de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

De acuerdo al desarrollo de los embriones somáticos de palma datilera se observó que estaban aptos para poder realizar las pruebas de conservación *in vitro*, se procedió a pasar a esta etapa de la investigación. Estas pruebas servirán para aumentar el conocimiento y

orientar la investigación en el protocolo de conservación *in vitro* de palma datilera. Se probó ocho diferentes tratamientos. Los medios de cultivo de conservación *in vitro* usados fueron los siguientes:

3.4.6. Tratamientos de conservación *in vitro*: crecimiento lento de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Se aplicaron 8 tratamientos (Tabla 10), con medios MS y MS 1/2 suplementado con distintas cantidades de sacarosa, manitol y ABA todos tuvieron la misma cantidad de 6,0 g/l de agar. El ABA se esterilizó por filtración y se añadió al medio después del autoclave y enfriamiento a 40°C. Se empleó grupos de embriones somáticos (8-10 embriones somáticos para cada uno) se utilizó PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 como material para la conservación *in vitro*. Las placa Petri de cultivo de cada tratamiento fueronn incubados a 18°C a una intensidad de luz baja durante toda la duración de conservación de 2, 4, 6 y 8 meses. Se utilizaron 5 repeticiones por tratamiento en placas Petri.

Tabla 10: Composición de medios de cultivo para conservación *in vitro* de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Tratamiento	Componentes
Medio de conservación 1	Sales y vitaminas de MS + 30g de Sacarosa + 2g/L de PPM
Medio de conservación 2	Sales y vitaminas de MS + 60g/L de Sacarosa + 2ml/L de PPM
Medio de conservación 3	Sales y vitaminas de MS + 40g/L de Manitol + 2ml/L de PPM
Medio de conservación 4	Sales y vitaminas de ½ MS + 30g/L de Sacarosa + 2ml/L de PPM
Medio de conservación 5	Sales y vitaminas de ½ MS + 60g/L de Sacarosa + 2ml/L de PPM
Medio de conservación 6	Sales y vitaminas de ½ MS + 40g/L de Manitol + 2ml/L de PPM
Medio de conservación 7	Sales y vitaminas de MS + 40g/L de Sacarosa + 1g/L ABA 2ml/L de PPM
Medio de conservación 8	Sales y vitaminas de MS + 40g/L de Sacarosa + 2g/L ABA 2ml/L de PPM

Tabla 11: **Codificación para el medio de conservación de embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)**

Tratamiento	Código
Medio de conservación 1	MC1
Medio de conservación 2	MC2
Medio de conservación 3	MC3
Medio de conservación 4	MC4
Medio de conservación 5	MC5
Medio de conservación 6	MC6
Medio de conservación 7	MC7
Medio de conservación 8	MC8

3.4.7. Recuperación de embriones de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L) después de la conservación *in vitro* a 2, 4, 6 y 8 meses

Después de 2, 4, 6 y 8 meses, los 4 ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 de embriones somáticos de palma datilera se transfirieron a medio de multiplicación MES1 con el fin de evaluar su viabilidad (porcentaje de viabilidad) después de cada período de conservación *in vitro*, también se evaluó la regeneración (porcentaje de recuperación) será definida como el porcentaje de germinación de embriones somáticos o formación de embriones secundarios, se registró los datos obtenidos para cada tratamiento y ecotipo.

3.5. Parámetros evaluados

3.5.1. Tratamiento de formación de callo de palma datilera

En esta primera parte de la investigación se realizó las evaluaciones para cada ecotipo PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 al cabo de 4 semanas después de introducir el material vegetal de palma datilera y se evaluó lo siguiente:

- Porcentaje de viabilidad del explante para la formación de callo de palma datilera.
- Porcentaje de formación de callo de palma datilera.

Para esta evaluación de formación del callo se trabajó bajo un diseño completamente al azar con un tratamiento y cinco repeticiones, se trabajó con un diseño completamente al azar con un análisis de varianza para comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) previa transformación angular ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos.

3.5.2. Tratamientos de proliferación de callo indiferenciado de palma datilera

En esta primera parte de la investigación se hicieron las evaluaciones para cada ecotipo PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 al cabo de 4 semanas después de introducir el material vegetal (callo indiferenciado) de Palma datilera y se evaluó lo siguiente:

- Porcentaje de viabilidad de callo indiferenciado de palma datilera
- Porcentaje de formación de callo indiferenciado de palma datilera.

Para esta evaluación de proliferación del callo se trabajó bajo un diseño completamente al azar con dos tratamientos y cinco repeticiones, se trabajó con un diseño completamente al azar con un análisis de varianza para comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) previa transformación angular ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos.

3.5.3. Tratamientos de formación de callo embriogénico de palma datilera

Seguidamente se realizaron las evaluaciones en la formación de callo embriogénico de los 4 ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 al cabo de 4 semanas después de haber formado callo indiferenciado de palma datilera y se evaluó lo siguiente:

- Porcentaje de viabilidad de callo embriogénico de palma datilera.
- Porcentaje de formación de callo embriogénico de palma datilera.

Para esta evaluación de formación de callo embriogénico se trabajó bajo un diseño completamente al azar con dos tratamientos y cinco repeticiones, se trabajó con un diseño

completamente al azar con un análisis de varianza para comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) previa transformación angular ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos. .

3.5.4. Tratamientos de inducción de embriones somáticos de palma datilera

Se hicieron las evaluaciones en la inducción de embriones somáticos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 de los 4 ecotipos al cabo de 6 semanas después de haber formado callo embriogénico de palma datilera y se evaluó lo siguiente:

- Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos estadios (globular, oblongo y corazón) de palma datilera.
- Porcentaje de formación de embriones somáticos estadios (globular, oblongo y corazón) de palma datilera.

Para esta evaluación de formación de embriones somáticos se trabajó bajo un diseño completamente al azar con un tratamiento y cinco repeticiones, se trabajó con un diseño completamente al azar con un análisis de varianza para comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) previa transformación angular ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos.

3.5.5. Tratamientos de conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera

En la última parte de la investigación y las más importante por ser el objetivo principal se hicieron las evaluaciones al cabo de 2, 4, 6 y 8 meses después de conservar *in vitro* embriones somáticos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 de palma datilera de ecotipos y se evaluó lo siguiente:

- Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de palma datilera.
- Porcentaje de regeneración de embriones somáticos de palma datilera.

La evaluación se realizó al cabo de 2, 4, 6 y 8 meses que los embriones permanecieron en conservación, se trabajó bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial (4x8) con ocho tratamientos y cinco repeticiones por cada tratamiento, se trabajó con un análisis de varianza para comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) previa transformación angular ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 12: Valores de las variables cualitativas

Callo	Viabilidad
No hay presencia de callo indiferenciado	Callo indiferenciado muerto
Hay presencia de callo indiferenciado	Callo indiferenciado vivo
No hay presencia de callo embriogénico	Callo embriogénico muerto
Hay presencia de callo embriogénico	Callo embriogénico vivo
No hay embriones somáticos	Embriones somáticos muertos
Si hay embriones somáticos	Embriones somáticos muertos

NCI: No hay callo indiferenciado; SCI: Hay Callo indiferenciado; NCE: No hay callo embriogénico; SCE: No hay callo embriogénico; NES; No hay embriones somáticos; SES: Si hay embriones somáticos; CIM: Callo indiferenciado muerto; CIV: Callo indiferenciado vivo; CEM: Callo embriogénico muerto; CEV: Callo embriogénico vivo; ESM: Embrión somático muerto; ESV: Embrión somático vivo.

3.6. Análisis estadísticos

En las investigaciones donde se aplican técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*, generalmente se emplea el diseño completamente al azar (DCA), puesto que el material experimental empleado es homogéneo (por ejemplo se puede determinar cuál es el mejor medio de cultivo para meristemas, callos, anteras, hojas, embriones, óvulos, etc.) (Balzarini et al., 2011).

La presente investigación fue conducida con un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial (4x8) para la conservación *in vitro*, a un nivel de significancia $\alpha=0,05$. La comparación entre medias de los tratamientos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Tukey al 95 % de confianza previa transformación angular ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos.

3.6.1. Tratamientos de medios de cultivo

En los casos de las fases de proliferación de callo indiferenciado, formación de callo embriogénico, inducción de embriones somáticos y conservación *in vitro* (Tabla12) se realizó el análisis de varianza a un nivel de significancia del 95% y en los resultados donde se encontró diferencia significativa se sometieron a una prueba no paramétrica de Tukey con un nivel de significancia del 95% previa transformación angular ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos.

El análisis estadístico del presente trabajo se llevó a cabo con el software estadístico InfoStat versión 2016.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Formación de callo de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

En esta primera parte de la investigación se probó el medio MFC propuesto por Hassan et al. (2016). Los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 fueron sometidos al tratamiento para formar callo de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L). El establecimiento de los explantes se realizó durante los meses de verano. Como menciona Corrales (2017), en el cultivo *in vitro* de explantes; la estación otoño o invierno, reporta una mayor efectividad.

En esta etapa hay que considerar que los explantes empleados se encuentran en contacto con el medio y las condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos luego de las evaluaciones se pueden observar en las tablas 13, 14, 15, 16, 17 y 18 y figuras 11, 12, 13, 14 y 15.

Se consideró a los explantes de palma datilera con presencia de callo indiferenciado, en los cuales se vio el crecimiento de callo, indicando que el tratamiento empleado fue efectivo para inducir a la formación de callos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4.

4.1.1. Viabilidad de explante

Como se explicó en el punto 3.4.1. el porcentaje de viabilidad es importante; hay que tener en cuenta la sobrevivencia de los explantes de palma datilera, ya que al ser sometidos a un medio que cambiará sus condiciones de crecimiento para formar callo, en los resultados se puede tener un elevado porcentaje de formación de callo como los obtenidos con el MFC, pero si la viabilidad es baja entonces no será adecuado. Pero como se reporta en los resultados a continuación fue el tratamiento MFC tuvo mayor número de explantes vivos.

En la Tabla 13 y Figura 11 se pueden observar los resultados obtenidos para la viabilidad de explantes de palma datilera al cabo de dos meses. Los explantes que han sido considerados

como sobrevivientes a los efectos del tratamiento, son aquellos que mantuvieron intacta su capacidad de poder crecer y desarrollar callo en el medio de cultivo MFC.

Tabla 13: Porcentaje de viabilidad de explantes de palma datilera

Ecotipo	N° Explantes vivos	% Viabilidad
PD-ECO1	5	100
PD-ECO2	4	80
PD-ECO3	5	100
PD-ECO4	5	100

Como se observa en la Tabla 13 y Figura 11, el tratamiento empleado presentó mayor viabilidad de explantes, al presentar un mayor número de explantes vivos. Las principales causas de muerte que se observaron durante las evaluaciones y durante todo el desarrollo de la fase experimental de esta investigación fueron la necrosis de los tejidos vegetales de palma datilera ocasionados por manejo o factores ambientales, en este caso se debe al efecto del medio sobre el explante al tratarse de una embriogénesis, las células sufren un estrés al cambio en sus condiciones de crecimiento normal lo que provoca su muerte.

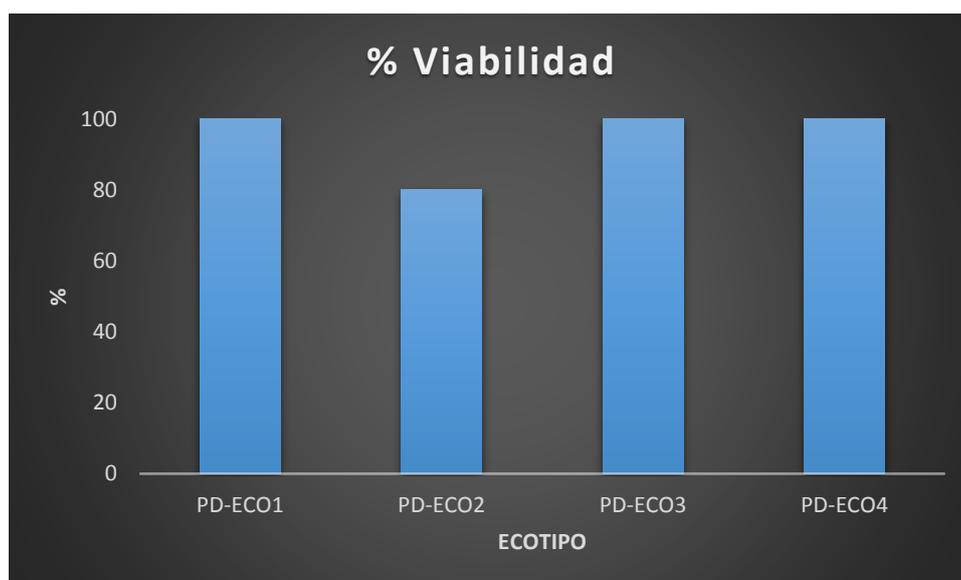


Figura 11: Porcentaje de viabilidad de explantes de ecotipos de palma datilera

Los resultados obtenidos respecto a la viabilidad de callos de palma datilera, se observan en la Figura 12, el medio MFC fue el medio de cultivo con el que se obtuvo callos en los 4 ecotipos. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% de viabilidad en PD-ECO1, PD-ECO3 Y PD-ECO4 de callos, mientras un 80% de viabilidad en PD-ECO2.

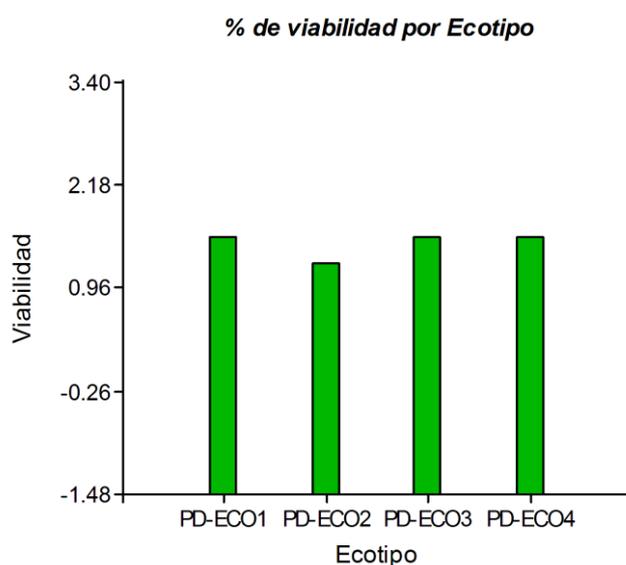


Figura 12: Gráfico de barras de porcentaje de viabilidad de callo de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera por el tratamiento MFC

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 5 y Anexo 6 se muestra el análisis de varianza realizado para la viabilidad. Se utilizaron los datos obtenidos a los 60 días de sembrados los explantes de palma datilera. Como el valor de p fue mayor a 0.05; esto nos indica que no hay una diferencia significativa entre los cuatro ecotipos probados en esta fase de la investigación.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se confirma que los cuatro ecotipos responden de igual forma para el medio MFC, al cabo de 6 semanas (Figura 13).

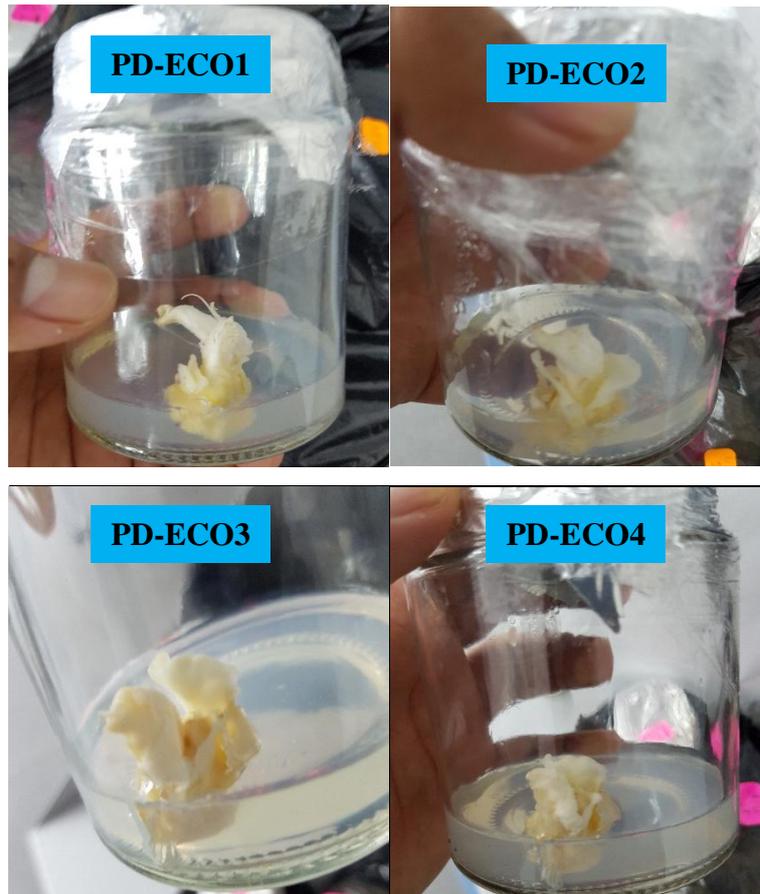


Figura 13: Imágenes de los explantes de ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 después de 30 días

También se puede mencionar que la palma datilera ha obtenido un resultado de viabilidad aceptable en los 4 ecotipos. En otros estudios realizados por Mouaad et al. (2017) en palma datilera se reporta hasta un 80% de viabilidad después de 6 meses

Otro factor que puede influenciar en la viabilidad de explantes de palma datilera es la edad del explante. Marulanda et al. (2005) evaluaron la edad fisiológica donde se mostró que explantes jóvenes mostraron un mayor porcentaje de formación de callo. Por esa razón, en este trabajo se usaron hojas tiernas del meristemo de palma datilera, con la intención de que la viabilidad y formación de callo sea mayor.

4.1.2. Formación de callo

Como se explicó en el punto 3.4.2. en la etapa de formación de callo *in vitro* se evaluó la presencia de callos en los explantes de palma datilera ya que es importante; para los objetivos de la investigación, con esto se está comprobando los efectos de las fitohormonas

empleadas, no es un objetivo de este trabajo generar callos pero se explicara a continuación los resultados obtenidos.

En la Tabla 16 se pueden observar los resultados obtenidos para la presencia de callos en los explantes de palma datilera al cabo de dos meses. Los explantes que han sido considerados con presencia de callo SCI, o ausencia de callo NCI generados por los efectos del medio de cultivo.

Tabla 14: Presencia de callos en los explantes de palma datilera

Tratamiento	Ecotipo	N° Explantes	N° Explantes con presencia de callo	N° Explantes sin presencia de callo
MFC	PD-ECO1	5	5	0
MFC	PD-ECO2	5	4	1
MFC	PD-ECO3	5	5	0
MFC	PD-ECO4	5	4	1

Como se observa el tratamiento empleado, presento callos en todos los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 y las repeticiones. Como se muestra la predominancia de la presencia de callos (SCI) fue de un 100% en PD-ECO1 y PD-ECO3 respectivamente. En PD-ECO2 y PD-ECO4 se obtuvo la presencia de un 80% de callo de palma datilera.

La principal causa de la presencia de callos en explantes de palma datilera se debe a la fitohormona 2,4-D como reporta Hassan et al. (2016) al agregar al medio se logró obtener callos lo cual se comprueba en esta investigación ya que el medio MFC es el único empleado en la formación de callo de palma datilera.

Los resultados obtenidos respecto a la formación de callos de palma datilera, se observan en la Figura 14, el medio basal de MFC fue el medio de cultivo con el que se obtuvo callos en los 4 ecotipos. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% en la formación de callos.

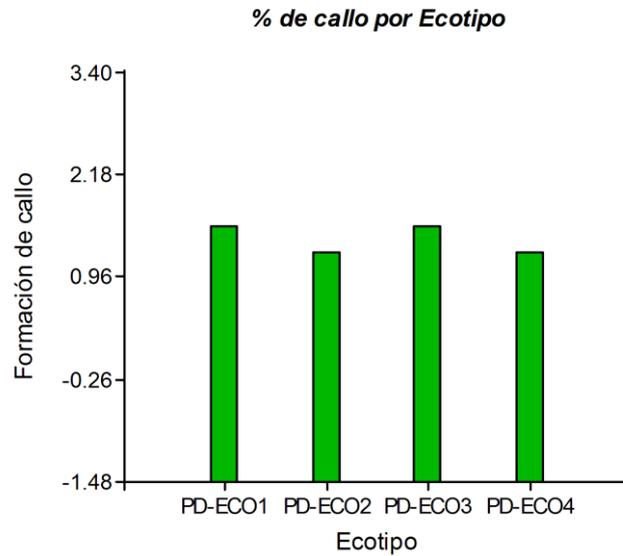


Figura 14: Gráfico de barras de porcentaje de formación de callo de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera por el tratamiento MFC

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 7 y Anexo 8 se muestra el análisis de varianza realizado para esta variable. Se utilizaron los datos obtenidos a los 60 días de sembrados los explantes de palma datilera. Como el valor de p fue mayor a 0.05; esto nos indica que no hay una diferencia significativa entre los cuatro ecotipos probados en esta fase de la investigación.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se confirma que los cuatro ecotipos responden de igual forma para el medio MFC, que si presenta una buena formación de los callos de Palma datilera al cabo de 6 semanas (Figura 15).

En otra investigación en la formación de callo empleando sales de MS suplementadas con 45uM de 2,4-D y 4.5uM de 2iP se obtuvo promedios de 86% de formación de callo (Mouaad el al. 2017).

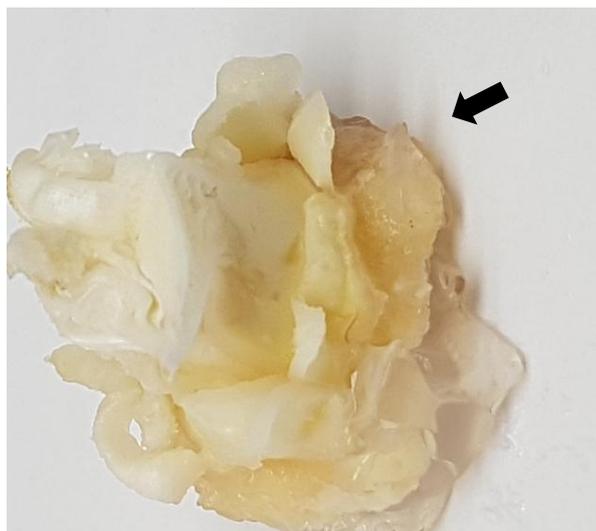


Figura 15: Formación de callo en el ecotipo PD-ECO3 a las seis semanas

Fuente: Registro de la Investigación.

4.2. Proliferación de callo *in vitro* de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Siguiendo con los resultados de la investigación se probó dos tratamientos para poder obtener la cantidad necesaria de callo indiferenciado de los 4 ecotipos seleccionados, estos medios MPC1 y MPC2 fueron propuestos por Kurup et al. (2014) y Hassan et al. (2016). Los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 fueron sometidos a los tratamientos de proliferación para formar callo *in vitro* de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L).

En esta etapa hay que considerar que los explantes empleados se encuentran en contacto con el medio y las condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos luego de las evaluaciones se pueden observar en las tablas 19, 20, 21, 22, 23 y 24; figuras 16, 17, 18 y 19.

Se consideró a los explantes de palma datilera con proliferación de callo indiferenciado, a los explantes que aumentaron la cantidad de callo inicial, indicando que el tratamiento empleado fue efectivo para inducir a la formación de callos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4.

4.2.1. Viabilidad de explante

Como se explicó en el punto 3.4.3. el porcentaje de viabilidad es importante, hay que tener en cuenta la sobrevivencia de los explantes de palma datilera, ya que depende de esta para

la posterior formación de embriones, como se reporta los resultados a continuación fue el tratamiento 2 propuesto por Hassan et al. (2016) que tuvo mayor número de explantes vivos. En la Tabla 19 y Figura 16 se pueden observar los resultados obtenidos para la viabilidad de explantes de palma datilera al cabo de un mes y medio de ser sometidos a proliferación en los 2 tratamientos. Los explantes que han sido considerados como sobrevivientes a los efectos del tratamiento, son aquellos que mantuvieron intacta su capacidad de poder crecer y desarrollarse formando callo en el medio de cultivo.

Tabla 15: Porcentaje de viabilidad de explantes de palma datilera

Ecotipo	Medio	N° Explantes vivos	% Viabilidad
PD-ECO1	MPC1	3	60
PD-ECO2	MPC1	4	80
PD-ECO3	MPC1	4	80
PD-ECO4	MPC1	4	80
PD-ECO1	MPC2	5	100
PD-ECO2	MPC2	5	100
PD-ECO3	MPC2	4	80
PD-ECO4	MPC2	5	100

Como se observa en la Tabla 19 y Figura 16, el tratamiento 2 empleado presentó mayor viabilidad de explantes, al presentar un mayor número de explantes vivos, hasta un 100% de viabilidad. Las principales causas de muerte que se observaron durante las evaluaciones y durante todo el desarrollo de la fase experimental de esta investigación fueron la necrosis de los tejidos vegetales de palma datilera ocasionados por manejo o factores ambientales.

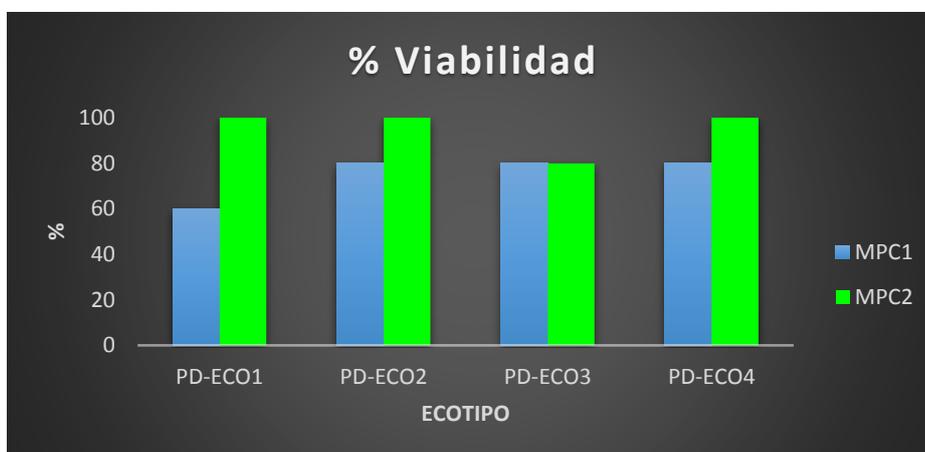


Figura 16: Porcentaje de viabilidad de proliferación de callo de ecotipos de palma datilera

Los resultados obtenidos respecto a la viabilidad en la proliferación de callos de palma datilera, se observan en la Figura 17, el medio MPC2 fue el medio de cultivo con el que se obtuvo una mayor viabilidad de callos en los 4 ecotipos. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan en MPC1 promedios de hasta un 80% de viabilidad en PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4, mientras un 60% de viabilidad en PD-ECO1. Para el medio MPC2 se presenta promedios de hasta un 100% de viabilidad en PD-ECO1, PD-ECO2 y PD-ECO4 de callos, mientras un 80% de viabilidad en PD-ECO3.

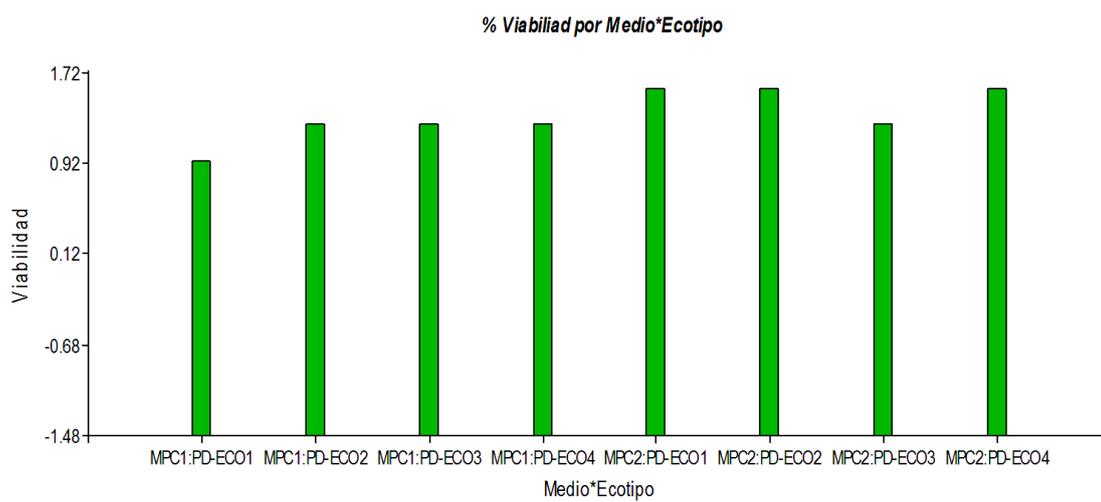


Figura 17: Gráfico de barras de porcentaje de viabilidad en la proliferación de callo de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera por los tratamientos MPC1 y MPC2

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 9 y Anexo 10 se muestra el análisis de varianza realizado para la viabilidad. Se utilizaron los datos obtenidos a los 45 días de sembrados los explantes de palma datilera. Como el valor de p fue mayor a 0.05; esto nos indica que no hay una diferencia significativa entre los cuatro ecotipos y los 2 medios MPC1 y MPC2 probados en esta fase de la investigación.

Para determinar la diferencia de los ecotipos frente al medio MPC1 y al medio MPC2 se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se confirma que la

viabilidad de los cuatro ecotipos responde de igual forma los 2 tratamientos MPC1 y MPC2, al cabo de 6 semanas. Pero se evidencio que el medio MPC2 respondió de mejor forma en la viabilidad de los ecotipos comparado con el medio MPC1 (Figura 18).

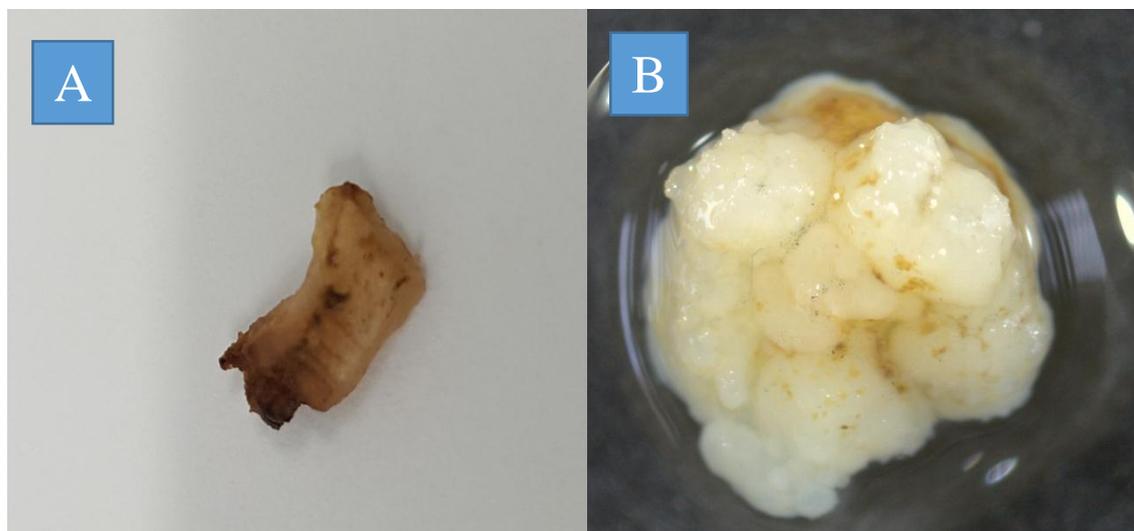


Figura 18: Imagen A donde aprecia tejido de palma datilera PD-ECO2 necrosado; Imagen B donde se aprecia callo PD-ECO2 en proliferación después de seis semanas

Abdullatif y Suliman (2016) reportan el efecto de las fitohormonas en la multiplicación de callos de palma datilera, demostraron que la combinación de BAP y 2iP promueven significativamente la formación de callo, demostraron buenos resultados empleando las concentración de 1mg/L de BAP y 1mg/L de 2iP en la formación de callos de palma datilera.

4.2.2. Formación de callo

Como se explicó en el punto 3 en la etapa de proliferación de callo *in vitro* se evaluó el crecimiento de los callos en los explantes de palma datilera ya que mediante estos obtuvimos los embriones somáticos necesarios en la investigación, con estos se está comprobando los efectos de las fitohormonas empleadas, no es un objetivo de este trabajo proliferar callos pero se explicara a continuación los resultados obtenidos.

En la Tabla 22 se pueden observar los resultados obtenidos para la proliferación de callos en los explantes de palma datilera al cabo de un mes. Los explantes que han sido considerados con presencia de callo SCI, o ausencia de callo NCI generados por los efectos del medio de cultivo.

Tabla 16: Proliferación de callos en los explantes de palma datilera

Ecotipo	Tratamiento	N° Explantes	N° Explantes con presencia de callo	N° Explantes sin presencia de callo
PD-ECO1	MPC1	5	3	2
PD-ECO2	MPC1	5	4	1
PD-ECO3	MPC1	5	3	2
PD-ECO4	MPC1	5	4	1
PD-ECO1	MPC2	5	5	0
PD-ECO2	MPC2	5	5	0
PD-ECO3	MPC2	5	4	1
PD-ECO4	MPC2	5	5	0

Como se observa en los tratamientos empleados presentan callos en todos los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4. Como se muestra la predominancia de la presencia de callos (SCI) fue de un 80% en el medio MPC1 en los ecotipos PD-ECO2 y PD-ECO4 y de un 60% en los ecotipos PD-ECO1 y PD-ECO3; para el medio MPC2 se obtuvo un 100% en los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2 y PD-ECO4 respectivamente. En PD-ECO3 se obtuvo la presencia de un 80% de callo de palma datilera, debido a que una repetición se necroso, posiblemente debido al manejo del material o variaciones en la condiciones de laboratorio.

La principal causa de la proliferación de callos en explantes de palma datilera se debe a la fitohormona 2,4-D como reporta Hassan et al. (2016) al agregar al medio se logró obtener callos lo cual se comprueba en esta investigación ya que el medio MPC2 es el que se empleó en la formación de callo de palma datilera.

Los resultados obtenidos respecto a la proliferación de callos de palma datilera, se observan en la Figura 19, el medio MPC2 fue el medio de cultivo con el que se obtuvo una mayor proliferación de callos en los 4 ecotipos. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% en la formación de callos.

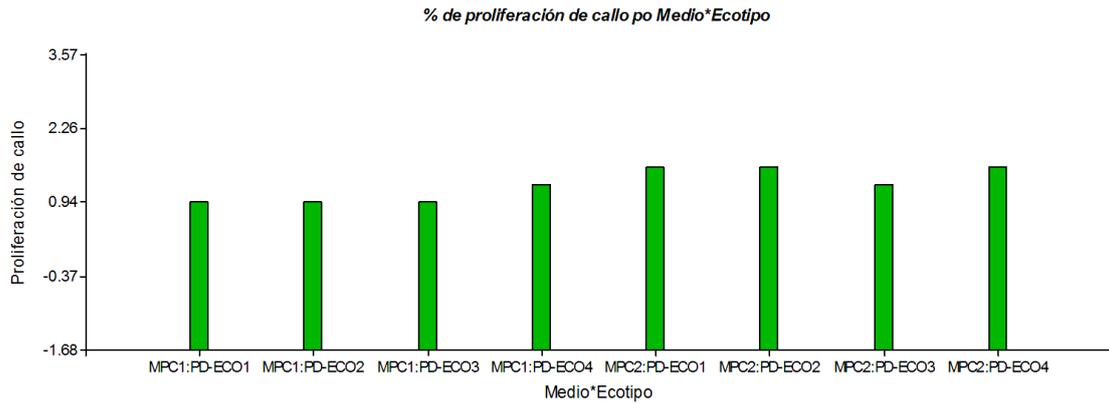


Figura 19: Gráfico de barras de porcentaje de proliferación de callo de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera en los medios MPC1 y MPC2

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 11 y Anexo 12 se muestra el análisis de varianza realizado para esta variable. Se utilizaron los datos obtenidos a los 45 días de sembrados los callos de palma datilera. Como el valor de p fue mayor a 0.05 en Ecotipo y en Medio*Ecotipo; esto nos indica que no hay una diferencia significativa entre los cuatro ecotipos probados en esta fase de la investigación, pero para el caso de medio si hay una clara diferencia entre los 2 tratamientos probados con un p menos a 0.05.

Para determinar la diferencia de los ecotipos frente a los medios MPC1 y MPC2 se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Como los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa en los medios empleados en la proliferación de callos de palma datilera al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se confirma que los cuatro ecotipos responden de igual forma en la proliferación de callos mientras que si hay un diferencia entre los medios MPC1 y MPC2, el segundo presento una mejor proliferación de los callos de palma datilera al cabo de 6 semanas.

Los nutrientes, minerales y fitohormonas son los componentes básicos del cultivo de tejidos vegetales. Determinan cuán rápido crecerá el tejido vegetal utilizado y la respuesta morfológica de este, se verán fuertemente influenciados por la concentración de los nutrientes que se les suministren al medio de cultivo. Además, la elección de un medio de cultivo depende principalmente de la especie a ser trabajada, del tipo de tejido vegetal u órgano vegetal a ser cultivado y del propósito del experimento (Dodds y Roberts, 1995).

Naik y Al-Khayri (2016) emplearon medio semisólido en la proliferación de callo de palma datilera compuesto por 30g/L de sacarosa, 6mg/L de 2iP, 10mg/L de NAA y 1.5g/L de carbón activado.

4.3. Formación de callo embriogénico de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Continuando con los resultados de la investigación se probó dos tratamientos para poder transformar el callo indiferenciado a callo embriogénico el cual es el único que forma embriones somáticos y de esta forma se pudo obtener la cantidad necesaria de callo embriogénico de los 4 ecotipos seleccionados, estos medios MCE1 y MCE2 fueron propuestos por Kurup et al. (2014) y Hassan et al. (2016). Los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 fueron sometidos a los tratamientos de formación de callo embriogénico para formar callo embriogénico *in vitro* de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L).

En esta etapa hay que considerar que los explantes empleados se encuentran en contacto con el medio y las condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos luego de las evaluaciones se pueden observar en las tablas 25, 26, 27, 28, 29 y 30; figuras 20, 21, 22 y 23.

Se consideró a los explantes de palma datilera con formación de callo embriogénico, a los obtenidos en los 2 tratamientos propuestos, indicando que ambos tratamientos empleados fueron efectivos para la formación de callos embriogénicos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4.

4.3.1. Viabilidad de callo embriogénico

Como se explicó en el punto 3.4.4. el porcentaje de viabilidad es importante, hay que tener en cuenta la sobrevivencia de los callos de palma datilera, ya que depende de esta etapa la

posterior formación de embriones somáticos, como se reporta los resultados a continuación fueron ambos tratamientos con MCE1 y MCE2 propuestos por Kurup et al. (2014) y Hassan et al. (2016), con los cuales se tuvo mayor número de explantes vivos.

En la Tabla 25 y Figura 20 se pueden observar los resultados obtenidos para la viabilidad de explantes de palma datilera al cabo de un mes de ser sometidos a formación de callo embriogénico en los 2 tratamientos. Los explantes que han sido considerados como sobrevivientes a los efectos del tratamiento, son aquellos que mantuvieron intacta su capacidad de poder crecer y desarrollar callo embriogénico en el medio de cultivo.

Tabla 17: Porcentaje de viabilidad de explantes de palma datilera

Ecotipo	Medio	N° Explantes vivos	% Viabilidad
PD-ECO1	MCE1	5	100
PD-ECO2	MCE1	4	80
PD-ECO3	MCE1	4	80
PD-ECO4	MCE1	5	100
PD-ECO1	MCE2	5	100
PD-ECO2	MCE2	5	100
PD-ECO3	MCE2	5	100
PD-ECO4	MCE2	4	80

Como se observa en la Tabla 25 y Figura 20, los tratamientos empleados presentaron una buena viabilidad de explantes, al presentar un mayor número de explantes vivos, hasta un 20% de muerte.

Las principales causas de muerte que se observaron durante las evaluaciones y durante todo el desarrollo de la fase experimental de esta investigación fueron la necrosis de los tejidos vegetales de palma datilera ocasionados por manejo o factores ambientales.

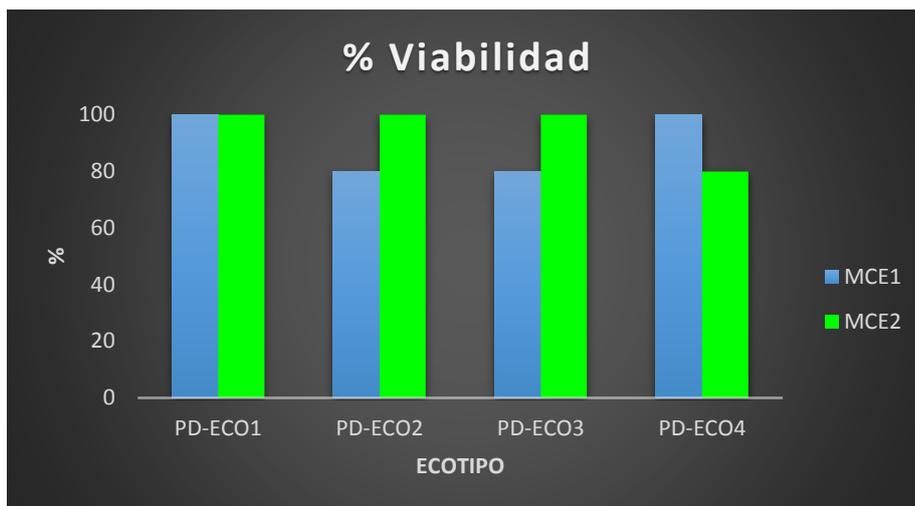


Figura 20: Porcentaje de viabilidad de callo embriogénico de ecotipos de palma datilera

Los resultados obtenidos respecto a la viabilidad en la formación de callos embriogénicos de Palma datilera, como se observan en la Figura 21, los medios MCE1 y MCE2 fueron los medios de cultivo con los que se obtuvo una mayor viabilidad de callos embriogénicos en los 4 ecotipos. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan en MCE1 promedios de hasta un 100% de viabilidad en PD-ECO1 y PD-ECO4, mientras un 80% de viabilidad en PD-ECO2 y PD-ECO3. Para el medio MCE2 se presenta promedios de hasta un 100% de viabilidad en PD-ECO1, PD-ECO2 y PD-ECO3 de callos, mientras un 80% de viabilidad en PD-ECO4.

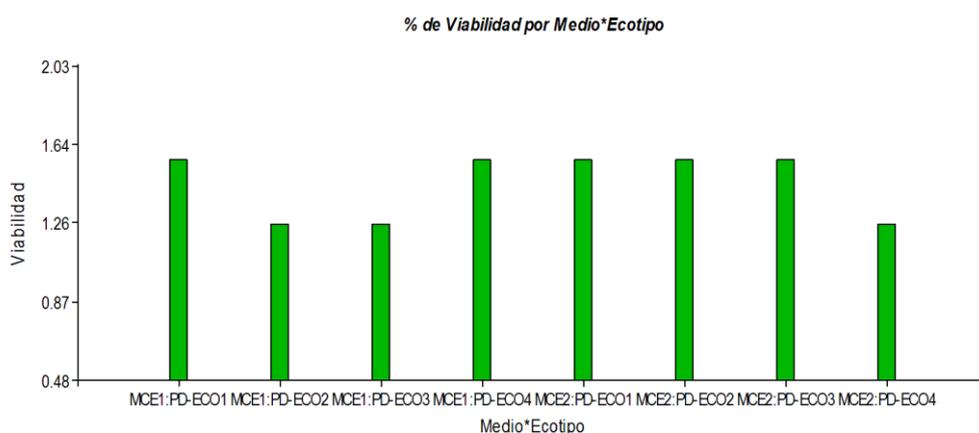


Figura 21: Gráfico de barras de porcentaje de viabilidad en la formación de callo embriogénico de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera por los tratamientos MCE1 y MCE2

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 13 y Anexo 14 se muestra el análisis de varianza realizado para la viabilidad. Se utilizaron los datos obtenidos a los 30 días de sembrados los explantes de palma datilera. Como el valor de p fue mayor a 0.05; esto nos indica que no hay una diferencia significativa entre los cuatro ecotipos y los 2 medios MCE1 y MCE2 probados en esta fase de la investigación.

Para determinar la diferencia de los ecotipos frente al medio MCE1 y al medio MCE2 se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se confirma que la viabilidad de los cuatro ecotipos responde de igual forma los 2 tratamientos MCE1 y MCE2, al cabo de 6 semanas (Figura 22). Pero se evidencio que el medio MCE2 respondió de mejor forma en la viabilidad de los ecotipos comparado con el medio MCE1.



Figura 22: Imagen donde se observa callo embriogénico del ecotipo PD-ECO1 en medio MCE2 después de 30 días

4.3.2. Formación de callo embriogénico

Como se explicó en el punto 3 en la etapa de formación de callo embriogénico *in vitro* se evaluó la conversión de los callos a callos embriogénicos de palma datilera ya que mediante estos se obtuvo los embriones somáticos necesarios en la investigación, con estos se está comprobando los efectos de las fitohormonas empleadas, es un objetivo de este trabajo obtener callos embriogénicos se explicara a continuación los resultados obtenidos.

-

En la Tabla 28 se pueden observar los resultados obtenidos para la formación de callos embriogénicos de palma datilera al cabo de un mes. Los explantes que han sido considerados con presencia de callo embriogénico SCE, o ausencia de callo embriogénico NCE generados por los efectos de los medios de cultivo propuestos en la investigación.

Tabla 18: Formación de callos embriogénicos de palma datilera

Ecotipo	Tratamiento	N° Explantes	N° Explantes con presencia de callo embriogénico	N° Explantes sin presencia de callo embriogénico
PD-ECO1	MCE1	5	5	0
PD-ECO2	MCE1	5	4	1
PD-ECO3	MCE1	5	4	1
PD-ECO4	MCE1	5	5	0
PD-ECO1	MCE2	5	5	0
PD-ECO2	MCE2	5	5	0
PD-ECO3	MCE2	5	5	0
PD-ECO4	MCE2	5	4	1

Como se observa en los tratamientos empleados, se presentan callos embriogénicos en todos los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4. Como se evidencia la predominancia de la presencia de callos embriogénico (SCE) fue de un 100% en el medio MCE1 en los ecotipos PD-ECO1 y PD-ECO4 y de un 80% en los ecotipos PD-ECO2 y PD-ECO3; para el medio MCE2 se obtuvo un 100% en los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2 y PD-ECO3 respectivamente. En PD-ECO4 se obtuvo la presencia de un 80% de callo embriogénico de palma datilera, debido a que una repetición se necrosó, posiblemente debido al manejo del material.

La principal causa de la presencia de callos embriogénicos de palma datilera se debe a la reducción de la fitohormona 2,4-D como reporta Hassan et al. (2016) al disminuir las auxinas en el medio se logró obtener callos embriogénicos en palma datilera, esto se comprobó en esta investigación ya que los medios MCE1 y MCE2 fueron empleado en la formación de callo embriogénico de Palma datilera.

Los resultados obtenidos respecto a la formación de callos embriogénicos de palma datilera, se observan en la Figura 23, el medio MCE1 y MCE2 fueron los que obtuvieron una mayor formación de callos embriogénicos en los 4 ecotipos. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% en la formación de callos embriogénicos.

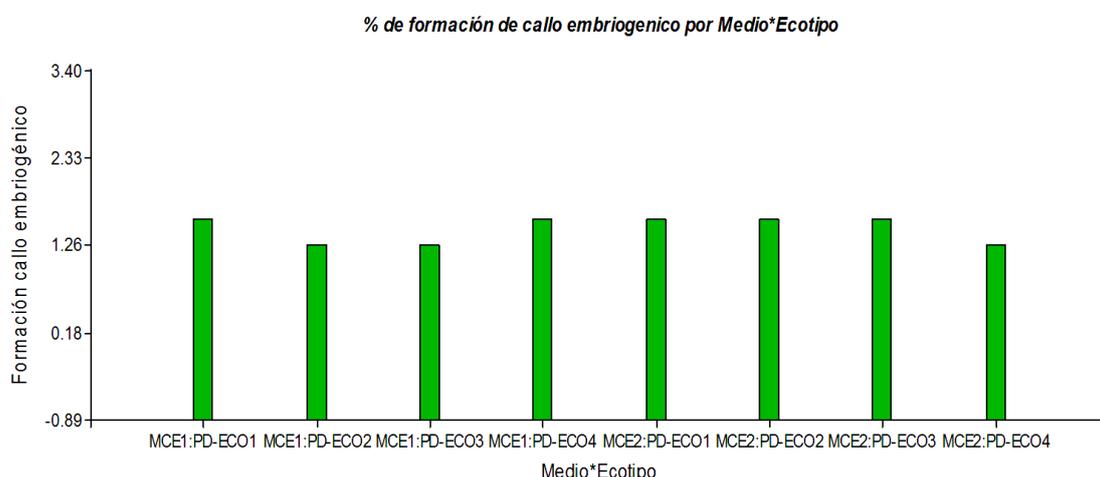


Figura 23: Gráfico de barras de porcentaje de formación de callo embriogénico de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera en los medios MCE1 y MCE2

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 15 y Anexo 16 se muestra el análisis de varianza realizado para esta variable. Se utilizaron los datos obtenidos a los 30 días de sembrados los callos de palma datilera. Como el valor de p fue mayor a 0.05 en Ecotipo y Medio; esto nos indica que no hay una diferencia significativa entre los cuatro ecotipos probados en esta fase de la investigación.

Para determinar la diferencia de los ecotipos frente a los medios MCE1 y MCE2 se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Los resultados obtenidos nos muestran que no hay diferencia significativa en los medios y los ecotipos empleados en la formación de callos embriogénicos de palma datilera al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se confirma que los cuatro ecotipos responden de igual forma en la formación de callos embriogénicos en los medios MCE1 y MCE2, de igual forma se evidencio que ambos tratamientos responden de manera efectiva en la formación de los callos embriogénicos de palma datilera al cabo de 4 semanas.

En otros estudios relacionados a la palma datilera se ha obtenido resultados en la formación de callo embriogénico. Mouaad et al. (2017) reporta que aplicando 45uM de 2,4-D y NAA se obtiene callo de palma datilera. De la misma forma se reporta que los diferentes genotipos responde de diferente forma (Fki et al., 2011).

4.4. Inducción de embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Los resultados obtenidos para esta parte de la investigación se presentan a continuación, donde se probó el medio MES1 propuesto por Hassan et al. (2016). Los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 fueron sometidos al tratamiento para formar embriones de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L).

En esta etapa hay que considerar que los callos embriogénicos empleados se encuentran en contacto con el medio y las condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos luego de las evaluaciones se pueden observar en las tablas 31, 32, 33, 34, 35 y 36; figuras 24, 25, 26, 27 y 28.

Se consideró a los callos embriogénicos de palma datilera con mejores características fenotípicas, el tratamiento empleado fue efectivo para inducir a la formación de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4. Se obtuvo embriones hasta en 3 estadios (globular, Oblongo y corazón), los cuales fueron empleados para cumplir el objetivo principal de la investigación.

4.4.1. Viabilidad de embriones somáticos

Como se explicó en el punto 3.4.4. el porcentaje de viabilidad es importante, hay que tener en cuenta la sobrevivencia de los embriones de palma datilera al tratamiento propuesto. Se obtuvo un elevado porcentaje de formación de callo embriogénico en el paso anterior con los medios MCE1 y MCE2, para la obtención de embriones somáticos se reporta los resultados a continuación, estos fueron sometidos al tratamiento MES1 que tuvo mayor número de explantes vivos.

En la Tabla 31 y Figura 24 se pueden observar los resultados obtenidos para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera al cabo de un mes. Los embriones somáticos que han sido considerados como sobrevivientes a los efectos del tratamiento, son aquellos que mantuvieron intacta su capacidad de poder crecer y desarrollarse en el medio de cultivo MES1.

Tabla 19: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de palma datilera

Ecotipo	N° Explantes vivos	% Viabilidad
PD-ECO1	5	100
PD-ECO2	5	100
PD-ECO3	5	100
PD-ECO4	4	80

Como se observa en la Tabla 31 y Figura 24, el tratamiento empleado presentó hasta un 100% de viabilidad de embriones somáticos, al presentar la totalidad de los embriones vivos que fueron sometidos al tratamiento.

Las principales causas de muerte que se observaron durante las evaluaciones y durante todo el desarrollo de la fase experimental de esta investigación fueron la necrosis de los tejidos vegetales de palma datilera ocasionados por un mal manejo o factores ambientales.

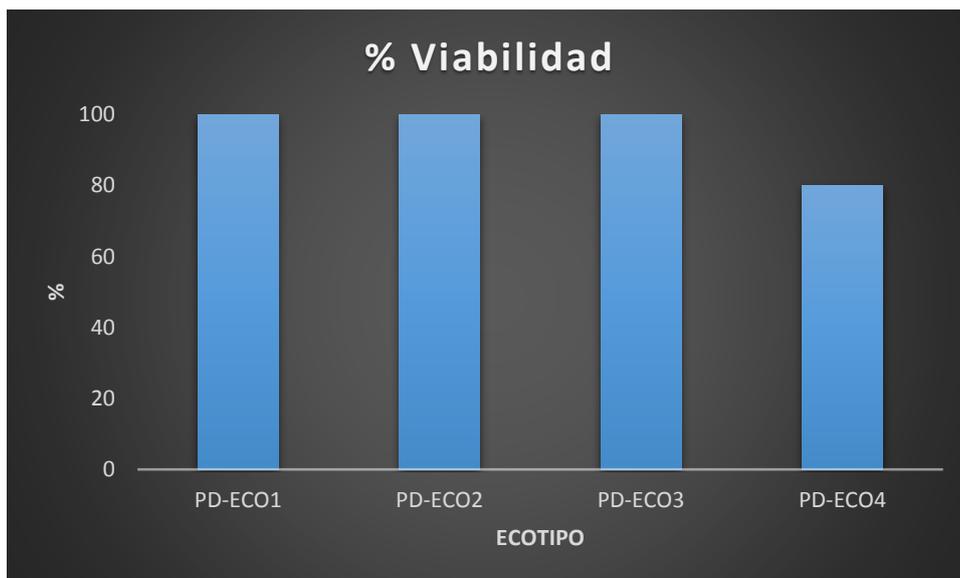


Figura 24: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de ecotipos de palma datilera

Los resultados obtenidos respecto a la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera, se observan en la Figura 25, el medio MES1 fue el medio de cultivo con el que se obtuvo embriones somáticos en los 4 ecotipos. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% de viabilidad de embriones somáticos en PD-ECO1, PD-ECO2 y PD-ECO3, mientras un 80% de viabilidad en PD-ECO4.

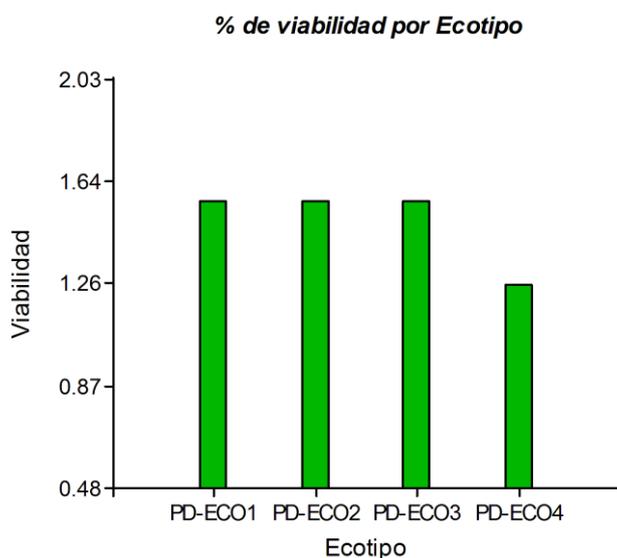


Figura 25: Gráfico de barras de porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera por el tratamiento MES1

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 17 y Anexo 18 se muestra el análisis de varianza realizado para la viabilidad de los embriones somáticos. Se utilizaron los datos obtenidos a los 30 días de sembrados los callos embriogénicos de palma datilera. Como el valor de p fue mayor a 0.05; esto nos indica que no hay una diferencia significativa entre los cuatro ecotipos respecto al tratamiento empleado en esta fase de la investigación.

Para poder determinar la diferencia de los ecotipos frente al medio MES1 se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se evidencia una misma letra “A” la cual confirma que los cuatro ecotipos responden de igual forma para el medio MES1, al cabo de 4 semanas (Figura 26).

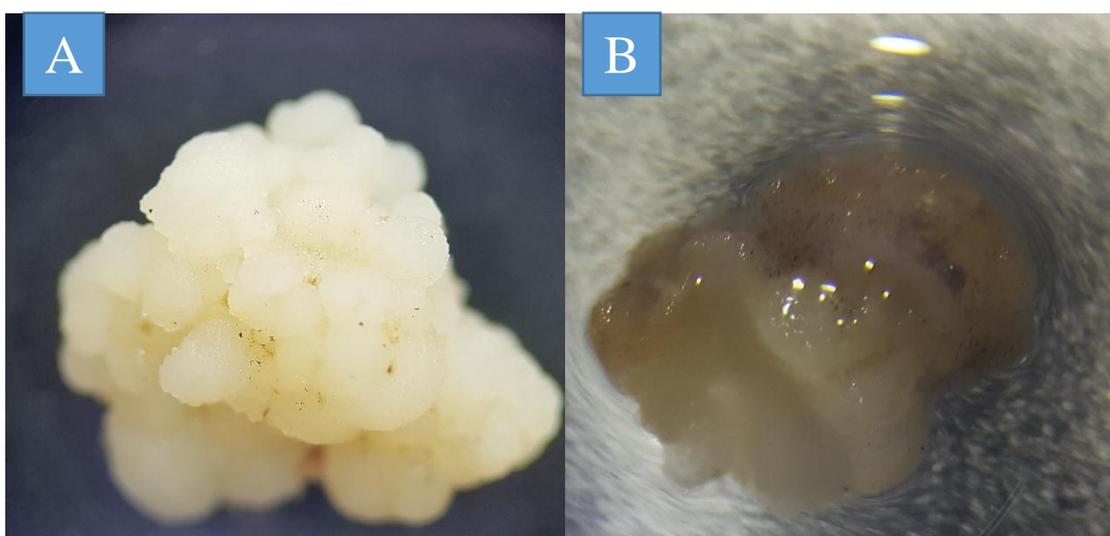


Figura 26: Imagen A donde aprecia embriones somáticos estadio globular de palma datilera PD-ECO3 vivos; Imagen B donde se aprecia embriones somáticos PD-ECO3 muertos en después de cuatro semanas

4.4.2. Formación de embriones somáticos

Como se explicó en el punto 3 en la etapa de formación de embriones somáticos *in vitro* se evaluó la presencia de embriones de palma datilera en diferentes estadios (globular, oblongo y corazón) ya que es importante, con estos se está comprobando los efectos de bajar la concentración de las fitohormonas empleadas, es un objetivo de este trabajo generar

embriones somáticos para posteriormente someterlos a conservación, a continuación los resultados obtenidos.

En la Tabla 34 se pueden observar los resultados obtenidos para la formación de embriones somáticos de palma datilera al cabo de un mes. Los explantes que han sido considerados con presencia de embriones somáticos SES, o ausencia de embriones somáticos NES generados por los efectos del medio de cultivo.

Tabla 20: Formación de embriones somáticos de palma datilera

Tratamiento	Ecotipo	N° Explantes	N° Explantes con presencia de embriones somáticos	N° Explantes sin presencia de embriones somáticos
MES1	PD-ECO1	5	5	0
MES1	PD-ECO2	5	5	0
MES1	PD-ECO3	5	5	0
MES1	PD-ECO4	5	4	1

Como se observa el tratamiento MES1 empleado, presento embriones somáticos en estadios (globular, oblongo y corazón) en todos los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 y las repeticiones. Como se muestra en los resultados una predominancia de la presencia de embriones somáticos (SES) fue de un 100% en PD-ECO1, PD-ECO y PD-ECO3, mientras un 80% en el ecotipo PD-ECO4.

La principal causa de la presencia de embriones somáticos de palma datilera se debe a la composición del medio donde las fitohormonas bajan en concentración y de esta forma se permite a las células vegetales dejar de seguir multiplicándose indiferenciadamente y comenzar a diferenciarse para formar una planta. Como reporta Hassan et al. (2016) al bajar la concentración de BA y Kinetina en el medio se logró obtener embriones somáticos de palma datilera, esto se comprobó en los ecotipos estudiados en la presente investigación ya que el medio MES1 es el único empleado en la formación de embriones somáticos de palma datilera.

Los resultados obtenidos respecto a la formación de embriones somáticos de palma datilera, se observan en la Figura 27, el medio de MES1 fue el medio de cultivo con el que se obtuvo

embriones somáticos en los 4 ecotipos. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% en la formación de embriones en diferentes estadios (globular, oblongo y corazón).

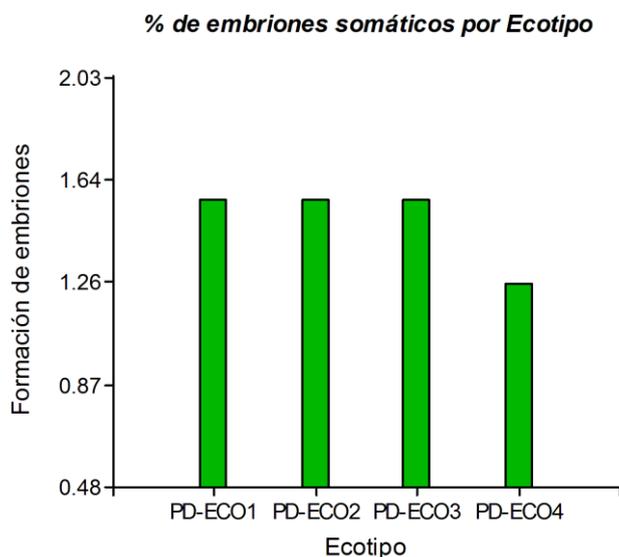


Figura 27: Gráfico de barras de porcentaje de formación de embriones somático de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera por el tratamiento MES1

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 19 y Anexo 20 se muestra el análisis de varianza realizado para esta variable. Se utilizaron los datos obtenidos a los 30 días de sembrados los callos embriogénicos de palma datilera. Como el valor de p fue mayor a 0.05; esto nos indica que no hay una diferencia significativa entre los cuatro ecotipos probados en esta fase de la investigación.

Para determinar la diferencia de los ecotipos frente al medio MES1 se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se confirma que los cuatro ecotipos responden de igual forma para el medio MES1, que presento una buena formación de los embriones somáticos de palma datilera al cabo de 4 semanas (Figura 28).

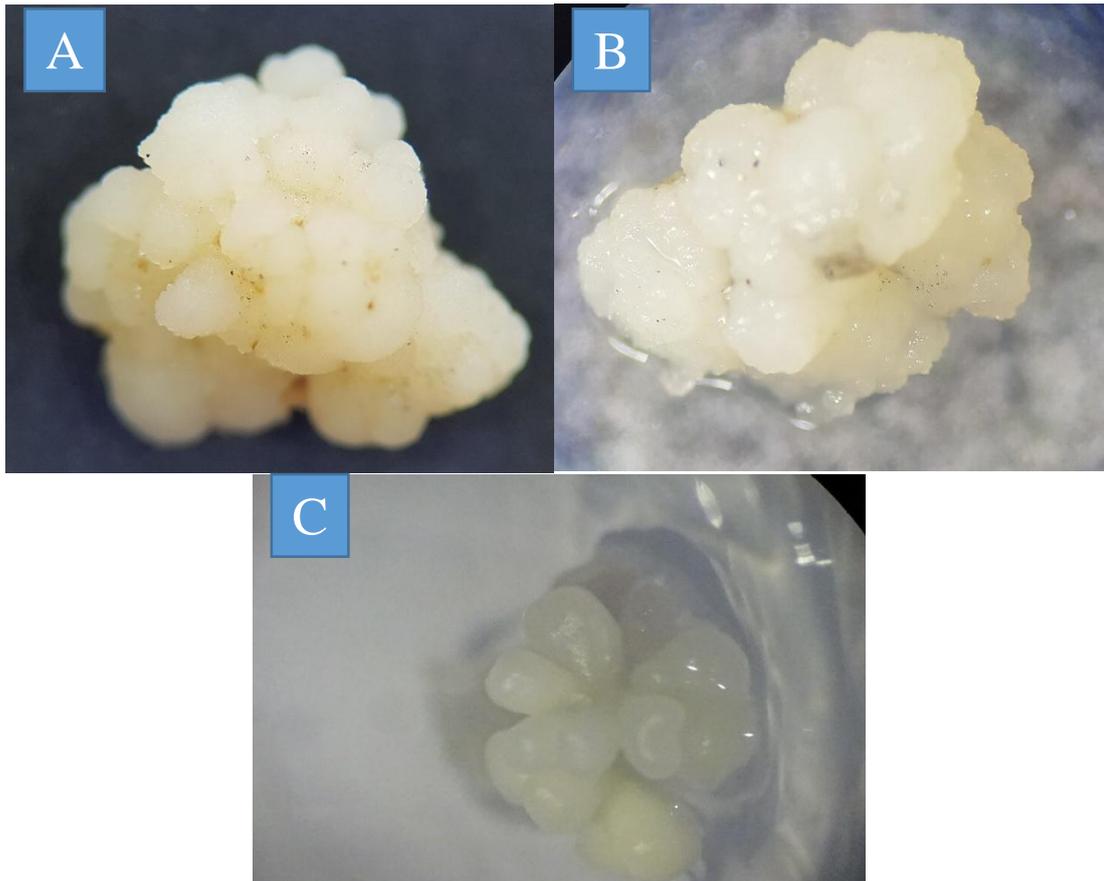


Figura 28: Imagen A embriones somáticos estadio globular; Imagen B embriones somáticos estadio oblongo; Imagen C embriones somáticos estadio corazón del ecotipo PD-ECO3 después de cuatro semanas

Fuente: Registro de la Investigación.

En otros estudios relacionados a la obtención de embriones somáticos de palma datilera. Mouaad el al. (2017) reporta que aplicando 45uM de picloran y 4.5uM de 2iP se obtienen embriones somáticos de palma datilera; no reporta los estadios. De la misma forma se reporta que los diferentes genotipos responden de diferente forma frente a un tratamiento (Fki et al., 2011).

4.5. Tratamientos de conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L)

Finalmente luego de obtener embriones somáticos *in vitro* de palma datilera, en 3 estadios (globular, oblongo y corazón) la siguiente fase de la investigación consistió en la conservación *in vitro* de los embriones somáticos de los cuatro ecotipos trabajados ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4, es la fase se probó 8 tratamientos. Esta es

una de las fases más importantes de la investigación, ya que al conservar *in vitro* embriones somáticos se puede guardar material vegetal de importancia que se encuentra en peligro de extinción, además se puede ahorrar en el uso de medios de cultivo ya que al prolongar el periodo de cambio de medio se garantiza un ahorro en medios de cultivo, lo más importante que se buscó en la investigación es lograr conservar hasta por 8 meses embriones somáticos de palma datilera, para luego de este periodo poder ser recuperarlos y puedan generar una planta sin afectar sus características fenotípicas y su viabilidad.

En esta prueba del trabajo de investigación en los medios de conservación *in vitro* de palma datilera, también se evaluaron la viabilidad y la regeneración de los embriones somáticos al cabo de 2, 4, 6 y 8 meses. En esta prueba se usó fitohormonas (ABA) en algunos tratamientos propuestos, para observar cómo influyen los distintos reguladores de crecimiento lento de los embriones somáticos de palma datilera. Como se mencionó anteriormente los parámetros más importantes son la viabilidad y la regeneración de los embriones somáticos de palma datilera al cabo de los meses que se evaluaron 2, 4, 6 y 8 meses en los cuales los embriones permanecieron en su medio sin ninguna adición de medio nuevo, a continuación se presenta los resultados obtenidos.

4.5.1. Viabilidad de embriones somáticos de palma datilera

Como se explicó en el punto 3.4.6. el porcentaje de viabilidad de embriones somáticos sometidos a conservación es importante, hay que tener en cuenta la sobrevivencia de los embriones de palma datilera a los tratamientos propuestos. Se obtuvo un elevado porcentaje de formación de embriones somáticos en los cuatro ecotipos en el paso anterior con el medio MES1, para la conservación de embriones somáticos se reporta los resultados a continuación que fueron sometidos a ocho tratamientos MC1, MC2, MC3, MC4, MC5, MC6, MC7 Y MC8, los resultados que se presentan a continuación, se obtuvieron luego de 2, 4, 6 y 8 meses.

En la Tabla 37 y Figura 29 se pueden observar los resultados obtenidos para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera al cabo de 2, 4, 6 y 8 meses respectivamente. Los embriones somáticos que han sido considerados como sobrevivientes a los efectos de los diferentes tratamientos, son aquellos que al ser transferidos al medio MES1 mantuvieron intacta su capacidad de poder crecer y desarrollarse en el medio de inducción de embriones somáticos.

Tabla 21: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de palma datilera al cabo de 2, 4, 6 y 8 meses

Ecotipo	Medio	% Viabilidad después de 2 meses	% Viabilidad después de 4 meses	% Viabilidad después de 6 meses	% Viabilidad después de 8 meses
PD-ECO1	MC1	100	85	75	70
PD-ECO2	MC1	85	80	75	65
PD-ECO3	MC1	100	85	70	65
PD-ECO4	MC1	100	85	70	65
PD-ECO1	MC2	100	90	80	80
PD-ECO2	MC2	100	85	80	75
PD-ECO3	MC2	100	85	80	75
PD-ECO4	MC2	85	80	80	80
PD-ECO1	MC3	85	70	50	35
PD-ECO2	MC3	80	60	45	20
PD-ECO3	MC3	100	80	40	20
PD-ECO4	MC3	80	60	30	25
PD-ECO1	MC4	80	80	75	75
PD-ECO2	MC4	100	90	85	85
PD-ECO3	MC4	100	90	90	80
PD-ECO4	MC4	100	90	85	80
PD-ECO1	MC5	100	90	90	85
PD-ECO2	MC5	80	80	80	70
PD-ECO3	MC5	100	90	90	80
PD-ECO4	MC5	100	90	90	90
PD-ECO1	MC6	80	60	30	10
PD-ECO2	MC6	80	50	20	5
PD-ECO3	MC6	90	40	20	10
PD-ECO4	MC6	100	50	30	10
PD-ECO1	MC7	100	100	100	90
PD-ECO2	MC7	100	100	100	75
PD-ECO3	MC7	100	100	95	90
PD-ECO4	MC7	100	100	100	90
PD-ECO1	MC8	100	100	90	90
PD-ECO2	MC8	100	100	100	100
PD-ECO3	MC8	100	100	100	95
PD-ECO4	MC8	100	100	100	100

- 2 meses de conservación *in vitro*

Como se observa en la Tabla 37 y Figura 29, el tratamiento MC7 y MC8 empleado presentó hasta un 100% de viabilidad de embriones somáticos al cabo de los 2 meses de evaluación, al ver los resultados se puede evidenciar que le medio y el ecotipo responden de manera diferente al cabo de los meses a continuación se procedió a explicar los resultados obtenidos de una manera más simplificada.

Las principales causas de muerte que se observaron durante las evaluaciones y durante todo el desarrollo de la fase experimental de esta investigación fueron por deshidratación y necrosis de los embriones somáticos de palma datilera ocasionados por un mal manejo o la composición del medio empleado.

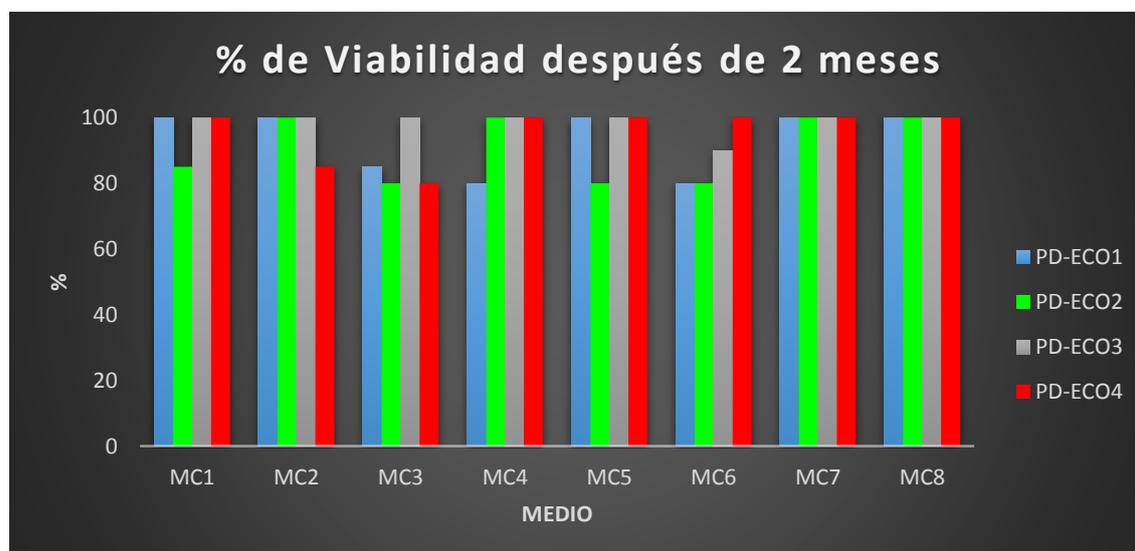


Figura 29: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de ecotipos de palma datilera después de 2 meses

Los resultados obtenidos respecto a la viabilidad después de 2 meses de conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera, como se observa en la Figura 30, el medio MC7 y MC8 fueron los medios de cultivo con el que se obtuvo una viabilidad completa en embriones somáticos en los 4 ecotipos. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% de viabilidad de embriones somáticos en PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4.

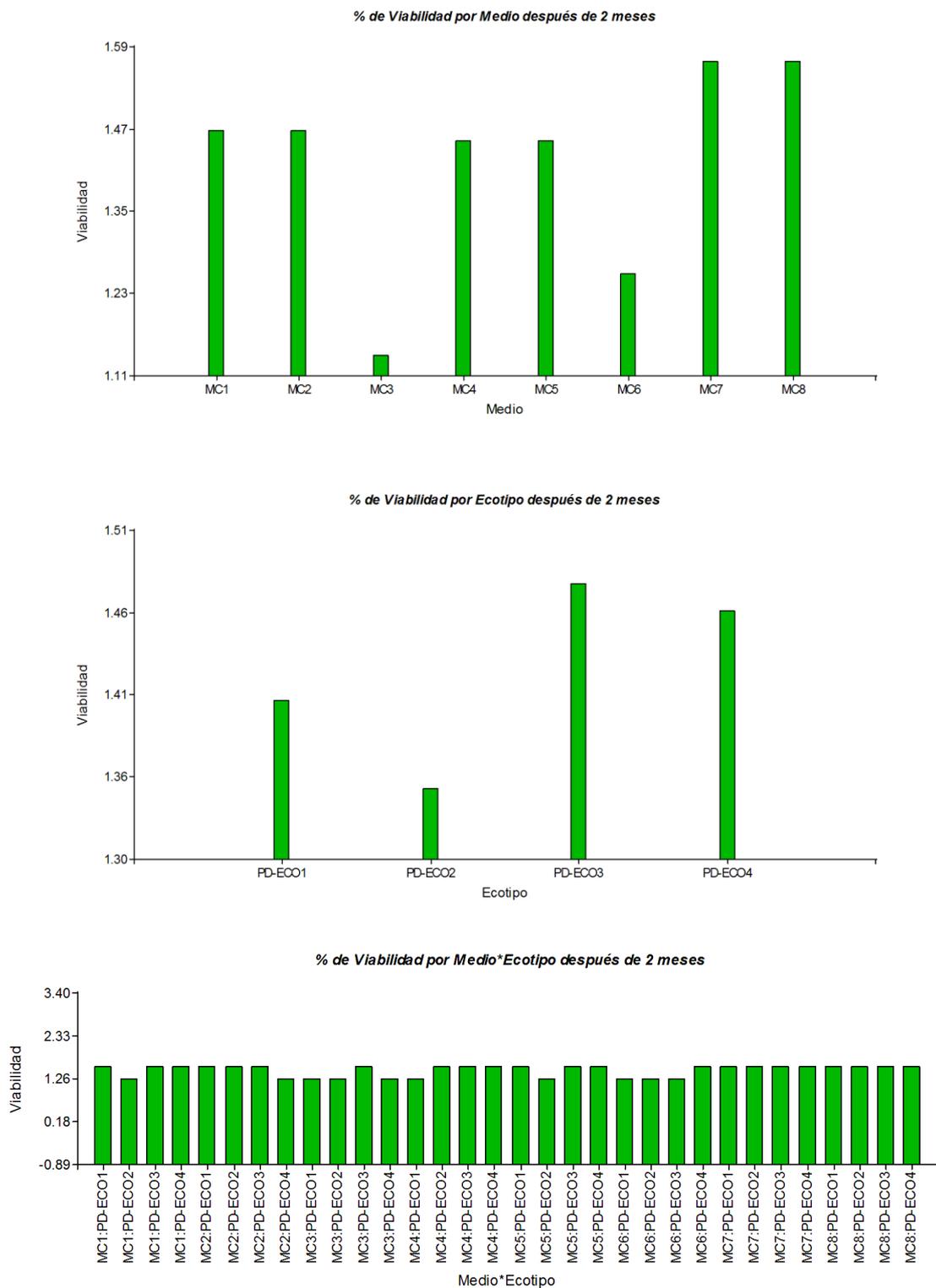


Figura 30: Gráficos de barras de viabilidad de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera en los 8 tratamientos después de 2 meses

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 21 y Anexo 22 se muestra el análisis de varianza realizado para la viabilidad de los embriones somáticos. Se utilizaron los datos obtenidos a los 60 días de sembrados los embriones somáticos de palma datilera. Como el valor de p fue mayor a 0.05; esto nos indica que no hay una diferencia significativa entre los cuatro ecotipos respecto a los tratamientos empleados en esta fase de la investigación.

Para poder determinar la diferencia de los ecotipos frente a los tratamientos se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se evidencia una misma letra "A" la cual confirma que los cuatro ecotipos responden de igual forma al cabo de 2 meses en conservación en los medios MC1, MC2, MC3, MC4, MC5, MC6, MC7 y MC8; (Tabla 39) al igual que la interacción Medio*Ecotipo (Anexo 37).

- 4 meses de conservación *in vitro*

Siguiendo con los resultados se observa en la Tabla 37 y Figura 31, el tratamiento MC7 y MC8 empleado presentó hasta un 100% de viabilidad de embriones somáticos al cabo de los 4 meses de evaluación, al ver los resultados se puede evidenciar que le medio y el ecotipo responden de manera diferente al cabo de los meses a continuación se procedió a explicar los resultados obtenidos de una manera más simplificada.

Las principales causas de muerte que se observaron durante las evaluaciones y durante todo el desarrollo de la fase experimental de esta investigación fueron por deshidratación y necrosis de los embriones somáticos de palma datilera ocasionados por un mal manejo o la composición del medio.

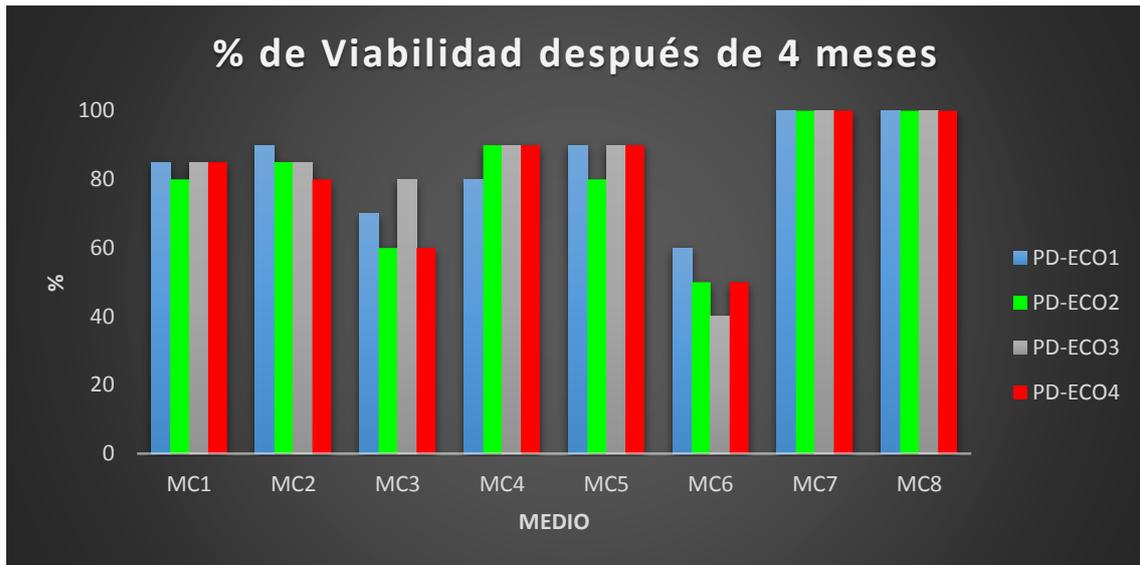
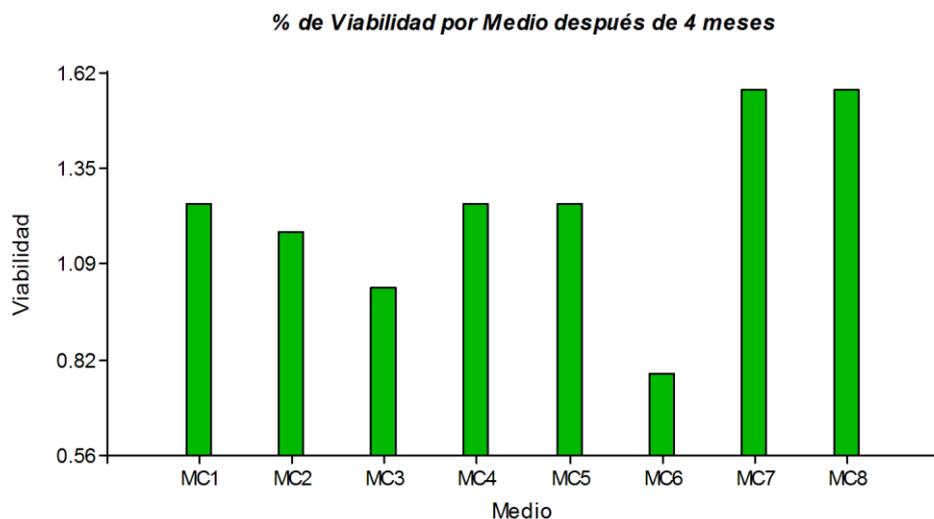


Figura 31: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de ecotipos de palma datilera después de 4 meses

Los resultados obtenidos respecto a la viabilidad después de 4 meses de conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera, como se observa en la Figura 32, el medio MC7 y MC8 fueron los medios de cultivo con el que se obtuvo una viabilidad completa en embriones somáticos en los 4 ecotipos. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% de viabilidad de embriones somáticos en PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4.



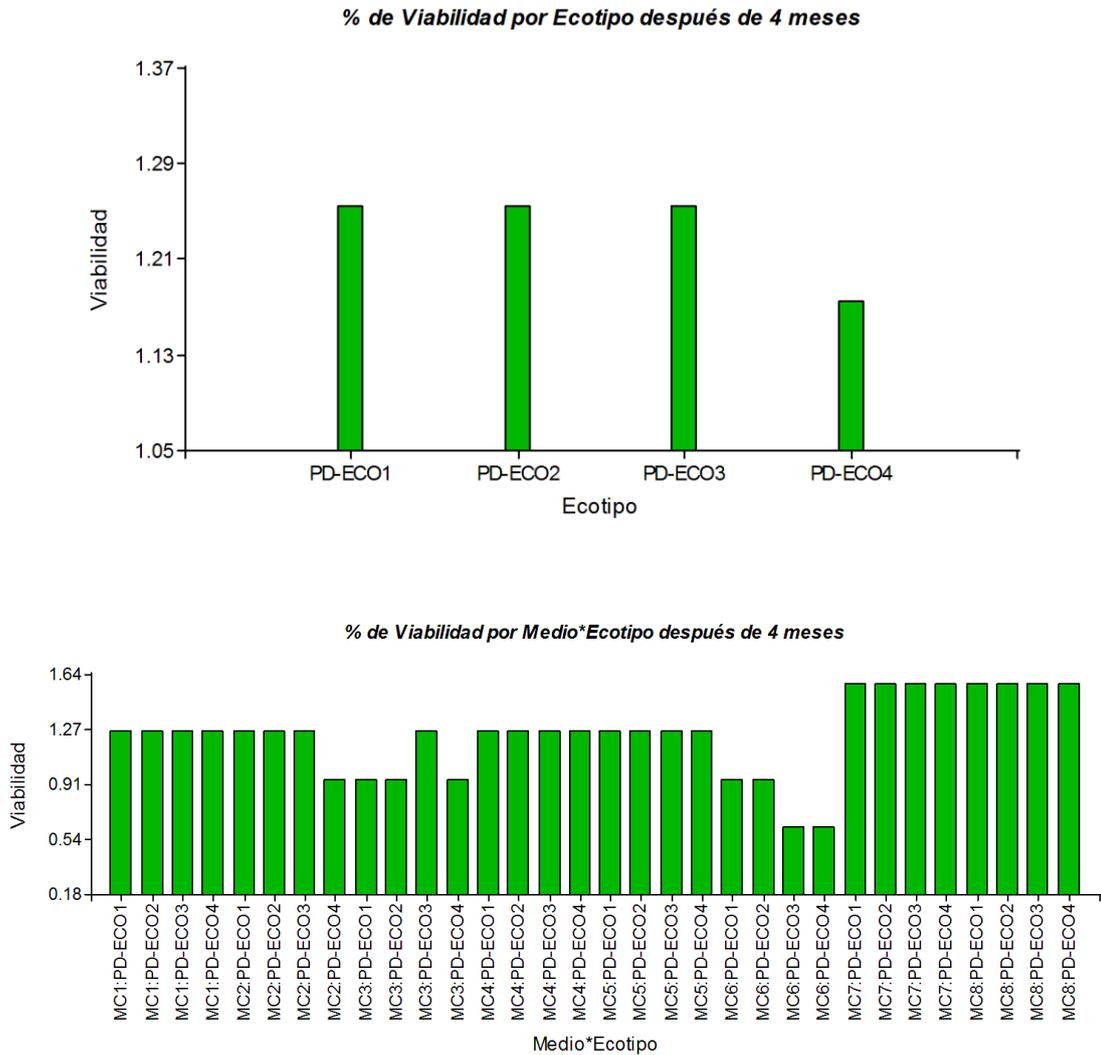


Figura 32: Gráficos de barras de viabilidad de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera en los 8 tratamientos después de 4 meses

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 23 y Anexo 24 se muestra el análisis de varianza realizado para la viabilidad de los embriones somáticos. Se utilizaron los datos obtenidos a los 120 días de sembrados los embriones somáticos de palma datilera. Como el valor de p fue menor a 0.05; esto nos indica que hay una diferencia significativa entre los medios empleados; mientras que los cuatro ecotipos y la interacción medio*ecotipo no tienen una diferencia significativa.

Para poder determinar la diferencia de los ecotipos frente a los tratamientos se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se evidencia una misma letra “A” la cual confirma que los cuatro ecotipos y la interacción medio*ecotipo (Anexo 38) responden de igual forma al cabo de 4 meses en conservación en los medios si se puede evidenciar una diferencia entre los tratamientos MC7 y MC8 representados por la letra “A”, mientras en tratamiento MC6 está representado por la letra “B”, lo cual nos indica que hay un diferencia entre estos medios (Tabla 41), con los resultados obtenidos se evidencia que los medios MC7 y MC8 conservaron una viabilidad total en los embriones somáticos de palma datilera mientras que en medio MC6 presento una baja viabilidad promedios de hasta un 60% de muerte de embriones después de 4 meses en conservación *in vitro*.

- 6 meses de conservación *in vitro*

Siguiendo con los resultados se observa en la Tabla 37 y Figura 33, el tratamiento MC7 y MC8 empleado presentó hasta un 100% de viabilidad de embriones somáticos al cabo de los 6 meses de evaluación, al ver los resultados se puede evidenciar que le medio y el ecotipo responden de manera diferente al cabo de los meses a continuación se procedió a explicar los resultados obtenidos de una manera más simplificada.

Las principales causas de muerte que se observaron durante las evaluaciones y durante todo el desarrollo de la fase experimental de esta investigación fueron por deshidratación y necrosis de los embriones somáticos de Palma datilera ocasionados por un mal manejo o composición del medio.

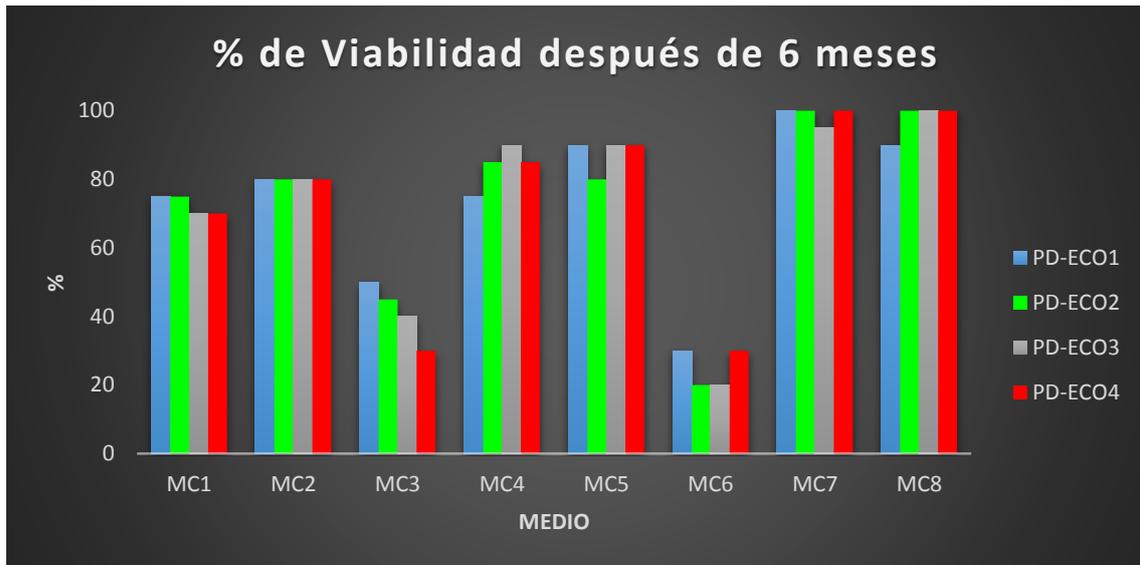
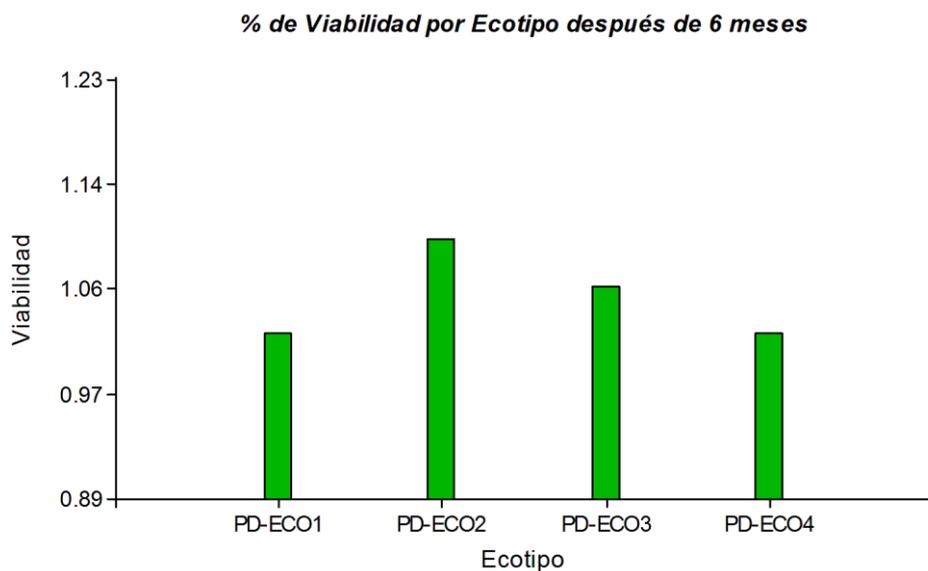


Figura 33: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de ecotipos de palma datilera después de 6 meses

Los resultados obtenidos respecto a la viabilidad después de 6 meses de conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera, como se observa en la Figura 34, el medio MC7 y MC8 fueron los medios de cultivo con el que se obtuvo una viabilidad casi completa en embriones somáticos en los 4 ecotipos. Para estos medios los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% de viabilidad de embriones somáticos en PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4.



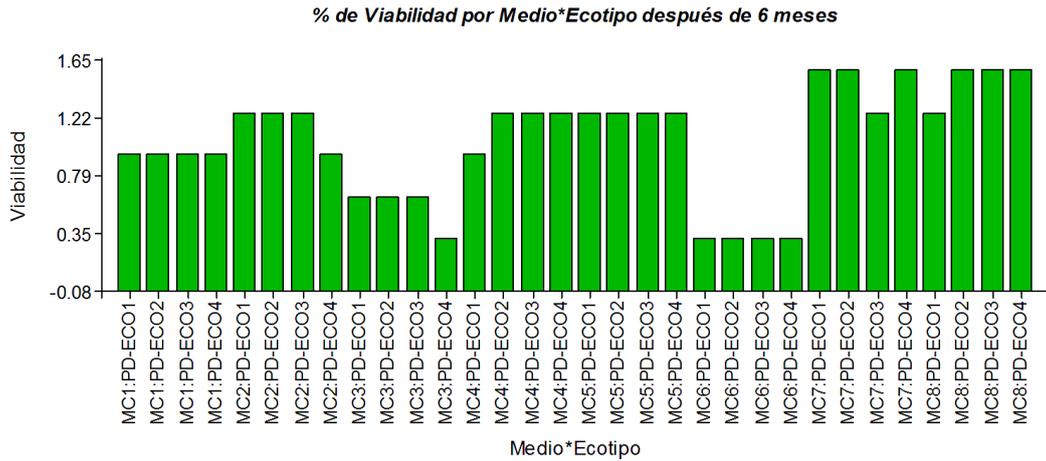


Figura 34: Gráficos de barras de viabilidad de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera en los 8 tratamientos después de 6 meses

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 25 y Anexo 26 se muestra el análisis de varianza realizado para la viabilidad de los embriones somáticos. Se utilizaron los datos obtenidos a los 180 días de sembrados los embriones somáticos de palma datilera. Como el valor de p fue menor a 0.05; esto nos indica que hay una diferencia significativa entre los medios empleados; mientras que los cuatro ecotipos y la interacción medio*ecotipo no tienen una diferencia significativa.

Para poder determinar la diferencia de los ecotipos frente a los tratamientos se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se evidencia una misma letra “A” la cual confirma que los cuatro ecotipos y la interacción medio*ecotipo (Anexo 39) responden de igual forma al cabo de 6 meses en conservación en los medios; si se puede evidenciar una diferencia entre los tratamientos MC5, MC7 y MC8 representados por la letra “A”, mientras en tratamiento MC6 está representado por la letra “C”, lo cual nos indica que hay una diferencia entre estos medios (Tabla 43), con los resultados obtenidos se evidencia que los medios MC5, MC7 y MC8 conservaron una viabilidad similar en los embriones somáticos de Palma datilera mientras que en medio MC6 presentó una baja viabilidad

promedios de hasta un 80% de muerte de embriones después de 6 meses en conservación *in vitro*.

- 8 meses de conservación *in vitro*

Siguiendo con los resultados se observa en la Tabla 37 y Figura 35, el tratamiento MC7 y MC8 empleado presentó hasta un 100% de viabilidad de embriones somáticos al cabo de los 8 meses de evaluación, al ver los resultados se puede evidenciar que el medio y el ecotipo responden de manera diferente al cabo de los meses a continuación se procedió a explicar los resultados obtenidos de una manera más simplificada.

Las principales causas de muerte que se observaron durante las evaluaciones y durante todo el desarrollo de la fase experimental de esta investigación fueron por deshidratación y necrosis de los embriones somáticos de palma datilera ocasionados por un mal manejo o composición del medio.

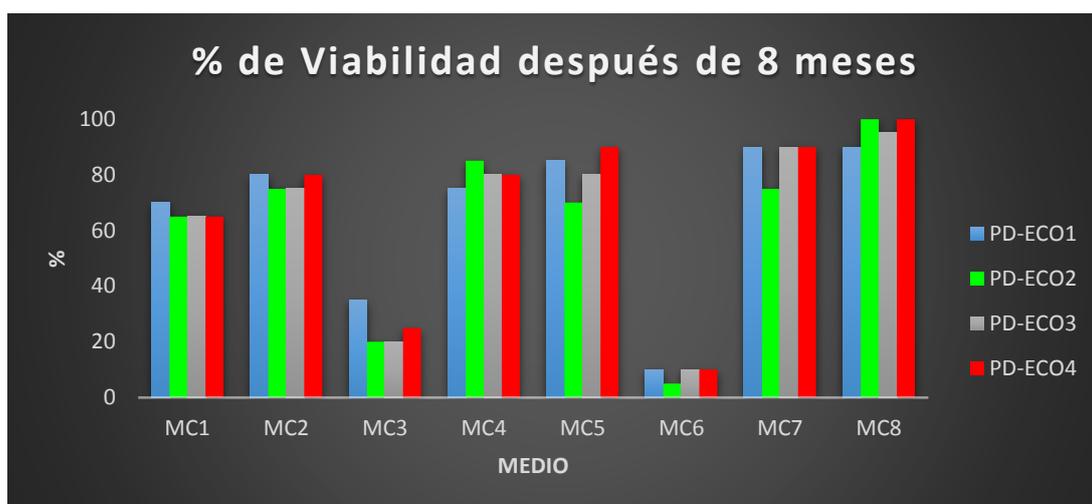


Figura 35: Porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de ecotipos de palma datilera después de 8 meses

Los resultados obtenidos respecto a la viabilidad después de 8 meses de conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera, como se observa en la Figura 36, el medio MC7 y MC8 fueron los medios de cultivo con el que se obtuvo una viabilidad casi completa en embriones somáticos en los 4 ecotipos. Para estos medios los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% de viabilidad de embriones somáticos en PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4.

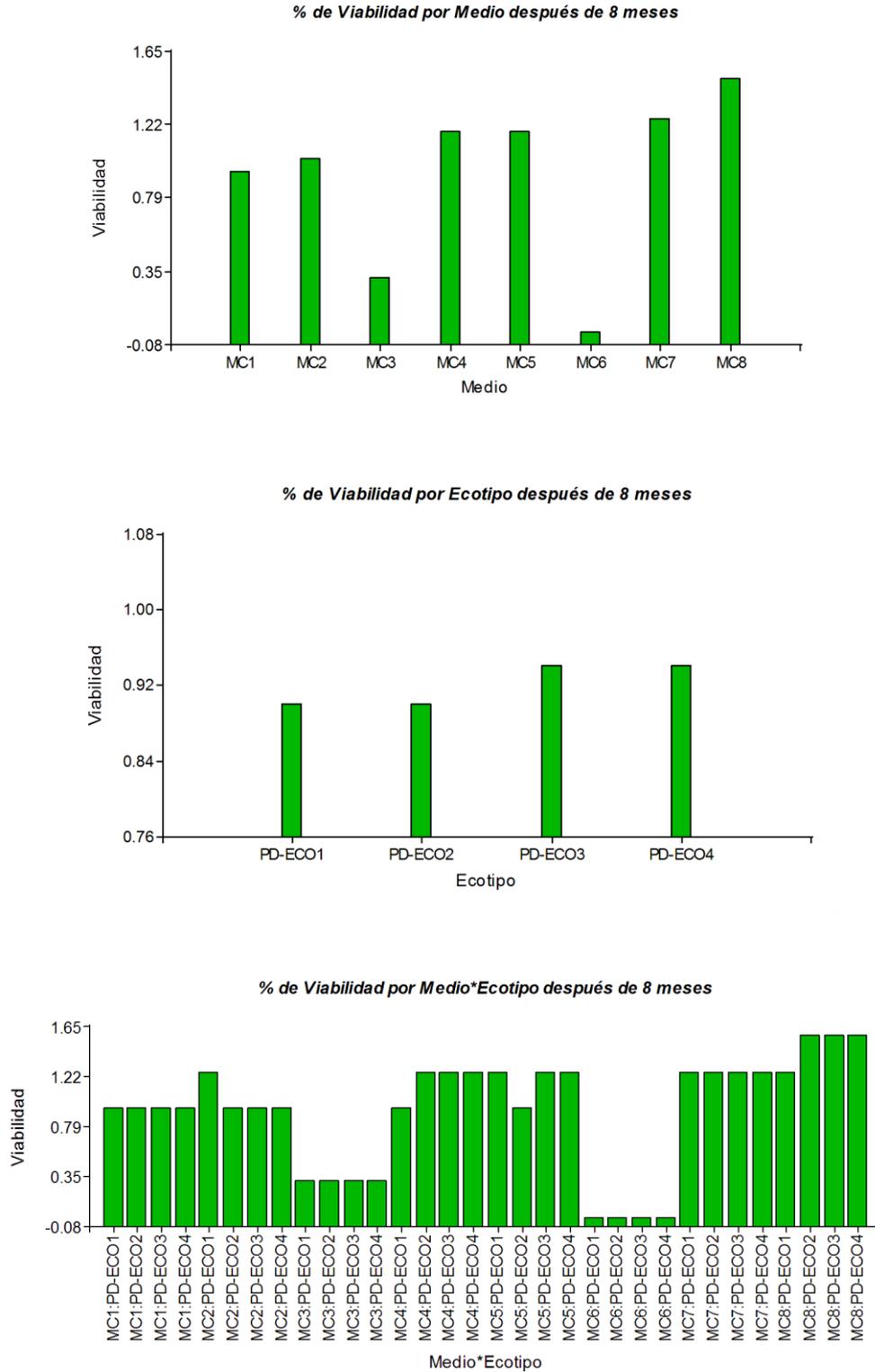


Figura 36: Gráficos de barras de viabilidad de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera en los 8 tratamientos después de 8 meses

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 27 y Anexo 28 se muestra el análisis de varianza realizado para la viabilidad de los embriones somáticos. Se utilizaron los datos obtenidos a los 240 días de sembrados los embriones somáticos de palma datilera. Como el valor de p fue menor a 0.05; esto nos indica que hay una diferencia significativa entre los medios empleados; mientras que los cuatro ecotipos y la interacción medio*ecotipo no tienen una diferencia significativa.

Para poder determinar la diferencia de los ecotipos frente a los tratamientos se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se evidencia una misma letra "A" la cual confirma que los cuatro ecotipos y la interacción medio*ecotipo (Anexo 40) responden de igual forma al cabo de 8 meses en conservación en los medios; si se puede evidenciar una diferencia entre los tratamientos MC2, MC4, MC5, MC7 y MC8 representados por la letra "A", mientras en tratamiento MC6 está representado por la letra "C", lo cual nos indica que hay una diferencia entre estos medios (Tabla 45), con los resultados obtenidos se evidencia que los medios, MC7 y MC8 (Figura 37) conservaron mejores características y una viabilidad superior en los embriones somáticos de Palma datilera mientras que los medios MC3 y MC6 presentaron una baja viabilidad promedios de hasta un 80 y 95% respectivamente de muerte de embriones después de 8 meses en conservación *in vitro*.

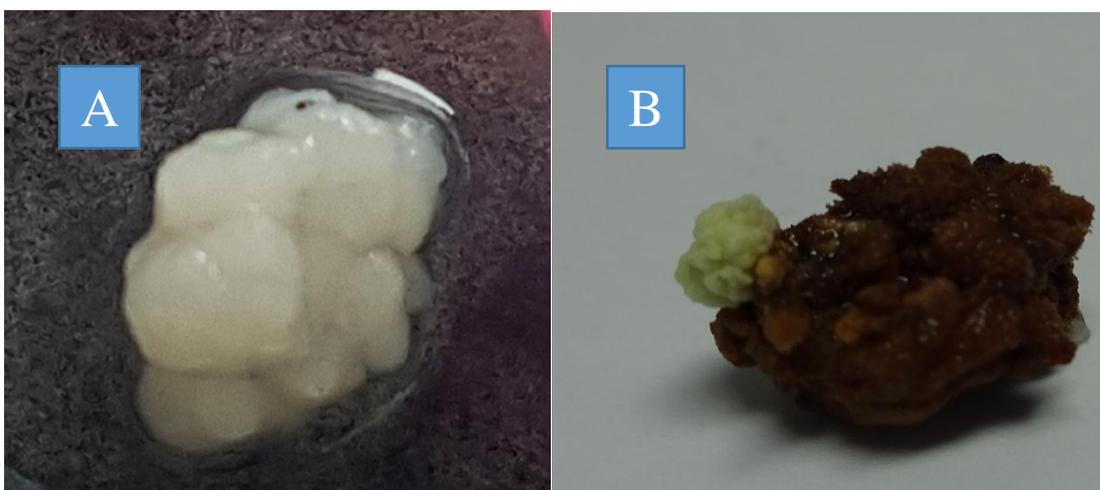


Figura 37: Imagen A embriones somáticos vivos PD-ECO2 en medio MC8; Imagen B embriones somáticos muertos PD-ECO2 en medio MC6 después de 8 meses

Warham y Burnett (1989) comprobaron que se podía aumentar la tasa de sobrevivencia a hasta en un 60% después de 12 meses, combinando ácido abscísico ABA al medio, como se evidencia en la investigación los tratamientos MC7 y MC8 presentan estas fitohormonas, con los resultados obtenidos se comprueba que esta fitohormona actúa en la conservación de embriones somáticos de Palma datilera sin afectar su viabilidad.

Por ejemplo, para disminuir un problema de necrosis en explantes de banano *in vitro*, se suplementó el medio de cultivo con 50-100 mg/l de cloruro de magnesio. Con esta medida se logró la recuperación del 90% de los explantes que se encontraban en estados iniciales de necrosis (Martin et al., 2007). En el caso de *Curcuma longa*, una planta aromática tropical utilizada en la cocina del medio oriente y asiática, el uso de agar y altas concentraciones de sacarosa (10%) en el medio de cultivo permitió su almacenamiento durante 23 semanas (Tyagi et al., 2007).

4.5.2. Regeneración de embriones somáticos de palma datilera

Como se explicó en el punto 3.4.6. el porcentaje de regeneración de embriones somáticos sometidos a conservación es importante, hay que tener en cuenta la regeneración de los embriones de Palma datilera a los tratamientos propuestos. Se obtuvo un elevado porcentaje de viabilidad de embriones somáticos en los cuatro ecotipos en el paso anterior con el medio MES1, para la conservación de embriones somáticos se reporta los resultados a continuación que fueron sometidos a ocho tratamientos MC1, MC2, MC3, MC4, MC5, MC6, MC7 Y MC8, los resultados que se presentan a continuación, se obtuvieron luego de 2, 4, 6 y 8 meses.

En la Tabla 46 y Figura 38 se pueden observar los resultados obtenidos para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera al cabo de 2, 4, 6 y 8 meses respectivamente. Los embriones somáticos que han sido considerados con capacidad para regenerarse a los efectos de los diferentes tratamientos, son aquellos que al ser transferidos al medio MES1 mantuvieron intacta su capacidad de poder crecer seguir con los distintos estadios (corazón, escutelar y coleoptilar) y desarrollarse en el medio de multiplicación de embriones somáticos.

Tabla 22: Porcentaje de regeneración de embriones somáticos de palma datilera al cabo de 2, 4, 6 y 8 meses

Ecotipo	Medio	% Regeneración después de 2 meses	% Regeneración después de 4 meses	% Regeneración después de 6 meses	% Regeneración después de 8 meses
PD-ECO1	MC1	100	80	70	65
PD-ECO2	MC1	80	70	70	65
PD-ECO3	MC1	100	80	75	65
PD-ECO4	MC1	80	75	70	60
PD-ECO1	MC2	100	80	80	80
PD-ECO2	MC2	100	80	60	55
PD-ECO3	MC2	90	80	80	75
PD-ECO4	MC2	85	80	80	80
PD-ECO1	MC3	85	60	45	25
PD-ECO2	MC3	80	60	40	20
PD-ECO3	MC3	90	60	40	10
PD-ECO4	MC3	80	65	30	15
PD-ECO1	MC4	80	80	75	70
PD-ECO2	MC4	100	80	85	80
PD-ECO3	MC4	100	80	80	75
PD-ECO4	MC4	100	80	75	70
PD-ECO1	MC5	100	80	80	70
PD-ECO2	MC5	80	80	80	70
PD-ECO3	MC5	100	80	80	75
PD-ECO4	MC5	100	80	80	70
PD-ECO1	MC6	70	50	20	10
PD-ECO2	MC6	75	40	10	0
PD-ECO3	MC6	80	40	0	0
PD-ECO4	MC6	70	40	20	10
PD-ECO1	MC7	100	100	80	75
PD-ECO2	MC7	100	100	85	75
PD-ECO3	MC7	100	100	85	80
PD-ECO4	MC7	100	100	90	70
PD-ECO1	MC8	100	100	90	90
PD-ECO2	MC8	100	100	90	85
PD-ECO3	MC8	100	100	95	90
PD-ECO4	MC8	100	100	95	90

- 2 meses de conservación *in vitro*

Como se observa en la Tabla 46 y Figura 38, el tratamiento MC7 y MC8 empleado presentó hasta un 100% de regeneración de embriones somáticos al cabo de los 2 meses de evaluación, al ver los resultados se puede evidenciar que le medio y el ecotipo responden de manera diferente al cabo de los meses a continuación se procedió a explicar los resultados obtenidos de una manera más simplificada.

Las principales causas por las cuales los embriones no continuaron su desarrollo que se debe generalmente a la muerte de los embriones somáticos de palma datilera ocasionados por el tiempo que permanecieron en conservación, recordemos que no se agregó medio nuevo y solo se mantuvieron con la formulación inicial del medio, esto genera un estrés celular y generalmente genera que las células somáticas se programen solo para multiplicarse y no diferenciarse.

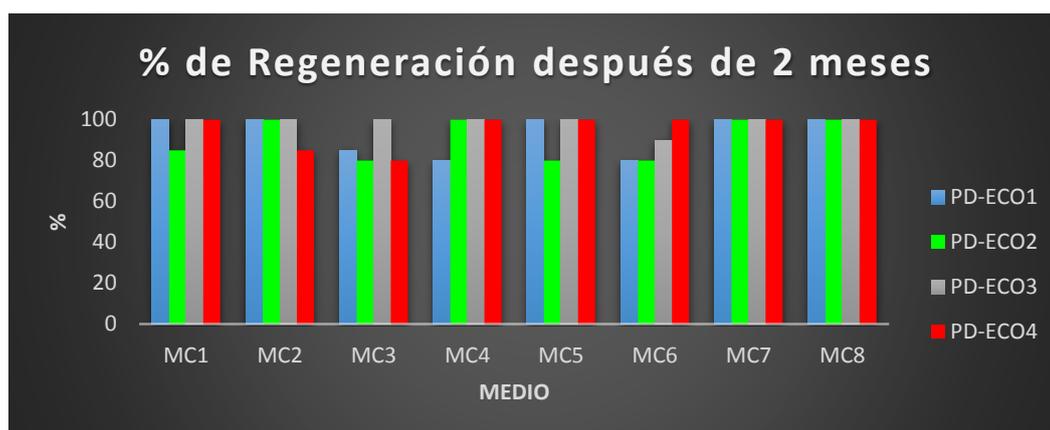


Figura 38: Porcentaje de regeneración de embriones somáticos de ecotipos de palma datilera después de 2 meses

Los resultados obtenidos respecto a la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 2 meses de conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera, se observan en la Figura 39, el medio MC7 y MC8 fueron los medios de cultivo con el que se obtuvo una regeneración completa en embriones somáticos en los 4 ecotipos. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% de regeneración de embriones somáticos en PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4, cabe resaltar que el periodo en comparación a los expuestos más adelante de 8 meses sin agregar medio nuevo.

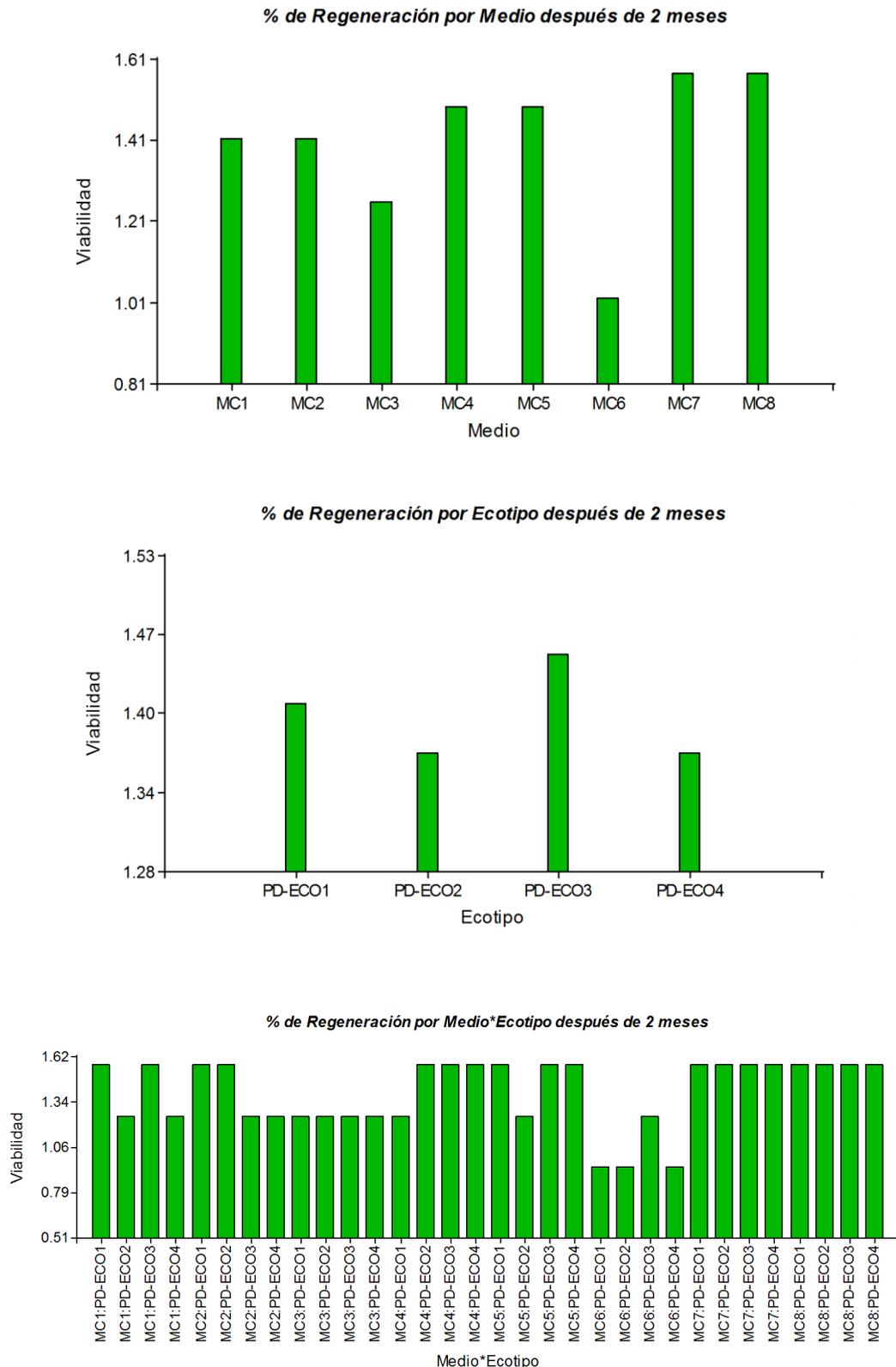


Figura 39: Gráficos de barras de regeneración de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera en los 8 tratamientos después de 2 meses

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 29 y Anexo 30 se muestra el análisis de varianza realizado para la regulación de los embriones somáticos. Se utilizaron los datos obtenidos a los 60 días de sembrados los embriones somáticos de palma datilera. Como el valor de p fue menor a 0.05; esto nos indica que hay una diferencia significativa entre los medios empleados; mientras que los cuatro ecotipos y la interacción medio*ecotipo no tienen una diferencia significativa.

Para poder determinar la diferencia de los ecotipos frente a los tratamientos se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se evidencia una misma letra "A" la cual confirma que los medio MC4, MC5, MC7 y MC7 responden de manera similar frente a los cuatro ecotipos responden de igual forma al cabo de 2 meses en conservación; mientras el medio MC6 es diferente ya que presentó bajo porcentaje de regeneración hasta un 70%, los ecotipos y la interacción medio*ecotipo (Anexo 41) presentar una misma letra lo cual indica que no son significativamente diferentes (Tabla 48), por lo tanto con los resultados obtenidos se ve los mejores medios después de los 2 meses son MC7 y MC8 con un 100% de regeneración de embriones.

- 4 meses de conservación *in vitro*

Siguiendo con los resultados se observa en la Tabla 46 y Figura 40, el tratamiento MC7 y MC8 empleado presentó hasta un 100% de regeneración de embriones somáticos al cabo de los 4 meses de evaluación, al ver los resultados se puede evidenciar que el medio y el ecotipo responden de manera diferente al cabo de los meses a continuación se procedió a explicar los resultados obtenidos de una manera más simplificada.

Las principales causas por las cuales los embriones no continuaron su desarrollo que se debe generalmente a la muerte de los embriones somáticos de palma datilera ocasionados por el tiempo que permanecieron en conservación, recordemos que no se agregó medio nuevo y solo se mantuvieron con la formulación inicial del medio, esto genera un estrés celular y generalmente genera que las células somáticas se programen solo para multiplicarse y no diferenciarse.

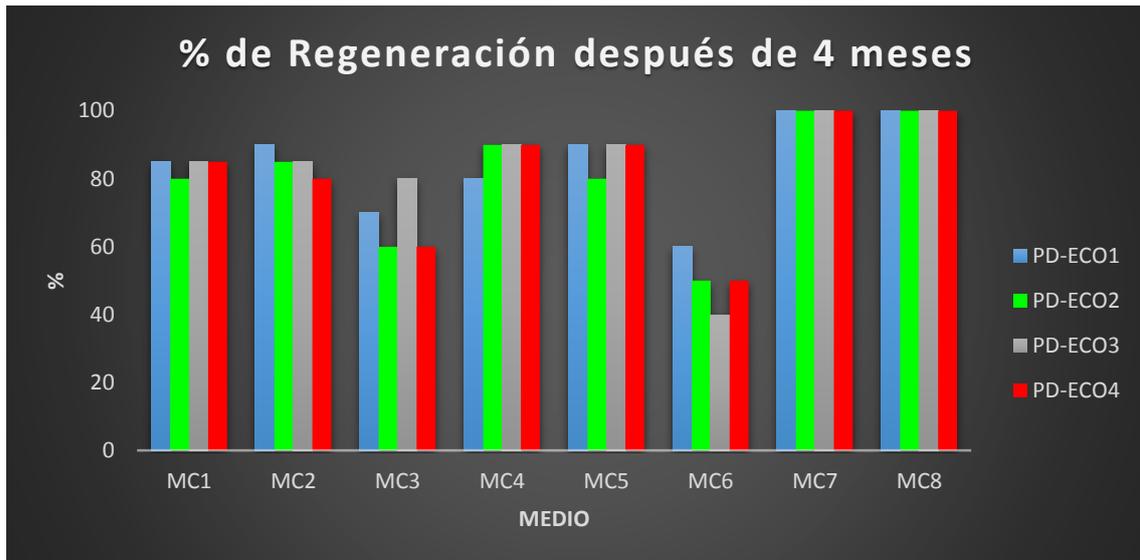
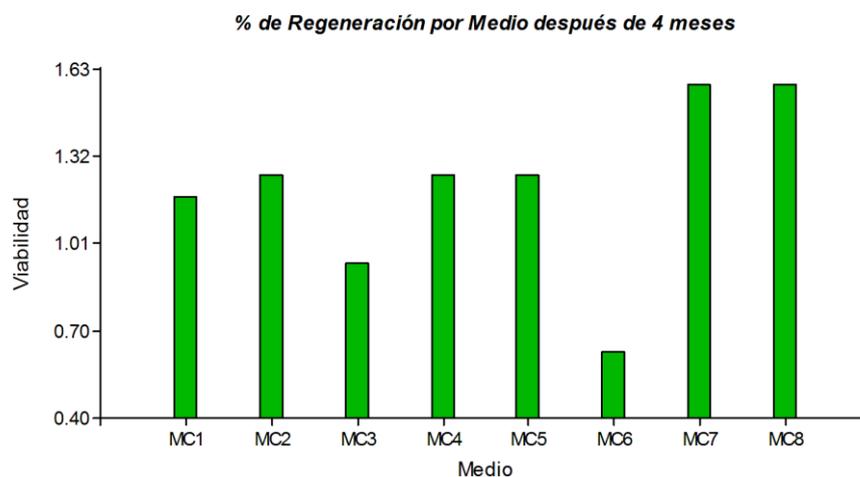


Figura 40: Porcentaje de regeneración de embriones somáticos de ecotipos de palma datilera después de 4 meses

Los resultados obtenidos respecto a la regeneración después de 4 meses de conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera, como se observa en la Figura 41, el medio MC7 y MC8 fueron los medios de cultivo con el que se obtuvo una regeneración completa en embriones somáticos en los 4 ecotipos. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% de regeneración de embriones somáticos en PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4.



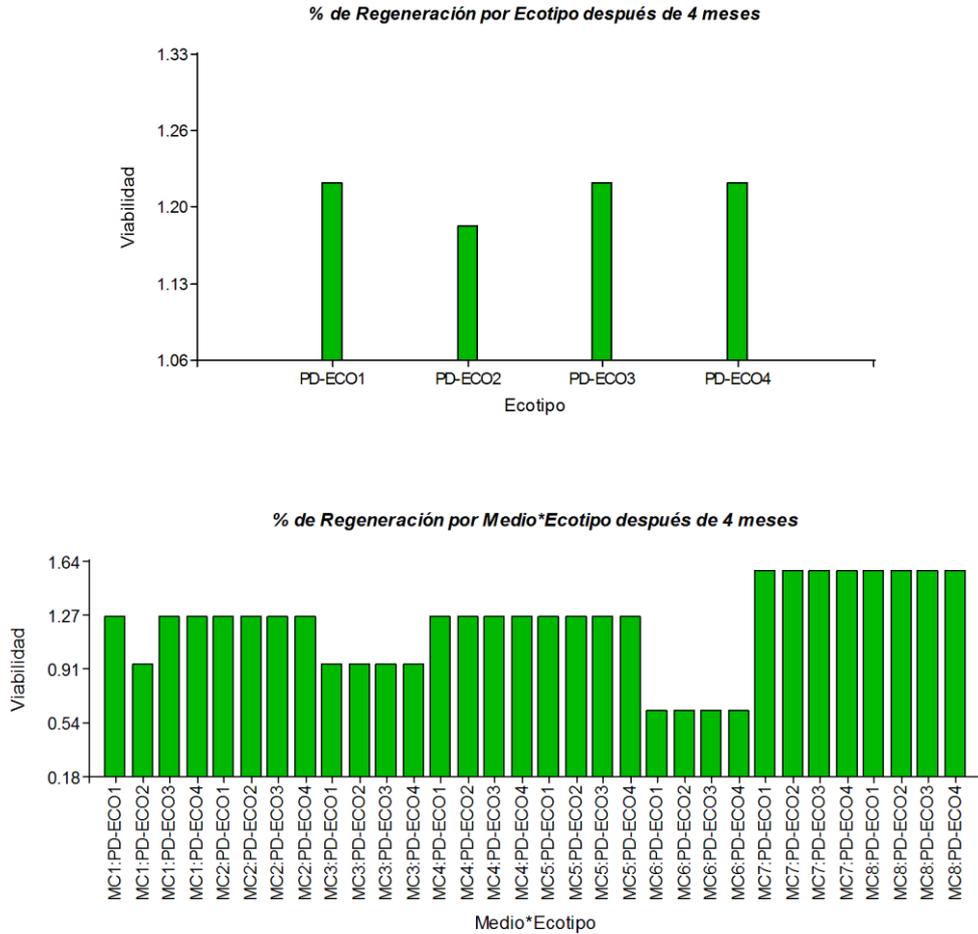


Figura 41: Gráficos de barras de regeneración de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera en los 8 tratamientos después de 4 meses

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 31 y Anexo 32 se muestra el análisis de varianza realizado para la regeneración de los embriones somáticos. Se utilizaron los datos obtenidos a los 120 días de sembrados los embriones somáticos de palma datilera. Como el valor de p fue menor a 0.05; esto nos indica que hay una diferencia significativa entre los medios empleados; mientras que los cuatro ecotipos y la interacción medio*ecotipo no tienen una diferencia significativa.

Para poder determinar la diferencia de los ecotipos frente a los tratamientos se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados. Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de

confianza, se evidencia una misma letra “A” la cual confirma que los cuatro ecotipos y la interacción medio*ecotipo (Anexo 42) responden de igual forma al cabo de 4 meses en conservación en los medios si se puede evidenciar una diferencia entre los tratamientos MC7 y MC8 representados por la letra “A”, mientras en tratamiento MC6 está representado por la letra “B”, lo cual nos indica que hay un diferencia entre estos medios (Tabla 50), con los resultados obtenidos se evidencia que los medios MC7 y MC8 conservaron una regeneración total en los embriones somáticos de palma datilera mientras que en medio MC6 presento una baja regeneración con promedios de hasta un 40% de embriones regenerados después de 4 meses en conservación *in vitro*.

- 6 meses de conservación *in vitro*

Siguiendo con los resultados se observa en la Tabla 46 y Figura 42, el tratamiento MC7 y MC8 empleado presentó hasta un 100% de regeneración de embriones somáticos al cabo de los 6 meses de evaluación, al ver los resultados se puede evidenciar que le medio y el ecotipo responden de manera diferente al cabo de los meses a continuación se procedió a explicar los resultados obtenidos de una manera más simplificada.

Las principales causas por las cuales los embriones no continuaron su desarrollo que se debe generalmente a la muerte de los embriones somáticos de palma datilera ocasionados por el tiempo que permanecieron en conservación, recordemos que no se agregó medio nuevo y solo se mantuvieron con la formulación inicial del medio, esto genera un estrés celular y generalmente genera que las células somáticas se programen solo para multiplicarse y no diferenciarse.

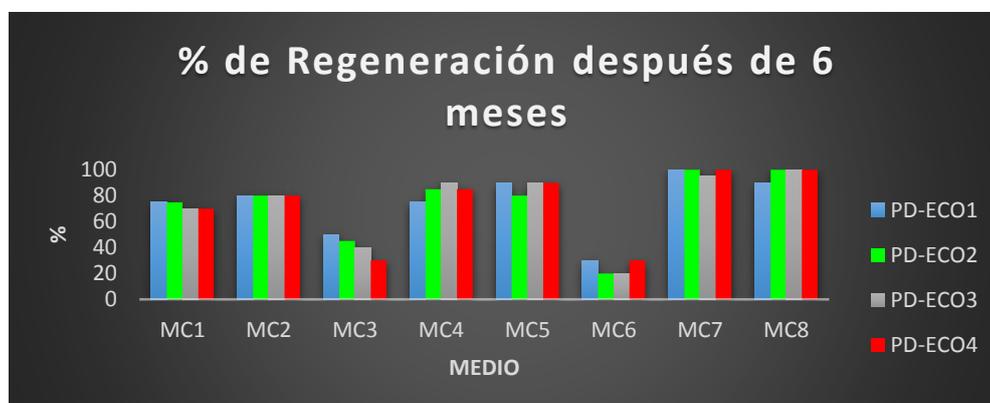
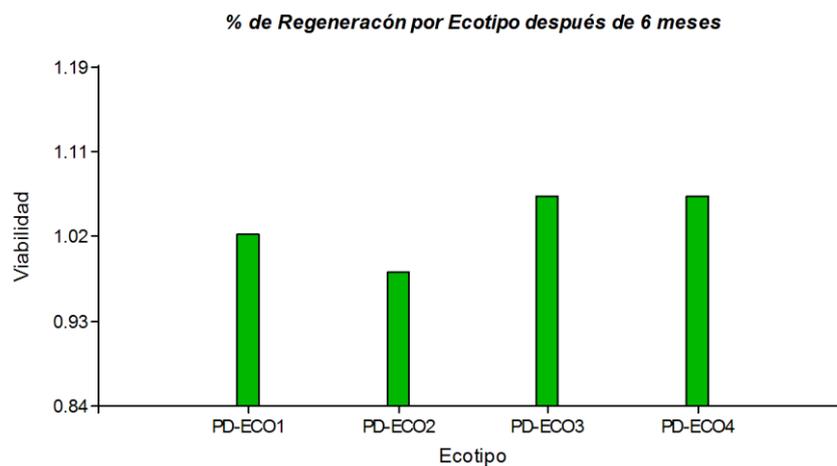
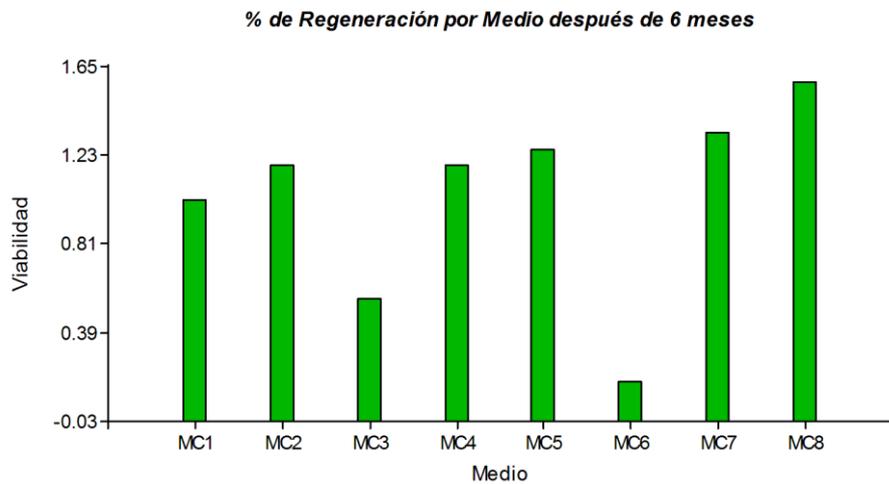


Figura 42: Porcentaje de regeneración de embriones somáticos de ecotipos de palma datilera después de 6 meses

Los resultados obtenidos respecto a la regeneración después de 6 meses de conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera, como se observa en la Figura 43, el medio MC7 y MC8 fueron los medios de cultivo con el que se obtuvo una regeneración casi completa en embriones somáticos en los 4 ecotipos. Para estos medios los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un 100% de viabilidad de embriones somáticos en PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4.



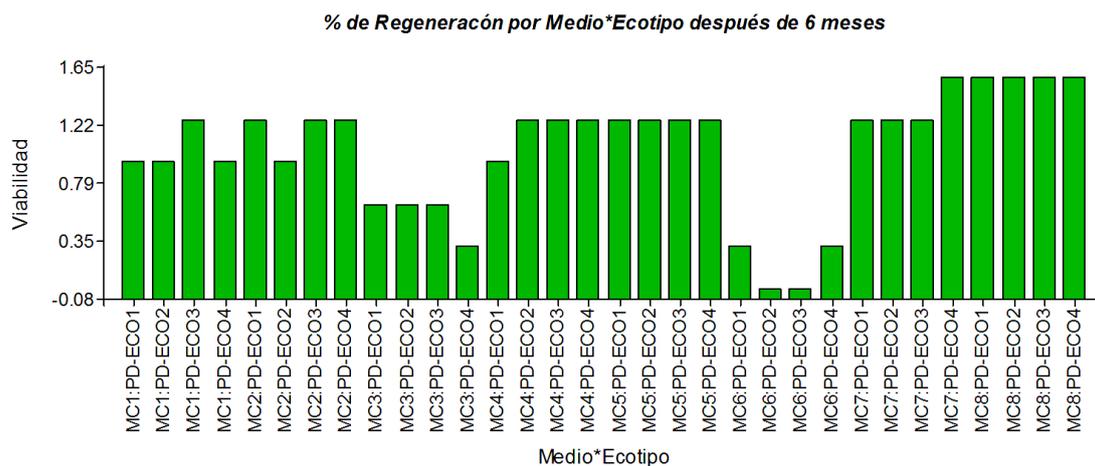


Figura 43: Gráficos de barras de regeneración de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera en los 8 tratamientos después de 6 meses

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 33 y Anexo 34 se muestra el análisis de varianza realizado para la regeneración de los embriones somáticos. Se utilizaron los datos obtenidos a los 180 días de sembrados los embriones somáticos de palma datilera. Como el valor de p fue menor a 0.05; esto nos indica que hay una diferencia significativa entre los medios empleados; mientras que los cuatro ecotipos y la interacción medio*ecotipo no tienen una diferencia significativa.

Para poder determinar la diferencia de los ecotipos frente a los tratamientos se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se evidencia una misma letra “A” la cual confirma que los cuatro ecotipos y la interacción medio*ecotipo (Anexo 43) responden de igual forma al cabo de 6 meses en conservación en los medios; si se puede evidenciar una diferencia entre los tratamientos MC5, MC7 y MC8 representados por la letra “A”, mientras en tratamiento MC6 está representado por la letra “C”, lo cual nos indica que hay una diferencia entre estos medios (Tabla 52), con los resultados obtenidos se evidencia que los medios MC5, MC7 y MC8 conservaron una regeneración similar en los embriones somáticos de palma datilera mientras que en medio MC3 y MC6 presentó una baja

regeneración con promedios de hasta un 30% y 0% respectivamente de embriones después de 6 meses en conservación *in vitro*.

- 8 meses de conservación *in vitro*

Siguiendo con los resultados se observa en la Tabla 46 y Figura 44, el tratamiento MC8 empleado presentó hasta un 90% de regeneración de embriones somáticos al cabo de los 8 meses de evaluación, al ver los resultados se puede evidenciar que le medio y el ecotipo responden de manera diferente al cabo de los meses a continuación se procedió a explicar los resultados obtenidos de una manera más simplificada.

Las principales causas por las cuales los embriones no continuaron su desarrollo que se debe generalmente a la muerte de los embriones somáticos de palma datilera ocasionados por el tiempo que permanecieron en conservación, recordemos que no se agregó medio nuevo y solo se mantuvieron con la formulación inicial del medio, esto genera un estrés celular y generalmente genera que las células somáticas se programen solo para multiplicarse y no diferenciarse.

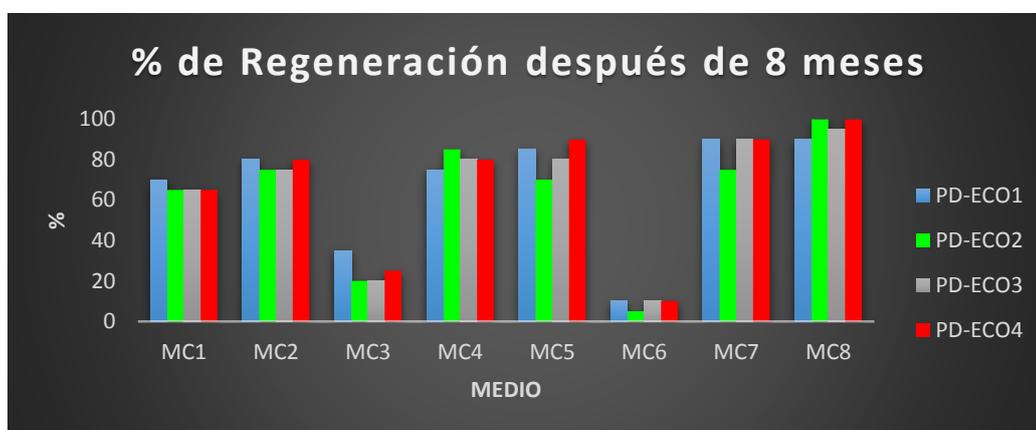


Figura 44: Porcentaje de regeneración de embriones somáticos de ecotipos de palma datilera después de 8 meses

Los resultados obtenidos respecto a la regeneración después de 8 meses de conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera, se observan en la Figura 45, el medio MC7 y MC8 fueron los medios de cultivo con el que se obtuvo una regeneración de un 70% y 85% respectivamente en embriones somáticos en los 4 ecotipos. Para estos medios los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de hasta un

90% de regeneración de embriones somáticos en PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4.



Figura 45: Gráficos de barras de regeneración de embriones somáticos de los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 transformado ($\text{Arcos}\sqrt{\%/100}$) de palma datilera en los 8 tratamientos después de 8 meses

Fuente: InfoStat.

En la Anexo 35 y Anexo 36 se muestra el análisis de varianza realizado para la regeneración de los embriones somáticos (Figura 46 y Figura 47). Se utilizaron los datos obtenidos a los 240 días de sembrados los embriones somáticos de palma datilera. Como el valor de p fue menor a 0.05; esto nos indica que hay una diferencia significativa entre los medios, mientras que los cuatro ecotipos no tiene diferencia significativa, al igual que la interacción medio*ecotipo respecto a los tratamientos empleados en esta fase de la investigación.

Para poder determinar la diferencia de los ecotipos frente a los tratamientos se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados.

Como los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa al aplicar estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza, se evidencia una misma letra “A” la cual confirma que los cuatro ecotipos y la interacción medio*ecotipo (Anexo 44) responden de igual forma al cabo de 8 meses en conservación en los medios; si se puede evidenciar una diferencia entre los tratamientos con respecto al MC8 (Figura 46) representados por la letra “A”, mientras en tratamiento MC3 y MC6 está representado por la letra “C”, lo cual nos indica que hay un diferencia entre estos medios (Tabla 54), con los resultados obtenidos se evidencia que los medios, MC8 conservó con mejores características y una regeneración de hasta 85% de los embriones somáticos de palma datilera mientras que los medios MC3 y MC6 presentaron la más baja regeneración con promedios de hasta un 10 y 0% respectivamente después de 8 meses en conservación *in vitro*.

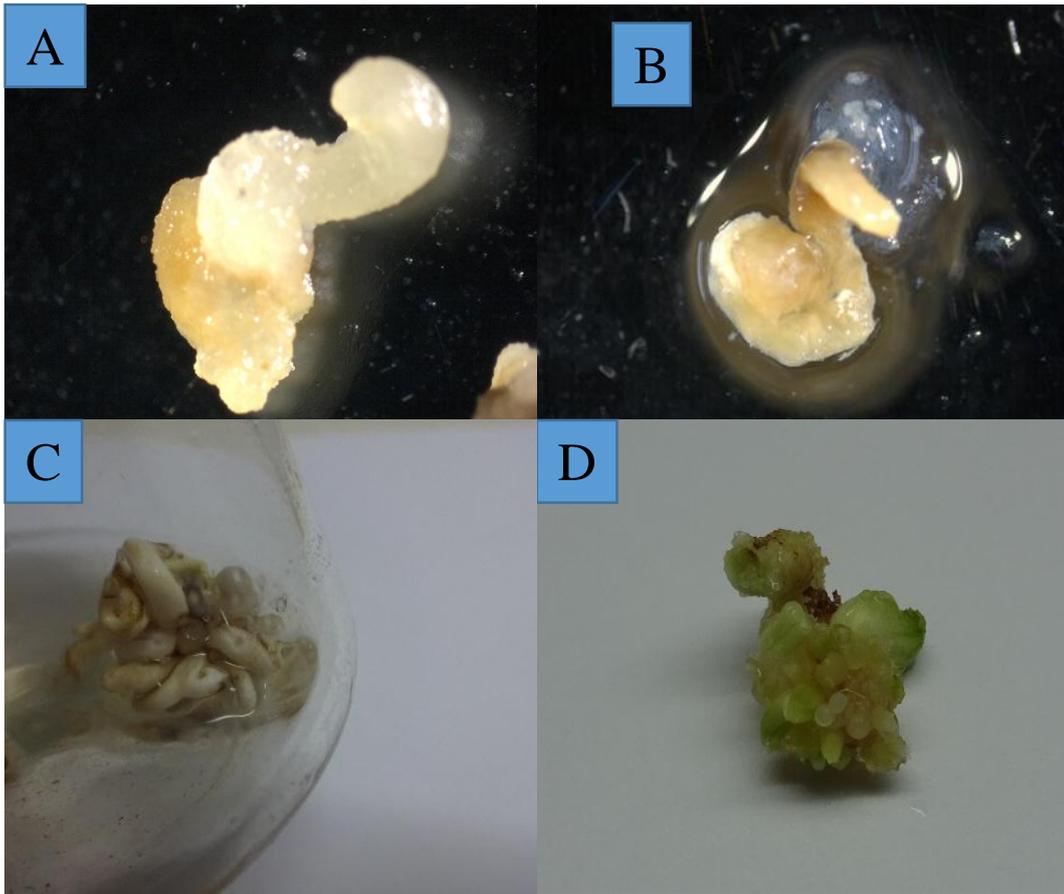


Figura 46: Imagen A embrión somático PD-ECO2 estadio escutelar; Imagen B embrión somático PD-ECO4 estadio coleptilar; Imagen C conjunto de embriones somáticos PD-ECO1 en medio de regeneración después de 6 meses en conservación; Imagen D conjunto de embriones somáticos PD:ECO3 en medio de regeneración después de 8 meses en conservación

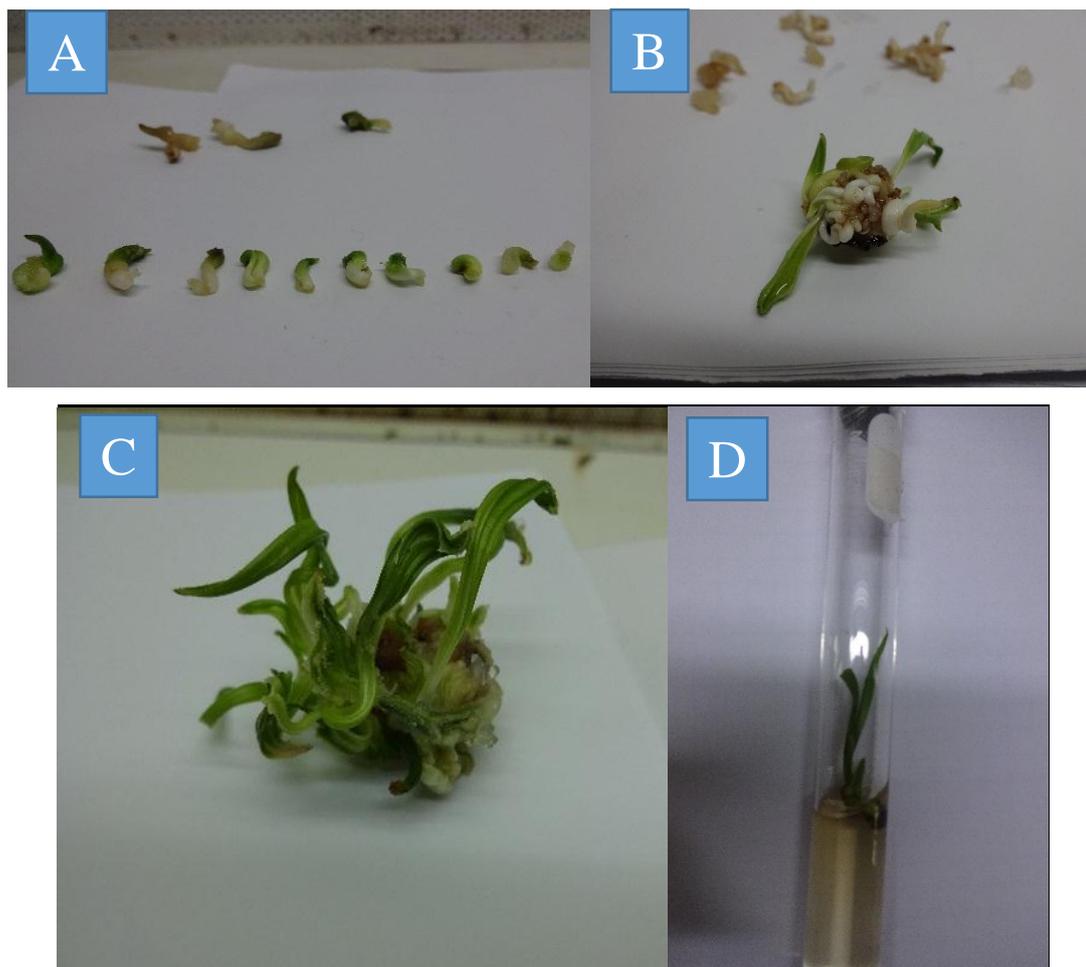


Figura 47: Imagen A embriones somáticos PD-ECO1 estadio escutelar; Imagen B embriones somáticos PD-ECO2 estadio coleptilar en medio de maduración; Imagen C conjunto de plantas PD-ECO3 en medio de maduración después de 8 meses en conservación; Imagen D palma PD:ECO4 en medio de maduración después de 8 meses en conservación

Hassan et al. (2016) lograron conservar embriones somáticos de palma datilera empleando distintas concentraciones de agentes osmóticos y ácido abscísico y logro conservar los embriones por hasta diez meses empleando concentraciones de 0.3M de sacarosa y 2 mg/L de ABA, obteniendo hasta 70% de regeneración de embriones somáticos; también reporta hasta un 80% de regeneración de embriones somáticos de palma datilera luego de 8 meses.

Luego de este análisis y los resultados obtenidos, con MC8 fue el que obtuvo una regeneración de hasta 85% en PD-ECO2 (Figura 47) de embriones somáticos de palma datilera al cabo de 8 meses, por eso no se recomienda este medio para la fase de conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera.

V. CONCLUSIONES

- 1 En la presente investigación se logró conservar *in vitro* embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) de la Región Ica empleando medios de crecimiento lento.
- 2 Se determinó que el mejor tratamiento para la formación de callo embriogénico de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) fue el medio MCE2, compuesto por Sales y vitaminas de MS modificadas, 45g/L de Sacarosa, 1.5g/L de Carbón activado, 100mg/L de L-glutamina, 40mg/L de Adenina, 2ml/L de ppm, 5mg/L de 2,4-D, 3mg/L de 2iP y 6.7g/L de Agar con el cual se obtuvo promedios de hasta 100% en los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y una 80% en PD-ECO4.
- 3 El mejor medio de cultivo *in vitro* para la etapa de formación de embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) fue el medio MES1 compuesto por Sales y vitaminas de 1/2MS, 45g/L de Sacarosa + 1g/L de Carbón activado, 100mg/L de L-glutamina, 40mg/L de Adenina, 2ml/L de ppm, 0.5mg/L de BA, 0.5mg/L de Kinetina y 6.7g/L de Agar con el cual se obtuvo promedios de hasta 100% en los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y una 80% en PD-ECO4.
- 4 El mejor tratamiento en la conservación *in vitro* de embriones somáticos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) donde se emplearon distintos agentes osmóticos y reguladores de crecimiento fue el medio MC8 compuesto por Sales y vitaminas de MS, 40g/L de Sacarosa, 2g/L ABA 2ml/L de ppm con el cual se logró conservar embriones somáticas por hasta 8 meses con promedios de viabilidad de hasta 100% en los ecotipos PD-ECO2 y PD-ECO4; en la regeneración se obtuvo hasta 90% en los ecotipos PD-ECO1, PD-ECO3, PD-ECO4 y 85% en PD-ECO2.

VI. RECOMENDACIONES

Utilizar PPM (Plant preservative mixture) en los medios de cultivo, ayuda a disminuir la contaminación de los explantes.

Realizar un ajuste de balance en el uso de las fitohormonas, como la aplicación de otras citoquininas así como auxinas en la etapa de embriogénesis somática *in vitro* de esta especie para aumentar la tasa de multiplicación y comprobar si producen mejores resultados que los obtenidos en la presente investigación.

Desarrollar las siguientes etapas del cultivo de Tejidos vegetales la etapa de enraizamiento y la aclimatación de explantes de Palma datilera; puede tomar como referencia los resultados obtenidos en la investigación.

Realizar pruebas cambiando las condiciones físicas como modificar la temperatura para ver la respuesta de los explantes sobretodo bajar la temperatura para evaluar el comportamiento del explante por ejemplo; ya que es una especie muy susceptible al cambio de temperatura.

Continuar la investigación con la obtención de células vegetales, después de superar la fase de formación de callos indiferenciados, los resultados de la presente investigación se pueden tomar como referencia, se recomienda probar bioreactores de matraz para la multiplicación de callos y la producción de embriones somáticos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdullatif, A.; Suliman, A. 2016. In Vitro role of hormones at multiplication stage of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cvs Khalas and Sukary. *Research Journal of Biotechnology*. 58-63.
2. Abo Elfadl, R. 2008. Studies on in vitro propagation of Aswan date palm cultivars and their germplasm preservation. Ph.D. Thesis, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute (GEBRI), Sadat City, Minufiya University, Egypt.
3. Al-Khayri, J. 2001. Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37:453–456.
4. Al-Khayri, J. 2005. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Protocols of somatic embryogenesis in woody plants*. Berlin: Springer. 309-319.
5. Al-Khayri, J. 2010. Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) improved by coconut water. *Biotechnology*. 9:477-484.
6. Al-Khayri, J.; Jain, S.; Johnson, D. 2015. Date palm genetic resources and utilization, Vol. 1: Africa and the Americas, Dordrecht: Springer. 546p.
7. Al-Yahyai, R.; Manickavasagan, A. 2012. An Overview of Date Palm. A. Manickavasagan, E. M. Mohamed, & E. Sukumar (Eds.), *Dates Production, Processing, Food and Medicinal Values Florida, Estados Unidos*. 3–11.
8. Arana, C.; Salinas, L.; Millán, B.; Kahn, F. 2013. Impacto del cambio climático global sobre la distribución geográfica de la Palma Datilera (*Phoenix dactylifera*) en el Perú.
9. Ashmore, S. 1997. Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources. *International Plant Genetic Resources Institute, Rome*.
10. Balzarini, M.; Di Rienzo, J.; Tablada, M.; González, L.; Bruno, C.; Córdoba, M.; Robledo, W.; Casanoves, F. 2011. *Introducción a la bioestadística: aplicaciones con InfoStat en agronomía*. Córdoba, Argentina. 383p.
11. Barba, A.; Romero A. 2001. *Propagación in vitro. Micropropagación de plantas*, Ed. Trillas. 107 p.

12. Barbón, R. 2001. Efecto del dióxido de carbono sobre la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo y *Clematis tangutica* K. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas.
13. Barrow, S. 1998. Una monografía de phoenix L. (palmae: Coryphoideae) Kew Bull. 53(1): 513-575.
14. Bhansali, R. 2010. Date palm cultivation in the changing scenario of Indian arid zones: Challenges and prospects. Desert plants, Springer. 423-459.
15. Bekheet, S.; Hanafy, M. 2011. Towards Sex Determination of Date Palm. En S. M. Jain, J. M. Al-Khayri, & D. V. Johnson (Eds.), Date Palm Biotechnology. Londres: Springer. 551-566.
16. Benbadis, A. 1992. Coconut and date palm. In: Biotechnology of Perennial Fruits Crops. F.A.Hammerschlag and R.E. Litz (Editors).C.A.B. International. Wallingford, UK. 383-400.
17. Benson, E.; Johnston, J.; Muthusamy, J.; Harding, K. 2006. Physical and engineering perspectives of *in vitro* plant cryopreservation. In: Gupta, DS; Ibaraki, Y. eds. Plant Tissue Culture Engineering. Springer. Holanda. 441-476.
18. Castillo, B.; Smith, M.; Yadava, U. 1998. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. Plant Cell Reports 17:172-176.
19. Carrión, A. 2018. Caracterización morfológica e inducción de embriogénesis somática de ecotipos representativos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) de la región Ica, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima.
20. Chandler, W. 1958. Everygreen orchards. Lea and Fabiger, Philadelphia. USA.
21. Chevalier, A. 1952. Recherche sur les Phoenix africains; R.B.A., Mai-Juin.
22. Cobo, B. 1882. Historia de la fundación de Lima. Imprenta liberal, Lima, Perú.
23. Corrales, D. 2017. Establecimiento In vitro de Bambú (*Guadua angustifolia* Kunth) mediante segmentos nodales de ramas primarias. Tesis Lic. Ing. For. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. 60p.
24. Cousins, M.; Adelberg, J. 2008. Short-term and long-term time course studies of tumeric (*Curcuma longa* L.) microrhizome development in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 93:283-293.
25. Diab, M. 2008. Biotechnological studies of date palm under Siwa Oasis conditions. Ph.D. Thesis, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute (GEBRI), Sadat City, Minufiya University. Egypt.

26. Dodeman, V., Duereux G.; Kreis M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48, (313): 1493 – 1509.
27. Dowson, V. 1982. Producción y protección de dátil, con especial referencia al norte de África y el Cercano Oriente. *Boletín Técnico de la FAO*. 35. 294p.
28. Doods, J.; Roberts, L. 1995. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press. Estados Unidos. 248p.
29. Dransfield, J.; Uhl N. 1986. An outline of a classification of palms. *Principes* 30 (1): 3-11.
30. Dussert, S.; Chabrillange, N.; Engelmann, F.; Anthony, F.; Hamon, S. 2000. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: toward a simplified protocol for routine use in coffee genebanks. p. 161 - 166. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application*. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.
31. Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica* 57:227-243.
32. Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Dev Biol –Plant*, 47 (1): 5–16.
33. Escobar, R.; Debouck, D.; Roca, W. 2000. Development of cassava cryopreservation. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application*. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p
34. FAO. 1993. *Agricultural Services. Bulletin N° 101*. Rome.
35. Fki, L. 2003. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, (*Phoenix dactylifera* L.). *Deglet Nour. Plant Cell Reports*. 21:517- 524.
36. Fki, L. 2011. *Date palm micropropagation via somatic embryogenesis*. Date palm biotechnology, Dordrecht: Springer. 47-68.
37. Gagliardi, R.; Hanai, L.; Pacheco, G; Oliveira, C.; Carneiro, L.; Montenegro-Valls, J.; Mansur, E.; Carneiro-Vieira, M. 2007. Assesment of genetic stability among *in vitro* plants of *Arachis retusa* using RAPD and AFLP markers for germplasm preservation. *Journal of Integrative Plant Biology* 46:307-312.
38. Gangopadhyay, G.; Bandyopadhyay, T.; Poddar, R.; Gangopadhyay, S.; Mukherjee, K. 2005. Encapsulation of pineapple microshoots in alginate beads for temporary storage.

Current Science 88:972- 977.

39. Gómez, R. 1998. Embriogénesis Somática. En .Pérez Ponce, J.N (Ed) Propagación y Mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. 57-79.
40. Gray, D. 1987. Introduction to the Symposium, in proc. Symp. synthetic seed technology for the mass cloning of crop plants: problems and prospects. Hort Science, 22: 795- 814.
41. Gupta, S.; Mandal, B. 2003. In vitro methods for PGR conservation: principles and prospects. In: Chaudhury R, Pandey R, Malik SK, Mal B (Eds.) In vitro conservation and cryopreservation of tropical fruit species. IPGRI. Rome. 71p.
42. Hassan, M. 2002. In vitro studies on somatic embryogenesis conservation of date palm. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University, Cairo, Egypt.
43. Hassan, M.; Gomaa, A.; Ibrahim, I.; Ali, S. 2004. In vitro storage of date palm somatic embryos under minimal growth condition and genetic stability of regenerated plantlets by RAPD Markers. International Conference of Genetics Engenering and its Application, Sharm El Sheikh, Egypt, pp. 483–498.
44. Hassan, M.; Taha, A.; Ibrahim, A. 2016. In vitro conservation of Date Palm embryos under slow-growth conditions with osmotic agent and abscisic acid. International Journal of PharmTech Research. Cairo, Egypt. 173-183.
45. Hashish, K.; Taha, L.; Ibrahim, S. 2015. Micropropagation potentiality and pigments content of Hibiscus rosasinensis L. as affected by gamma radiation. International Journal of ChemTech Research., 8 (9):131-136.
46. Hegazy, A. 2008. Micropropagation of Egyptian date palm. Selmy through floral buds culture. Journal of Agricultural Sciences, Mansoura University. 33(4):2803-2815.
47. Hoyos, J.; Braun, A. 2001. Palmas en Venezuela. Autóctonas y Exóticas. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. 47p.
48. Inagaki, M. 2000. Use of stored pollen for wide crosses in wheat haploid production. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.
49. Jain, S. 2011. Prospects of in vitro conservation of date palm genetic diversity for sustainable production. Emir J Food Agric. 23(2):110–119.
50. Jogeswar, G.; Ranadheer, D.; Anjaiah, V.; Kavikishor, P. 2007. High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of Sorghum bicolor (L.) Moench

- from immature inflorescence explants. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 43: 159–166.
51. Keaney, T. 1906. Date varieties and Date Culture in Tunis. Washington, U.S.D.A; Bureau of Plant Industry, Bulletin 92.
52. Keller, E.; Senula, A.; Leunufna, S.; Grübe, M. 2006. Slow growth storage and cryopreservation — tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration* 29:411-417.
53. Kintzios, S.; Sereti, E.; Bluchos, P.; Drossopoulos, J.; Kitsaki, C. Y Liopa, A. 2002. Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Reports* 21: 1-8.
54. Krueger, R. 2011. Biotecnología de palma datilera. Jain SM, editor. Springer Science Business Media BV.
55. Kumar, V.; Naidu, M.; Rayishankar, G. 2006. Developments in coffee biotechnology - *in vitro* plant propagation and crop improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87:49-65.
56. Kurup, S. 2014. Rapid *in vitro* regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Kheneizi using tender leaf explant. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 26(6):539-544.
57. Malinowski, R. Y Filipecki, M. 2002. The role of cell wall in plant embryogenesis. *Cellular y Molecular Biology Letters*, 7:1137–1151.
58. Mallón, R.; Barros, P.; Luzardo, A.; González, M. 2007. Encapsulation of moss buds: an efficient method for the *in vitro* conservation and regeneration of the endangered moss *Splachnum ampullaceum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88:41-49.
59. Martin, K.; Zhang, C.; Slater, A.; Madassery, J. 2007. Control of shoot necrosis and plant death during micropropagation of banana and plantains (*Musa* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88:51-59.
60. Marulanda, M.; Gutiérrez, L.; Márquez, M. 2005. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth. *Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal*. 27 (82).
61. Mashayekhi, N. 2000. The protein synthesis spectrum during the induction phase of somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota* L.) cultures and the role of nitrogen forms for embryo development. Thesis Doctor of Science in Agriculture. Institute of Plant Nutrition. Department of Tissue Culture. Justus Liebig University, Giesse, Germany. pp 199.

62. Mason, S. 1915. Botanical characters of the leaves of the date palms used in distinguishing cultivated varieties. USDA, Washington, D.C. Bull. 223p.
63. Matsumoto, T; Mochida, Cl; Itamura, H; Sakai, A. 2001. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. *Plant Cell Reports* 20:398-402.
64. Merkle, S., Parrot W.; Flinn B. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En Thorpe T.A (Ed). *In Vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers. 155-201.
65. MINAGRI. 2013. Producción de Frutas, 2012-2013. Ministerio de Agricultura y Riego - Oficina de Estudios Económicos y Estadísticos.
66. Milne, D. 1918. The Date Palm cultivation in the Punjab. Govt. Printing Press, Lahore.
67. Mouaad, A.; Ilham, B.; Reda, M.; Boutaina, M. 2017. Somatic embryogenesis from bud and leaf explants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Najda. *Biotech.* 7-58
68. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25: 135–166.
69. Murashige, T.; Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
70. Murier, P. 1973. Palmier-dattier-Techniques agricoles productions tropicales. Maison Neuve et Larose. Paris. 217p.
71. Naik, S.; Chand, P. 2006. Nutrient alginate encapsulation of in vitro nodal segments of Pomegranate (*Punica granatum* L.) for germplasm distribution and exchange. *Scientia Horticulturae*, 108: 247- 252.
72. Naik, P.; Al-Khayri, J. 2016. Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, Second Edition. 1391: 357-366.
73. Nogueira, F.; Pio, L.; Pasqual, M.; Amaral, A.; Scherwinski-Pereira, J. 2014. An approach on the in vitro maintenance of sugarcane with views for conservation and monitoring of plant nuclear DNA contents via flow cytometry. *In Vitro Cell and Dev Biol – Plant* 51:220–230.
74. Oihabi, A. 1991. Effect of vesicular arbuscular Mycorrhizae on Bayoud disease and date palm nutrition. Ph-D thesis at the University of Marrakech. 199p.
75. Olivo, A.; Vielma, M. 2010. La palma datilera: obtención de plantas por germinación de semillas *in vitro*. Laboratorio de Fijación de Nitrógeno y Cultivos in vitro. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. 34: 133-139.

76. Othmani, A. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 97:71-79.
77. Panis, B.; Schoofs, H.; Remy, S.; Sági, L.; Swennen, R. 2000. Cryopreservation of banana embryogenic cell suspensions: Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.
78. Parrott, W. 2002. La embriogénesis somática en las angiospermas. En: Resúmenes: VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal, Santa Clara, Cuba. 156 p.
79. Pedroza, J. 2008. Aplicaciones de tejidos vegetales en condiciones in vitro. Bogotá, CO. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 348 p.
80. Pence, V. 2011. Evaluating costs for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cell Dev Biol –Plant*, 47(1):176–187.
81. Pennycooke, J.; Towill, L. 2000. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. *Plant Cell Reports* 19:733-737.
82. Perea, M; Tirado, A. 2011. Cultivo de tejidos vegetales in vitro. Bogotá, CO. Universidad Nacional de Colombia. 160 p.
83. Pierik, R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. España. 346 p.
84. Quiroz, F. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86:285-301.
85. Rai, M.; Asthana P.; Singh S.; Jaiswal V.; Jaiswal U. 2009. The encapsulation technology in fruit plants - a review. *Biotechnology Advances*, 27: 671- 679.
86. Rao, N. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3:136-145.
87. Reed, B.; Sarasan, V.; Kane, M.; Bunn, E.; Pence, V. 2011. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cell Dev Biol- Plant*, 47 (1): 1–4.
88. Reinhoud, P.; Van-Iren, F.; Kijne, W. 2000. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. p. 91 - 102. In:Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.

89. Samoylov, V.; Tucker, D. Y Parrot, W. 1998. Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. In *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 34:8-13.
90. Sánchez, N.; Jiménez, V. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana* 20:135-151.
91. Sandoval-Yugar, E.; Dal Vesco, L.; Steinmacher, D.; Stolf, E.; Guerra, M. 2009. Microshoots encapsulation and plant conversion of *Musa Sp. Csv. Grand Naine*. *Ciencia Rural, Santa María*, 39 (4): 998- 1004.
92. Sant, R.; Panis, B.; Taylor, M.; Tyagi, A. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta*) accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92:107-111.
93. Sarasan, V. 2011. Importance of in vitro technology to future conservation programmes worldwide. *Kew Bull* 65(4): 549–554.
94. Sharma, S.; Shahzad, A.; Teixeira Da Silva, J. 2013. Synseed technology- A complete synthesis. *Biotechnology Advances*, 31: 186- 207.
95. Soengas, P.; Cartea, E.; Lema, M.; Velasco, P. 2009. Effect of regeneration procedures on the genetic integrity of *Brassica oleracea* accessions. *Molecular Breeding* 23:389-395.
96. Tisserat, B.; Esan, E.; Murashige, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1: 1-78.
97. Tyagi, R.; Agrawal, A.; Mahalakshmi, C.; Hussain, Z; Tyagi, H. 2007. Low-cost media for in vitro conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 43:51-58.
98. Tyagi, R.; Goswarni, R.; Sanayaima, R.; Singh, R.; Tandon, R.; Agrawal, A. 2009. Micropropagation and slow growth conservation of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). *In vitro Cell Dev Biol- Plant*, 45 (6): 721-729.
99. Wang, Y.; Fan, M.; Liaw, S. 2005. Cryopreservation of invitro–grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. *Botanical Bulletin of the Academia Sinica* 46:29-34.
100. Warham, E.; Burnett, P. 1989. In vitro storage of potato. *Zuowupinzhong- Ziyuan* N° 3, 42-43.
101. Withers, L.; Wheelans, S.; Williams, J. 1990. In vitro conservation of crop germplasm and the IBPGR databases. *Euphytica* 45:9-22.

102. Zaidi, N.; Habib, N.; Zafar, F. Y Zafar, S. 2000. Bulbous and cormous monocotyledonous ornamental plants in vitro. *Quarterly Science Vision*, 6(1):58- 73.
103. Zhao, M.; Xhu, Y.; Dhital, S.; Khu, D.; Song, Y.; Wang, M.; Lim, H. 2005. An efficient cryopreservation procedure for potato (*Solanum tuberosum* L.) utilizing the new ice blocking agent, supercool X1000. *Plant Cell Reports* 24:477-481.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Caracteres georreferenciales y morfológicos de las plantas de Palmas datileras seleccionadas

Ecotipo	Latitud (°)	Longitud (°)	Altitud (m.s.n.m.)	Ubicación	Altura (m)
PD-ECO1	-13.92157	-75.92368	357.92	Ica	8.7
PD-ECO2	-13.9105	-76.014766	296.31	Ica	8.5
PD-ECO3	-13.90444	-76.048399	252.99	Ica	5.4
PD-ECO4	-13.55946	-75.55906	363.00	Ica	6.2

Anexo 2: Ecotipos PD-ECO1, PD-ECO2, PD-ECO3 y PD-ECO4 de la región Ica



Figura 48: Imagen de las Palmas datileras de los ecotipos PD-ECO1 y PD-ECO2 de la región Ica



Figura 49: Imagen de las Palmas datileras de los ecotipos PD-ECO3 y PD-ECO4 de la región Ica

Anexo 3: Cortes histológicos a callos embriogénicos y embriones de Palta datilera

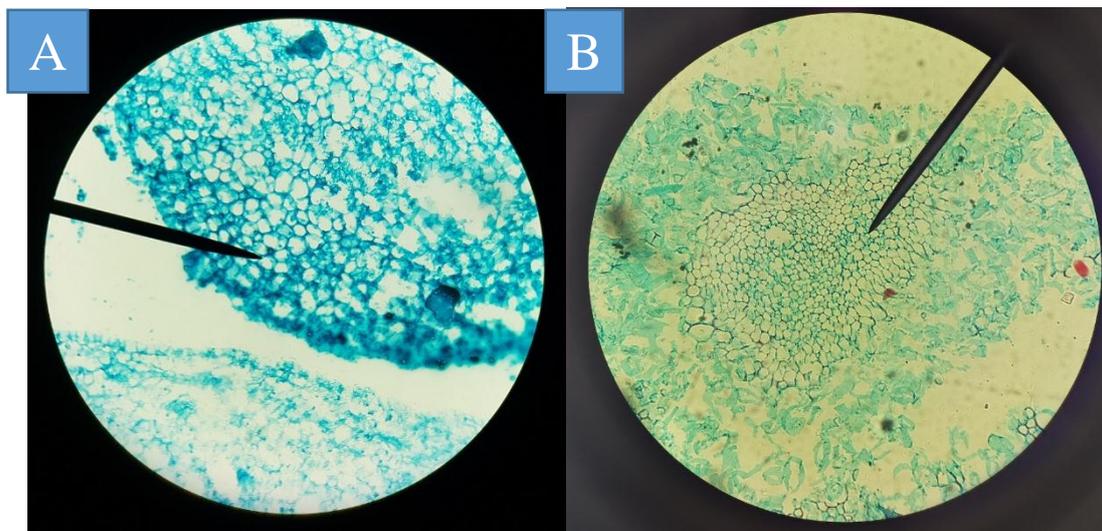


Figura 50: Imagen A corte histológico de callo inicial de Palma datilera vista a 100X;
Imagen B callo embriogénico de Palma datilera vista 40X

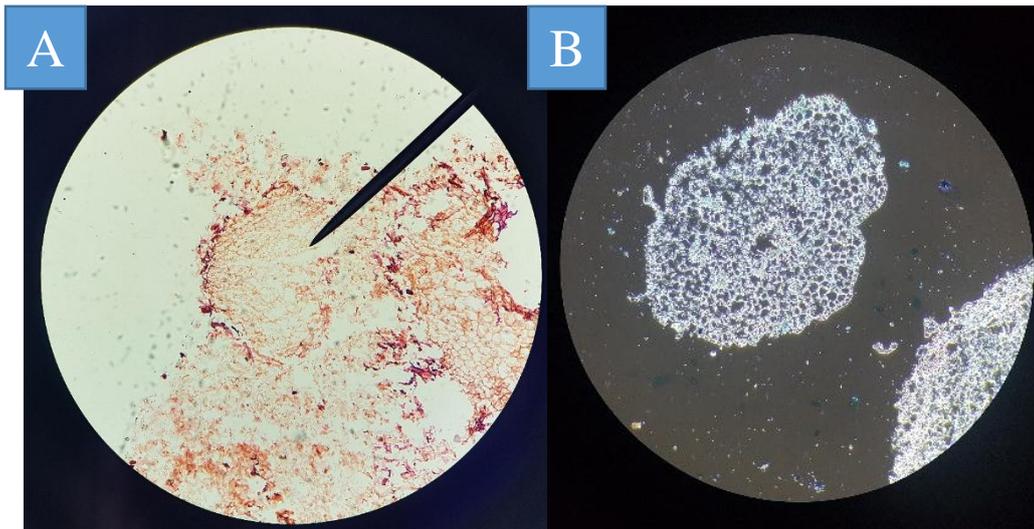


Figura 51: Imagen A corte histológico de embrión somático estadio globular de Palma datilera vista a 40X; Imagen B embrión somático estadio oblongo de Palma datilera vista a 40X

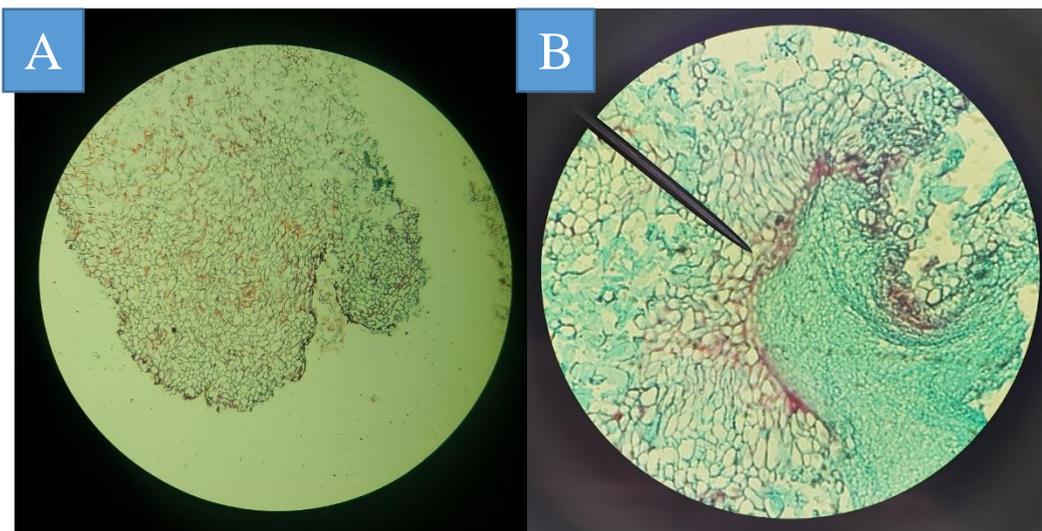


Figura 52: Imagen A corte histológico de embrión somático estadio escutelar de Palma datilera vista a 40X; Imagen B embrión somático estadio coleoptilar de Palma datilera vista a 40X

Anexo 4: Protocolo para la obtención de cortes histológicos en callos embriogénicos y embriones de Palta datilera

Metodología del trabajo

- Se montan las muestras de callo en casetes de histología
- Se remojan las muestras en solución FAA por 24 horas como mínimo.

Solución FAA:

Sustancia	MI
Alcohol absoluto	90
Ac. Acético	3
Formaldehido	7

- Lavar las muestras con agua corriente por 4 horas.
- Realizar la deshidratación de las muestras (por 1 hora en cada solución)
 - a. OH 50%
 - b. OH 75%
 - c. OH 85%
 - d. OH 96%
 - e. OH 100% (Alcohol absoluto)
 - f. OH 100% - Xilol (1:1)
- Realizar la infiltración o imbibición en parafina
 - a. Xilol -> 1h
 - b. Xilol -> 1h
 - c. Xilol + Parafina (1:1) -> 2h a 40°C
 - d. Parafina -> 2h a 58°C
 - e. Parafina -> 2h a 58°C
- Inclusión de las muestras en los bloques, la temperatura se debe mantener a 58°C.
 - a. Colocar la muestra de acuerdo a los objetivos que se quiere cumplir.
- Colocar los bloques en el refrigerador por 2h para enfriar la parafina.
- Proceder a cortar las muestras en el micrótopo.

- Colectar la serpentina de parafina y ponerla en baño maría a 58°C. Proceder a pescar la muestra con ayuda del porta objeto, seguidamente secar con papel filtro y pasar el dedo por encima para eliminar cualquier burbuja.
- Después flamear por la parte de abajo del porta objeto, rotular y colocar en una incubadora a 38°C de un día para el otro.
- Desparafinar las muestras
 - a. Xilol -> 5'
 - b. Xilol -> 5'
 - c. Xilol -> 5'
- Hidratación de las muestras
 - a. OH 100% -> 5'
 - b. OH 95% -> 5'
 - c. OH 85% -> 5'
 - d. OH 75% -> 5'
- Tinción de las muestras
 - a. Se utiliza solución de safranina y se deja remojando por una noche.
 - b. Lavar las muestras usando agua destilada; si las muestras estuviera sobreteñida emplear Diferenciador ROH acidulado.
 - c. Pasar las muestras por agua destilada para detener la acción del Diferenciador.
 - d. Proceder a deshidratar de las muestras
 - e. OH 85% -> 2'
 - f. OH 95% -> 2'
 - g. OH 100% -> 2'
 - h. Después sumergir las muestras en solución de Verde de malaquita o Fast Green por menos de 1'.
 - i. Pasar las muestras por una solución ROH/Xilol (1:1) por 2'.
 - j. Seguidamente pasar las muestras por Xilol por 10', con papel retirar el exceso de xilol y dejar secar durante unos minutos.
 - k. Cuando la muestra este seca se procede a poner el cubre objeto aplicando una gota del Bálsamo de Canadá para muestras permanentes o Glicerol para muestras temporales.
 - l. Finalmente observar las muestras en un microscopio y tomar fotos para su posterior descripción e interpretación.

Anexo 5: ANOVA para la viabilidad de callo de palma datilera (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
Viabilidad	20	0.16	0.00		23.54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.37	3	0.12	1.00	0.4182
Ecotipo	0.37	3	0.12	1.00	0.4182
Error	1.97	16	0.12		
Total	2.34	19			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: InfoStat.

Anexo 6: Prueba de Tukey para la viabilidad de callo de palma datilera

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
Viabilidad	20	0.16	0.00		23.54

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.63524

Error: 0.1232 gl: 16

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO2	1.26	5	0.16 A
PD-ECO4	1.57	5	0.16 A
PD-ECO3	1.57	5	0.16 A
PD-ECO1	1.57	5	0.16 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 7: ANOVA para la formación de callo de palma datilera (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
Formación de callo	20	0.11	0.00		25.14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.49	3	0.16	0.67	0.5847
Ecotipo	0.49	3	0.16	0.67	0.5847
Error	3.94	16	0.25		
Total	4.44	19			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: InfoStat.

Anexo 8: Prueba de Tukey para la formación de callo de palma datilera

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Formación de callo	20	0.11	0.00	25.14

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.89836

Error: 0.2465 gl: 16

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO4	1.26	5	0.22 A
PD-ECO2	1.26	5	0.22 A
PD-ECO3	1.57	5	0.22 A
PD-ECO1	1.57	5	0.22 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 9: ANOVA para la viabilidad de callo de palma datilera (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	40	0.14	0.00	23.62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.73	7	0.25	0.73	0.6501
Medio	0.99	1	0.99	2.91	0.0978
Ecotipo	0.25	3	0.08	0.24	0.8661
Medio*Ecotipo	0.49	3	0.16	0.48	0.6952
Error	10.85	32	0.34		
Total	12.57	39			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: InfoStat.

Anexo 10: Prueba de Tukey para la viabilidad de callo de palma datilera

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	40	0.14	0.00	23.62

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.37500

Error: 0.3389 gl: 32

Medio	Medias	n	E.E.
MPC1	1.18	20	0.13 A
MPC2	1.49	20	0.13 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.70540

Error: 0.3389 gl: 32

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO1	1.26	10	0.18 A
PD-ECO3	1.26	10	0.18 A
PD-ECO4	1.41	10	0.18 A
PD-ECO2	1.41	10	0.18 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.19270

Error: 0.3389 gl: 32

Medio	Ecotipo	Medias	n	E.E.
MPC1	PD-ECO1	0.94	5	0.26 A
MPC1	PD-ECO4	1.26	5	0.26 A
MPC2	PD-ECO3	1.26	5	0.26 A
MPC1	PD-ECO3	1.26	5	0.26 A
MPC1	PD-ECO2	1.26	5	0.26 A
MPC2	PD-ECO4	1.57	5	0.26 A
MPC2	PD-ECO2	1.57	5	0.26 A
MPC2	PD-ECO1	1.57	5	0.26 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 11: ANOVA para la proliferación de callo de palma datilera (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Proliferación de callo	40	0.19	0.01	15.39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2.96	7	0.42	1.05	0.4141
Medio	2.22	1	2.22	5.54	0.0249
Ecotipo	0.49	3	0.16	0.41	0.7467

Medio*Ecotipo	0.25	3	0.08	0.21	0.8921
Error	12.82	32	0.40		
Total	15.78	39			

Fuente: InfoStat.

Anexo 12: Prueba de Tukey para la proliferación de callo de palma datilera

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Proliferación de callo	40	0.19	0.01	15.39

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.40766

Error: 0.4005 gl: 32

Medio	Medias	n	E.E.
MPC1	1.02	20	0.14 A
MPC2	1.49	20	0.14 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.76685

Error: 0.4005 gl: 32

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO3	1.10	10	0.20 A
PD-ECO2	1.26	10	0.20 A
PD-ECO1	1.26	10	0.20 A
PD-ECO4	1.41	10	0.20 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.29660

Error: 0.4005 gl: 32

Medio	Ecotipo	Medias	n	E.E.
MPC1	PD-ECO3	0.94	5	0.28 A
MPC1	PD-ECO2	0.94	5	0.28 A
MPC1	PD-ECO1	0.94	5	0.28 A
MPC2	PD-ECO3	1.26	5	0.28 A
MPC1	PD-ECO4	1.26	5	0.28 A
MPC2	PD-ECO4	1.57	5	0.28 A
MPC2	PD-ECO2	1.57	5	0.28 A
MPC2	PD-ECO1	1.57	5	0.28 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 13: ANOVA para la viabilidad de callo embriogénico de palma datilera (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	40	0.14	0.00	19.61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.92	7	0.13	0.71	0.6604
Medio	0.06	1	0.06	0.33	0.5677
Ecotipo	0.18	3	0.06	0.33	0.8013
Medio*Ecotipo	0.68	3	0.23	1.22	0.3176
Error	5.92	32	0.18		
Total	6.84	39			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: InfoStat.

Anexo 14: Prueba de Tukey para la viabilidad de callo embriogénico de palma datilera

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	40	0.14	0.00	19.61

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.27695

Error: 0.1849 gl: 32

Medio	Medias	n	E.E.
MCE1	1.41	20	0.10 A
MCE2	1.49	20	0.10 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.52097

Error: 0.1849 gl: 32

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO4	1.41	10	0.14 A
PD-ECO3	1.41	10	0.14 A
PD-ECO2	1.41	10	0.14 A
PD-ECO1	1.57	10	0.14 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.88087

Error: 0.1849 gl: 32

Medio	Ecotipo	Medias	n	E.E.
MCE1	PD-ECO3	1.26	5	0.19 A
MCE1	PD-ECO2	1.26	5	0.19 A
MCE2	PD-ECO4	1.26	5	0.19 A
MCE2	PD-ECO2	1.57	5	0.19 A
MCE2	PD-ECO3	1.57	5	0.19 A
MCE1	PD-ECO1	1.57	5	0.19 A
MCE1	PD-ECO4	1.57	5	0.19 A
MCE2	PD-ECO1	1.57	5	0.19 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 15: ANOVA para la formación de callo embriogénico de palma datilera (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Formación callo embriogénico	40	0.14	0.00	19.61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.92	7	0.13	0.71	0.6604
Medio	0.06	1	0.06	0.33	0.5677
Ecotipo	0.18	3	0.06	0.33	0.8013
Medio*Ecotipo	0.68	3	0.23	1.22	0.3176
Error	5.92	32	0.18		
Total	6.84	39			

Fuente: InfoStat.

Anexo 16: Prueba de Tukey para la formación de callo embriogénico de palma datilera

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Formación callo embriogénico	40	0.14	0.00	19.61

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.27695

Error: 0.1849 gl: 32

Medio	Medias	n	E.E.
MCE1	1.41	20	0.10 A
MCE2	1.49	20	0.10 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.52097

Error: 0.1849 gl: 32

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO4	1.41	10	0.14 A
PD-ECO3	1.41	10	0.14 A
PD-ECO2	1.41	10	0.14 A
PD-ECO1	1.57	10	0.14 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.88087

Error: 0.1849 gl: 32

Medio	Ecotipo	Medias	n	E.E.
MCE1	PD-ECO3	1.26	5	0.19 A
MCE1	PD-ECO2	1.26	5	0.19 A

MCE2	PD-ECO4	1.26	5	0.19	A
MCE2	PD-ECO2	1.57	5	0.19	A
MCE2	PD-ECO3	1.57	5	0.19	A
MCE1	PD-ECO1	1.57	5	0.19	A
MCE1	PD-ECO4	1.57	5	0.19	A
MCE2	PD-ECO1	1.57	5	0.19	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 17: ANOVA para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	20	0.16	0.00	23.54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.37	3	0.12	1.00	0.4182
Ecotipo	0.37	3	0.12	1.00	0.4182
Error	1.97	16	0.12		
Total	2.34	19			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Fuente: InfoStat.

Anexo 18: Prueba de Tukey para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	20	0.16	0.00	23.54

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.63524

Error: 0.1232 gl: 16

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO4	1.26	5	0.16 A
PD-ECO3	1.57	5	0.16 A
PD-ECO2	1.57	5	0.16 A
PD-ECO1	1.57	5	0.16 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 19: ANOVA para la formación de embriones somáticos de palma datilera (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Formación de embriones	20	0.16	0.00	23.54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.37	3	0.12	1.00	0.4182
Ecotipo	0.37	3	0.12	1.00	0.4182
Error	1.97	16	0.12		
Total	2.34	19			

Fuente: InfoStat.

Anexo 20: Prueba de Tukey para la formación de embriones somáticos de palma datilera

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Formación de embriones	20	0.16	0.00	23.54

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.63524

Error: 0.1232 gl: 16

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO4	1.26	5	0.16 A
PD-ECO3	1.57	5	0.16 A
PD-ECO2	1.57	5	0.16 A
PD-ECO1	1.57	5	0.16 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 21: ANOVA para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 2 meses (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.15	0.00	26.67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.39	31	0.11	0.71	0.8658
Medio	1.17	7	0.17	1.09	0.3763
Ecotipo	0.31	3	0.10	0.67	0.5740
Medio*Ecotipo	1.91	21	0.09	0.59	0.9189
Error	19.72	128	0.15		

Total	23.11	159
-------	-------	-----

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: InfoStat.

Anexo 22: Prueba de Tukey para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 2 meses

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.15	0.00	26.67

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.37699

Error: 0.1541 gl: 128

Medio	Medias	n	E.E.
MC8	1.57	20	0.09 A
MC7	1.57	20	0.09 A
MC5	1.49	20	0.09 A
MC4	1.49	20	0.09 A
MC1	1.49	20	0.09 A
MC2	1.49	20	0.09 A
MC6	1.33	20	0.09 A
MC3	1.33	20	0.09 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.22585

Error: 0.1541 gl: 128

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO3	1.53	40	0.06 A
PD-ECO4	1.49	40	0.06 A
PD-ECO1	1.45	40	0.06 A
PD-ECO2	1.41	40	0.06 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 23: ANOVA para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 4 meses (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.16	0.00	23.12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10.78	31	0.35	0.81	0.7526

Medio	9.55	7	1.36	3.16	0.0041
Ecotipo	0.18	3	0.06	0.14	0.9341
Medio*Ecotipo	1.05	21	0.05	0.12	>0.9999
Error	55.21	128	0.43		
Total	66.00	159			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: InfoStat.

Anexo 24: Prueba de Tukey para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 4 meses

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.16	0.00	23.12

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.63083

Error: 0.4314 gl: 128

Medio	Medias	n	E.E.	
MC7	1.57	20	0.15	A
MC8	1.57	20	0.15	A
MC5	1.26	20	0.15	A B
MC4	1.26	20	0.15	A B
MC1	1.26	20	0.15	A B
MC2	1.18	20	0.15	A B
MC3	1.02	20	0.15	A B
MC6	0.79	20	0.15	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.37792

Error: 0.4314 gl: 128

Ecotipo	Medias	n	E.E.	
PD-ECO3	1.26	40	0.10	A
PD-ECO2	1.26	40	0.10	A
PD-ECO1	1.26	40	0.10	A
PD-ECO4	1.18	40	0.10	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 25: ANOVA para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 6 meses (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.31	0.14	25.29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	27.22	31	0.88	1.87	0.0084
Medio	25.37	7	3.62	7.71	<0.0001
Ecotipo	0.17	3	0.06	0.12	0.9481
Medio*Ecotipo	1.68	21	0.08	0.17	>0.9999
Error	60.14	128	0.47		
Total	87.37	159			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: InfoStat.

Anexo 26: Prueba de Tukey para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 6 meses

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.31	0.14	25.29

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.65839

Error: 0.4699 gl: 128

Medio	Medias	n	E.E.			
MC8	1.49	20	0.15	A		
MC7	1.49	20	0.15	A		
MC5	1.26	20	0.15	A		
MC4	1.18	20	0.15	A	B	
MC2	1.18	20	0.15	A	B	
MC1	0.94	20	0.15	A	B	C
MC3	0.55	20	0.15		B	C
MC6	0.31	20	0.15			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.39443

Error: 0.4699 gl: 128

Ecotipo	Medias	n	E.E.	
PD-ECO2	1.10	40	0.11	A
PD-ECO3	1.06	40	0.11	A
PD-ECO1	1.02	40	0.11	A
PD-ECO4	1.02	40	0.11	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 27: ANOVA para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 8 meses (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.39	0.24	23.09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	37.40	31	1.21	2.66	0.0001
Medio	35.93	7	5.13	11.29	<0.0001
Ecotipo	0.06	3	0.02	0.05	0.9872
Medio*Ecotipo	1.42	21	0.07	0.15	>0.9999
Error	58.17	128	0.45		
Total	95.58	159			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Fuente: InfoStat.

Anexo 28: Prueba de Tukey para la viabilidad de embriones somáticos de palma datilera después de 8 meses

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.39	0.24	23.09

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.64751

Error: 0.4545 gl: 128

Medio	Medias	n	E.E.		
MC8	1.49	20	0.15	A	
MC7	1.26	20	0.15	A	
MC5	1.18	20	0.15	A	
MC4	1.18	20	0.15	A	
MC2	1.02	20	0.15	A	
MC1	0.94	20	0.15	A	B
MC3	0.31	20	0.15	B	C
MC6	0.00	20	0.15		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.38791

Error: 0.4545 gl: 128

Ecotipo	Medias	n	E.E.	
PD-ECO4	0.94	40	0.11	A
PD-ECO3	0.94	40	0.11	A

PD-ECO2	0.90	40	0.11	A
PD-ECO1	0.90	40	0.11	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 29: ANOVA para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 2 meses (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.18	0.00	24.82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6.89	31	0.22	0.93	0.5772
Medio	4.79	7	0.68	2.87	0.0082
Ecotipo	0.17	3	0.06	0.24	0.8707
Medio*Ecotipo	1.93	21	0.09	0.38	0.9933
Error	30.56	128	0.24		
Total	37.45	159			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: InfoStat.

Anexo 30: Prueba de Tukey para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 2 meses

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.18	0.00	24.82

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.46935

Error: 0.2388 gl: 128

Medio	Medias	n	E.E.	
MC7	1.57	20	0.11	A
MC8	1.57	20	0.11	A
MC5	1.49	20	0.11	A
MC4	1.49	20	0.11	A
MC2	1.41	20	0.11	A B
MC1	1.41	20	0.11	A B
MC3	1.26	20	0.11	A B
MC6	1.02	20	0.11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.28118

Error: 0.2388 gl: 128

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO3	1.45	40	0.08 A
PD-ECO1	1.41	40	0.08 A
PD-ECO4	1.37	40	0.08 A
PD-ECO2	1.37	40	0.08 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 31: ANOVA para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 4 meses (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.20	4.3E-03	24.90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13.91	31	0.45	1.02	0.4464
Medio	13.54	7	1.93	4.41	0.0002
Ecotipo	0.05	3	0.02	0.04	0.9912
Medio*Ecotipo	0.32	21	0.02	0.04	>0.9999
Error	56.20	128	0.44		
Total	70.11	159			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: InfoStat.

Anexo 32: Prueba de Tukey para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 4 meses

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.20	4.3E-03	24.90

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.63644

Error: 0.4391 gl: 128

Medio	Medias	n	E.E.
MC7	1.57	20	0.15 A
MC8	1.57	20	0.15 A
MC5	1.26	20	0.15 A B
MC4	1.26	20	0.15 A B
MC2	1.26	20	0.15 A B
MC1	1.18	20	0.15 A B
MC3	0.94	20	0.15 A B
MC6	0.63	20	0.15 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.38128

Error: 0.4391 gl: 128

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO3	1.22	40	0.10 A
PD-ECO4	1.22	40	0.10 A
PD-ECO1	1.22	40	0.10 A
PD-ECO2	1.18	40	0.10 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 33: ANOVA para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 6 meses (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.36	0.20	24.87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31.78	31	1.03	2.29	0.0007
Medio	29.44	7	4.21	9.41	<0.0001
Ecotipo	0.17	3	0.06	0.13	0.9443
Medio*Ecotipo	2.17	21	0.10	0.23	0.9998
Error	57.19	128	0.45		
Total	88.97	159			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: InfoStat.

Anexo 34: Prueba de Tukey para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 6 meses

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.36	0.20	24.87

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.64199

Error: 0.4468 gl: 128

Medio	Medias	n	E.E.
MC8	1.57	20	0.15 A
MC7	1.33	20	0.15 A
MC5	1.26	20	0.15 A
MC4	1.18	20	0.15 A B

MC2	1.18	20	0.15	A	B
MC1	1.02	20	0.15	A	B
MC3	0.55	20	0.15		B C
MC6	0.16	20	0.15		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.38461

Error: 0.4468 gl: 128

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO3	1.06	40	0.11 A
PD-ECO4	1.06	40	0.11 A
PD-ECO1	1.02	40	0.11 A
PD-ECO2	0.98	40	0.11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 35: ANOVA para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 8 meses (SC tipo III)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.38	0.23	22.03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	37.47	31	1.21	2.53	0.0002
Medio	34.51	7	4.93	10.32	<0.0001
Ecotipo	0.12	3	0.04	0.09	0.9676
Medio*Ecotipo	2.83	21	0.13	0.28	0.9992
Error	61.13	128	0.48		
Total	98.60	159			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: InfoStat.

Anexo 36: Prueba de Tukey para la regeneración de embriones somáticos de palma datilera después de 8 meses

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viabilidad	160	0.38	0.23	22.03

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.66376

Error: 0.4776 gl: 128

Medio	Medias	n	E.E.
MC8	1.49	20	0.15 A
MC4	1.02	20	0.15 A B
MC7	1.02	20	0.15 A B

MC2	1.02	20	0.15	A	B
MC5	0.94	20	0.15	A	B
MC1	0.63	20	0.15		B C
MC3	0.16	20	0.15		C
MC6	0.00	20	0.15		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.39765

Error: 0.4776 gl: 128

Ecotipo	Medias	n	E.E.
PD-ECO1	0.82	40	0.11 A
PD-ECO3	0.79	40	0.11 A
PD-ECO4	0.79	40	0.11 A
PD-ECO2	0.75	40	0.11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 37: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la viabilidad después de 2 meses

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.94124

Error: 0.1541 gl: 128

Medio	Ecotipo	Medias	n	E.E.
MC7	PD-ECO1	1.57	5	0.18 A
MC5	PD-ECO4	1.57	5	0.18 A
MC4	PD-ECO4	1.57	5	0.18 A
MC7	PD-ECO2	1.57	5	0.18 A
MC8	PD-ECO4	1.57	5	0.18 A
MC8	PD-ECO3	1.57	5	0.18 A
MC8	PD-ECO2	1.57	5	0.18 A
MC2	PD-ECO1	1.57	5	0.18 A
MC1	PD-ECO1	1.57	5	0.18 A
MC6	PD-ECO4	1.57	5	0.18 A
MC2	PD-ECO2	1.57	5	0.18 A
MC5	PD-ECO3	1.57	5	0.18 A
MC1	PD-ECO4	1.57	5	0.18 A
MC1	PD-ECO3	1.57	5	0.18 A
MC8	PD-ECO1	1.57	5	0.18 A
MC7	PD-ECO4	1.57	5	0.18 A
MC7	PD-ECO3	1.57	5	0.18 A
MC4	PD-ECO3	1.57	5	0.18 A
MC4	PD-ECO2	1.57	5	0.18 A
MC3	PD-ECO3	1.57	5	0.18 A
MC5	PD-ECO1	1.57	5	0.18 A
MC2	PD-ECO3	1.57	5	0.18 A
MC5	PD-ECO2	1.26	5	0.18 A
MC1	PD-ECO2	1.26	5	0.18 A
MC2	PD-ECO4	1.26	5	0.18 A
MC4	PD-ECO1	1.26	5	0.18 A
MC6	PD-ECO2	1.26	5	0.18 A
MC6	PD-ECO3	1.26	5	0.18 A
MC6	PD-ECO1	1.26	5	0.18 A
MC3	PD-ECO1	1.26	5	0.18 A
MC3	PD-ECO2	1.26	5	0.18 A
MC3	PD-ECO4	1.26	5	0.18 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 38: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la viabilidad después de 4 meses

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.57499

Error: 0.4314 gl: 128

Medio	Ecotipo	Medias	n	E.E.
MC7	PD-ECO4	1.57	5	0.29 A
MC7	PD-ECO3	1.57	5	0.29 A
MC7	PD-ECO2	1.57	5	0.29 A
MC7	PD-ECO1	1.57	5	0.29 A
MC8	PD-ECO2	1.57	5	0.29 A
MC8	PD-ECO3	1.57	5	0.29 A
MC8	PD-ECO4	1.57	5	0.29 A
MC8	PD-ECO1	1.57	5	0.29 A
MC3	PD-ECO3	1.26	5	0.29 A
MC2	PD-ECO1	1.26	5	0.29 A
MC2	PD-ECO3	1.26	5	0.29 A
MC2	PD-ECO2	1.26	5	0.29 A
MC5	PD-ECO2	1.26	5	0.29 A
MC5	PD-ECO1	1.26	5	0.29 A
MC5	PD-ECO3	1.26	5	0.29 A
MC5	PD-ECO4	1.26	5	0.29 A
MC1	PD-ECO1	1.26	5	0.29 A
MC1	PD-ECO2	1.26	5	0.29 A
MC1	PD-ECO4	1.26	5	0.29 A
MC1	PD-ECO3	1.26	5	0.29 A
MC4	PD-ECO2	1.26	5	0.29 A
MC4	PD-ECO1	1.26	5	0.29 A
MC4	PD-ECO4	1.26	5	0.29 A
MC4	PD-ECO3	1.26	5	0.29 A
MC3	PD-ECO1	0.94	5	0.29 A
MC3	PD-ECO2	0.94	5	0.29 A
MC3	PD-ECO4	0.94	5	0.29 A
MC6	PD-ECO2	0.94	5	0.29 A
MC6	PD-ECO1	0.94	5	0.29 A
MC2	PD-ECO4	0.94	5	0.29 A
MC6	PD-ECO4	0.63	5	0.29 A
MC6	PD-ECO3	0.63	5	0.29 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 39: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la viabilidad después de 6 meses

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.64380

Error: 0.4699 gl: 128

Medio	Ecotipo	Medias	n	E.E.
MC8	PD-ECO3	1.57	5	0.31 A
MC8	PD-ECO4	1.57	5	0.31 A
MC7	PD-ECO2	1.57	5	0.31 A
MC8	PD-ECO2	1.57	5	0.31 A
MC7	PD-ECO1	1.57	5	0.31 A
MC7	PD-ECO4	1.57	5	0.31 A
MC5	PD-ECO3	1.26	5	0.31 A
MC5	PD-ECO2	1.26	5	0.31 A
MC5	PD-ECO1	1.26	5	0.31 A
MC4	PD-ECO2	1.26	5	0.31 A
MC2	PD-ECO2	1.26	5	0.31 A
MC2	PD-ECO3	1.26	5	0.31 A
MC4	PD-ECO3	1.26	5	0.31 A
MC5	PD-ECO4	1.26	5	0.31 A
MC8	PD-ECO1	1.26	5	0.31 A
MC4	PD-ECO4	1.26	5	0.31 A
MC2	PD-ECO1	1.26	5	0.31 A
MC7	PD-ECO3	1.26	5	0.31 A
MC4	PD-ECO1	0.94	5	0.31 A
MC2	PD-ECO4	0.94	5	0.31 A
MC1	PD-ECO4	0.94	5	0.31 A
MC1	PD-ECO3	0.94	5	0.31 A
MC1	PD-ECO2	0.94	5	0.31 A
MC1	PD-ECO1	0.94	5	0.31 A
MC3	PD-ECO3	0.63	5	0.31 A
MC3	PD-ECO2	0.63	5	0.31 A
MC3	PD-ECO1	0.63	5	0.31 A
MC6	PD-ECO1	0.31	5	0.31 A
MC6	PD-ECO2	0.31	5	0.31 A
MC6	PD-ECO4	0.31	5	0.31 A
MC6	PD-ECO3	0.31	5	0.31 A
MC3	PD-ECO4	0.31	5	0.31 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 40: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la viabilidad después de 8 meses

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.61663

Error: 0.4545 gl: 128

Medio	Ecotipo	Medias	n	E.E.	
MC8	PD-ECO2	1.57	5	0.30	A
MC8	PD-ECO3	1.57	5	0.30	A
MC8	PD-ECO4	1.57	5	0.30	A
MC5	PD-ECO3	1.26	5	0.30	A
MC5	PD-ECO4	1.26	5	0.30	A
MC5	PD-ECO1	1.26	5	0.30	A
MC4	PD-ECO4	1.26	5	0.30	A
MC4	PD-ECO3	1.26	5	0.30	A
MC8	PD-ECO1	1.26	5	0.30	A
MC7	PD-ECO4	1.26	5	0.30	A
MC7	PD-ECO3	1.26	5	0.30	A
MC7	PD-ECO2	1.26	5	0.30	A
MC7	PD-ECO1	1.26	5	0.30	A
MC4	PD-ECO2	1.26	5	0.30	A
MC2	PD-ECO1	1.26	5	0.30	A
MC1	PD-ECO2	0.94	5	0.30	A
MC1	PD-ECO1	0.94	5	0.30	A
MC1	PD-ECO4	0.94	5	0.30	A
MC2	PD-ECO2	0.94	5	0.30	A
MC1	PD-ECO3	0.94	5	0.30	A
MC2	PD-ECO3	0.94	5	0.30	A
MC2	PD-ECO4	0.94	5	0.30	A
MC5	PD-ECO2	0.94	5	0.30	A
MC4	PD-ECO1	0.94	5	0.30	A
MC3	PD-ECO4	0.31	5	0.30	A
MC3	PD-ECO1	0.31	5	0.30	A
MC3	PD-ECO2	0.31	5	0.30	A
MC3	PD-ECO3	0.31	5	0.30	A
MC6	PD-ECO1	0.00	5	0.30	A
MC6	PD-ECO2	0.00	5	0.30	A
MC6	PD-ECO3	0.00	5	0.30	A
MC6	PD-ECO4	0.00	5	0.30	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 41: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la regeneración de embriones somáticos después de 2 meses

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.17183

Error: 0.2388 gl: 128

Medio	Ecotipo	Medias	n	E.E.	
MC2	PD-ECO2	1.57	5	0.22	A
MC5	PD-ECO3	1.57	5	0.22	A
MC4	PD-ECO3	1.57	5	0.22	A
MC4	PD-ECO2	1.57	5	0.22	A
MC2	PD-ECO1	1.57	5	0.22	A
MC1	PD-ECO1	1.57	5	0.22	A
MC8	PD-ECO4	1.57	5	0.22	A
MC5	PD-ECO1	1.57	5	0.22	A
MC1	PD-ECO3	1.57	5	0.22	A
MC7	PD-ECO1	1.57	5	0.22	A
MC5	PD-ECO4	1.57	5	0.22	A
MC8	PD-ECO1	1.57	5	0.22	A
MC8	PD-ECO2	1.57	5	0.22	A
MC8	PD-ECO3	1.57	5	0.22	A
MC7	PD-ECO2	1.57	5	0.22	A
MC7	PD-ECO3	1.57	5	0.22	A
MC7	PD-ECO4	1.57	5	0.22	A
MC4	PD-ECO4	1.57	5	0.22	A
MC3	PD-ECO1	1.26	5	0.22	A
MC3	PD-ECO2	1.26	5	0.22	A
MC3	PD-ECO3	1.26	5	0.22	A
MC2	PD-ECO4	1.26	5	0.22	A
MC1	PD-ECO2	1.26	5	0.22	A
MC1	PD-ECO4	1.26	5	0.22	A
MC2	PD-ECO3	1.26	5	0.22	A
MC3	PD-ECO4	1.26	5	0.22	A
MC6	PD-ECO3	1.26	5	0.22	A
MC4	PD-ECO1	1.26	5	0.22	A
MC5	PD-ECO2	1.26	5	0.22	A
MC6	PD-ECO1	0.94	5	0.22	A
MC6	PD-ECO2	0.94	5	0.22	A
MC6	PD-ECO4	0.94	5	0.22	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 42: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la regeneración de embriones somáticos después de 4 meses

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.58899

Error: 0.4391 gl: 128

Medio	Ecotipo	Medias	n	E.E.	
MC7	PD-ECO4	1.57	5	0.30	A
MC7	PD-ECO3	1.57	5	0.30	A
MC7	PD-ECO2	1.57	5	0.30	A
MC7	PD-ECO1	1.57	5	0.30	A
MC8	PD-ECO4	1.57	5	0.30	A
MC8	PD-ECO3	1.57	5	0.30	A
MC8	PD-ECO1	1.57	5	0.30	A
MC8	PD-ECO2	1.57	5	0.30	A
MC5	PD-ECO1	1.26	5	0.30	A
MC4	PD-ECO4	1.26	5	0.30	A
MC4	PD-ECO3	1.26	5	0.30	A
MC5	PD-ECO4	1.26	5	0.30	A
MC5	PD-ECO3	1.26	5	0.30	A
MC5	PD-ECO2	1.26	5	0.30	A
MC2	PD-ECO4	1.26	5	0.30	A
MC1	PD-ECO4	1.26	5	0.30	A
MC1	PD-ECO3	1.26	5	0.30	A
MC2	PD-ECO1	1.26	5	0.30	A
MC2	PD-ECO2	1.26	5	0.30	A
MC2	PD-ECO3	1.26	5	0.30	A
MC1	PD-ECO1	1.26	5	0.30	A
MC4	PD-ECO1	1.26	5	0.30	A
MC4	PD-ECO2	1.26	5	0.30	A
MC3	PD-ECO2	0.94	5	0.30	A
MC3	PD-ECO4	0.94	5	0.30	A
MC1	PD-ECO2	0.94	5	0.30	A
MC3	PD-ECO1	0.94	5	0.30	A
MC3	PD-ECO3	0.94	5	0.30	A
MC6	PD-ECO1	0.63	5	0.30	A
MC6	PD-ECO2	0.63	5	0.30	A
MC6	PD-ECO3	0.63	5	0.30	A
MC6	PD-ECO4	0.63	5	0.30	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 43: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la regeneración de embriones somáticos después de 6 meses

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.60287

Error: 0.4468 gl: 128

Medio	Ecotipo	Medias	n	E.E.
MC8	PD-ECO4	1.57	5	0.30 A
MC8	PD-ECO1	1.57	5	0.30 A
MC7	PD-ECO4	1.57	5	0.30 A
MC8	PD-ECO2	1.57	5	0.30 A
MC8	PD-ECO3	1.57	5	0.30 A
MC5	PD-ECO3	1.26	5	0.30 A
MC5	PD-ECO4	1.26	5	0.30 A
MC4	PD-ECO2	1.26	5	0.30 A
MC5	PD-ECO2	1.26	5	0.30 A
MC5	PD-ECO1	1.26	5	0.30 A
MC7	PD-ECO1	1.26	5	0.30 A
MC2	PD-ECO1	1.26	5	0.30 A
MC2	PD-ECO3	1.26	5	0.30 A
MC2	PD-ECO4	1.26	5	0.30 A
MC7	PD-ECO3	1.26	5	0.30 A
MC7	PD-ECO2	1.26	5	0.30 A
MC1	PD-ECO3	1.26	5	0.30 A
MC4	PD-ECO3	1.26	5	0.30 A
MC4	PD-ECO4	1.26	5	0.30 A
MC1	PD-ECO4	0.94	5	0.30 A
MC4	PD-ECO1	0.94	5	0.30 A
MC2	PD-ECO2	0.94	5	0.30 A
MC1	PD-ECO1	0.94	5	0.30 A
MC1	PD-ECO2	0.94	5	0.30 A
MC3	PD-ECO1	0.63	5	0.30 A
MC3	PD-ECO2	0.63	5	0.30 A
MC3	PD-ECO3	0.63	5	0.30 A
MC3	PD-ECO4	0.31	5	0.30 A
MC6	PD-ECO4	0.31	5	0.30 A
MC6	PD-ECO1	0.31	5	0.30 A
MC6	PD-ECO2	0.00	5	0.30 A
MC6	PD-ECO3	0.00	5	0.30 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 44: Prueba Tukey de la interacción Medio*Ecotipo en la regeneración de embriones somáticos después de 8 meses

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.65722

Error: 0.4776 gl: 128

Medio	Ecotipo	Medias	n	E.E.
MC8	PD-ECO1	1.57	5	0.31 A
MC8	PD-ECO3	1.57	5	0.31 A
MC8	PD-ECO4	1.57	5	0.31 A
MC2	PD-ECO4	1.26	5	0.31 A
MC4	PD-ECO2	1.26	5	0.31 A
MC7	PD-ECO3	1.26	5	0.31 A
MC8	PD-ECO2	1.26	5	0.31 A
MC2	PD-ECO1	1.26	5	0.31 A
MC4	PD-ECO1	0.94	5	0.31 A
MC4	PD-ECO3	0.94	5	0.31 A
MC4	PD-ECO4	0.94	5	0.31 A
MC5	PD-ECO4	0.94	5	0.31 A
MC5	PD-ECO3	0.94	5	0.31 A
MC5	PD-ECO2	0.94	5	0.31 A
MC7	PD-ECO2	0.94	5	0.31 A
MC7	PD-ECO1	0.94	5	0.31 A
MC7	PD-ECO4	0.94	5	0.31 A
MC2	PD-ECO3	0.94	5	0.31 A
MC5	PD-ECO1	0.94	5	0.31 A
MC1	PD-ECO2	0.63	5	0.31 A
MC1	PD-ECO1	0.63	5	0.31 A
MC2	PD-ECO2	0.63	5	0.31 A
MC1	PD-ECO3	0.63	5	0.31 A
MC1	PD-ECO4	0.63	5	0.31 A
MC3	PD-ECO2	0.31	5	0.31 A
MC3	PD-ECO1	0.31	5	0.31 A
MC6	PD-ECO3	0.00	5	0.31 A
MC6	PD-ECO1	0.00	5	0.31 A
MC6	PD-ECO2	0.00	5	0.31 A
MC6	PD-ECO4	0.00	5	0.31 A
MC3	PD-ECO3	0.00	5	0.31 A
MC3	PD-ECO4	0.00	5	0.31 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 45: Figuras complementarias del proyecto de la Palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.)



Figura 53: Imágenes de Palma datilera en medio de maduración después de 3 semanas



Figura 54: Imágenes de Palma datilera con raíces listas para ser aclimatadas en invernadero



Figura 55: Imagen de plantas de Palma datilera aclimatadas en bandeja después de cuatro semanas