

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

**PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE DOS ESPECIES DE PALMERAS
NATIVAS DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN: *Bactris major*
Jacquin Y *Desmoncus orthacanthos* Martius.**

Tesis que presenta:

Q.F.B. Miguel Alonso Tzec Simá

**para obtener el grado de Maestro en Ciencias y
Biotecnología de Plantas**

**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.
Mérida, Yucatán, México
2002**



*A las dos personas más importantes de mi vida:
Mi esposa Rosalba... por todo lo que significa para mí,
Mi hijo Miguel Ulises... esa pequeña personita que apenas empieza
a descubrir las maravillas de este mundo.*

*A mis Padres y Hermanos, por todos sus consejos y palabras de aliento. De
manera especial a mi tío Luis, por su apoyo de toda la vida.*

Agradecimientos.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, haciendo uso de sus instalaciones y equipo. Agradezco a las autoridades del CICY las facilidades que me brindaron para cursar este posgrado.

A mis directores de tesis Dr. Manuel L. Robert y Dr. Roger Orellana por sus asesorías y ayuda invaluable.

Agradezco al CONACYT la beca crédito otorgada para realizar mis estudios de Maestría (138456)

A los miembros de mi comité, Drs. Héctor Lozoya, Jorge Santamaría, y Mycola Piven, por sus observaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

A todos mis compañeros de este centro que de alguna u otra forma contribuyeron a la realización de esta tesis, en especial a: Felipe Barredo, Miguel Keb, Ileana Borges, Ernesto Reyes, Miguel Herrera, etc. Así como al Dr. Orellana y su grupo: José Ramos, Roberto Sibaja, Gabriel Canto, Joaquín Quiroz y Sigfredo Escalante, por su compañía en las salidas de campo.

Abreviaturas usadas

BAP	6-bencilaminopurina
ANA	Ácido α -naftalenacético.
ABA	Ácido abscísico
TTZ	2,3,5-cloruro de trifenil tetrazolio
AIA	Ácido indol acético
AIB	Ácido indol butírico
MS	Medio MS (Murashige y Skoog, 1962)
Y3	Medio Y3, (Euwens, 1976)
LS	Medio LS (Linsmaier y Skoog, 1965)
KNO ₃	Nitrato de potasio.
M	Molar
GA ₃	Ácido giberélico

Contenido

	Pag.
Resumen	1
Summary	3
Introducción	5
Bibliografía	6
Capítulo 1	7
Antecedentes	7
Descripción botánica de las especies en estudio	7
<i>Desmoncus orthacanthos</i> Martius	7
<i>Bactris major</i> Jacquin	8
Problemática y alternativas	10
Germinación y latencia de semillas	11
Generalidades y terminología	11
Longevidad de semillas	12
Generalidades sobre cultivo de tejidos	13
Factores que afectan el éxito del cultivo de tejidos	13
Cultivo de embriones	13
La micropropagación	14
Fases de la micropropagación	15
Morfogénesis	16
Organogénesis	16
Embriogénesis somática	16
Objetivos	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
Bibliografía	18
Capítulo 2	20
Germinación <i>in vitro</i> de semillas y embriones aislados de <i>B. major</i> y <i>D. orthacanthos</i>	20
Introducción	20
Materiales y métodos	21
Resultados y discusión	25
Bibliografía	39
Capítulo 3	42
Propagación <i>in vitro</i> de <i>B. major</i> y <i>D. orthacanthos</i>	42
Introducción	42
Materiales y Métodos	44
Resultados y Discusión	47
Bibliografía	57

Capítulo 4	Discusión general, conclusiones y perspectivas	59
	Discusión general	59
	Conclusiones	64
	Perspectivas	65
	Bibliografía	66
Anexo	Formulación de medios de cultivo empleados	68

Índice de tablas

		Pag.
Tabla 1	Tratamientos empleados para inducir la germinación en embriones y semillas almacenadas de <i>D. orthacanthos</i> y <i>B. major</i> .	25
Tabla 2	Algunas especies de palmas con potencial morfogénico demostrado.	43
Tabla 3	Efecto de diferentes combinaciones de ANA/BAP sobre el Número Promedio de Brotes por Explante en <i>B. major</i> .	49
Tabla 4	Efecto de diferentes combinaciones de ANA/BAP sobre el Número Promedio de Brotes por Explante (NPBE) en <i>D. orthacanthos</i> .	49
Tabla 5	Efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la formación de raíces en brotes de <i>B. major</i> .	50
Tabla 6	Porcentaje de formación de raíces en brotes de <i>B. major</i> en medio MS completo (1 X) y a la mitad de su fuerza iónica (1/2 X)	51
Tabla 7	Estimación del proceso de propagación de <i>B. major</i> y <i>D. orthacanthos</i> .	53

Índice de figuras

		Pág.
Figura 1	<i>D. orthacanthos</i> Mart. A) Planta completa B) Inflorescencia. C) Frutos frescos.	8
Figura 2	<i>B. major</i> Jacq. A) Colonia de <i>B. major</i> . B) Inflorescencia. C) Frutos frescos.	9
Figura 3	Mapa del sitio de colecta de semillas de <i>B. major</i> . el "jahuactal", localizado en el ejido de La Unión, Q. Roo, México.	22
Figura 4	Mapa del sitio de colecta de semillas de <i>D. orthacanthos</i> : "el huasteco" y "la milpa", localizados en el ejido de Noh-Bec, Q. Roo, México.	23
Figura 5	Germinación de semillas de <i>B. major</i> y <i>D. orthacanthos</i> en condiciones de vivero después de 18 meses de cultivo. (n=100).	26
Figura 6	Germinación de <i>B. major</i> en condiciones <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> después de 30 días de cultivo para los embriones y de 120 días para las semillas.	27
Figura 7	Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de embriones cigóticos de <i>B. major</i> y <i>D. orthacanthos</i> (n=100)	28
Figura 8	Germinación de embriones de <i>D. orthacanthos</i> . (n=90 por tratamiento). E + S) Embrión aislado rodeado de semillas enteras. S) Semilla entera E) Embrión aislado solo.	29
Figura 9	Germinación de embriones de <i>D. orthacanthos</i> . (n=90 por tratamiento). E) Embrión aislado solo. E + ½ S) Embrión aislado rodeado de semillas partidas a la mitad. ½ S) Semilla partida a la mitad.	29
Figura 10	Germinación de embriones de <i>D. orthacanthos</i> . (n=90). E + E) Embrión aislado rodeado de otros embriones aislados. E) Embrión aislado solo.	30
Figura 11	Germinación de embriones de <i>B. Major</i> (n=90 por tratamiento).. E + S) Embrión aislado rodeado de semillas enteras. S) Semilla entera E) Embrión aislado solo.	31
Figura 12	Germinación de embriones de <i>B. major</i> . (n=90 por tratamiento). E + ½ S) Embrión aislado rodeado de semillas partidas a la mitad. ½ S) Semilla partida a la mitad E) Embrión aislado solo.	32
Figura 13	Germinación de embriones de <i>B. major</i> . (n=90). E + E) Embrión aislado rodeado de otros embriones aislados. E) Embrión aislado solo.	33
Figura 14	Germinación de embriones de A) <i>D. orthacanthos</i> y B) <i>B. major</i> rodeados de endospermo. (n= 30 por tratamiento). E + EndBm) embrión de <i>D. orthacanthos</i> rodeado de endospermo de <i>B. major</i> . ½ S) embrión adherido al endospermo. E) Embrión aislado solo. E + End) Embrión aislado rodeado de endospermo. E + EndDo) Embrión de <i>B. major</i> rodeado de endospermo de <i>D. orthacanthos</i> .	34
Figura 15	Efecto de ABA sobre la germinación de embriones de <i>B. major</i> . (n=30)	35
Figura 16	Efecto del endospermo de <i>B. major</i> y de ABA a 1×10^{-4} M sobre la	

	germinación de semillas de lechuga (n=100).	36
Figura 17	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la germinación de semillas de <i>B. major</i> . (n=30)	37
Figura 18	Seccionamiento de una plántula para la obtención de explantes.	44
Figura 19	Corte longitudinal de una plántula de <i>Bactris major</i> de 6 meses de edad mostrando las zonas meristemáticas. A) Plántula entera. B) Región de la base del tallo en donde se pueden apreciar el meristemo apical (ma) y el meristemo de engrosamiento primario (mep), también se aprecian los primordios foliares (pf) (10x). C) Tipo de células meristemáticas observadas (flecha) (40x).	48
Figura 20	Enraizamiento de brotes de A) <i>B. major</i> , ½ MS líquido y B) <i>D. orthacanthos</i> , MS sólido.	51
Figura 21	Proceso de micropropagación en <i>Bactris major</i> . A) inicio de la formación de brotes en <i>B. major</i> . B) Brotes de <i>B. major</i> después de 30 días de cultivo. C) Proliferación de brotes de <i>B. major</i> después de una segunda resiembra en un medio libre de reguladores. D) Plantas de <i>B. major</i> en invernadero. E) Plantas listas para su trasplante a campo.	54
Figura 22	Proceso de micropropagación en <i>Desmoncus orthacanthos</i> . A) Inicio de la formación de brotes en <i>D. orthacanthos</i> . B) Brotes de <i>D. orthacanthos</i> después de 30 días de cultivo. C) Proliferación de brotes de <i>B. major</i> después de una segunda resiembra en un medio libre de reguladores. D) Plantas listas para su trasplante a campo.	55
Figura 23	Planta de <i>B. major</i> obtenida <i>in vitro</i> y establecida en el jardín botánico del CICY.	56
Figura 24	Proceso de micropropagación empleado en <i>Bactris major</i> y <i>Desmoncus orthacanthos</i>	63

Resumen

Bactris major y *Desmoncus orthacanthos* son dos palmeras nativas de la Península de Yucatán. En el CICY se han realizado estudios comparativos de sus tallos con los del ratán demostrando que poseen propiedades anatómicas y mecánicas muy semejantes que los hacen sustitutos adecuados para la fabricación de muebles. Estas especies nunca han sido cultivadas y para su explotación comercial se requieren grandes cantidades de material vegetativo.

Los experimentos con embriones aislados y semillas germinadas *in vivo* e *in vitro*, mostraron que estas semillas son altamente recalcitrantes y con una viabilidad muy corta, por lo que una alternativa para su propagación es su cultivo *in vitro*.

Los experimentos de germinación *in vitro* con embriones cigóticos aislados demuestran que el endospermo ejerce un efecto inhibitorio sobre la germinación de ambas especies, siendo más drástico en *B. major*. El ABA no parece ser responsable de esta inhibición, ya que a concentraciones muy elevadas (1×10^{-4} M) solo se redujo levemente la germinación, contrario a lo que sucedió al utilizar semillas de lechuga o embriones adheridos al endospermo.

Por otro lado, se estableció un proceso de micropropagación para ambas especies. La base del tallo resultó ser la mejor fuente de explante, y el BAP a una concentración de 10 mgL^{-1} indujo el mayor número de brotes, con un número promedio de 6.1 para *B. major* y de 4 para *D. orthacanthos*. El mayor porcentaje de enraizamiento de los brotes se obtuvo al utilizar las sales del MS líquido a la mitad de su fuerza iónica, sin fitorreguladores. Los porcentajes de supervivencia en invernadero fueron del 16% para *Bactris* y del 40% para *Desmoncus*. Estos resultados representan el primer paso para el establecimiento de plantaciones experimentales.

Summary

Bactris major and *Desmoncus orthacanthos* are two native palms from the Yucatan Peninsula. Comparative studies of their stems with those of rattan, carried out at CICY, demonstrate that they possess very similar anatomical and mechanical properties that make them suitable for the elaboration of furniture. These species, however, have never been cultivated and in order to exploit them commercially high quantities of vegetative plant material are required.

Experiments with isolated embryos and seeds germinated *in vivo* and *in vitro*, showed that these seeds are highly recalcitrant and have a very short viability span. *In vitro* culture is, therefore, the best option for their propagation.

In vitro germination of isolated zygotic embryos showed that the endosperm prevents the germination of both species, particularly in *B. major*. ABA does not seem to be the inhibitor responsible for this effect, since high concentrations (1×10^{-4} M) only reduced the germination slightly contrary to what it is observed on lettuce seeds or the embryos joined to the endosperm.

A micropropagation protocol was established for both species. The base of the stem proved to be the best source of explants, and 10 mgL^{-1} of BAP induced the highest number of shoots, with an average number of 6.1 for *B. major* and 4 for *D. orthacanthos*. Rooting was induced on half strength of MS liquid basic salts, without growth regulators. The percentage of survival in the nursery was 16% for *Bactris* and 40% for *Desmoncus*. These results provide a basic propagation method and represent the first step for the establishment of experimental plantations.

Introducción

El ratán es un material de gran valor comercial obtenido de los tallos de varias especies de palmas, principalmente del género *Calamus*, con las que se fabrica una gran variedad de productos altamente cotizados en el ámbito mundial como son muebles, artesanías y otros derivados (Uhl & Dransfield, 1987). La enorme demanda de estos productos ha ocasionado una sobreexplotación que pone en riesgo a las poblaciones naturales (Goh et al., 2001). En México, este material se importa a muy alto costo de países productores como Tailandia, Malasia, China, Indonesia y Taiwán y de comercializadores como Singapur, Hong Kong y Estados Unidos. Aunque en los últimos años la importación del ratán ha disminuido, en 1998 alcanzó los 880 mil dólares (INEGI, 1999). Por lo anterior, resulta de gran interés el encontrar materiales alternativos locales que lo reemplacen para su uso en México.

En la literatura se sugiere que ciertas especies de palmeras podrían ser utilizadas para la fabricación de muebles y artesanías (Quero, 1992; Henderson y Chávez, 1993), dos de las cuales, *Bactris major* Jacquin y *Desmoncus orthacanthos* Martius, se encuentran presentes en la Península de Yucatán. En el Centro de investigación Científica de Yucatán (CICY), se han realizado algunos estudios comparativos de las propiedades mecánicas y la anatomía de los tallos cuyos resultados son muy alentadores ya que estas especies presentan propiedades semejantes al ratán y podrían ser utilizadas para la fabricación de muebles (Orellana et al., 1999).

Estas especies, sin embargo, nunca han sido domesticadas, y para el establecimiento de plantaciones se requiere de grandes cantidades de material genético. En este sentido, se han desarrollado diversos estudios de germinación *ex situ* pero los resultados obtenidos ponen de manifiesto algunas limitaciones para lograr dicho propósito ya que las semillas de *D. orthacanthos* presentaron un bajo porcentaje de germinación mientras que en los de *B. major* la germinación fue nula. En poblaciones naturales, la forma de propagación de esta última especie parece estar limitada a la producción de rizomas formando colonias clonales.

Una alternativa para la producción en gran escala de estas especies es la propagación *in vitro* de plantas seleccionadas, lo cual, además, ofrecería un método de propagación continua y de poblaciones uniformes.

Por lo anterior, se planteó la necesidad de propagar estas especies utilizando técnicas de cultivo *in vitro*. La metodología generada permitiría disponer de protocolos para el establecimiento de plantaciones experimentales en campo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Goh, D. K. S., Bon, M. C., Allotti, F., Escoute, J., Ferriere, N. and Monteuis, O.** (2001). *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrillii* and *Calamus subinermis*. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 375-381.
2. **Henderson, A. y Chávez, F.** (1993). *Desmoncus* as a useful palm in the western Amazon basin. *Principes*, 37 (4): 184-186.
3. **INEGI** (1999). Anuario estadístico del comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos, 1998. Importación (en miles de dólares). Tomo I. 14.01.20.01. Pp 48.
4. **Orellana, R., Herrera, P., Reboliar, S., Escalante, J., López, G., Escalante, S. y Gus, L.** (1999). Studies on the potential uses of some native palms of the Yucatan Peninsula (Mexico) as substitutes of rattan. *Proc. Of the 2nd Int. Symp. on Ornamental Palms and Other Monocots from the Tropics*. Caballero Ruano, M. (Eds). *Acta Hort.* 486: 291-295.
5. **Quero, H. J.** (1992). Las palmas silvestres de la Península de Yucatán. *Pub. Esp.* 10. Instituto de Biología, UNAM. 63 pp.
6. **Uhl, N. W. y Dransfield, J.** (1987). *Genera palmarum – a classification of palms based on the work of Harold E. Moore, Jr.* The L.H. Bailey Hortorium and the International Palm Society, Allen Press, Kansas. 610 pp.

CAPITULO 1

Antecedentes

La familia Palmae (monocotiledóneas) comprende cerca de 200 géneros y 2500 especies (Tomlinson, 1961; Jones, 1995) entre los que se encuentran los ratanes, cuyos tallos largos y flexibles son usados para fabricar muebles y artesanías de gran valor agregado (Uhl & Dransfield, 1987). Se considera que esta familia es la segunda en importancia para los seres humanos después de las gramíneas (Tisserat, 1984).

B. major y *D. orthacanthos* son dos especies de palmeras nativas de la Península de Yucatán, cuyos tallos han sido comparados con los del ratán por sus propiedades físicas y mecánicas (Orellana *et al.*, 1999), otras propiedades de los tallos como su grosor, color y belleza, les confiere una calidad propia que las hace una fuente alternativa ideal de material para la elaboración de muebles y otros materiales para los trópicos.

Estas especies crecen en forma silvestre en las selvas tropicales húmedas de la Península de Yucatán donde se reproducen en forma vegetativa, principalmente, a través de rizomas formando colonias clonales, y en menor grado por semillas. Para protegerlas contra la deforestación en la selva, ya amenazada por las actividades humanas, la domesticación y el cultivo *in vitro* parece ser una de las mejores alternativas para su explotación comercial.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO

Desmoncus orthacanthos Martius

Esta especie, conocida comúnmente como bayal o hanan (en maya), es una planta trepadora cuyas pinnas terminales están dispuestas como ganchos en forma de cirros con la punta dirigida hacia el ápice, la cual les sirve para asirse a los árboles y trepar por ellos en forma de enredadera. Sus tallos, de 4 cm de diámetro en promedio y sus hojas de más de dos metros de largo, están cubiertos de espinas oscuras de 0.5 a 10 cm de largo. Las flores son unisexuadas, las flores masculinas miden hasta 10 mm de largo, cáliz con lóbulos triangulares; las flores femeninas son pequeñas con cáliz cupuliforme de 1 mm y la corola mide hasta 4 mm de longitud. Los frutos son drupas de forma globosa de 1-1.5 cm de diámetro y de color rojizo a púrpura (Quero, 1992).

Esta planta suele encontrarse en hábitats perturbados, como las orillas de los caminos, en las selvas con vegetación secundaria o en los márgenes de los ríos. Sin embargo, esta especie es más abundante en las selvas conservadas. Se distribuye generalmente en la Península de Yucatán, Tabasco, Chiapas, Belice y Guatemala (Quero, 1992), llegando hasta Bolivia en Sudamérica.



Figura 1. *D. orthacanthos* Mart. A) Planta completa. B) Inflorescencia. C) Frutos frescos.

Se piensa que el centro de origen del género *Desmoncus* se encuentra probablemente en la cuenca del Amazonas (Moore, 1973, citado por Quero, 1992).

Usos. Entre los usos del género se mencionan la fabricación de cestos, sombreros, tejidos, artesanías y especialmente taburetes de piano (Henderson y Chávez, 1993). En la Península de Yucatán se tiene registro de su uso tradicional por algunos grupos mayas (Ej. Chanká, Veracruz y Xhazil, de Quintana Roo) para fabricar cestos para almacenar maíz (Orellana, com. pers.)

Bactris major Jacquin

Esta especie, conocida comúnmente como "jahuacté", es una palma cespitosa que a menudo forma colonias conocidas como "jahuactales" en zonas con suelos inundables.

Sus tallos, de hasta 5 metros de altura, son delgados de 5-6 cm de diámetro y cubiertos de espinas en los nudos. Las hojas son pinnadas de 1-1.5 m de largo, con pecíolos de 40 a 60 cm igualmente espinosos; las flores son sésiles y unisexuales formando racimos; los frutos son de color marrón, ovoides y de 3-4 cm de diámetro y contienen una semilla con un embrión de aproximadamente 1 mm de largo. Los frutos son comestibles y los tallos y las hojas se usan para hacer cestos (Quero, 1992).



Orden:
Arecales.

Familia:
Arecaceae.
(Palmae)

Tribu:
Bactridinae.

Género:
Bactris.

Especie:
Bactris
major.

Sinonimia:
Bactris
balanoidea.

Figura 2. *B. major* Jacq. A) Colonia de *B. major*. B) Inflorescencia. C) Frutos frescos.

El género *Bactris* también es originario de la región del Amazonas (Moore, 1973, citado por Quero, 1992). Se pueden encontrar en México, en los estados de Veracruz, Chiapas, Tabasco y la Península de Yucatán. En Centroamérica habitan desde Belice hasta Panamá (Quero, 1992).

Usos. El fruto se utiliza para preparar refrescos y dulces, y algunos animales domésticos también lo comen. Los tallos se usan para hacer cestos.

PROBLEMÁTICA Y ALTERNATIVAS

La familia Palmae (Arecaceae), es muy importante botánica y hortícolamente (Balick, 1988; Tomlinson, 1989; Uhl y Dransfield, 1987). Las palmas son únicas entre las plantas ornamentales perennes dado que, con pocas excepciones, solo pueden ser propagadas por semilla y la mayoría germina ineficientemente. Se ha estimado que en cerca del 25% de las especies de palmas, las semillas requieren alrededor de 100 días para germinar y solo alcanzan un 20% de germinación total (Tomlinson, 1990). Las razones de esto son desconocidas y los estudios al respecto son limitados (Meerow, 2001; De Mason, 1992).

En condiciones *ex situ*, *D. orthacanthos* presenta un porcentaje de germinación bajo mientras que en *B. major* la germinación es casi nula. En las poblaciones naturales se ha observado una gran producción de frutos, sin embargo, el porcentaje de germinación es inferior al 10%, por lo que la forma de propagación de esta última especie parece estar limitada a la producción de rizomas formando colonias clonales. Ambas especies son de ciclos de fructificación estacionales por lo que las semillas no se encuentran disponibles durante todo el año.

Para el establecimiento de plantaciones experimentales se necesita gran cantidad de material genético. Una alternativa para generarlo es por medio del cultivo *in vitro*, a partir de plantas seleccionadas. En este trabajo se estudia la propagación de estas especies por medio del cultivo de embriones y de la morfogénesis *in vitro*. Asimismo, se investiga acerca del efecto inhibitorio del endospermo en la germinación *in vitro* de estas especies.

GERMINACIÓN Y LATENCIA DE SEMILLAS

Generalidades y terminología

Las semillas, al momento de su separación de la planta madre consisten de un embrión y de reservas alimenticias encerrados en una cubierta protectora. La activación de la maquinaria metabólica del embrión, que permite la emergencia de una nueva planta se conoce como *germinación* (Hartmann *et al.*, 1997). Cuando se presentan todas las condiciones necesarias, la germinación inicia con la entrada de agua al embrión y culmina justo antes de la emergencia de la radícula (Bewley y Black, 1997), es un proceso irreversible y sólo queda la alternativa de establecer una nueva planta o morir.

Las semillas se han clasificado en dos categorías con respecto a su respuesta al agua: ortodoxas y recalcitrantes (Roberts, 1973). Las semillas ortodoxas pueden ser secadas a bajos contenidos de humedad sin dañarse, la mayoría de ellas pueden perder hasta cerca del 95% de su contenido de humedad (Roberts y Ellis, 1989). Las semillas recalcitrantes, por el contrario, no pueden ser deshidratadas por debajo de un cierto nivel de humedad relativamente alto sin que pierdan la viabilidad casi inmediatamente. Esta condición de alta humedad tampoco permite su almacenamiento por debajo de 10 °C, ya que la formación de hielo podría dañar sus tejidos. No existe un método adecuado de almacenamiento por largo tiempo de estas semillas (Roberts y Ellis, 1989). Dado que las semillas de la mayoría de las especies de palmas son recalcitrantes, se ha investigado la forma de prolongar su viabilidad en almacenamiento (Nwankwo y Krikorian, 1982).

En las semillas ortodoxas se distinguen diversas formas de retraso de la germinación (Bewley y Black, 1985):

1) La quiescencia es la fase de retraso que es revertida solamente por la adición de agua, germinando rápidamente después de la imbibición.

2) la latencia primaria, la cual opera en las semillas maduras es controlada ya sea por mecanismos internos o por tejidos externos al embrión como el endospermo, la testa, el pericarpio y otros tejidos florales. La germinación ocurre en presencia de agua después que los mecanismos internos son revertidos o por la eliminación de los tejidos inhibitorios.

3) La latencia secundaria es aquella que es inducida ulteriormente, después de que, previamente hallan ocurrido las condiciones favorables de germinación. Ocurre en semillas no latentes cuando la latencia se induce por factores ambientales como sequía, luz, oscuridad, y temperaturas extremas.

Los mecanismos de latencia permiten que las semillas persistan en el suelo por largos períodos de tiempo, extendiendo así la posibilidad de la generación de nuevos individuos (Vázquez-Yanes, 1999). La latencia puede ser influenciada por muchos factores, los cuales se pueden clasificar en tres grupos principales (Bildwell, 1974): 1) factores ambientales, los cuales incluyen luz, temperatura y requerimientos de agua; 2) factores internos, como la presencia de las cubiertas de las semillas, inmadurez del embrión, concentraciones de gases (ej. CO₂, O₂, etileno), presencia de inhibidores como el ABA, ausencia de promotores como el GA₃; y 3) mecanismos programados

genéticamente, incluyendo la post- maduración (after-ripening), degradación de inhibidores y síntesis de promotores.

Se ha tratado de explicar el control de la germinación centrándose principalmente en el papel de ciertas hormonas promotoras e inhibitoras (ej. GA₃ y ABA). Por medio del uso de mutantes se ha logrado esclarecer varios aspectos de la germinación, usando como modelos *Arabidopsis thaliana* y *Lycopersicon esculentum*, principalmente (Hilhorst y Karssen, 1992), sin embargo, aún se desconoce gran parte de este proceso, por lo que es necesario el estudio de otros factores que nos permitan explicarlo.

Longevidad de semillas

La longevidad de las semillas se puede dividir en dos formas:

1) La longevidad ecológica, es la persistencia de las semillas en el suelo, sujetas a los efectos del medio ambiente, a la posibilidad de germinar y a la acción de parásitos y depredadores (Vázquez-Yanes, 1999). Un ejemplo de longevidad ecológica, es la formación de bancos de semillas.

2) La longevidad potencial, es el tiempo durante el cual las semillas presentes en el suelo poseen la capacidad de germinar, lo que indica un almacenamiento más prolongado en condiciones artificiales con un control estricto de la humedad, la temperatura y los patógenos. La longevidad suele ser mayor mientras más complejos y sofisticados sean los mecanismos de latencia.

La pérdida de la viabilidad difiere entre las especies y podría estar determinada por el nivel de hidratación de las células. Cada especie tiene un tiempo máximo de vida bajo las mejores condiciones de almacenamiento; por ej. una monocotiledónea (*Canna*) vivió 620±60 años antes de germinar (Lerman y Cigliano, 1971), mientras que otras especies dispersadas por el viento viven menos de dos semanas.

Dado que uno de los primeros eventos en la germinación es la reparación activa del ADN que se rompe progresivamente durante la deshidratación (Osborne *et al.*, 1981), se ha reportado que la pérdida de viabilidad se debe a la disminución en la capacidad de reparación del ADN (Waterworth *et al.*, 2000), así como de diversas alteraciones: en la ultraestructura de las membranas y permeabilidad, en los lípidos como la peroxidación, en la estructura de proteínas, en el metabolismo respiratorio y en las vías de síntesis de proteínas.

El estudio de la viabilidad de las semillas es un factor muy importante para la propagación y conservación de especies de interés que, como en el caso de la mayoría de las palmas, tienen corta vida de almacén.

GENERALIDADES SOBRE EL CULTIVO DE TEJIDOS

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es un conjunto de técnicas que permiten cultivar *in vitro*, células, tejidos, órganos, embriones o plantas completas bajo condiciones asépticas manteniendo su crecimiento por períodos prolongados. Estos métodos incluyen el desarrollo de eventos morfogénicos como la organogénesis y la embriogénesis somática, que consisten en el desarrollo de órganos y plantas completas a partir de una o algunas células, fundamentándose en el concepto de la totipotencialidad celular.

El CTV tiene un importante papel en la producción de plantas de importancia agrícola u ornamental y en la manipulación de estas para mejoramiento agronómico. La investigación en CTV es de grandes aplicaciones, ya que ofrece diversas perspectivas para el mejoramiento futuro en especies importantes. Por ejemplo, el potencial para la selección de clones resistentes a patógenos o estrés, la creación de nuevas combinaciones genéticas, etc.

Factores que afectan el éxito del cultivo de tejidos

Para obtener una buena respuesta en el cultivo de tejidos se deben tener en cuenta varios factores como son:

- El medio de cultivo: Sales minerales, fuente de carbono, vitaminas, reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) y otros compuestos orgánicos.
- El explante: Tamaño del explante, fuente del explante, edad fisiológica.
- Luz: Fotoperíodo, longitud de onda, intensidad luminosa.
- Temperatura. Dependerá de la respuesta que se quiera obtener.
- Subcultivos: Pérdida del potencial morfogénico, variabilidad del cultivo.
- Genotipo.

Todas las especies e incluso las variedades tienen requisitos diferentes para estos factores, por lo que para cada especie es necesario optimizar cada uno de ellos.

Cultivo de embriones

Los embriones cigóticos pueden ser usados ventajosamente como explantes en el cultivo de tejidos, por ejemplo para iniciar cultivo de callos. En el cultivo de embriones, sin embargo, estos son extraídos de las semillas, aislados individualmente y germinados *in vitro* para desarrollarse en una planta completa. El cultivo de embriones aislados puede ayudar a la rápida producción de plántulas a partir de semillas que tienen períodos prolongados de latencia o una baja viabilidad del embrión o de la semilla.

El cultivo de embriones ha sido usado exitosamente en un gran número de géneros de plantas para vencer la incompatibilidad post-cigótica la cual por otra parte impide la producción de plántulas híbridas deseables. El cultivo *in vitro* en estas circunstancias es más apropiadamente llamado rescate de embriones.

Las técnicas empleadas para el cultivo de embriones son relativamente sencillas, los frutos o semillas son esterilizados superficialmente antes de la extracción del embrión, el cual ya no necesita ser esterilizado posteriormente. Para facilitar la extracción, las semillas duras son sumergidas en agua para ablandarlas. Es muy importante que el embrión no sea dañado por lo que, para semillas pequeñas, puede ser necesario el uso de un microscopio. La extracción de embriones requiere mucha destreza y no puede ser realizada rápidamente, lo que podría causar daños al embrión inhibiendo el crecimiento *in vitro*.

En general los medios empleados para el cultivo de embriones maduros solamente requieren sales inorgánicas adicionadas con sacarosa, mientras que los embriones inmaduros requieren además vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento y algunas veces leche de coco o algún otro extracto de endospermo (George y Sherington, 1984).

Las aplicaciones importantes del cultivo de embriones son: 1) vencer la latencia y la esterilidad de las semillas. 2) rescatar cruza híbridas incompatibles, y 3) regeneración *in vitro*.

La latencia de las semillas de muchas especies se debe a la presencia de inhibidores químicos o a una resistencia mecánica producida por las estructuras que cubren al embrión, mas que a la latencia del tejido embriogénico. La separación de los embriones de la testa y su cultivo posterior en un medio nutritivo puede evitar la latencia de las semillas. Algunas especies producen semillas estériles debido a un desarrollo incompleto del embrión, mutaciones en las estructuras que las cubren o a un tipo de latencia por las cuales no existen métodos de liberación. El cultivo de embriones puede producir plántulas viables en cada caso.

La incompatibilidad sexual ha sido separada en dos tipos de infertilidad:

1) pre-cigótica, en donde el crecimiento del tubo polínico y la germinación del polen es inhibido por lo que nunca se forma un cigoto y,

2) la incompatibilidad post-cigótica, en donde el cigoto se forma pero no es aceptado por el endospermo por alguna falla en su desarrollo, lo que ocasiona que el embrión aborte o resulte de alguna incompatibilidad embrión-endospermo en donde el endospermo produce toxinas que matan al embrión.

La incompatibilidad pre-cigótica puede ser eliminada por técnicas de polinización *in vitro*.

La micropropagación

Una de las principales aplicaciones del CTV es la micropropagación, la cual es un proceso de multiplicación vegetativa *in vitro* que permite, tanto la regeneración clonal de plantas completas a partir de tejido vegetal en un período breve, como la conservación de germoplasma bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra. Para lograr esto existen varios métodos como son: esquejes, microinjertos, organogénesis, embriogénesis, etc.

La micropropagación ofrece la posibilidad de producir miles de plantas partiendo de pequeñas porciones de tejido vegetal (explante) en períodos de tiempo

relativamente cortos. Una vez establecidos, los cultivos se dividen activamente y son una fuente continua de material que puede dar lugar a una producción de plantas en invernadero sin interrupciones estacionales. Adicionalmente, si estas se derivan de células sanas que no albergan ningún microorganismo patógeno estarán también libres de enfermedades. Estos métodos son de especial importancia para la propagación masiva de especies económicamente importantes o en peligro de extinción, beneficiándose más aquellas que poseen mecanismos reproductores ineficientes o ciclos de vida demasiado largos. El explante puede ser tomado prácticamente de cualquier parte de la planta donadora, la cual es seleccionada teniendo en cuenta características agronómicamente importantes, sin destruir a la planta madre. Un medio de cultivo adecuado, así como la apropiada combinación de fitorreguladores resulta en la proliferación continua de brotes (organogénesis) o embriones somáticos (embriogénesis somática) a través de resiembras sucesivas, generándose plantas que tienen todas las características genéticas de la planta original. De acuerdo a la totipotencialidad celular todas las especies vegetales son susceptibles de ser micropropagadas, aunque la velocidad de proliferación varía dependiendo de la especie.

Por todo lo anterior, la micropropagación ofrece grandes ventajas para la obtención clonal de plantas élite o en peligro de extinción con las consecuentes ventajas para la comercialización conservación o investigación.

Fases de la micropropagación

La micropropagación puede dividirse en varias fases de acuerdo al criterio de cada autor, en general consta de las siguientes:

- **Fase 0.** Esta fase corresponde a la preadaptación del material parental vegetal a condiciones homogéneas que favorezcan la multiplicación vegetativa *in vitro*.
- **Fase I.** También es llamada fase de inducción, comprende el establecimiento o iniciación de cultivos asépticos, es la primera etapa del cultivo durante la cual se induce el desarrollo de los meristemos o la embriogénesis por medio de fitorreguladores.
- **Fase II.** Esta es la fase de multiplicación, por medio de la inducción de brotes adventicios (organogénesis), para aumentar el número de plantas que se derivan de una sola planta madre. Este proceso puede repetirse varias veces.
- **Fase III.** En esta fase las plántulas obtenidas son tratadas para inducir la formación de raíces y así obtener plantas completas. En este sentido, se ha observado que la adición de reguladores, tales como auxinas a bajas concentraciones, salicilatos, estimula fuertemente la formación de raíces en diversas especies (Raskin, 1992 a, b).
- **Fase IV.** Transplante. Es la etapa más difícil del cultivo, cuando las plantas salen del ambiente estéril y rico en nutrimentos para iniciar su desarrollo en tierra. Esta fase requiere de condiciones adecuadas y grandes cuidados para que las plántulas no mueran por pérdida excesiva de agua o por el ataque de microorganismos.

Las condiciones de desinfección, los medios de cultivo y los factores físicos varían para cada especie y para cada fase del proceso.

Morfogénesis

Los vegetales poseen una característica que los distinguen de los demás organismos, conocido como la totipotencialidad celular, la cual se basa en la capacidad inherente que poseen las células para regenerar una planta completa (Haberlandt, 1902) por lo que pueden reproducirse en forma sexual y asexual.

La génesis de nuevas estructuras y organización tisular (órganos o embriones somáticos) donde previamente no existían, es denominada morfogénesis (Halperin, 1986; Christianson y Warnick, 1988; D'amato, 1990). La morfogénesis puede llevarse a cabo por dos vías: directa, que es la formación de estructuras *de novo* a partir de tejidos del explante, e indirecta, que es la formación de estructuras a partir de un tejido desdiferenciado y desorganizado al que se le denomina callo (George y Sherrington, 1984). Sin embargo, en la práctica no todas las partes de la planta tienen la capacidad de producir nuevos individuos, aunque hay otras que aún después de la desdiferenciación *in situ* mantienen la capacidad de revertir al estado meristemático (D'amato, 1990).

Esta característica ha sido muy explotada para fines biotecnológicos, en la propagación clonal de especies, limpieza fitosanitaria, conservación de germoplasma, rescate de especies en peligro de extinción, mejoramiento y manipulación genética de plantas (Novak, 1990; Shankla, *et al.*, 1992) y estudios de biología molecular y transformación genética (Kackar y Shekhawat, 1991).

Organogénesis

La organogénesis es la formación *de novo* de órganos (generalmente brotes y/o raíces) a partir de células del explante o callo por vía directa o indirecta. Estos órganos son estructuras unipolares formados por la extensión del tejido del explante (George y Sherrington, 1984; Brown, 1986). Su principal característica es que los tejidos vasculares están conectados con el tejido del explante.

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es la formación de estructuras con una organización bipolar, a partir de tejidos somáticos, el patrón de desarrollo es muy semejante a los embriones cigóticos los cuales se forman por el desarrollo de un cigoto. La embriogénesis somática puede ser directa cuando los embriones se forman a partir de las células del explante o indirecta cuando se derivan de un callo. Los embriones somáticos pueden germinar y desarrollarse en plantas completas que son transferidas a tierra o pueden ser encapsulados para formar semillas artificiales.

La regeneración de plantas por este método es considerada como la más eficiente para la propagación clonal de plantas *in vitro* ya que permite la producción rápida y en grandes cantidades en un corto período de tiempo (Sankhla, *et al.*, 1992; Ornstrup *et al.*, 1993).

OBJETIVOS

Objetivo general:

Obtener un protocolo de propagación *in vitro* de *Bactris major* y *Desmoncus orthacanthos*.

Objetivos específicos:

Establecer un método eficiente de germinación de *B. major* y *D. orthacanthos in vitro*.

Evaluar el efecto de la presencia de endospermo sobre la germinación de embriones cigóticos de *B. major* y *D. orthacanthos*.

Evaluar el efecto del ácido abscísico sobre la germinación de los embriones cigóticos de *B. major* y *D. orthacanthos*.

Establecer un método de morfogénesis *in vitro* para *B. major* y *D. orthacanthos*.

Establecer un método de enraizamiento y aclimatización de las plántulas generadas *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Balick, M. J.** (1988). The palm –tree of life: biology, utilization and conservation. *Adv. Econ. Bot.* 6: 1-282.
2. **Bewley J. D.** (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell.* Vol. 9, 1055-1066
3. **Bewley J. D. and Black M.** (1985) Seeds: physiology of development and germination. New York: Plenum Press. 367 pp.
4. **Bildwell, R. G. S.** (1974). Dormancy, senescence and death: plant physiology. Macmillan, New York. Pp. 466-493
5. **Brown, D. C.** (1986). Plant regeneration by organogénesis. Chap. 2. In cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 3. Academic press. Inc. pp 49-65.
6. **Christianson, M. L. y Warnick, D. A.** (1988). Organogénesis *in vitro* as a developmental process. *HortScience.* 23(3): 515-519.
7. **D'amato, F.** (1990). Somatic nuclear mutations *in vivo* and *in vitro* in higher plants. *Caryologia.* 43(3-4): 191-204.
8. **De mason, D. A., Widney, D., and Stillman J. I.** (1992). *In vitro* and transplantation experiments with germination of date embryos. *Can. J. Bot.* 70: 965-974.
9. **George, E. F. y Sherington, P. D.** (1984). Plant propagation by tissue culture. First edition. Edit. Exegenetics limited. 709 p.
10. **Haberlandt, G.** (1902). Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wiem., Math-Naturwiss. Kl., Abt. 1.* 111, 69-92
11. **Halperin, W.** (1986). Attainment and retention of morphogenetic capacity *in vitro*. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants.* Vol. 3. Academic press, Inc. Chapter: 1. Pp. 3-47.
12. **Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. and Geneve, R. L.** (1997). Principles of propagation by seed. In: *Plant propagation, principles and practices.* Chapter 7. Pp. 177-215. Prentice Hall.
13. **Henderson, A. y Chávez, F.** (1993). *Desmoncus* as a useful palm in the western Amazon basin. *Principes,* 37 (4): 184-186.
14. **Hilhorst, H. W. M. and Karszen, C. M.** (1992). Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Regulation.* 11: 225-238
15. **Jones, D. L.** (1995). Palms throughout the world. Smithsonian, Washington D. C. 410 pp.
16. **Kackar, A. y Shekhawat, N. S.** (1991). Plant regeneration from cultured immature inflorescence of *Urochloa panicoides* (Beauv.). *Indian Journal of Experimental Botany* 29:331-333.
17. **Meerow, A.** (2001). Palm seed germination. Bulletin 274. On line. [Http://www.palmsonline.org/](http://www.palmsonline.org/)
18. **Novak, F. J.** (1990). Plant tissue culture techniques for mutation breeding. FAO/IAEA Press. 169 pp.
19. **Nwankwo, B. A. and Krikorian, A. D.** (1982). Water as a storage medium for *Elaeis guineensis* (pisifera) seeds under aseptic conditions. *Annals of Botany.* 50: 793-798.
20. **Orellana, R., Herrera, P., Rebolgar, S., Escalante, J., López, G., Escalante, S. y Gus, L.** (1999). Studies on the potential uses of some native palms of the Yucatan Peninsula (Mexico) as substitutes of rattan. *Proc. of the 2nd Int. Symp. on*

- Ornamental Palms and Other Monocots from the Tropics. Caballero Ruano, M. (Eds). Acta Hort. 486: 291-295
21. **Omstrup, H., Peter, J. y Farestveit, B.** (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspensions of *Exacum affine*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 35:37-41.
 22. **Quero, H. J.** (1992). Las palmas silvestres de la Península de Yucatán. Pub. Esp. 10. Instituto de Biología, UNAM.
 23. **Raskin, I.** (1992 a). Role of salicylic acid in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43:439-463.
 24. **Raskin, I.** (1992 b). Salicylate, a new plant hormone. Plant Physiol. 99:799-803
 25. **Roberts, E. H.** (1973). Predicting the storage life of seeds. Seeds Science and Technology. 1: 499-514.
 26. **Roberts, E. H. and Ellis, R. H.** (1989). Water and seed survival. Annals of Botany. 63: 39-52
 27. **Sankhla, A., Davis, T., Sankhla, D., Sankhla, N. Upadhyaya, A. y Joshi, S.** (1992). Influence of growth regulators on somatic embryogenesis, plantlet regeneration, and post transplant survival of *Echinochloa frumentacea*. Plant Cell Reports. 11:368-371.
 28. **Tisserat, B.** (1984). Propagation of date palm by shoot tip cultures. HortScience 19 (2): 230-231
 29. **Tomlinson, P. B.** (1961). Anatomy of the Monocotyledons, Vol. II. Palmae. Metcalfe, C. R. (Ed) Oxford Univ. Press (Clarendon), London and New York
 30. **Tomlinson, P. B.** (1990). The structural biology of palms. Clarendon Press, Oxford.
 31. **Uhl, N. W. and Dransfield, J.** (1987). Genera Palmarum – a classification of palms based on the work of Harold E. Moore, Jr. The L.H. Bailey Hortorium and the International Palm Society, Allen Press, Kansas. 610 pp.

Germinación *in vitro* de semillas y embriones aislados de *B. major* y *D. orthacanthos*

INTRODUCCIÓN

Las semillas de las palmas tienen una gran diversidad en formas, tamaños y estructuras, que son características de cada especie. Consisten principalmente de un endospermo triploide, rodeado de una testa delgada y seca dentro del cual está embebido el embrión. Cuando el embrión madura el endospermo se vuelve duro debido al engrosamiento de las paredes celulares. La viabilidad de las semillas es extremadamente variable dentro de la misma especie y puede variar también de un año a otro (Kheong, 1992) lo que sugiere una fuerte interacción con fenómenos ambientales y fisiológicos.

Generalmente, las semillas de las palmas permanecen viables por unas pocas semanas aunque en algunas especies (ej. *Dypsis lutescens*) pueden retener su viabilidad por cerca de un año si se almacenan adecuadamente (Broschat y Donselman, 1986). No se sabe qué causa la pérdida de viabilidad, algunos estudios lo atribuyen a un fenómeno de latencia incrementada por la cubierta, que se da cuando las semillas no completan su germinación debido a que las estructuras que rodean al embrión le impiden emerger (Ren y Kermodé, 1999), mientras que otros reportes se lo imputan a la latencia del embrión mismo (Bewley, 1997).

Según Bewley y Black (1994), algunos posibles efectos producidos por el tejido que encierra al embrión son: 1) interferencia con el suministro de agua, 2) restricción mecánica, 3) interferencia con el intercambio gaseoso, 4) impedimento de la salida de inhibidores del embrión y 5) suministro de inhibidores al embrión.

De las cerca de 2600 especies de palmas en el mundo (Uhl y Dransfield, 1987), solamente se ha investigado la germinación y almacenamiento de una pequeña proporción. La mayoría de estos estudios se han enfocado a palmas de los trópicos húmedos donde la mayoría de las especies son recalcitrantes; las semillas de *B. major* y de *D. orthacanthos* pertenecen a este tipo.

El establecimiento de plantaciones experimentales de especies silvestres requiere de grandes cantidades de material vegetativo. En el caso de *D. orthacanthos* y *B. major*, aunque hay un adecuado suministro de frutos y semillas, su germinación presenta serias limitaciones, particularmente en el caso de *B. major*. Una alternativa para su propagación *ex situ* es el cultivo *in vitro*, ya sea por medio del rescate de embriones extraídos de las semillas o a través del cultivo de tejidos, o una combinación de ambos. En este capítulo se reporta la propagación de *B. major* y *D. orthacanthos* a través de la germinación de embriones aislados y el posible efecto inhibitorio del endospermo en la latencia de las semillas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Como material biológico, en ambas especies se emplearon:

1. Semillas y embriones cigóticos que habían sido almacenadas por cerca de un año en condiciones de baja humedad y en oscuridad.
2. Semillas y embriones cigóticos extraídos de semillas recién colectadas.

Los frutos de *B. major* fueron colectados de palmeras creciendo en la selva en un sitio denominado el "Jahuactal", localizado en el ejido de la Unión, en las cercanías del Río Hondo (Fig. 3). Los frutos de *D. orthacanthos*, se colectaron en el ejido de Noh Bec, Quintana Roo, México (Fig. 4), y fueron transportadas al laboratorio en bolsas de polietileno oscuras. Para la desinfestación, los frutos fueron lavados con extrán y enjuagados repetidamente con agua destilada antes de sumergirlos por una hora en una solución al 2.4 % de cloro comercial. Después de enjuagarlas, las semillas fueron extraídas, dentro de un gabinete de flujo laminar, eliminando el mesocarpo con un cuchillo. Estas semillas fueron usadas para los experimentos tanto *ex vitro* como *in vitro*.

Para la germinación *ex vitro*, se plantaron 100 semillas por tratamiento en suelo o en una mezcla estéril (1:1) de suelo local y peatmoss (turba canadiense), y se colocaron en un invernadero en donde fueron regados cada tres días. En vivero, las semillas se sembraron en almácigos con sustrato local.

Para el cultivo *in vitro* las semillas fueron sumergidas en etanol al 96% durante cinco minutos y se flamearon individualmente en un mechero. Debido a la gran dureza que presentan el endocarpo y el endospermo sólido, se utilizó una pinza de presión para romper las semillas y extraer cuidadosamente los embriones con la ayuda de un bisturí. Los embriones aislados se depositaron sobre papel filtro humedecido en cajas de petri estéril para mantenerlos húmedos, mientras se sembraban en el medio de germinación.

Germinación de semillas almacenadas

Se realizaron diferentes experimentos de inducción de la germinación de semillas de ambas especies almacenadas por cerca de un año. Para cada experimento se utilizaron embriones cigóticos aislados o semillas ($n=30$) escarificadas manualmente con una lija fina. El procedimiento de desinfestación fue igual al descrito anteriormente utilizando semillas previamente escarificadas. A menos que se especifique otra cosa, el medio de cultivo utilizado fueron las sales de MS adicionado con 3% de sacarosa y gelificado con gel rite (2 gL^{-1}). La incubación se realizó en fotoperíodo 16/8 hrs. (luz/oscuridad) a una temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Las variables estudiadas fueron: 1) Ácido giberélico (GA3) a concentraciones de 0, 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} y 1×10^{-6} M; 2) Nitrato de potasio (KNO₃) a 0, 20 y 40 mM; 3) Ácido indolacético (AIA) a 0, 0.5, 1 y 2 mgL^{-1} ; 4) 6-Bencilaminopurina (BAP) a 0, 1, 3 y 5 mgL^{-1} ; 5) Diferentes temperaturas de incubación (27, 32 y $40 \text{ }^\circ\text{C}$), 6) en condiciones

de luz, fotoperíodo 16/8 y oscuridad; 7) Sacarosa a concentraciones de 0, 3, 6, 9, 12 y 15%; 8) Diferentes condiciones de cultivo (líquido, sólido y puente de papel filtro) en diferentes formulaciones de medio (Y3, MS, LS; ver anexo), así como combinaciones entre estos tratamientos. Todos los tratamientos anteriores han sido previamente reportados como estimulantes de la germinación o por actuar en la maduración del embrión (Roberts y Smith, 1977; Vincent y Roberts, 1977; Khan, 1975; Skene, 1969; Schooler, 1960; La Rue, 1936; Riestsema *et al.*, 1953; Tisserat, 1987).

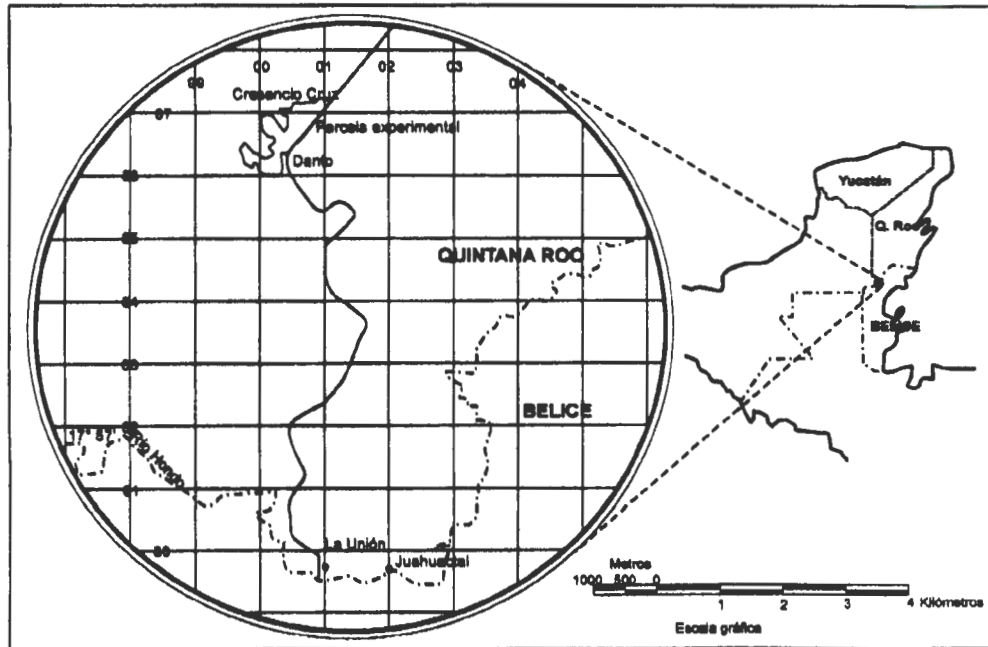


Figura 3. Mapa del sitio de colecta de semillas de *B. major*: el "Jahuactal", localizado en el ejido de La Unión Q. Roo, México (tomado de Carrillo-Sánchez, L., *et al.*, 1998).

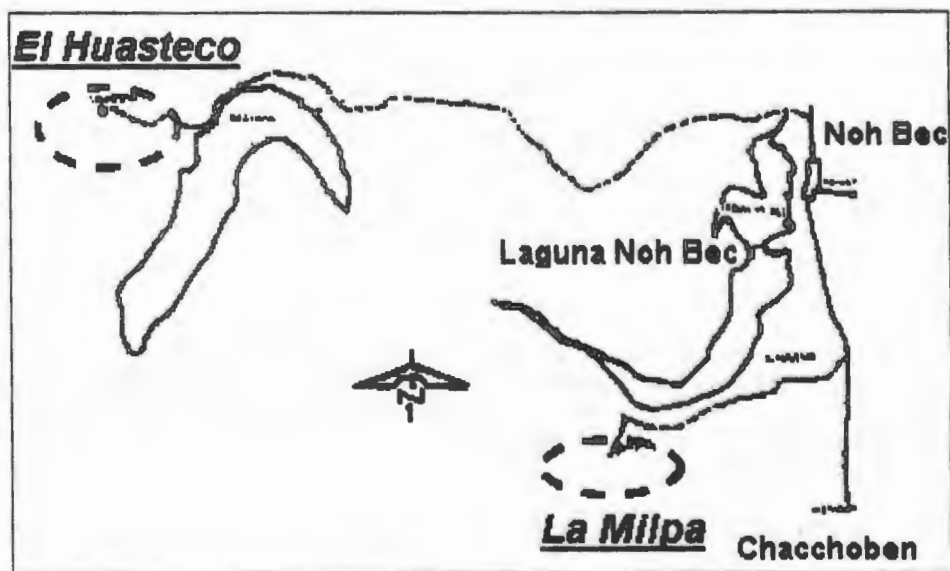


Figura 4. Mapa del sitio de colecta de semillas de *D. orthacanthos*: "El huasteco" y "la milpa", localizados en el ejido de Noh-Bec, Q. Roo, México (Sibaja, R. com. pers.).

Germinación de semillas recién colectadas

Para la inducción de la germinación, se utilizaron embriones cigóticos aislados y/o semillas enteras o partidas a la mitad (n= 15 réplicas por tratamiento) de ambas especies, de acuerdo a lo descrito para cada variable. Las semillas recién colectadas fueron desinfectadas como se describió anteriormente.

Las variables evaluadas fueron:

Germinación in vitro de embriones aislados

Los embriones cigóticos aislados fueron sembrados en frascos gerber (tres por frasco) conteniendo 25 ml de las sales de MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado con 3% de sacarosa, gelrite (2 gL^{-1}), sin reguladores de crecimiento. Los frascos se incubaron en un cuarto de cultivo a una temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ con fotoperíodo de 16/8 h (luz / oscuridad) y una intensidad promedio de $129 \mu \text{ mol m}^2 \text{ seg}^{-1}$.

Germinación de embriones después de diferentes períodos de almacenamiento

Las semillas fueron almacenadas bajo condiciones secas a $27 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad. Las muestras fueron tomadas a diferentes períodos y los embriones se extrajeron para evaluar su capacidad de germinación *in vitro*.

Interacciones entre la semilla, el endospermo y los embriones

Los embriones aislados se incubaron, en las condiciones ya descritas, adheridos al endospermo o rodeados por seis semillas o medias semillas con el endospermo en contacto directo con el medio. En todos los experimentos se utilizaron 15 réplicas y el criterio para la germinación fue la elongación del embrión justo antes de la emergencia del cotiledón o de la radícula.

Efecto del ácido abscísico (ABA) sobre la germinación de embriones aislados

El ABA, ((±) -cis, trans- Abscisic Acid; Sigma, Inc;1998.), fue esterilizado por filtración a través de una membrana milipore® de $0.45 \mu \text{m}$ y se adicionó al medio de cultivo a concentraciones finales de 1×10^{-4} a $1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Prueba de viabilidad con tetrazolio (TTZ)

Para cada evaluación, se incubaron 15 embriones en una caja petri conteniendo un papel filtro humedecido con 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio al 1% y se incubaron en oscuridad por 24 hr. antes de registrar la tinción (Moore, 1973; Mac Kay, 1972; citados por Hartmann *et al.*, 1997).

Todo el material empleado fue esterilizado en un autoclave a 1.05 Kg cm^{-2} y a una temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min. El pH de los medios se ajustó a 5.8 previo a la esterilización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación de semillas almacenadas

Se realizaron diversos experimentos con semillas de *B. major* y *D. orthacanthos* que habían permanecido almacenadas por cerca de un año, en condiciones de baja humedad. Las pruebas con tetrazolio en los embriones de estas especies indicaron un alto porcentaje de viabilidad, 80 y 66.6 % respectivamente. Sin embargo, la germinación tanto de embriones aislados como de semillas enteras fue nula en ambas especies y esta condición no pudo ser revertida por ningún tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos empleados para inducir la germinación en embriones y semillas almacenadas de *D. orthacanthos* y *B. major*.

Tratamientos	Concentraciones y/o condiciones	Germinación del embrión y/o semilla
GA ₃	0, 1x10 ⁻³ , 1x10 ⁻⁴ , 1x10 ⁻⁵ y 1x10 ⁻⁶ M	-
KNO ₃	0, 0.2 y 0.4 mM	-
AIA	0, 0.5, 1 y 2 mg l ⁻¹	-
BAP	0, 1, 3 y 5 mg l ⁻¹	-
Temperatura	27, 32 y 40 °C	-
Sacarosa	0, 3, 6, 9, 12 y 15 %	-
Medios	Y3, MS, LS (líquido, sólido, puente papel filtro)	-
Iluminación	Fotoperíodo (16/8), luz, oscuridad.	-
Escarificación	Abrasión	-

En muchas especies se ha estimulado la germinación utilizando KNO₃ (Roberts y Smith, 1977; Vincent y Roberts, 1977), GA₃ el cual es conocido ampliamente por romper latencia en semillas (Khan, 1975; Skene, 1969; Schooler, 1960). El AIA promueve también el desarrollo de embriones de varias especies (La Rue, 1936; Riestema *et al.*, 1953) y combinado con citocininas como BAP estimula el crecimiento y diferenciación de los embriones (Raghavan y Torrey, 1963). Asimismo, se ha reportado que una alta concentración de sacarosa (8%) incrementa el crecimiento del embrión de cocotero (Tisserat, 1987). En otras especies de palmas, el empleo de elevadas temperaturas (40 °C) lograron estimular la germinación (Broschat, 1998; Carpenter y Ostmark, 1993). La escarificación, también ha incrementado la germinación de varias especies de palmas con semillas duras e impermeables al agua (Nagao *et al.*, 1980; Odetola, 1987; Carpenter y Ostmark, 1993; Daquinta *et al.*, 1996). En nuestro caso ninguno de los tratamientos anteriores, o combinaciones de ellos, pudieron inducir la germinación en las semillas latentes (Tabla 2). Otros métodos, como la incubación de las semillas en medios sólido (agar al 1%), líquido, líquido con puente de papel filtro, empleando diferentes medios nutritivos: Y3 (Euwens, 1976), MS (Murashige y Skoog, 1962) y LS (Linsmaier y Skoog, 1965) (ver anexo), así como temperaturas diferentes de germinación (27-40 °C) fueron evaluados, sin que ninguno

de ellos pudiera inducir la germinación de las semillas almacenadas o embriones aislados de ellas en ambas especies en estudio.

Germinación de semillas recién colectadas

Germinación *ex vitro*

Las evaluaciones de germinación *ex vitro* en condiciones de vivero, con semillas frescas recién colectadas de campo, dieron como resultado un porcentaje de germinación del 47% para *D. orthacanthos* después de 18 meses de siembra (Fig. 5). Sin embargo, en *B. major* el porcentaje de germinación observado fue de solo el 9%. Estos bajos porcentajes de germinación son similares a los que se observan en condiciones naturales, en donde las semillas que no logran germinar al momento de caer al suelo permanecen en estado latente o formando bancos de semillas. Las semillas de *D. orthacanthos* empiezan a germinar al tercer mes y continúan haciéndolo hasta alcanzar el 47% a los 12 meses; las semillas de *B. major* empiezan a germinar a los 10 meses, y a los 18 solo habían germinado menos del 10% (cabe mencionar que después de 30 meses alcanzaron el 33% de germinación). Esta lenta y errática germinación también ha sido observada en otras especies (Broschat, 1998) y es atribuida a la latencia del embrión y al grosor de la cubierta de la semilla (Carpenter, 1988).

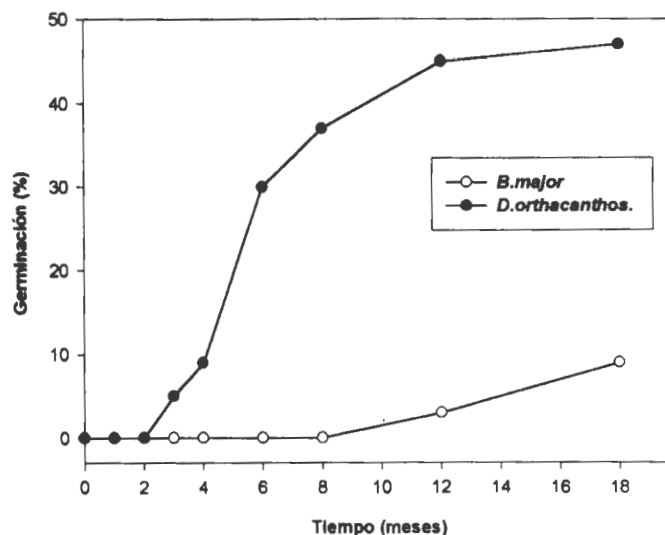


Figura 5. Germinación de semillas de *B. major* y *D. orthacanthos* en condiciones de vivero después de 18 meses de cultivo (n=100).

Germinación *in vitro*

La figura 6 muestra que las semillas enteras de *B. major* no germinaron en ninguno de los tratamientos ensayados bajo condiciones de invernadero y tampoco germinaron *in vitro* después de 120 días de cultivo. Sin embargo, cuando los embriones de las semillas recién colectadas fueron extraídos y separados del endospermo, el porcentaje de germinación se incrementó hasta cerca del 90 y 80% en *Bactris* y *Desmoncus*, respectivamente. Sin embargo, las semillas enteras no germinaron bajo las mismas condiciones (Fig. 7). Lo anterior sugiere un posible efecto inhibitorio del endospermo o de las cubiertas que rodean al embrión. Pritchard y Davies (1998) mencionan que en una especie de ratán (*Ceratolobus concolor*), la germinación ocurrió únicamente al extraer el embrión y cultivarlo en condiciones *in vitro*, mientras que en otras especies (*Calamus* sp) las semillas frescas germinan entre 30 - 120 días y el porcentaje de germinación varía de 30-90% en condiciones de campo (Gunawan, 1991).

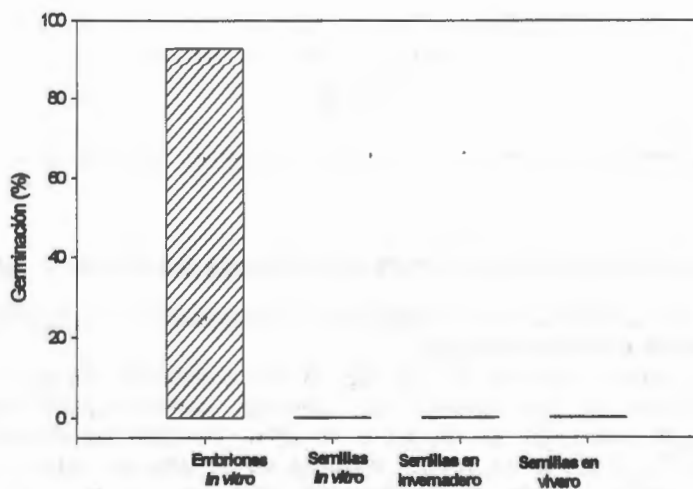


Figura 6. Germinación de *B. major* en condiciones *in vitro* y *ex vitro* después de 30 días de cultivo para los embriones y de 120 días para las semillas.

La figura 7 muestra la cinética de germinación de los embriones cigóticos aislados de ambas especies cultivadas *in vitro*.

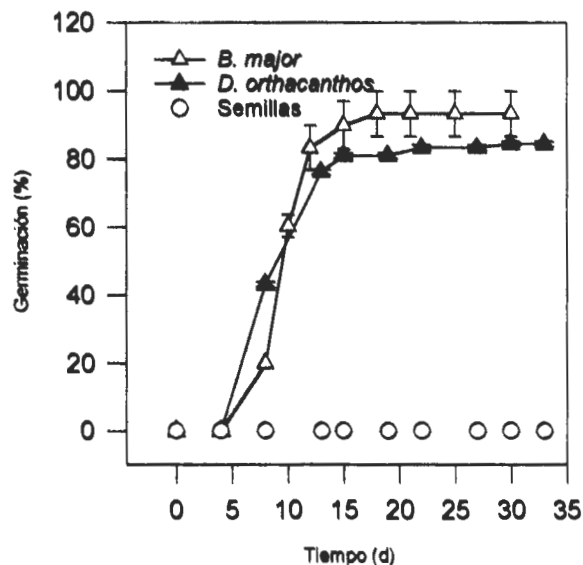


Figura 7. Porcentaje de germinación *in vitro* de embriones cigóticos de *B. major* y *D. orthacanthos* (n=100).

Efecto del endospermo sobre la germinación de embriones aislados de D. orthacanthos

Para evaluar un posible efecto inhibitorio del endospermo se realizaron una serie de experimentos con embriones aislados.

Como se puede observar en la Fig. 8 los embriones aislados germinan eficientemente (83%) en una semana. Sin embargo, cuando están rodeados de semillas enteras el porcentaje se reduce a un 38%. También se observa que las semillas enteras (S) germinan en un 5% después de 30 días de cultivo. Lo anterior sugiere que las semillas enteras no germinan debido a una baja permeabilidad de la testa o, más probablemente a que liberan algún inhibidor al medio de cultivo que impide la germinación de los embriones aislados (E + S).

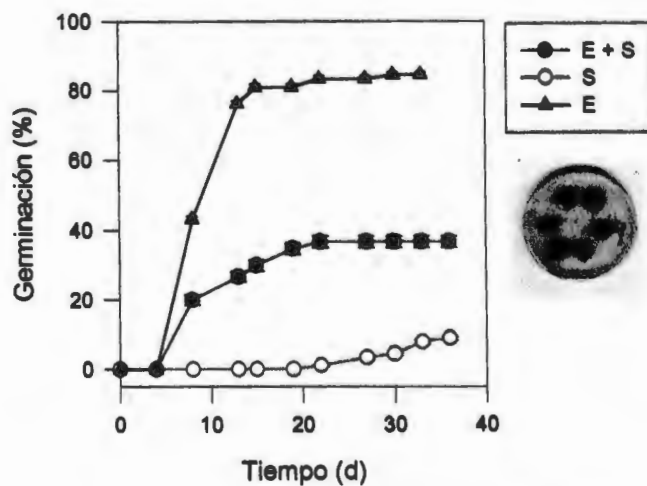


Figura 8. Germinación de embriones de *D. orthacanthos*. (n=90 por tratamiento). ● E + S) Embrión aislado rodeado de semillas enteras. ○ S) Semilla entera. ▲ E) Embrión aislado solo.

Con el objeto de entender un poco más sobre la inhibición que producen los tejidos de la semilla se realizó otro experimento en el que el embrión aislado se incubó rodeado de medias semillas de *D. orthacanthos*, los resultados se presentan en la figura 9.

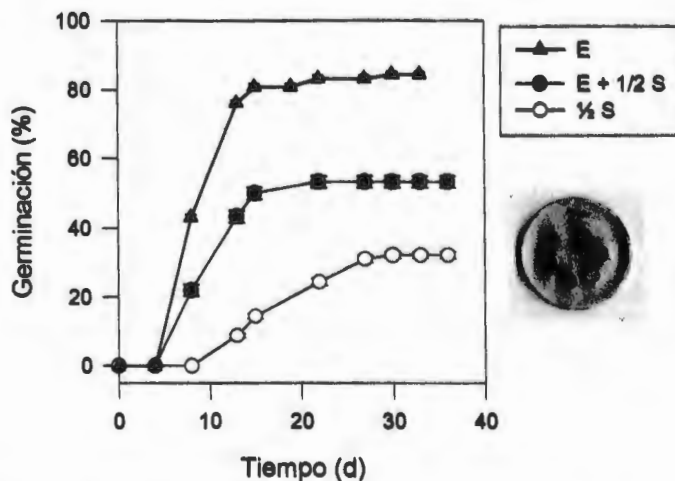


Figura 9. Germinación de embriones de *D. orthacanthos*. (n=90 por tratamiento). ▲ E) Embrión aislado solo. ● E + 1/2 S) Embrión aislado rodeado de semillas partidas a la mitad. ○ 1/2 S) Semilla partida a la mitad

Al igual que en el experimento anterior los embriones aislados (E) germinaron eficientemente cuando se incubaron solos alcanzando un porcentaje del 83% (Fig. 9). Sin embargo, una vez más se observa el efecto inhibitor de las semillas. En este caso las semillas partidas a la mitad ($E + \frac{1}{2} S$), carecían de testa por lo que el efecto parece ser producido por el endospermo. El porcentaje de germinación de estos embriones fue del 46%, siendo significativamente inferior a los embriones aislados solos. Las semillas partidas a la mitad ($\frac{1}{2} S$) también germinaron, alcanzando un porcentaje del 30% después de 30 días de cultivo. Este porcentaje de germinación es significativamente superior al observado con semillas enteras ($p=0.009$) (Fig. 8), tal vez debido a una mayor imbibición o a que en las medias semillas se reduce la concentración de inhibidores al eliminar parte del endospermo.

Germinación de embriones aislados rodeados de embriones de *D. orthacanthos*

Al utilizar embriones aislados rodeados de otros embriones aislados ($E + E$), no se observaron diferencias significativas ($p=0.1$) (Fig. 10). En ambos casos se alcanzó un porcentaje de germinación de alrededor del 80%. Lo anterior indica que no existe ningún tipo de competencia entre los embriones y que la interacción entre ellos no afecta su germinación.

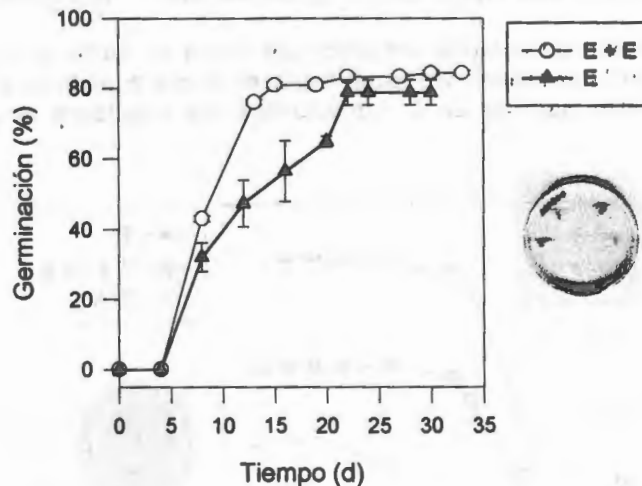


Figura 10. Germinación de embriones de *D. orthacanthos*. (n=90): ○ E + E) Embrión aislado rodeado de otros embriones aislados. ▲ E) Embrión aislado solo.

Efecto de la presencia del endospermo en la germinación de embriones de *B. major*

Para determinar si en *B. major* existía una inhibición similar a la producida por el endospermo de *Desmoncus*, se realizó un experimento en el que se utilizaron embriones aislado de *Bactris* rodeado de seis semillas enteras de la misma especie.

Como se puede observar en la Fig. 11, no se observó ningún efecto inhibitorio de la semilla sobre la germinación de los embriones aislados. Sin embargo, las semillas enteras (S) no germinaron, debido tal vez al mayor grosor y mayor impermeabilidad de la testa, o a la presencia de algún inhibidor que no permea al medio de cultivo.

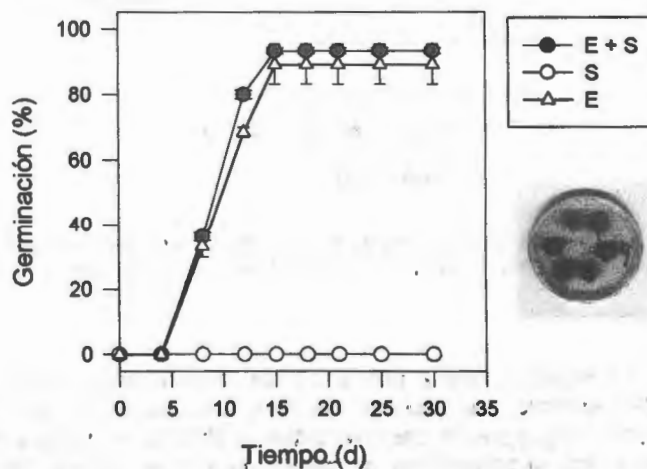


Figura 11. Germinación de embriones de *B. major* (n=90 por tratamiento). ● E + S) Embrión aislado rodeado de semillas enteras. ○ S) Semilla entera. ▲ E) Embrión aislado solo.

Para demostrar lo anterior se observó el efecto de medias semillas de *B. major* con el endospermo expuesto sobre la germinación de los embriones aislados.

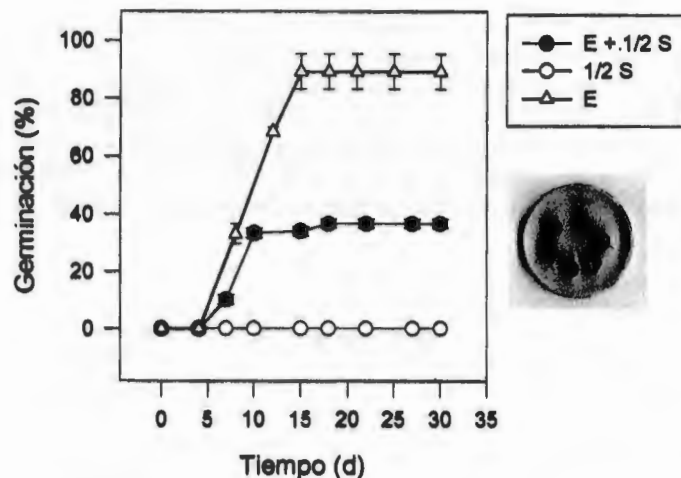


Figura 12. Germinación de embriones de *B. major*. (n=90 por tratamiento). ● E + 1/2 S) Embrión aislado rodeado de semillas partidas a la mitad. ○ 1/2 S) Semilla partida a la mitad. ▲ E) Embrión aislado solo

La figura 12 muestra que a diferencia del experimento anterior en donde se utilizaron semillas enteras, las medias semillas disminuyen la germinación de los embriones aislados, lo que puede deberse a que al eliminar la barrera permeable de la testa y exponer a los endospermos al medio de cultivo ocurre una liberación de inhibidores al medio de cultivo disminuyendo, por consiguiente, la germinación del embrión aislado. Los embriones adheridos al endospermo de las semillas partidas a la mitad (1/2 S) no germinaron. Este resultado es diferente del obtenido con *D. orthacanthos* (Fig. 9), en donde sí ocurre un pequeño porcentaje de germinación de los embriones unidos a la testa.

La figura 13 muestra que al igual que en el caso de *Desmoncus* en *Bactris* tampoco hay interacción entre los embriones.

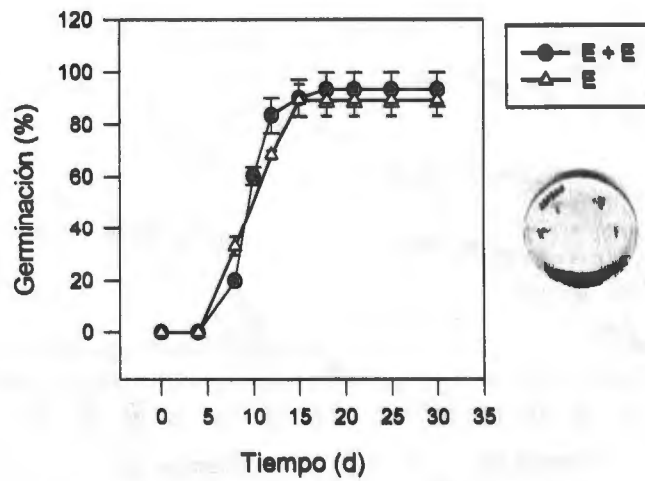


Figura 13. Germinación de embriones de *B. major*. (n=90). ● E + E) Embrión aislado rodeado de otros embriones aislados. ▲ E) Embrión aislado solo.

Efecto cruzado del endospermo de B. major sobre la germinación de embriones aislados de D. orthacanthos y del endospermo de D. orthacanthos sobre la germinación de embriones aislados de B. major

La figura 14 muestra que los dos endospermos inhiben la germinación de los embriones en ambas especies, observándose una mayor inhibición de la germinación de los embriones de *D. orthacanthos*. Cabe mencionar que se observó un gran porcentaje de fenolización en el caso de embriones de *D. orthacanthos* rodeados de endospermo de *B. major* y lo que podría indicar la presencia de inhibidores de tipo fenólico.

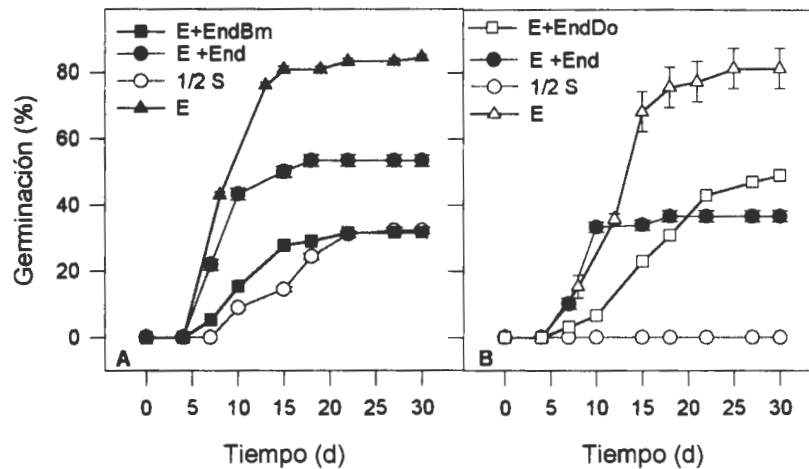


Figura 14. Germinación de embriones de A) *D. orthacanthos* y B) *B. major* rodeados de endospermo. (n=30 por tratamiento). ■- E + EndBm) embrión de *D. orthacanthos* rodeado de endospermo de *B. major*. ○- 1/2 S) Embrión adherido al endospermo. ▲-E) Embrión aislado solo. ●-E + End) Embrión aislado rodeado de endospermo. □-E + EndDo) embrión de *B. major* rodeado de endospermo de *D. orthacanthos*.

Efecto del ABA sobre la germinación de embriones aislados cultivados in vitro

Debido a que se ha reportado que el ABA tiene un efecto inhibitor en la germinación, se evaluó su efecto en *B. major*.

La adición de varias concentraciones de ABA al medio de cultivo (Fig. 15) solamente resultó en una ligera inhibición de la germinación. A concentraciones de 1×10^{-6} y 1×10^{-5} M el efecto no fue estadísticamente diferente del control sin ABA. A 1×10^{-4} M la germinación se redujo aproximadamente un 30% lo cual fue estadísticamente diferente. Los embriones unidos al endospermo no germinaron. Para comparar el efecto sobre una especie que se inhibe en presencia de ABA, se evaluaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L. cv Grand rapids). El endospermo de *Bactris* no tuvo ningún efecto sobre las semillas de esta especie mientras que 1×10^{-4} M ABA inhibió completamente la germinación (Fig. 16). Lo anterior sugiere que el ABA, no es el inhibidor en la germinación de los embriones de *Bactris*. La concentración ensayada es muy alta comparada con lo reportado en otras especies (Piaggese *et al.*, 1991; Finch-Savage, *et al.*, 1992). Los niveles de ABA que se acumulan en semillas en los rangos fisiológicos de actividad, varían aproximadamente entre 1-10 μ M (Rock y Quatrano, 1995).

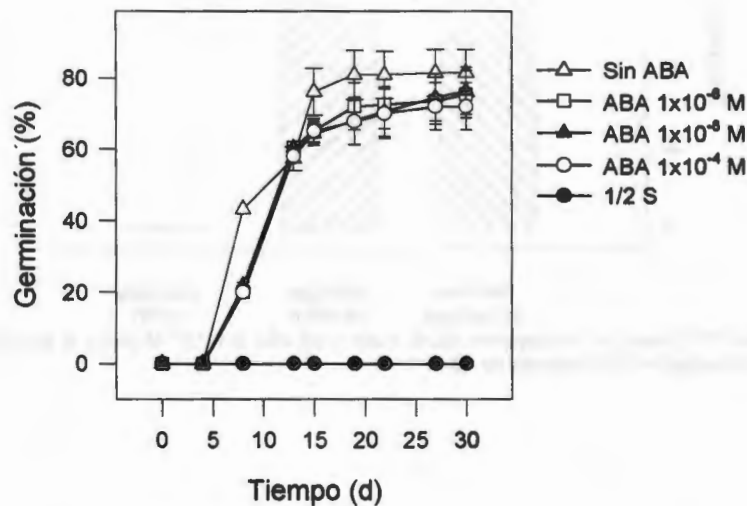


Figura 15. Efecto de ABA sobre la germinación de embriones de *B. major* (n=30).

Hay evidencias en trigo, maíz y soya, que los niveles de ABA declinan durante el desarrollo del embrión y la sensibilidad del tejido al ABA también decrece. Lo que podría indicar que la deshidratación y no el ABA, es probablemente la causa principal de la inhibición (Ackerson, 1984; Finkelstein, 1985).

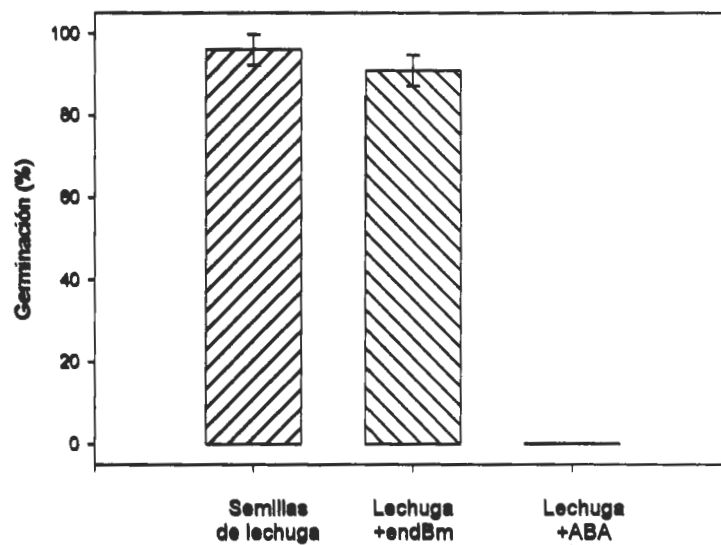


Figura 16. Efecto del endospermo de *B. major* y de ABA a 1×10^{-4} M sobre la germinación de semillas de lechuga (n=100) después de 48 h.

Efecto del almacenamiento sobre la germinación de embriones aislados

El almacenamiento en un lugar seco resultó en una disminución gradual de la germinación en los embriones extraídos de las semillas almacenadas (Fig. 17). Después de las primeras dos semanas de almacenamiento se obtuvieron los máximos porcentajes de germinación (>90%) sin ser diferentes significativamente ($p=0.10$). A partir de la tercera y cuarta semana de almacenamiento la germinación se redujo al 76 y 36%, respectivamente. Después de cinco semanas de almacenamiento de las semillas, los embriones aislados ya no germinaron a pesar de mantener un porcentaje de viabilidad del 80% de acuerdo a la prueba de TTZ.

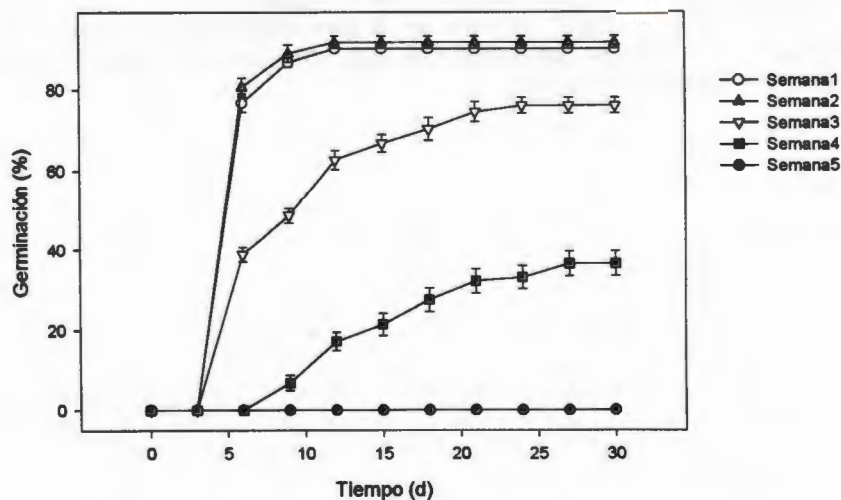


Figura 17. Efecto del tiempo de almacenamiento de las semillas sobre la germinación de embriones de *B. major* ($n=30$).

Resultados similares se han observado en ratón (*Calamus* sp.), en el que el almacenamiento de las semillas en un lugar seco resultó en una nula germinación después de dos semanas (Nainggolan, 1985), lo que se atribuye principalmente a la pérdida excesiva de agua (Kheong, 1992; Mori *et al.*, 1980). De acuerdo a Roberts y Ellis (1989), estas semillas recalcitrantes no pueden secarse por debajo de un cierto contenido relativamente alto de humedad sin perder viabilidad y su longevidad es de unas pocas semanas o meses, estas semillas no pueden ser almacenadas a bajas temperaturas ($<10^{\circ}\text{C}$) ya que dada la condición de humedad esencial para su supervivencia, la formación de hielo podría dañar sus tejidos. Por consiguiente, no existe un método satisfactorio disponible para el almacenamiento de estas semillas a largo plazo.

En general, los resultados arriba descritos indican que:

1. Los embriones extraídos de semillas almacenadas de ambas especies, no pudieron germinar por ninguno de los tratamientos ensayados, indicando una fuerte condición de latencia. Asimismo, los embriones aislados de las semillas recién colectadas entran en latencia después de cuatro semanas de almacenamiento.
2. El endospermo ejerce un efecto inhibitorio en la germinación de ambas especies, debido posiblemente a la presencia de inhibidores químicos ya que la eliminación de las cubiertas que rodean al embrión (restricciones físicas) no lograron incrementar significativamente la germinación. Un mayor efecto inhibitorio se observó en el endospermo de *B. major*.
3. El ABA no es el principal inhibidor en la germinación de *B. major*, lo que se demostró al comparar los embriones con semillas de lechuga puestas a germinar en presencia de ABA.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Ackerson, R. C.** (1984). Absciscic acid and precocious germination in soybeans. *Journal of Experimental Botany* 35: 414-421.
2. **Bewley, J. D.** (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. Vol. 9, 1055-1066
3. **Bewley, J. D. and Black, M.** (1994) *Seeds: physiology of development and germination*, 2nd edition. New York: Plenum Press. Pp 199-269
4. **Broschat, T. K. and Donselman, H.** (1986). Factors affecting storage and germination of *Chrysalidocarpus lutescens* seeds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111: 872-877.
5. **Broschat, T. K.** (1998). Pindo palm (*Butia capitata*) seed germination revisited. *Tropic Line*, vol. 10 Number 3-4. On line. [Http://www.tropicline.com](http://www.tropicline.com)
6. **Carpenter, W. J.** (1988). Seed after-ripening and temperature influence *Butia capitata* germination. *HortScience* 23:702-703
7. **Carpenter, W. J. y Ostmark, E. R.** (1993). Embryo cap removal and high-temperature exposure stimulate rapid germination of needle palm seeds. *HortScience* 28(9):904-907
8. **Carrillo-Sánchez, L., Barredo-Pool, F., Varela, L., Arce-Montoya, M., Orellana, R.** (1998). Estudio de la asociación micorrízica en tres especies de palmeras nativas de la Península de Yucatán. *Avances de la Investigación Micorrízica en México*. Zulueta-Rodriguez, R., Escalona-Aguilar, M. A., Trejo-Aguilar, D. (Eds.) Universidad Veracruzana. Pp. 77-83
9. **Daquinta, M., Concepción, O., Capote, I., Cobo, I., Escalona, M. and Borroto, C.** (1996). *In vitro* germination of *Chamaedorea seifrizii*. *Principes* 40(2), pp. 112-113.
10. **Euwens, C. J.** (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and culture *in vitro*. *Physiol. Plant.* 36:23-28.
11. **Finch-Savage, W. E., Clay, H. A., Blake, P. S. and Browning, G.** (1992). Seed development in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: water status and endogenous absciscic acid levels. *Journal of Experimental Botany* 43: 671-679.
12. **Finkelstein, R. R., Tenberge, K. M., Shumway, J. E. and Crouch, M. L.** (1985). Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. *Plant Physiology*. 78: 630-636.
13. **Gunawan, L. W.** (1991). Rattans (*Calamus* sp). In: *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 16. *Trees III* (Ed by Y.P.S. Bajaj). Springer-Berlag, Berlin Heidelberg. Pp. 211-220
14. **Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. and Geneve, R. L.** (1997). *Plant propagation: Principles and practices*, sixth edition. Prentice Hall, New Jersey. 770 pp.
15. **Khan, A. A.** (1975). Primary, preventive, and permissive roles of hormones in plants system. *Bot. Rev.* 41:391-420.
16. **Kheong, Y. S.** (1992). Aspects of seed technology of rattans. In *A Guide to the Cultivation of Rattan*. Wan Mohd W. R., Dransfield J., Manokaran N. (eds). Pp. 143-148
17. **La Rue, C.D.** (1936). The growth of plant embryos in culture. *Bull Torrey Bot. Club* 63:365-382.

18. **Linsmaier, E. M. and Skoog, F.** (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
19. **Mori, T., Zolfatah Abd. Rahman and Tan, C. H.** (1980). Germination and storage of rotau mannan (*Calamus manan*) seeds. *Malay Forester* 43(1):44-45
20. **Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
21. **Nagao, M. A., Kanegawa, K. and Sakai, W. S.** (1980). Accelerating palm seed germination with gibberellic acid, scarification, and bottom heat. *HortScience* 15: 200-201.
22. **Nainggolan, P. H. J.** (1985). Preliminary observations on the effect of different canopy and soil moisture conditions on the growth of *Calamus manan* (manau). Proceedings of rattan seminar, Kuala Lumpur, Malaysia, oct 2-4, 1984. Wong, K. M. and Manokaran, N. (eds). Rattan Information Centre, FRIM, Kepong. Pp. 73-76
23. **Odetola, J. A.** (1987). Studies on seed dormancy, viability and germination in ornamental palms. *Principes* 31: 24-30
24. **Piaggese, A., Perata, P., Vitagliano, C., and Alpi, A.** (1991). Level of abscisic acid in integuments, nucellus, endosperm, and embryo of peach seeds (*Prunus persica* L. cv Sprincrest) during development. *Plant Physiol.* 97: 793-797.
25. **Pritchard, H. W. and Davies, R. I.** (1998). Biodiversity and conservation of rattan seeds. International consultation on rattan cultivation: achievements, problems and prospects. In press. Pp 16.
26. **Ren, C. and Kermode, A. R.** (1999) Analyses to determine the role of the megagametophyte and other seed tissues in dormancy maintenance of yellow cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*) seeds: morphological, cellular and physiological changes following moist chilling and during germination. *Journal of Experimental Botany.* Vol. 50 No. 337, pp 1403-1419.
27. **Rhagavan, V. and Torrey, J. G..** (1963). Growth and morphogenesis of globular and older embryos of *Capsella* in culture. *Amer. J. Bot.* 50: 540-541.
28. **Riestsema, J., Satina, S. and Blakeslee, A. F.** (1953). The effect of Indole-3-acetic acid on *Datura* embryos. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A*
29. **Roberts, E. H. and Ellis, R. H.** (1989). Water and seed survival. *Annals of Botany* 63, 39-52.
30. **Roberts, E. H. and Smith, R. D.** (1977). Dormancy and the pentose phosphate pathway, in "The physiology and Biochemistry of seed dormancy and germination", A.A. Khan, ed., Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
31. **Rock, C. D. and Quatrano, R. S.** (1995) The role of hormones during seed development. In: *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* Peter J. Davies (Ed). Kluwer Academic Publishers. Pp.671-697
32. **Schooler, A. B.** (1960). The effect of gibrel and gibberellic acid (K salt) in embryo culture media for *Hordeum vulgare*. *Agron. J.* 52:411.
33. **Skene, K. G. M.** (1969). Stimulation of germination in immature bean embryos by gibberellic acid. *Planta* 87:118-129
34. **Tisserat, B.** (1987) Palms. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry.* Bonga, J. M. and Durzan, D. J. (eds.) Vol. 3, Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. Pp. 338-356.

35. Uhl, N. W. and Dransfield, J. (1987). *Genera Palmarum – a classification of palms based on the work of Harold E. Moore, Jr. The L.H. Bailey Hortorium and the International Palm Society, Allen Press, Kansas. 610 pp.*
36. Vincent, E. M. and Roberts, E. H. (1977). The interaction of light, nitrate and alternating temperature in promoting the germination of dormant seeds of common weed species, *Seed Sci. Technol.*, 5:859.

Propagación *In vitro* de *B. major* y *D. orthacanthos*

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de cultivo *in vitro* en palmas neotropicales se han aplicado con éxito para estudios morfogénicos y de micropropagación en especies de interés económico (Guerra, 1988), como son: palma datilera (*Phoenix dactylifera*), palma aceitera (*Elaeis guineensis*) y cocotero (*Cocos nucifera*). Sin embargo, a pesar del gran número de especies de palmas, existen pocos reportes sobre la micropropagación de especies silvestres (tabla 2).

En general, los reguladores de crecimiento que han dado la mejor respuesta morfogénica en las palmas son: el ácido naftalen acético (ANA), la 6-Bencilaminopurina (BAP), y el ácido 2, 4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), aunque también se reporta que el picloram a 0.06 mgL^{-1} combinado con BAP a 5 mgL^{-1} , promovió la embriogénesis somática en *Bactris gasipaes* (Valverde *et al.*, 1987). En *Elaeis guineensis*, Teixeira *et al.* (1993), obtuvieron embriones somáticos a partir de callo con 2,4-D a $500 \mu\text{M}$; Touchet *et al.* (1991) utilizaron de $80-100 \text{ mgL}^{-1}$ de 2,4-D para obtener callo embriogénico. La utilización de BAP o ANA a $150 \mu\text{M}$ indujo la organogénesis en *Metroxylon sagu* (Hisajima, 1996). En *Calamus* sp. la organogénesis fue observada al utilizar ANA y BAP a 1 y 2 mgL^{-1} respectivamente (Gunawan, 1991) y al combinar 1 mgL^{-1} BAP + 1 mgL^{-1} de 2,4-D (Umali-García, 1985). En *Phoenix dactylifera* concentraciones de $453 \mu\text{M}$ de 2,4-D indujeron la formación de embriones somáticos (Veramendi *et al.*, 1996; Bhaskaran *et al.*, 1992).

Debido a su semejanza con el ratán, *B. major* y *D. orthacanthos* exhiben características interesantes para su explotación comercial. Sin embargo, a pesar de la abundante producción de frutos en las poblaciones naturales, estas especies presentan serias limitantes para su propagación *ex situ*, principalmente *B. major*. Observaciones previas de germinación en campo muestran que, tanto las semillas de *B. major* como las de *D. orthacanthos*, presentan porcentajes de germinación inferiores al 10 y 40% respectivamente. Aunado a lo anterior, estas especies tienen ciclos de fructificación estacionales por lo que las semillas no se encuentran disponibles todo el año, lo que refuerza la necesidad de establecer métodos de propagación para el establecimiento de plantaciones. La micropropagación ofrece una alternativa para la producción clonal rápida de palmas (Tisserat, 1984) partiendo de plantas madres seleccionadas y, dado que la mayoría de las semillas de palmas son recalcitrantes y tienen una corta vida de almacén, el cultivo de tejidos podría ser el método ideal de almacenamiento de su germoplasma (Blake, 1983).

Tabla 2. Algunas especies de palmas con potencial morfogénico demostrado.

Especie	Fuente de explante	Respuesta morfogénica	Referencia.
<i>Phoenix dactylifera</i>	Ápices	Organogénesis, embriogénesis	Tisserat, 1979.
<i>Elaeis guineensis</i>	Embrión cigótico.	Embriogénesis	Teixeira <i>et al.</i> , 1993.
<i>Acrocomia</i> sp.	Embrión cigótico.	Callo embriogénico.	Crocomo y Melo, 1996
<i>Bactris gasipaes</i> .	Meristemos.	Organogénesis. Embriogénesis.	Arias y Huete, 1983; Valverde <i>et al.</i> , 1987.
<i>Cocos nucifera</i>	Plúmula	Embriogénesis	Homung, 1995; Chan, <i>et al.</i> , 1998.
<i>Metroxylon sagu</i>	Embrión cigótico	Organogénesis	Hisajima, 1996
<i>Euterpe edulis</i>	Embrión cigótico	Embriogénesis	Guerra y Handro, 1981
<i>Rhapis excelsa</i>	Inflorescencia	Callo	Daquinta <i>et al.</i> , 1997
<i>Calamus</i> sp	Base del tallo.	Organogénesis.	Umali-García, 1985.
	Embrión cigótico.	Embriogénesis.	Goh <i>et al.</i> , 1999, 2001.
	Raíz, hoja.		

De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue el de establecer un protocolo eficiente de micropropagación para *B. major* y *D. orthacanthos*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Como fuente de explante se utilizaron plántulas de *B. major* y *D. orthacanthos* de 6-12 meses de edad, germinadas *in vitro* a partir de embriones cigóticos extraídos de semillas de acuerdo al método descrito anteriormente (capítulo 2). Los frutos maduros, de donde se obtuvieron las semillas, fueron colectados en localidades cercanas a los ejidos de la Unión y de Noh Bec en Q. Roo, México.

Elección del explante adecuado

Para obtener los explantes, las plántulas se seccionaron en cuatro partes: Base del tallo (B), hoja 1 (M), hoja 2 (A) y hoja 3 (H) (Fig. 18). Las secciones de la base fueron cortadas en fragmentos de 3 mm^3 las secciones de hoja 1 y 2 (M, A) se dividieron longitudinalmente en fragmentos de 0.5 cm de longitud y la sección de hoja 3 en fragmentos de 0.5 cm^2 antes de ser incubados en los tratamientos correspondientes. Los explantes obtenidos de esta forma fueron incubados en las sales de MS con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento: ANA ($0, 2, 5 \text{ mgL}^{-1}$) y BAP ($0, 2, 4, 8, 10 \text{ mgL}^{-1}$). Para cada tratamiento se utilizaron tres explantes por frasco con tres réplicas cada uno,

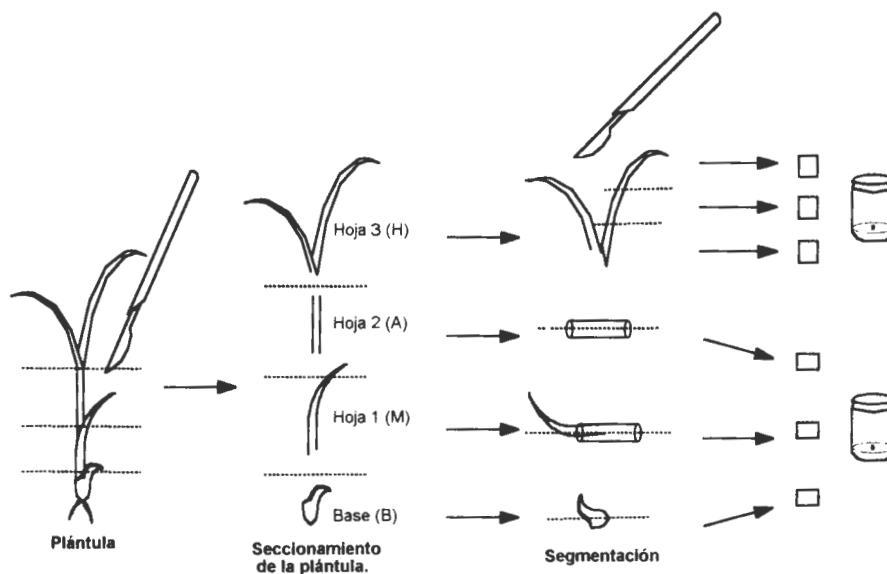


Figura 18. Seccionamiento de una plántula para la obtención de explantes.

Localización de zonas meristemáticas

Para la localización de las zonas meristemáticas se realizaron cortes histológicos a las plántulas germinadas *in vitro* de seis meses de edad. El tejido fue fijado en Formaldehído- Ácido acético - alcohol (FAA) en proporción 3:2:1, y posteriormente deshidratado con una concentración gradual de etanol (30, 50, 70, 85, 96 y 100 %) dejándolo sumergido por una hora y media en cada concentración y realizando tres cambios en alcohol al 100%. Después se realizó una preinclusión en resina JB-4 (Polyscience®) durante 48 hr. antes de realizar la inclusión en la misma resina.

Los cortes histológicos, de 5 μm , se realizaron en un microtomo de rotación (Microm HM 325) y se tiñeron con azul de toluidina dejándolos en contacto con el colorante por 1-2 min. antes de enjuagarlos para eliminar el exceso.

Efecto de diferentes combinaciones de fitorreguladores (ANA/BAP) sobre la morfogénesis *in vitro*

Las plántulas germinadas *in vitro* de 6 a 12 meses de edad fueron seccionadas, utilizando como fuente de explantes la región de la base del tallo. Los explantes de aprox. 3 mm³, fueron sembrados en frascos gerber conteniendo 25 ml de las sales de MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con sacarosa al 3% y gelificado con gel rite (2 g/l). Asimismo, se adicionaron diferentes combinaciones de ácido α -naftalenacético (ANA) y de 6-bencilaminopurina (BAP) a concentraciones de 0 a 5 mgL⁻¹ y de 0 a 10 mgL⁻¹, respectivamente. Se utilizaron tres réplicas con dos explantes c/u por tratamiento. La incubación se realizó en fotoperíodo 16/8 hrs. (luz / oscuridad) a una temperatura de 27 \pm 2 °C, durante un mes, después del cual se evaluó el número de brotes formados.

Todo el material empleado fue esterilizado con autoclave a una presión de 1.05 Kg cm⁻² y una temperatura de 121 °C durante 20 min. El pH de los medios se ajustó a 5.8 previo a la esterilización.

Enraizamiento

Los brotes obtenidos fueron separados y empleados en experimentos de enraizamiento *in vitro* en las sales de MS con diferentes fitorreguladores: ácido naftalen - acético (ANA), ácido indol acético (AIA) y ácido indol butírico (AIB), a concentraciones de: 0.0, 0.01, 0.1; 0.0, 1.0, 2.0; y 0.0, 0.5, 1.0 mgL⁻¹, respectivamente.

Por otro lado, se ensayó la disponibilidad de nutrimentos y la condición del medio (líquido o semisólido). Para ello, se utilizó el medio MS líquido o gelificado con gel-rite a 2 gL⁻¹. Asimismo, en ambas condiciones, se redujo a la mitad la concentración de sales (½ MS). Se utilizaron 10 réplicas con 1 brote c/u por tratamiento.

La evaluación se realizó después de cuatro semanas de cultivo, en condiciones de fotoperíodo 16/8 hrs. de luz y oscuridad.

Aclimatación y establecimiento en campo

Para la aclimatación se utilizaron cinco macetas con peat-moss + suelo nativo como sustrato. Cada maceta contenía 10 plántulas micropropagadas, cubiertas con una tapa de plástico para mantener una alta humedad. Estas macetas fueron descubriéndose parcialmente hasta remover completamente la tapa después de cuatro semanas en el invernadero. La supervivencia fue evaluada después de haberse retirado la cubierta. El riego se efectuó con agua de la llave cada tres días

Las plantas aclimatadas fueron trasplantadas a bolsas de plástico y establecidas en condiciones de campo.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa SAS (Statistical Analysis System) versión 8, aplicando una comparación de medias de acuerdo a la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elección del explante adecuado

De acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, las plántulas germinadas fueron seccionadas para obtener los diferentes tipos de explantes (Fig. 18). Las porciones de hoja 1 (H) y 2 (A) no presentaron ninguna respuesta morfogénica después de 30 días de cultivo. Los explantes foliares solamente adquirieron un color verde más intenso en los tratamientos con mayor concentración de auxina/citocinina, y en la mayoría de estos explantes hubo fenolización después de 15 días de cultivo. Por el contrario, la utilización de explantes de hojas en ratán y palma datilera, indujo la formación de "laminoides" y se logró obtener plántulas utilizando BAP (Padmanabhan y Sudharsan, 1987).

En la región inferior, hoja 1 (M), se observó que a concentraciones de 5 y 10 mgL⁻¹ de BAP y a la mayor concentración de auxina (5 mgL⁻¹), la médula del explante se elongó hasta formar un brote, en algunos casos solamente se observó un desarrollo foliar a partir de la sección de tallo utilizada como explante.

La base del tallo (B) como fuente de explante produjo un mayor número de brotes, con un número promedio de 6.1 brotes por explante para *B. major* (tabla 3) y de 4.1 para *D. orthacanthos* (tabla 4). La utilización de este tejido como explante, coincide con lo reportado para algunas especies de ratán, en las que se ha observado una mayor proliferación de brotes al utilizar la región denominada "collar", en plántulas de 6 a 12 meses de edad (Aziah, 1989; citado por Yusoff, 1992).

Se ha reportado que la combinación de ANA/BAP promueve la organogénesis en varias especies de palmas (Gunawan, 1991; Kundu y Sett, 2000). De manera similar, Tisserat (1984) logró la proliferación de brotes en palma datilera al usar como explante meristemas apicales de plantas de dos años de edad, cultivadas en las sales de MS con 0.1 mgL⁻¹ de ANA y 10 mgL⁻¹ de BAP después de 32 semanas de cultivo.

Cabe señalar que para ambas especies en estudio, los explantes respondieron de manera similar, por lo que se eligió la base del tallo como fuente de explante.

Localización de zonas meristemáticas

En forma paralela, para seleccionar la mejor fuente de explante, se realizaron cortes histológicos de las plántulas germinadas *in vitro* para localizar las zonas meristemáticas, las cuales se consideran ideales para la inducción de morfogénesis debido a que en ellas se encuentran células en división continua.

Como se observa en la figura 19, fue precisamente en la base del tallo en donde se localizó el mayor número de regiones meristemáticas (meristemo apical y meristemas primordiales), dispersas y principalmente en regiones cercanas al haz vascular. Éstas consistían de células poco vacuoladas, con citoplasma denso y núcleo prominente (Fig. 19). Estas zonas meristemáticas también se observan en otra monocotiledónea (maíz), en donde se describen los mismos puntos de crecimiento (Esau, 1985). En este tejido también se observó la mayor formación de brotes al utilizar BAP a 10 mgL⁻¹. En *D. orthacanthos* su anatomía fue muy similar y los puntos meristemáticos se localizaron en la misma región (dato no mostrado).

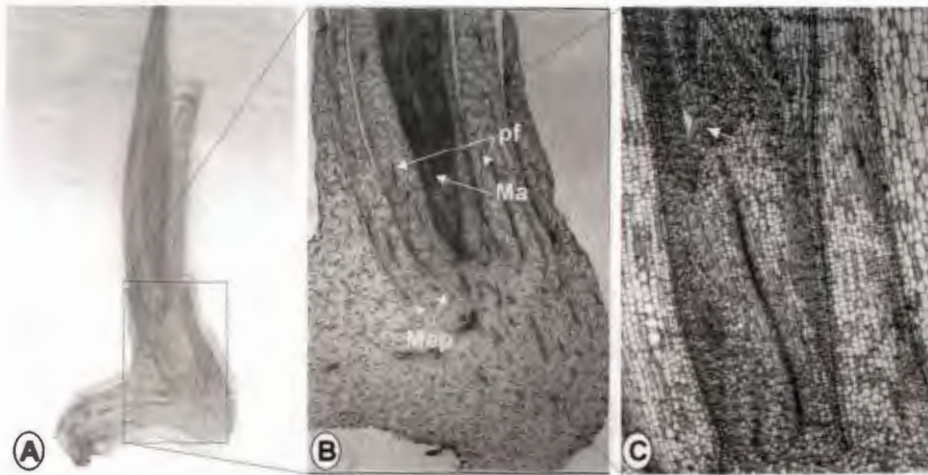


Figura 19. Corte longitudinal de una plántula de *B. major* de 6 meses de edad mostrando las zonas meristemáticas. A) Plántula entera. B) Región de la base del tallo en donde se localizan el meristemo apical (Ma) y el meristemo de engrosamiento primario (Mep), también se aprecian los primordios foliares (pf) (10x). C) Tipo de células meristemáticas observadas (flecha) (40x).

Efecto de diferentes combinaciones de ANA/BAP (aux/cit) sobre la morfogénesis *in vitro*

En ambas especies en estudio, el mayor número promedio de brotes por explante se obtuvo al utilizar solamente BAP a 10 mgL⁻¹ (tablas 3 y 4). Sin embargo, *B. major* presentó mayor número de brotes (6.1) que *D. orthocanthos* (4). Este tratamiento resultó significativamente diferente a los demás empleados. La presencia de ANA redujo la formación de brotes, mientras que a mayor concentración de BAP el número de brotes aumentó.

Tabla 3. Efecto de diferentes combinaciones de ANA/BAP sobre el número promedio de brotes por explante en *B. major*. Las medias seguidas por letras distintas son significativamente diferentes. Prueba de Tukey, p<0.05

		BAP (mgL ⁻¹)				
		0	2	4	8	10
ANA (mgL ⁻¹)	0	1 ^c	1 ^c	2 ^{bc}	2 ^{bc}	6.1 ^a
	2	1 ^c	1 ^c	2.1 ^{bc}	2 ^{bc}	3.3 ^b
	5	1.3 ^c	2 ^{bc}	2 ^{bc}	2.3 ^{bc}	3.1 ^b

Tabla 4. Efecto de diferentes combinaciones de ANA/BAP sobre el número promedio de brotes por explante en *D. orthocanthos*. Las medias seguidas por letras distintas son significativamente diferentes. Prueba de Tukey, p<0.05

		BAP (mgL ⁻¹)				
		0	2	4	8	10
ANA (mgL ⁻¹)	0	0 ^e	1.2 ^{cde}	3 ^{abc}	3.6 ^{ab}	4 ^a
	2	0.6 ^{de}	1 ^{de}	2.3 ^{cde}	3.1 ^{abc}	3 ^{abc}
	5	0 ^e	1 ^{de}	2 ^{bcd}	2.1 ^{abcd}	2.3 ^{cde}

La utilización de una mayor concentración de BAP (15 mgL⁻¹) resultó en una formación de brotes amorfos y con apariencia vitrificada (datos no mostrados). Del mismo modo, Aziah (1989) utilizó altas concentraciones de BAP para obtener estructuras nodulares que posteriormente formaron brotes múltiples; la utilización de concentraciones mayores de BAP también resultó en una deformación de los brotes los cuales presentaban apariencia vitrificada. Asimismo, en *Beaucarnea recurvata* (ponytail palm) (Samyn, 1997), el mayor número de brotes se obtuvo al utilizar BAP (1 mgL⁻¹). Sin embargo estas fueron de hojas pequeñas y algunas veces distorsionadas.

Fase de multiplicación

Los brotes generados en las sales de MS con 10 mgL^{-1} de BAP pueden ser utilizados como fuente de explante y resembrados en el mismo medio para inducir la producción de brotes, esto puede realizarse de manera continua. Los brotes que no enraizaron también son reutilizados para su inducción, por lo que este material no es desperdiciado. Esta fase también es aplicable para ambas especies, con la diferencia de que en *B. major* se obtiene una mayor producción de brotes (6.1) que en *D. orthacanthos* (4).

En algunos explantes se observó una abundante proliferación de brotes después de haberlos transferido a un medio sin reguladores (Fig. 21 C), lo que pudo deberse a un acarreo del efecto del BAP (carry over) por las altas concentraciones empleadas.

Enraizamiento

Efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la formación de raíces en brotes de B. major

Los brotes obtenidos de *B. major* fueron separados y sembrados en las sales de MS adicionado con ANA ($0 - 0.1 \text{ mgL}^{-1}$), AIA ($0 - 2.0 \text{ mgL}^{-1}$) y AIB ($0 - 1.0 \text{ mgL}^{-1}$). La evaluación se realizó después de un mes de cultivo.

Como se puede observar (tabla 5), la adición de fitorreguladores a cualquiera de las concentraciones ensayadas no estimuló la formación de raíces; Sin embargo, en otras especies de palmas, la utilización de bajas concentraciones de ANA (0.01 a 0.1 mgL^{-1}) ha dado buenos resultados para inducir la formación de raíces en plántulas propagadas *in vitro* (Tisserat, 1984; Kundu y Sett, 2000; Ong, 1975, citado por Blake, 1983).

Al utilizar solamente MS, sin adición de reguladores, se observó la formación de raíces en un 20% de los brotes evaluados. En el medio que contenía AIA a 1 mgL^{-1} sólo se observó una plántula enraizada.

Tabla 5. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la formación de raíces en brotes de *B. major*.

Regulador	Concentración (mgL^{-1}).	Formación de raíces (%)
ANA	0	20
	0.01	0
	0.1	0
AIA	0	20
	1.0	10
	2.0	0
AIB	0	20
	0.5	0
	1.0	0

Efecto de la disponibilidad de nutrimentos y la condición del medio sobre la formación de raíces en brotes de B. major

Se ensayaron diferentes condiciones de cultivo (líquido y sólido) y la disponibilidad de nutrimentos (sales de MS completo y a la mitad de su fuerza iónica) utilizando como explantes los brotes obtenidos por morfogénesis.

Tabla 6. Porcentaje de formación de raíces en brotes de *B. major* en las sales de MS completo (1 X) y a la mitad de su fuerza iónica (1/2 X).

Medio	1 X	½ X
Líquido	20%	40%
Sólido	20%	20%

Como se puede observar en la tabla 6 y de manera similar al experimento anterior, en las sales de MS completo se observó la formación de raíces en el 20% de los brotes, tanto en medio sólido como en líquido; Sin embargo, al disminuir a la mitad la fuerza iónica de las sales, la formación de raíces fue mayor en el medio líquido (40%) que en el medio sólido (20%).

Los brotes obtenidos de *B. major* enraizaron empleando el medio MS líquido a ½ X, mientras que en *D. orthacanthos* el 85% de las plántulas lo hicieron después de tres meses de haberlos separado y resembrado en las sales de MS sin BAP (Fig. 20).

El empleo del medio MS líquido a la mitad de su fuerza iónica, favoreció la formación de raíces, de manera similar a lo reportado por Samyn (1997), quién logró mejores resultados al enraizar brotes de *Beaucarnea recurvata* en un medio MS a un tercio de su fuerza iónica sin reguladores de crecimiento, que en un medio con toda su fuerza.

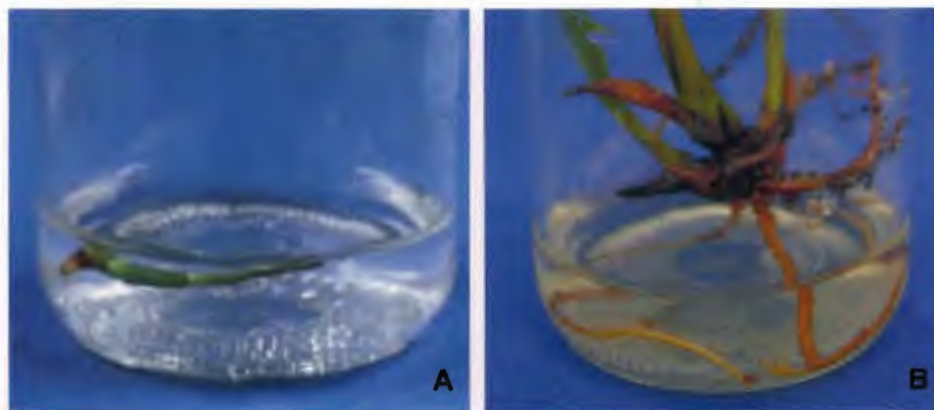


Figura 20. Enraizamiento de brotes de: A) *B. major*, ½ MS líquido y B) *D. orthacanthos*, MS sólido.

Diferentes condiciones de iluminación (Luz - oscuridad, fotoperíodo), no produjeron diferencias significativas en el enraizamiento de los brotes (datos no

mostrados), lo que junto con los experimentos anteriores sugiere que la formación de raíces está principalmente modulado por la condición física del medio y/o a la disponibilidad de nutrimentos.

Aclimatización

Los brotes que generaron una mayor cantidad de raíces fueron aclimatizados en invernadero. Se sembraron 10 plantas en cada maceta las cuales fueron cubiertas con una tapa de plástico, las que fueron descubriéndose gradualmente hasta su completa eliminación. El porcentaje de supervivencia obtenido después de haberse retirado completamente la cubierta (un mes) fue del 16% para *B. major* y del 40% para *D. orthacanthos*. Esto pudo deberse al poco desarrollo radical, ya que se observó que solo aquellas plantas con un buen desarrollo lograron sobrevivir. A diferencia de éstas, las plántulas de *D. orthacanthos* presentaron mayor supervivencia (40%) y en contraste fueron las que presentaron un mayor desarrollo radical.

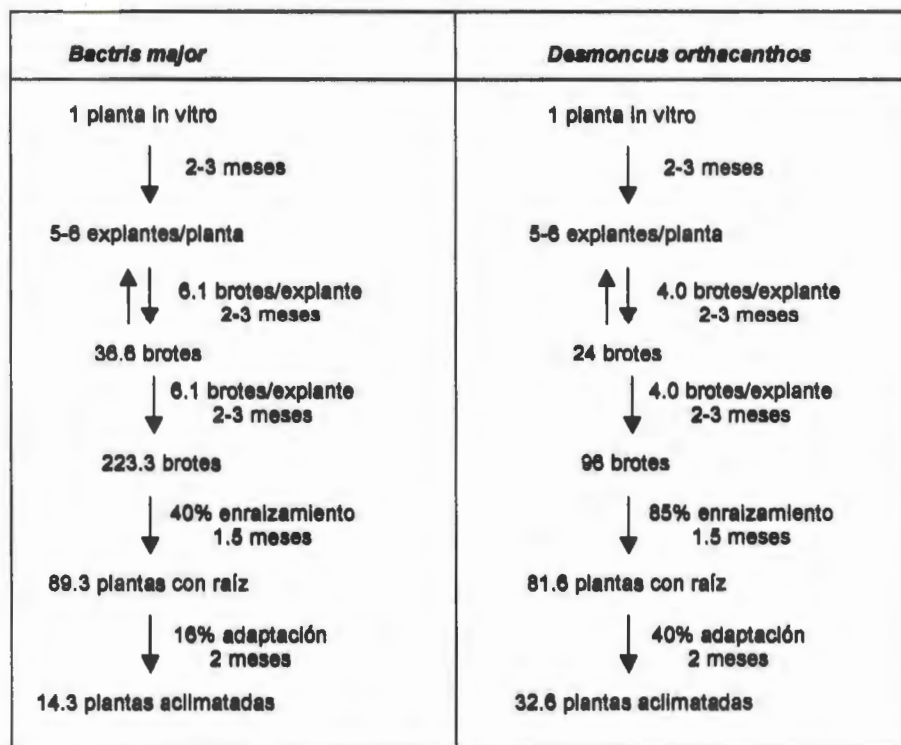
Las plantas que sobrevivieron fueron trasplantadas a bolsas de plástico para incrementar su desarrollo radical (Fig. 21 E) y posteriormente se trasplantaron al campo (Fig. 23).

Eficiencia de la micropropagación

La tabla 7 representa la estimación del proceso de la propagación, mientras que en *B. major* se obtienen 14.3 plantas aclimatadas a partir de una planta *in vitro*, en *D. orthacanthos* se obtienen 32.6 a pesar del menor número de brotes. Esto es debido a las diferencias en el porcentaje de enraizamiento y aclimatación. La producción de brotes puede realizarse de manera continua, lo que aumenta la eficiencia del proceso en ambos casos. Todo el proceso puede ser realizado en un mínimo de 9.5 meses, lo cual es rápido si se compara con otras especies de palmas (Ej. cocotero). Cuando los brotes enraizados son mantenidos *in vitro* por resiembras continuas, el número de raíces aumenta durante el tiempo; la aclimatización de estas plántulas utilizando camas de agua resulta en un incremento en el porcentaje de supervivencia que alcanza un 75%. Sin embargo, esto alarga el tiempo del proceso por lo que es necesario optimizar las dos últimas fases para incrementar el número de plantas aclimatadas.

En las figuras 21 y 22, se puede observar el proceso de micropropagación de las dos especies en estudio.

Tabla 7. Estimación del proceso de la propagación de *B. major* y *D. orthocanthos*.



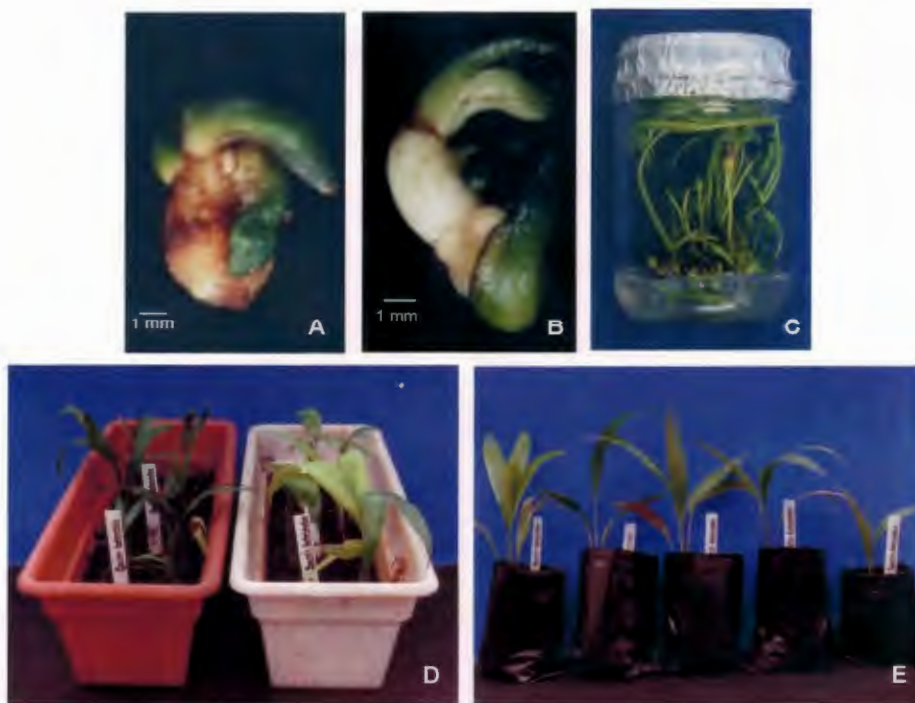


Figura 21. Proceso de micropropagación en *B. major*. A) inicio de la formación de brotes en *B. major*. B) Brotes de *B. major* después de 30 días de cultivo. C) Proliferación de brotes de *B. major* después de una segunda resiembra en un medio libre de reguladores. D) Plantas de *B. major* en invernadero. E) Plantas listas para su trasplante a campo.

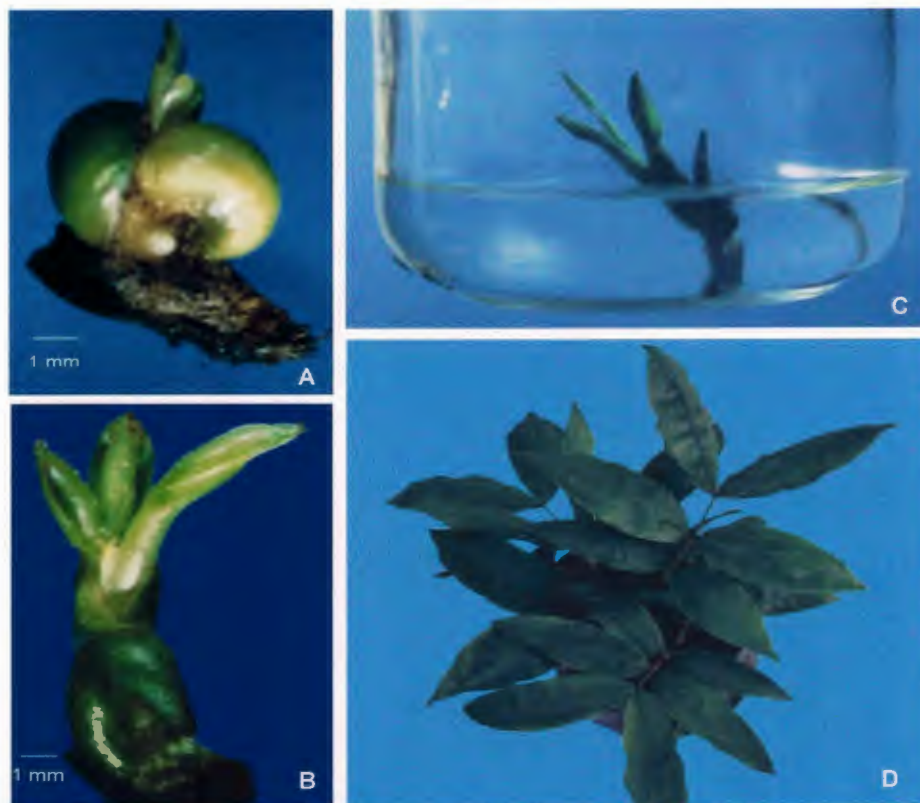


Figura 22. Proceso de micropropagación en *D. orthacanthos*. A) Inicio de la formación de brotes en *D. orthacanthos*. B) Brotes de *D. orthacanthos* después de 30 días de cultivo. C) Proliferación de brotes de *B. major* después de una segunda resiembra en un medio libre de reguladores de crecimiento. D) Plantas listas para su trasplante a campo.



Figura 23. Planta de *B. major* obtenida *in vitro* y establecida en el jardín botánico del CICY

En conclusión podemos decir que se cuenta con un protocolo de micropropagación de estas especies, lo que representa el primer paso para el establecimiento de plantaciones experimentales; sin embargo, será necesario optimizar este proceso, principalmente en la etapa de enraizamiento y aclimatación para hacerlo más eficiente y por lo tanto económico y aplicable.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Arias, O., Huete, F.** (1983). Propagación vegetativa *in vitro* del pejobaye (*Bactris gasipaes* H. B. K.) Turialba 33:103-108
1. **Aziah M. Y.** (1992). Tissue culture of rattans. In: A guide to the cultivation of rattan. Malayan forest record No. 35. W. Razali W. Mohd, J. Dransfield, N. Manokaran (eds.). Forest Research Institute Malaysia. Kepong, Kuala, Lumpur, Malaysia. Pp. 149-161
2. **Bhaskaran, S. and Smith, R. H.** (1992). Somatic embryogenesis from shoot tip and immature inflorescence of *Phoenix dactylifera* cv. Barhee. Plant Cell Reports 12:22-25.
2. **Blake, J.** (1983) Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm. In: Tissue Culture of Trees. J. H. Dodds (ed.). Croom Helm. Pp. 29-50.
3. **Chan, J. L., Sáenz, L., Talavera, C., Hornung, R., Robert, M., Oropeza, C.** (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports. 17: 515-521
4. **Crocorno, O. J. and Melo, M.** (1996). *Acrocomia* species (Macauba palm). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 35. Trees IV (ed. By Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 3-17.
5. **Daquinta, M., Concepción, O., Capote, I., Cobo, I., Escalona, M. and Borroto, C.** (1996). *In vitro* germination of *Chamaedorea seifrizii*. Principes 40(2), pp. 112-113.
6. **Esau, K.** (1985). Anatomía vegetal. Ed. Omega. 3ª edición. Barcelona, España. Pp. 779
7. **Goh, D. K. S., Michaux-Ferriere, N., Monteulis, O., Bon, M. C.** (1999). Evidence of somatic embryogenesis from root tip explants of the rattan *Calamus manan*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 35: 424-427.
8. **Goh, D. K. S., Bon, M. C. Allotti, F., Escoute, J., Ferriere, N. and Monteulis, O.** (2001). *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrillii* and *Calamus subinermis*. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 37: 375-381.
9. **Guerra, M. P. and Handro, H.** (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* mart. (palmae). Plant Cell Reports 7:550-552
3. **Gunawan L. W.** (1991). Rattans (*Calamus* sp). In: Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 16. Trees III (Ed by Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp. 211-220
10. **Hisajima, S.** (1996). *Metroxylon sagu* Rottb. (sago palm). Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 35. Trees IV (Ed by Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp. 217-230
11. **Hornung, R.** (1995). Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. *In vitro* Culture. Mars-Avril 1995. Pp. 38-41.
12. **Kundu, M. and Sett, R.** (1999). Regeneration through organogenesis in rattan. Plant Cell Tissue and Organ Culture 59:219-222
13. **Murashige T. and Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497

14. **Padmanabhan, D. and Sudhersan, C.** (1987). Laminoids in leaf cultures of a rattan palm. In: Recent Research on Rattans. Rao, A. N., Vongkaluang, I., Dransfield, J., Manokaran, N., Sastry, C. B., Dhanarajan, G. (Eds). November 12-14, 1987. Chiangmai, Thailand. Pp. 148-151.
15. **Samyn, G.** (1997). Micropropagation of *Beaucarnea recurvata* Lem. Syn. *Nolina recurvata* (Lem) Hemsl. (Ponytail Palm). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 40. High-Tech and Micropropagation VI (Ed. By Y. P. S. Bajaj) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp.264-275
16. **Teixeira, J. B., Söndhal, M. R. and Kirby E. G.** (1993). Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell Tiss.Org. Cult.* 34:227-233.
17. **Tisserat B.** (1979). Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 30:1275-1283.
18. **Tisserat, B.** (1984). Clonal Propagation: Palms. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Indra K. Vasil (Ed) Vol. I. Academic Press. Pp 74-81.
19. **Touchet, B., Duval, Y. and Pannetier, C.** (1991). Plant regeneration from embryogenic suspension culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jack). *Plant Cell Reports.* 10:529-532
20. **Umali-García, M.** (1985). Tissue culture of some rattan species. In: Proc. Of rattan species. Pp 23-31. In proc. Of rattan seminar, Kuala Lumpur, Malaysia. Wong, K. M. and Manokaran, N. (eds.) The rattan information Center Forest Research Institute. Kepong Malaysia
21. **Valverde, R., Arias, O. and Thorpe, T. A.** (1987). Picloram induced somatic embryogenesis in pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 10:149-156.
22. **Veramendi, J. and Navarro, L.** (1996). Influence of physical conditions of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 45:159-164.

Discusión General, Conclusiones y Perspectivas

Germinación *in vitro* de *B. major* y *D. orthacanthos*

B. major y *D. orthacanthos* son dos palmeras nativas de la Península de Yucatán que son sustitutos potencialmente del ratán. Estas especies crecen en selvas tropicales húmedas y están amenazadas por la actividad humana, por lo que una alternativa para su explotación es su domesticación y cultivo. La mayoría de las especies de palmas, sin embargo, posee semillas recalcitrantes (Chin y Roberts, 1980; Tompsett y Kemp, 1996; citados por Pritchard y Davies, 1998) lo que hace difícil su propagación, *B. major* y *D. orthacanthos* no son la excepción, y en los que la dificultad observada en los procesos de germinación en campo, condujo a realizar estudios sobre la germinación y rescate de embriones *in vitro*, dirigidos a romper la latencia de las semillas, y sobre métodos de micropropagación que permitan propagar adecuadamente estos materiales.

La utilización de semillas almacenadas de ambas especies demostró una fuerte condición de latencia, la cual no pudo ser rota por ninguno de los métodos ensayados para estimular la germinación. Sin embargo, los embriones extraídos de semillas recién colectadas de ambas especies presentaron altos porcentajes de germinación. Por otro lado, al utilizar semillas enteras o medias semillas este porcentaje se redujo drásticamente, particularmente en *B. major* en donde no se observó germinación, lo que sugiere que el endospermo ejerce un efecto inhibitorio sobre la misma. La inhibición también se observa al incubar embriones aislados rodeados de endospermo. Resultados similares fueron encontrados en *Chamaecyparis nootkatensis* en donde por medio de la eliminación secuencial de los tejidos que encierran al embrión se determinó que el megagametofito (endospermo) es el tejido que contribuye primariamente al mantenimiento de la latencia, complementando la inhibición mecánica de este tejido, algunos factores como inhibidores químicos pueden estar involucrados (Ren y Kermodé, 1999).

Las estructuras que rodean al embrión son una barrera para el intercambio gaseoso o la entrada de agua, como demuestra el hecho que la escarificación de las semillas facilita la germinación en muchas especies (Carpenter y Ostmark, 1993; Clancy y Sullivan, 1988; Holmquist y Popenoe, 1967; Nagao et al., 1980; Odetola, 1987). En *Cynoglossum officinale*, la testa es lignificada y es impermeable al O₂, lo que contribuye al establecimiento y mantenimiento de la latencia (Stabell et al., 1996). Sin embargo, en el caso de *B. major* y *D. orthacanthos* cuando se eliminó la testa de las semillas (medias semillas) solamente germinaron los embriones de *D. orthacanthos*, aunque de manera significativamente inferior a como ocurrió en los embriones aislados solos, lo cual sugiere que la interferencia del intercambio gaseoso y la absorción de agua no son los factores clave en la latencia de estas semillas.

La presencia de semillas enteras en *Bactris* no reduce el porcentaje de germinación de los embriones aislados, como sucede con *Desmoncus*. Esto puede

deberse al mayor grosor e impermeabilidad de la testa de *Bactris* que no permite la liberación de los inhibidores al medio.

Diversos inhibidores de la germinación están presentes en las cubiertas de las semillas. El inhibidor que ha sido más estudiado con respecto a la latencia es el ABA. Se ha mencionado que el mantenimiento de la latencia puede ser debido a altos niveles de ABA en las semillas maduras y a una sensibilidad incrementada del embrión a este inhibidor (Walker-Simmons, 1987; Kermodé, 1995). Sin embargo, no siempre se requiere de altas concentraciones de ABA para mantener la latencia aunque si para imponerla (Bewley y Black, 1994). En el caso de los embriones de *Bactris* solamente la adición de altas concentraciones de ABA (1×10^{-4} M) resultó en una inhibición de la germinación, los embriones con endospermo tampoco germinaron. Contrario a esto, en semillas de lechuga, se encontró que a esta misma concentración (1×10^{-4} M) la germinación se inhibió completamente mientras que la presencia del endospermo de *B. major* no tuvo ningún efecto. Lo anterior sugiere que la inhibición de la germinación de los embriones de *Bactris* producidos por el endospermo no se debe a ABA. La utilización de 1×10^{-5} M de ABA inhibió la germinación de cerca del 95% de los embriones extraídos de *Avena sativa* y a 1×10^{-4} M la germinación se inhibió completamente (Corbineau *et al.*, 1991); En alfalfa, la germinación de embriones aislados fue muy lenta y baja cuando se incubaron en presencia de las estructuras que rodean a la semilla (endospermo o cubierta de la semilla), este efecto inhibitorio también fue observado al incubar los embriones en ABA a 1×10^{-5} M (Xu *et al.*, 1990). Estas concentraciones de ABA son muy altas comparadas con los niveles fisiológicos que se acumulan en las semillas, los cuales varían aproximadamente entre 1-10 μ M (Rock y Quatrano, 1995).

Micropropagación de *B. major* y *D. orthacanthos*

Para el establecimiento de la micropropagación de *B. major* y *D. orthacanthos*, la base del tallo de las plántulas resultó ser la mejor fuente de explante, lo que coincide con lo reportado en algunas especies de ratán (Aziah, 1989; citado por Aziah, 1992), en los que también se ha observado una mayor proliferación de brotes al utilizar la región denominada "collar" de plántulas de 6 a 12 meses de edad. Esta región corresponde con la zona de la base del tallo en las dos especies en estudio y es en donde se localizó el mayor número de regiones meristemáticas.

En general, la combinación de ANA/BAP ha resultado en la proliferación de brotes en varias especies de palmas (Gunawan, 1991; Kundu y Sett, 2000). Tisserat (1984) logró la proliferación de brotes en palma datilera al usar como explante ápices de plantas de dos años de edad, cultivadas en medio MS con 0.1 mgL^{-1} de ANA y 10 mgL^{-1} de BAP después de 32 semanas de cultivo. El empleo de citocininas ha dado buenos resultados en la inducción de callo de diversas especies. Sin embargo, en la literatura también se menciona la utilización de altas concentraciones de auxina (2, 4-D) para la obtención de callo embriogénico; en especies de palmas como el cocotero, palma datilera y en palma de aceite, se reportan niveles de hasta 110 mgL^{-1} de 2,4-D para obtener callo embriogénico y posteriormente embriones somáticos (Veramendi y Navarro, 1996; Hornung, 1995; Bhaskaran y Smith, 1992; Teixeira, *et al.*, 1993; Teixeira, *et al.*, 1995). Cabe mencionar que en *B. major*, al utilizar concentraciones mayores que 100 mgL^{-1} de 2,4-D con embriones cigóticos recién colectados como

explantos, solamente se obtuvo un callo amarillento muy compacto (Datos no mostrados). Sin embargo, al utilizar la base del tallo de vitroplántulas, empleando BAP y ANA como reguladores ocurrió la formación de brotes. El mayor número de brotes se obtuvo al utilizar solamente BAP a la mayor concentración ensayada (10 mgL^{-1}), y este número se incrementó al resembrar las plántulas en el mismo medio. Aziah (1989), también utilizó altas concentraciones de BAP en ratán para obtener estructuras nodulares que posteriormente formaron brotes múltiples. Mayores concentraciones de BAP resultaron en una deformación de los brotes y en una apariencia vitrificada. El efecto anterior se observó también en otra monocotiledónea (*Beaucarnea recurvata*) (ponytail palm) a una concentración de 1 mgL^{-1} de BAP, que aunque produjo el mayor número de brotes, éstos presentaron hojas pequeñas y algunas veces distorsionadas (Samyn, 1993; Samyn, 1997).

Por otro lado, la utilización de bajas concentraciones de ANA (0.01 a 0.1 mgL^{-1}) ha dado buenos resultados para la formación de raíces en plántulas de varias especies de palmas (Tisserat, 1984 a, 1984 b; Kundu y Sett, 2000; Ong, 1975, citado por Blake, 1983). Sin embargo, en nuestro caso la adición de fitoreguladores no estimuló la formación de raíces, lo cual solamente se logró en medio líquido libre de reguladores reduciendo a la mitad la fuerza iónica del medio MS. De manera similar, en *Beaucarnea recurvata*, Samyn (1993, 1997), logró mejores resultados al enraizar brotes en un medio MS a un tercio de su fuerza iónica sin reguladores de crecimiento, el número de raíces aumentó al utilizar ANA a 0.25 mgL^{-1} . En *B. major* sólo el 40% de los brotes forma una raíz primaria gruesa con muy pocos pelos radicales, mientras que en *D. orthacanthos* se observó una mayor proliferación de raíces en los brotes obtenidos y no presentaron limitaciones en su enraizamiento.

Las diferentes condiciones de iluminación (Luz - oscuridad, fotoperíodo), tampoco mejoraron el enraizamiento de los brotes lo que, junto con los experimentos anteriores, sugiere que la formación de raíces podría deberse a la condición del medio y/o a la disponibilidad de nutrientes.

El poco desarrollo radical de las plantas de *B. major* puede ser la causa principal del bajo porcentaje de supervivencia (16%) de las plántulas enraizadas *in vitro* y aclimatadas en invernadero después de un mes de haber sido transferidos, ya que se observó que sólo aquellas que presentaban un mayor desarrollo radical lograron sobrevivir. A diferencia de éstas, las plántulas de *D. orthacanthos* tuvieron un mayor desarrollo radical y presentaron también mayor supervivencia (40%).

Resumen de los resultados

1. Después de 18 meses de haber sido sembradas en tierra (*ex vitro*), las semillas recién colectadas presentaron porcentajes de germinación del 47% y 9 % para *D. orthacanthos* y *B. major* respectivamente.
2. La germinación *in vitro* de los embriones cigóticos de *B. major* y *D. orthacanthos* extraídos de semillas recién colectadas, fue del 93 y 81% respectivamente, en medio MS sin fitorreguladores al cabo de 30 días. La utilización de reguladores de crecimiento no incrementó significativamente la germinación.
3. Las semillas enteras recién colectadas no germinaron y esta latencia no pudo romperse por ninguno de los métodos ensayados (escarificación, aplicación de fitorreguladores, etc.)
4. Los embriones de las semillas recién colectadas entraron en latencia, sin perder viabilidad, después de un mes de almacenamiento.
5. El endospermo de *B. major* inhibió la germinación de embriones cigóticos de la misma especie, lo que sugiere la presencia de inhibidores de la germinación difusibles en el endospermo. Este efecto fue menos drástico en *D. orthacanthos*.
6. El efecto cruzado del endospermo de *B. major* y *D. orthacanthos* demuestra que los endospermos de ambas especies inhiben la germinación, este efecto inhibitorio fue mayor en *B. major*, lo que sugiere la presencia de un inhibidor más fuerte ó una mayor concentración del mismo en este tejido.
7. Los experimentos realizados con endospermo de *Bactris* y semillas de lechuga sugieren que el ABA no es el inhibidor de la germinación de los embriones de esta palmera.
8. Los explantes de hojas y tallos no fueron adecuados para inducir la morfogénesis *in vitro*.
9. La mejor fuente de explante resultó ser la región de la base del tallo. Los cortes histológicos de esta región demostraron la presencia de regiones meristemáticas.
10. a). La micropropagación de ambas especies se logró por organogénesis utilizando la base de la planta ("región del collar") como explante. Sin embargo, la mayor producción de brotes parece estar ligada a una parte más específica de este tejido.
b). El protocolo de micropropagación para ambas especies se puede resumir de la siguiente forma (Figura 24):
 - 1) La plántula germinada *in vitro* se secciona en tres partes utilizando la región de la base del tallo como explante y eliminando la raíz y las hojas.
 - 2) El explante se corta en fragmentos más pequeños de 3 mm² de área aproximadamente, y se siembran en el medio de cultivo MS adicionado con BAP a una concentración de 10 mgL⁻¹, en donde después de 30 días se inicia la formación de brotes.
 - 4) Los brotes se resiembran en el mismo medio para producir una mayor proliferación de brotes.
 - 5) Los brotes se separan individualmente y se siembran en un medio MS líquido a la mitad de su fuerza iónica para inducir la formación de raíces.
 - 6) Finalmente, las plántulas enraizadas son aclimatizadas en invernadero para su establecimiento en campo.

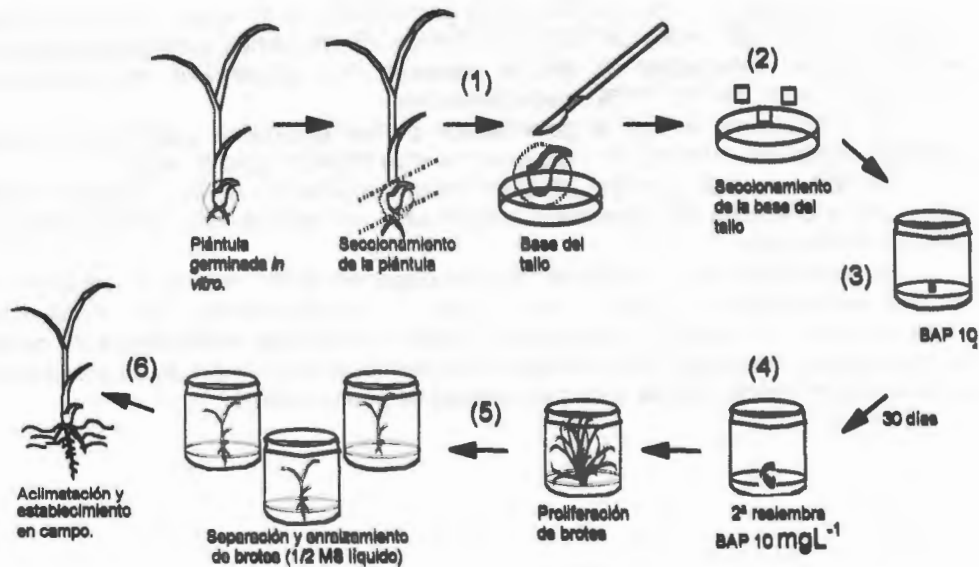


Figura 24. Proceso de micropropagación empleado en *Bactris major* y *Desmoncus orthacanthos*.

11. La utilización de 10 mgL⁻¹ de BAP permitió obtener un número promedio de 4.1 brotes por explante en *D. orthacanthos* y de 6.1 en *B. major*.
12. El enraizamiento en medio MS líquido a la mitad de su fuerza iónica, indica que la disponibilidad de nutrientes (forma de suministro y concentración), es el factor más importante para la inducción, ya que una mayor concentración de nutrientes y/o un medio sólido reducen el porcentaje de enraizamiento.

CONCLUSIONES

Se estableció un método eficiente de germinación de *B. major* y *D. orthacanthos*, lo cual se obtuvo por medio del cultivo *in vitro* de los embriones cigóticos extraídos de semillas recién colectadas de ambas especies, los porcentajes de germinación observados fueron del 93 y 81%, respectivamente.

El endospermo inhibió la germinación de los embriones cigóticos de ambas especies en estudio, este efecto inhibitorio fue más drástico para *B. major*.

El ABA no es el principal inhibidor de la germinación de los embriones de *B. major*, como lo indican los experimentos realizados con endospermo de esta palmera y semillas de lechuga.

Se estableció un protocolo de micropropagación de *B. major* y *D. orthacanthos*, lo que representa el primer paso para el establecimiento de plantaciones experimentales. Sin embargo, aunque se cuenta con plantas establecidas en campo, aún es necesario optimizar este proceso, principalmente en la etapa de enraizamiento y aclimatización, hasta obtener altos porcentajes de supervivencia.

PERSPECTIVAS

1. Aunque se ha estudiado mucho acerca del control de la germinación, este aspecto de la fisiología de las semillas continúa presentando muchas interrogantes para explicar el proceso de germinación vs. latencia. Los estudios realizados en este trabajo acerca del papel del endospermo en la inhibición de la germinación permitirán un mayor entendimiento sobre la fisiología de la germinación de estas palmeras, en relación con el bajo porcentaje de germinación que se observa en campo. Sin embargo es necesario profundizar los estudios acerca de la naturaleza de los inhibidores de la germinación que pudieran estar presentes en el endospermo de *B. major* y *D. orthacanthos*.
2. El protocolo de micropropagación desarrollado contribuirá al establecimiento de plantaciones experimentales de ambas especies, lo que permitirá un manejo adecuado para la explotación de este recurso, sin poner en riesgo las poblaciones silvestres. Aunque aún falta por optimizar algunas fases de este proceso como son el enraizamiento y la aclimatización para incrementar el porcentaje de supervivencia en campo, se tienen las bases suficientes para su propagación *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Aziah M. Y.** (1992). Tissue culture of rattans. In: A guide to the cultivation of rattan. Malayan forest record No. 35. W. Razali W. Mohd, J. Dransfield, N. Manokaran (eds.). Forest Research Institute Malaysia. Kepong, Kuala, Lumpur, Malaysia. Pp. 149-161
2. **Aziah M.Y.** (1989). Shoot formation in *Calamus manan* under *in vitro*. Pp. 45-49. In: Rao A.N. and Aziah M.Y. (Eds.). Proceedings of the seminar on tissue culture of forest species. Kuala, Lumpur, 15-18 June, 1987. FRIM and IDRC.
3. **Bewley J. D. and Black M.** (1994) Seeds: physiology of development and germination, 2nd edition. New York: Plenum Press. Pp. 199-269
4. **Bhaskaran, S. and Smith, R.H.** (1992). Somatic embryogenesis from shoot tips and immature inflorescence of *Phoenix dactylifera* cv. Barhee. Plant Cell Reports. 12:25-29
5. **Blake, J.** (1983) Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm. In: Tissue Culture of Trees. J. H. Dodds (ed.). Croom Helm. Pp. 29-50.
6. **Carpenter, W. J. and Ostmark, E. R.** (1993). Embryo cap removal and high-temperature exposure stimulate rapid germination of needle palm seeds. HortScience 28(9): 904-907
7. **Ciancy, K. E. and Sullivan, M. J.** (1988). Some observations on seed germination and polyembryony in the needle palm *Rhapidophyllum hystrix*. Principes 32: 18-25.
8. **Corbineau, F., Poljakoff-Mayber, A., and Come, D.** (1991). Responsiveness to abscisic acid of embryos of dormant oat (*Avena sativa*) seeds. Involvement of ABA-inducible proteins. Physiologia Plantarum. 83, 1-6
9. **Gunawan L. W.** (1991). Rattans (*Calamus* sp). In: Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 16. Trees III (Ed. by Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp. 211-220
10. **Holmqvist, J. de Dios and Popeone, J.** (1967). The effect of scarification on the germination of seed of *Acrocomia crispera* and *Arenga engleri*. Principes 11:23-25.
11. **Hornung R.** (1995). Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. *In vitro* culture. Mars-April 1995. Pp. 38-41
12. **Kermode A. R.** (1995) Regulatory mechanism in the transition from seed development to germination: Interaction between the embryo and seed environment. In: Kigel J., Galili G. (eds.). Seed development and germination. New York: Marcel Dekker, pp. 273-332.
13. **Kundu, M. and Sett, R.** (1999) Regeneration through organogenesis in rattan. Plant Cell Tissue and Organ Culture 59:219-222.
14. **Nagao, M. A., Kanegawa, K. and Sakai, W. S.** (1980). Accelerating palm seed germination with gibberellic acid, scarification, and bottom heat. HortScience 15: 200-201.
15. **Odetola, J. A.** (1987). Studies on seed dormancy, viability and germination in ornamental palms. Principes 31: 24-30.
16. **Ong, H. T.** (1975). Callus formation from roots of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Proceedings of the National Plant Tissue Culture Symposium. Kuala Lumpur Pp. 25-31.

17. Pritchard, H. W. and Davies, R. I. (1998). Biodiversity and conservation of rattan seeds. International consultation on rattan cultivation: achievements, problems and prospects. En prensa. Pp 16.
18. Ren C. and Kermodé A. R. (1999) Analyses to determine the role of the megagametophyte and other seed tissues in dormancy maintenance of yellow cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*) seeds: morphological, cellular and physiological changes following moist chilling and during germination. Journal of Experimental Botany. Vol. 50 No. 337, pp. 1403-1419.
19. Rock C. D. and Quatrano R. S. (1995) The role of hormones during seed development. In: Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Peter J. Davies (Ed). Kluwer Academic Publishers. Pp.671-697
20. Samyn, G. (1997). Micropropagation of *Beaucarnea recurvata* Lem. Syn. *Nolina recurvata* (Lem) Hemsl. (Ponytail Palm). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 40. High-Tech and Micropropagation VI (Ed. By Y. P. S. Bajaj) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Pp. 264-275
21. Samyn, G. L. (1993). *In vitro* propagation of ponytail palm: producing multiple-shoot plants. HortScience 28 (3): 225
22. Stabell E., Upadhyaya M. M. and Ellis B. E. (1996) Development of seed coat-imposed dormancy during seed maturation in *Cynoglossum officinale*. Physiologia Plantarum. 97, 28-34.
23. Teixeira J. B., Sondahl M. R., and Kirby E. G. (1993). Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. Plant Cell Tissue & Organ Culture. 34:227-233
24. Teixeira J. B., Sondahl M. R., Nakamura T. and Kirby E. G. (1995). Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. Plant Cell Tissue & Organ Culture. 40:105-111
25. Tisserat, B. (1984a). Clonal propagation: Palms. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Indra K. Vasil (ed.). Academic Press. Vol. 1. Pp. 74-81
26. Tisserat, B. (1984b). Propagation of date palm by shoot tip cultures. HortScience 19 (2): 230-231
27. Veramendi J., Navarro F. L. (1996). Influence of physical conditions of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis palms. Plant Cell Tissue & Organ Culture. 45:159-164.
28. Walker-Simmons M. K. (1987) ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. Plant Physiology. 72, 146-150.
29. Xu, N., Coulter, K. M. and Bewley, J. D. (1990). Abscisic acid and osmoticum prevent germination of developing alfalfa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. Planta 182: 382-390

ANEXO

FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

COMPONENTES INORGÁNICOS (mgL⁻¹)

Sales minerales.

COMPUESTO	MS ⁽¹⁾	Y3 ⁽²⁾	LS ⁽³⁾
NH ₄ NO ₃	1650		1650
NH ₄ Cl		535	
KNO ₃	1900	2020	1900
KCl		1492	
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	294	440
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	247	370
KH ₂ PO ₄	170		170
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O		312	
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8	13.9	27.8
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3	11.2	22.3
ZnSO ₄ 4H ₂ O	8.6		
ZnSO ₄ 7H ₂ O		7.2	8.6
H ₃ BO ₃	6.3	3.1	6.2
KI	0.83	8.3	0.83
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.24	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	0.25	0.025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.24	0.025

COMPONENTES ORGÁNICOS (mgL⁻¹)

COMPUESTO	MS ⁽¹⁾	Y3 ⁽²⁾	LS ⁽³⁾
Myo-inositol	100	100	100
Ac. Nicotínico	0.5	0.05	
Piridoxina-HCl	0.5	0.05	
Tiamina-HCl	0.1	0.5	0.4
Glicina	2.0		
Ca-O-Pantotenato		0.05	
Biotina		0.05	

Sacarosa (p/v)	3%	4.5%	3%
PH	5.8	5.8	5.8

(1) Murashige & Skoog, 1962

(2) Euwens, 1978

(3) Linemater & Skoog, 1965.