

207  
lej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

## ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO IN VITRO EN PALMAS MEXICANAS EN PELIGRO DE EXTINCION

**T E S I S**  
 QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
 P R E S E N T A  
 Ma. **LUCIA INES VARGAS LUNA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

I	Introducción .....	1
I 1	Extinción de especies .....	1
I 2	Características de la familia Palmae .....	6
I 3	Cultivo <u>in vitro</u> de tejidos vegetales .....	9
I 4	Causas de la oxidación .....	15
II	Objetivos .....	17
III 1	Materiales y Métodos .....	18
III 1 a	Material biológico .....	18
III 1 b	Material de laboratorio (equipo e instrumental) .....	19
2	Métodos .....	20
III 2 a	Pruebas de oxidación ( <u>Chamaedorea humilis</u> ) .....	20
III 2 b	Pruebas de contaminación ( <u>Chamaedorea tepejilote</u> y <u>Gaussia gomez-pompa</u> ) .....	22
III 2 c	Pruebas de oxidación ( <u>Gaussia gomez-pompa</u> ) .....	23
III 2 d	Pruebas con reguladores de crecimiento en inflorescencias ( <u>Ch. tepejilote</u> ) .....	25
IV	Resultados y Discusión .....	26
IV 1	Pruebas de oxidación ( <u>Chamaedorea humilis</u> ) .....	26
IV 2	Pruebas de contaminación ( <u>Ch. tepejilote</u> y <u>G. gomez-pompa</u> ) .....	33
IV 3	Pruebas de oxidación ( <u>G. gomez-pompa</u> ) .....	37
IV 4	Pruebas con reguladores de crecimiento ( <u>G. gomez-pompa</u> ) .....	41
IV 5	Pruebas con reguladores de crecimiento en inflorescencias ( <u>Ch. tepejilote</u> ) .....	44
V	Conclusiones y perspectivas .....	47
VI	Apéndice I (medio de cultivo MS) .....	48
	Apéndice II (medio de cultivo MS modificado) .....	49
	Apéndice III (medio de cultivo Vacin y Went modificado) .....	50
VII	Bibliografía .....	51

## ABREVIATURAS

AIA	ácido indol acético
ANA	ácido naftalenacético
BAP	6 Bencil aminopurina
2,4-D	2,4-Diclorofenoxiacético
K	cinetina
BA	Bencil adenina
NaOH	hidróxido de sodio
NaClO	hipoclorito de sodio
MS	medio de cultivo Murashige y Skoog
MS mod.	medio MS modificado
PAL	fenilalanina amonio liosa
HCl	ácido clorhídrico
GA <sub>3</sub>	ácido giberélico

## INTRODUCCION

Establecimiento del cultivo in vitro en palmas mexicanas en peligro de extinción.

## EXTINCION DE ESPECIES

Las angiospermas son las plantas más comunes en la tierra con habitats ampliamente diversificados y especializados que representan -- una riqueza y potencial biótico importante; muchas de ellas son silvestres y sus características aún son desconocidas. Actualmente muchas especies de plantas se han extinguido; o muchas de ellas están en peligro de desaparecer debido entre otras causas al mal uso y manejo irracional del recurso natural renovable y a la falta de una legislación adecuada y planificación del uso del suelo (Vázquez, 1979).

La destrucción del habitat de las especies no es un hecho aislado y reciente, donde el hombre desde su aparición ha jugado un papel muy importante, como se puede observar por ejemplo en la profunda alteración de los ecosistemas naturales en Asia Menor, Norte de Africa, al igual que en otras regiones que se han modificado para destinarlas a la agricultura, la industria, o a las ciudades en su continua expansión (Hagsater, 1976).

A nivel mundial desaparecen al año aproximadamente 7.5 millones de hectáreas (el 0.62% del total) de los bosques densos y 3.8 millones de hectáreas (0.52%) de las masas arbóreas. Por lo tanto, cada año desaparecen en total 11.3 millones de hectáreas de masas arbóreas (FAO, 1983).

Se estima que más de 20 hectáreas de bosque tropical se pierde cada minuto (Raven, 1976 en Simmons, 1976).

De seguir la tendencia actual a nivel mundial aproximadamente 60 000 especies vegetales se habrán extinguido al llegar al año 2050. (Myers (1976); citado por Hagsater, 1976), señala que se pierde una especie por día y que al final del siglo la diversidad natural puede ser reducida aún más al aumentar la proporción de extinción a 100 especies por día.

La situación de América tropical y en particular de nuestro país no es muy distinta, aunque ha sido más lenta; sólo una pequeña parte del habitat se había alterado en tiempos precolombinos, se destruyeron los bosques de encino que cubrían la mayoría de las montañas del altiplano mexicano, especialmente en los estados de Hidalgo, Zacatecas y Guanajuato, a pesar de ello muchas regiones permanecieron vírgenes; sólo hasta comienzos del siglo XX a raíz de la explosión demográfica se ha causado la mayor destrucción de grandes áreas boscosas y selváticas (Hagsater, 1976).

Un ejemplo de la destrucción de áreas naturales en la ciudad de México es el pedregal de San Angel, el cual tenía una extensión y vegetación iniciales de 80 km<sup>2</sup>. Esta zona se formó hace aproximadamente 2500 años por la erupción de el Xitle, presentando un sustrato heterogéneo, con una gran cantidad de accidentes topográficos como cuevas, hondonadas y promontorios rocosos. Esta topografía permite la presencia de diversos macro y microambientes los cuales han sido sitios ideales para el establecimiento de una gran cantidad de especies vegetales y animales con diferentes requerimientos ambientales. De esos 80 km<sup>2</sup>, Rzendowski en 1954 denominó Senecionetum praecosis a la porción baja del pedregal que ocupaba 40.45 km<sup>2</sup>, con 319 especies de "palo loco". En un lapso de 30 años a partir de la década de los 50 desapareció el 90% de la superficie correspondiente a la comunidad de Senecio praecox y partes significativas de las comunidades de zonas altas. En un principio esta comunidad cubría la mitad de la superficie total del derrame del Xitle pero hoy apenas sobrevive el 5% aproximadamente 1.5 km<sup>2</sup>. Se estima que la reducción del 90% faltante conllevó a la pérdida de unas 150 especies de ésta área.

Pero en 1983 y debido al avance urbano de ésta área sólo quedaban 2.9 km<sup>2</sup> de los cuales en ese mismo año la UNAM decretó 1.245 km<sup>2</sup> como reserva ecológica (Gaceta UNAM 30 sept. 1983); (Alvarez F.J. et al 1982; citado por Carabias L. H. y Meane del C., 1987).

En nuestro país ha desaparecido el 90% de las selvas tropicales (Lot y Toledo, 1980). Actualmente las tierras son utilizadas para la agricultura de modo erróneo y costoso para la humanidad, (FAO, 1983).

Aunado a la extinción de especies, poca atención se ha puesto al problema de la especialización agrícola en términos de cultígenos que actualmente se utilizan. La mayor parte de la producción agrícola -- mundial se basa en el cultivo de alrededor de 100 especies comesti--- bles. No obstante se sabe o se presume la existencia de varios miles de especies potencialmente comestibles presentes en todo el mundo. Algunos autores suponen que incluso el número llega a las 80,000 espe--- cies (Sarukhán, et al, 1983).

En México este hecho resulta paradójico en virtud de su riqueza biológica y su enorme herencia histórica. Debe tenerse presente que el territorio mexicano con sus más de 20,000 especies de plantas vas--- culares, es una de las áreas de mayor riqueza florística del mundo. En la actualidad alrededor de 600 son usadas en la alimentación pero sólo regionalmente. En general se estima que el número de especies - de plantas útiles de la flora mexicana es de unas 5000; aproximada--- mente una cuarta parte del total de plantas vasculares presente en -- México (Sarukhán, loc, cit.).

No obstante la importancia de las plantas en el sostén de la vi da en la tierra, son pocas las que se conocen y un número mucho ma--- yor las que se desconocen y no se usan pero que sustentan el equili--- brio de los ecosistemas.

Esta riqueza se encuentra amenazada, la extinción de una especie sea planta o animal, es una pérdida irreparable, lo que se traduce en una opción menos para el hombre (Vovides, 1981) y una pérdida que al--- tera las cadenas y tramas alimenticias.

Las especies al extinguirse ejercen un efecto significativo so--- bre los habitats que en otro tiempo ocuparon, Raven (1976) estima que una planta al desaparecer puede arrastrar consigo de 10 a 30 especies dependientes tales como insectos, animales superiores y otras plantas (Wochok, 1981).

Las actividades del hombre están ocasionando ahora el exterminio de una cuarta parte del total de plantas en la tierra y de continuar esto así terminarán por desaparecer en las próximas décadas. Es posi--- ble que con la pérdida de algunas especies vegetales también se anule la posibilidad de poder elaborar productos para la cura de enfermeda---

des y el desarrollo de nuevas y mejores fuentes alimenticias y de -- otros productos que se necesitan obtener a partir de fuentes vegetales naturales (Raven, 1976).

La perspectiva para el desarrollo de la región tropical es desoladora debido a la presente tendencia irreversible de la duplicación, en los próximos 20 años de la población humana, que por otro lado es pera la producción de alimentos suficientes para cubrir sus necesida des básicas (Fisher, 1980).

En países subdesarrollados en general tienen necesidad de obtener divisas para pagar diversos productos industriales, ésto acelera la utilización de su único recurso explotable que son los bosques, - más aún el aumento del costo de productos derivados del petróleo oca siona la necesidad de utilizar leña o carbón vegetal como combusti-- ble para cocinar o calentar, lleva a una gran destrucción de los bos ques cercanos a las poblaciones que requieren dicho producto.

La tala de bosques o desmonte para posteriormente realizar agri cultura es muy común; ésto sucede por falta de información ya que -- desconocen que el bosque tropical es muy fértil mientras mantiene la comunidad biótica, luego que se tala pierde rápidamente su riqueza y no puede mantener por mucho tiempo las cosechas, además de razones - de origen socio-económico (Fischer loc, cit.).

Otros problemas que se presentan son el pastoreo y la sobreco-- lecta. La gente nativa del lugar colecta plantas para venderlas en el pueblo o ciudades cercanas y así poder sobrevivir económicamente; además personas de las mismas ciudades van a la selva y colectan sin moderación ni escrúpulos para el mismo propósito y en gran escala -- las sacan muchas veces ilegalmente del país dañando severamente los ecosistemas. Por ésta razón todos los esfuerzos y estudios tendien-- tes a eliminar y corregir ésta situación tienen un gran valor intrín seco.

Plantas amenazadas o en peligro de extinción de especies mexica nas informa Vovides y Gomez-Pompae en 1977.

Entre los diversos grupos de plantas útiles y en mayor peligro están las palmas:

Las palmas son importantes por diferentes características dentro de las que se citan:

- Como indicadoras de suelo
- Relaciónens palma-insecto
- Evolutivamente
- Por sus usos
- Las palmas frecuentemente sirven como indicadoras de tipos de -- suelo, patrones de drenaje o tipos de vegetación (Eiten, 1974, Pérez, 1974; citados por Moore, 1978).

Los frutos de muchas palmas son carnosas y coloreadas de rojo o naranja y sirven como una adaptación que facilita su dispersión por animales (Corner, 1966 y Vauder Pijl, 1969).

- Debido a que los restos fósiles encontrados están muy deteriorados, no ha sido posible establecer a satisfacción la evolución - de las especies actuales (Moore, 1978).
- Desde un punto de vista evolutivo se conoce que la palma Nypa es uno de los fósiles más primitivos ya identificados (Muller, 1970, citado por Moore, 1978), que data del cretácico superior.
- El hombre ha utilizado las palmas en una gran variedad de formas, como material para construcción de viviendas, para fabricación - de muebles, sombreros, canastas, juguetes entre otras cosas, ade más como fuente de alimento y bebidas, también colectadas y vendidas como plantas de ornato (Vosters, 1975; Vazquez, 1979; Reynolds, 1982), así como combustible, mitos y religión.

En el país conforman también un grupo en serio peligro de extinción. De acuerdo con Vovides, 1981 existían 4 especies extintas, 5 vulnerables y 2 raras, haciendo un total de 11 especies en estos dife rentes grados de extinción, además de 4 especies indeterminadas. Pa- ra 1985 International Union for Conservation of Nature (IUCN, 1985) cita un total de 52 especies amenazadas por los diversos factores que ya han sido mencionados.

## CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA PALMAE

Las palmas corresponden al grupo de monocotiledoneas de la familia Palmae y Aracaceae, elementos de muchas asociaciones vegetales, se les encuentra en una gran diversidad de ecosistemas tales como -- oasis zonas costeras, sabanas, bosques, pantanos, tierras bajas y -- bosques de montaña.

El tallo de las palmas es perenne y generalmente tiene una apariencia leñosa, con entrenudos poco o muy distanciados; puede ser columnar, rastrero, postrado o trepador va desde 10 cm. a 100 metros - de largo, delgado o muy grueso, solitario o agrupado, su superficie puede ser lisa o rugosa por la presencia de fibras o espinas presenta sólo un punto de crecimiento (Moore, 1973; citado por Sandoval, 1985).

Las hojas son alternas, compuestas de lámina, ráquis y peciolo, con una vaina envolvente que puede o no ser perenne. El tamaño de la lámina va desde unos pocos cm. hasta más de 20 metros, pueden ser palmadas, costapalmadas o pinnadas, con su lámina parcial o completamente dividida. Los segmentos o pinnas son induplicados o reduplicados según la posición de la costilla central en el punto de inserción sobre el ráquis. Generalmente presentan una costilla central - junto con numerosas venas secundarias que corren paralelas al eje -- longitudinal de la pinna. La forma de la pinna es muy variada y al igual que el ráquis y el peciolo puede o no estar armada con espinas (Moore, loc. cit.).

Las palmas son hermafroditas, polígamas, monoicas o dioicas son una o varias inflorescencias protegidas dentro de una o más brácteas cuando están muy ramificadas incluyen pedúnculo, ráquis, raquillas y numerosas brácteas; cuando son simples además del pedúnculo, presentan alguna bráctea. Su posición puede ser interfoliar, infrafoliar o suprafoliar, las palmas son monocárpicas o policárpicas, dependiendo del número de veces que florecen en su vida.

Las flores son principalmente unisexuales, similares o dimórficas; sésiles e individuales, agrupadas o con arreglos especializados. Perianto formado por sépalos y pétalos, raramente uniseriados; sépalos y pétalos, de 2 a 3 límbos, imbricados o connatos. Androceo con

6 o más estambres, filamentos connatos o adnatos a los pétalos, anteras basifijas o dorsifijas, rectas o raramente torcidas, estaminodios presentes o ausentes en flores pistiladas pudiendo ser desde dentiformes a subulados y estar parcial o totalmente fusionados entre sí; Gineceo apocarpico con 1 ó 3 carpelos o sincárpico con 3 ó más lóculos o pseudomonómero con 2 lóculos abortivos y uno fértil. Carpelos glabros o cubiertos con pelos o escamas; estilos libres o fusionados, estigmas rectos o recurvados. Ovulos anátropos, hemianátropos, campilótropos u ortótropos; unidos basal, lateral o apicalmente silitarios en cada lóculo. Pistilodio presente o ausente en flores estaminadas y de tamaño muy variado (Moore, loc. cit.).

Frutos generalmente con una sola semilla, pero a veces más de 3, su tamaño va desde muy pequeñas 0.5 cm. hasta de unos 30 cms. de diámetro, residuo estigmático basal, apical o lateral; epicarpio liso, cubierto con pelos, fibras o escamas; mesocarpio carnoso, fibroso o seco; endocarpio poco diferenciado.

Semilla adherente a las capas del fruto, o libre o con una testa lisa o en ocasiones carnosa; endospermo homogéneo o ruminado embrión apical, lateral o basal; germinación remota, tubular, ligular o adyacente ligular (Moore Loc. cit.).

En México existen 21 géneros de palmas originarias de diversas partes del continente Americano (Quero, 1985), con aproximadamente 100 especies que prosperan en su mayoría en zonas de clima cálido y húmedo a semihúmedo, tanto en la vertiente del Pacífico como en el Golfo y también en el Caribe (Quero, comunicación personal; citado por Sandoval, 1985).

Aunque existen pocos estudios enfocados o ecofisiología de palmas se sabe que son especies con poca capacidad de adaptación a hábitats perturbados, que requieren de condiciones precisas para la germinación y el establecimiento de sus plántulas considerando además que cuando es dañado o cortado la planta muere; y si a esto agregamos enfermedades, incendios e inundaciones tenemos otras causas que intervienen en la extinción de sus especies.

Algunas alternativas para la preservación de especies amenazadas o en peligro de extinción es propagarlas por métodos tradiciona-

les los que sin embargo se ven afectados por la escacés del número de semillas, viabilidad, períodos prolongados de latencia en algunas especies y la poca cantidad de individuos que son factibles de cultivarse.

## CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES

Hence, citado por Wochok, (1981) indica que toda la tecnología disponible a la propagación de las plantas debería ser aplicada para ayudar a restaurar esos recursos y de ésta manera determinar métodos dignos de confianza para restablecer los habitats alterados previamente ocupados por comunidades vegetales (Wochok, 1981).

El uso de las distintas técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) con especies nativas es una alternativa en aquellas especies amenazadas y donde las semillas son escasas con poca viabilidad, dificultad para su almacenamiento (recalcitrantes) y el mismo material vegetativo es poco disponible, además de que presentan un solo meristemo apical y el crecimiento de la planta sea muy lento como es el caso de las palmas, el método de CTV adquiere un gran valor como técnica de propagación vegetal.

El CTV está basado en la teoría sobre la totipotencialidad celular, que permite regenerar plantas en corto tiempo, prácticamente a partir de cualquier estructura vegetal (explante), (flores, granos de polen, tallos, raíces, hojas, etc.), que se cultive bajo condiciones asépticas, nutricionales y ambientales adecuadas, éstos es medios nutritivos específicos, pH, luz, temperatura, atmósfera, etc., y de ésta manera permitiendo al investigador variar condiciones de cultivo y/o tipo de explante para llegar a dirigir la respuesta morfogénica y biosintética de las células logrando una propagación masiva de plantas que posteriormente se les destinarán objetivos tanto en la investigación básica como aplicada (Gautheret, 1982).

En los países con tecnología avanzada el CTV ha tenido un gran impacto en la industria, agricultura, fitosanitarias, fitomejoradoras, etc., como consecuencia de esto contribuyendo a solventar problemas alimenticios y económicos.

El primer intento que se hizo en los estudios de cultivo de tejidos en palma de coco fué en 1950, los avances de la regeneración in vitro ha sido observada en pocos años, las palmas con mayor impacto económico y por lo tanto más trabajadas son Elaeis guinensis Jacq. (palma de coco), Cocos nucifera L. (palma de coco), Phoenix dactylifera L. (palma datilera). Las palmas ornamentales tienen un desarrollo

relativamente lento y por consecuencia requiere de más tiempo y esfuerzo en su producción (Reynolds, 1982).

Se han hecho estudios de Cultivo de Tejidos en embriogenesis asexual en callos de embriones maduros de palmas (Acrocomia aculeata y Elaeís oleífera por Teixeira, J. B. et al., 1986, así como en Cycadas gimospermas del mesozoico consideradas en extinción en técnicas para iniciación de callo por Osborne, R. 1986.

En el CTV existen 3 pasos básicos (Murashige, 1978).

- 1.- El establecimiento en el medio de cultivo para la especie estudiada o estado 1.
- 2.- La respuesta morfogenética in vitro.
- 3.- El enraizamiento y cultivo de éstas plantas in vivo.

El estado 1 se refiere al establecimiento de los cultivos libres de contaminación, porque de presentarse ésta, los tejidos serían destruidos.

Por ello es requisito previo a la siembra de los explantes la esterilización superficial que destruye organismos saprófitos y esporas, pero no elimina las infecciones dentro del tejido (George y Sherrington, 1984).

Cuando ya se ha controlado la contaminación de los explantes es posible que otro problema se presente como el de la oxidación y muerte de los tejidos el cual se ha visto es frecuente en las palmas .

La oxidación inhibe el crecimiento celular, esto es más severo en especies que contienen en forma natural grandes niveles de taninos u otros hidroxifenoles (George loc. cit.).

La Tabla A muestra estudios de CTV que se han efectuado en las diferentes especies de palmas. Es notorio que las especies trabajadas básicamente son las de interés económico, los explantes que se han utilizado son de hoja, embriones, endospermo, semilla, fragmentos de ápices, meristemas en poca medida y el medio más utilizado es el MS (Murashige y Skoog, 1962), las respuestas en la mayoría de los casos ha sido la regeneración de plántulas, lográndose establecer los sistemas de regeneración in vitro.

Resulta notorio que con la excepción de algunos trabajos como George y Sherrington, 1984; Reynolds y Murashige, 1979; tisserat B., 1984. entre otros, no se hace mención de los problemas de oxidación

siendo este problema muy frecuente y muy severo.

Hasta ahora no se han trabajado especies en peligro de extinción a los cuales está dedicado este trabajo.

ESPECIE	EXPLANTE	CONDICIONES DE CULTIVO	CONTROL DE OXIDACION	RESPUESTA	REFERENCIA
<u>Archontophoenix alexandrae</u> . Huell <u>Ptychosperma macarthurii</u>	Aceleración de germinación	Acido giberélico 1000 p.p. m. escarificación y calor 26-27°C remojo		germinación a 6 semanas	Nagao A.M et. al., 1980
<u>Bactris gasipaes</u> H B K (Pejibaye)	semillas ápices embriones inmaduros embriones maduros ápices meristemáticos ápices de raíz	Murashige y Skoog (MS) con reguladores de crecimiento de oscuridad a luz pH 7, temp. 22° ± 2°C		Embriogénesis somática, plántulas completas, callos : 2 y 4 meses, crecimiento del meristemo apical	Arias M.O.Y. Huete V.F. (1983)
<u>Cocos nucifera</u> L.	embriones callos	MS suplementado con agua de coco + reguladores de crecimiento pH 6.5-7.0, 20°-26°C.	Carbón activado 2.5 ó 3,6 g/L	crecimiento de embriones antes de 10 semanas callo-NO respuesta	Fisher J. B. y Tsai H.J., 1978
	endosperma (celular) líquido o sólido	Medio basal + reguladores de crecimiento, pH 6 28° ± 2°C oscuridad, subcultivos en 8-10 semanas	carbón activado	callo	Kumar, et al, 1985
	embriones	Medio de Saunders y Burkholder + agua de coco inmaduro, en oscuridad	ácido ascórbico 10 µg m/1	desarrollo de embriones de 12-19 semanas	Cutter Jr. M.V y Wilson S.K., 1954
	endospermo	Medio basal Eeuwens' y 3 + reguladores de crec., pH 6 a 28° ± 2°C en oscuridad	carbón activado 0.1 %	callo subcultivado	Kumar P.P. et al, 1985
	tejido de hoja	Medio Eeuwens modificado + reguladores de crecimiento a 27°C.	carbón activado	callo	Pannetier, C. y Buffard H.J., 1982
	hojas jóvenes inflorescencias raquis	Medio según la formula Eeuwens, 1976 + hormonas - de crecimiento		raíces	Eeuwens C.J., 1978

ESPECIE	EXPLANTE	CONDICIONES DE CULTIVO	CONTROL DE OXIDACION	RESPUESTA	REFERENCIA
<u>Elaeis guinensis</u> Jacq. (Oil palm)	semillas	MS + reguladores de crecimiento, remojo en agua y temp. 27°C.		50% de germinación	Rees A.R., 1963
	semillas	MS, previa esterilización en agua x 15,30 y 60 días		días % de germinación 15 90 % 30 82 % 60 6.84%	Nwankwo B.A. y Krikorian D. A., 1983
	embriones, hoja y raíz de plántulas pequeñas	MS suplementado con inositol + reguladores de crecimiento y subcultivos	carbón activado .5 g/l x caseína hidrolizada .5 g/l	callos antes de 60 días	Nwankwo B.A. y Krikorian, 1986
	semillas	almacenadas en agua destilada esteril x 6 meses a 30° ± 1°C en oscuridad		germinación 20-30%	Nwankwo B.A. y Krikorian A.D., 1982
	bases de peciolo fragmentos de ápices	MS modificado + reguladores de crecimiento, 12000 lux a 27° ± 0.5 y subcultivo de oscuridad a luz		callos y plántulas	Rebechault, et al. 1972
	hoja, secciones de embriones	MS + reguladores de crecimiento H 4.5 + 10,000 lux		embriones plántulas	Rabechault H. J. y Jean-Pierre H., 1976
	hojas jóvenes de 1 a 2 cm	MS modificado + reguladores de crecimiento, a 27°C	carbón activado	callos antes de 60 días, subcultivo x 6 meses de embrioides a plántulas	Hanower J. y Pannetier C., 1982
	semillas	MS Líquido + reguladores de crecimiento	carbón activado	plántulas	Paranjothy K. y Othonan R., 1982
	semillas embriones hojas jóvenes	MS + reguladores de crecimiento	carbón activo 3 g/l	callo o plántulas	Paranjothy K., 1984
	<u>Phoenix dactilifera</u> L.	merístemos apicales	MS + reguladores de crecimiento	carbón activado	plántulas robustas antes de 6 meses

ESPECIE	EXPLANTE	CONDICIONES DE CULTIVO	CONTROL DE OXIDACION	RESPUESTA	REFERENCIA
	meristemas de yemas laterales de la base del tallo	MS Modificado + reguladores de crecimiento	carbón activado 0.8 g/l	callo de nodo inducción de embriogénesis somática y germinación	Tisserat, B., 1983
	embriones excisados	MS + reguladores de crecimiento pH 5.7 a 27°C, 1000 lux	carbón activado 3 g/l	callo recultivado de -- plántulas a los 10 semanas	Reynolds, F. J. y Murashige T., 1979
<u>Palmas ornamentales</u>	semillas	sales del MS + 100 mg/l inositol 0.4 mg/l tiamina HCl, 3 mg/l de adenina + 100 mg/l 2,4-D 0.8 % tita <u>gar</u>	carbón activado 1 g/l	8 semanas eventualmente produce callo modular blanco	Wagner R. I., 1982
	cultivo de embriones	Vacin y Went modificado a 29°C + reguladores de cre <u>cimiento</u>	carbón activado	vástagos y raíces	Hodel, 1977

## CAUSAS DE LA OXIDACION

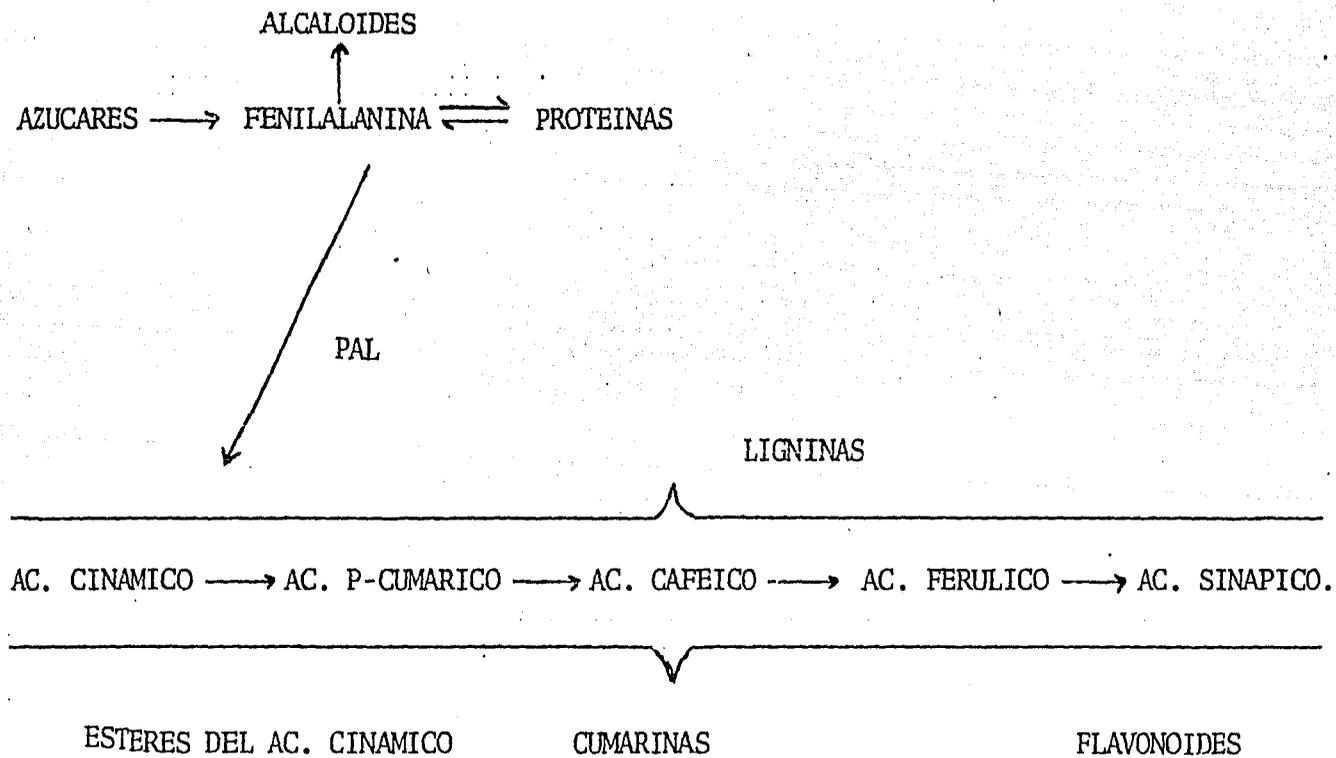
La hipersensibilidad es una reacción típica de las plantas sujetas o situaciones de estrés, una de las mejor conocidas bajo condiciones de cultivo de tejidos es la oxidación del tejido y/o el medio --- (Debergh, 1986).

Los tejidos se tornan cafés o negros y posteriormente mueren por la acción de enzimas como fenilalanina amonio liasa, peroxidasa y fenolasas (Debergh, 1986; Lerch, 1981). Estas son liberadas y/o sintetizadas cuando los tejidos son cortados y expuestos al medio ambiente, por temperaturas apropiadas, condiciones de luz o bajo contenido de elementos minerales determinados (Debergh, 1986). Los substratos para éstas enzimas varían en diferentes tejidos, siendo comúnmente tirosina u o-hidroxifenoles como el ácido clorogénico. Las enzimas y --- substrato se encuentran siempre en las células dentro de diferentes compartimentos y se ponen en contacto cuando son dañadas o el tejido es muy viejo (George y Sherrington, 1984). Con la excepción de las involucradas en la formación de lignina donde es un proceso normal favorable para los tejidos de resistencia (Thorpe, 1978).

La enzima fenilalanina amonioliase (PAL) se ha encontrado en la mayoría de las plantas verdes excepto briofitas, se encuentran especialmente en domo tepetal (del meristemo apical), anteras, cambium y tejidos adyacentes, en general en tejidos jóvenes, a nivel celular en plastidios, mitocondria y microestructuras (Albert, et al., 1977; McClure, 1979; Ranjeva et al. 1979; citados por Hanson y Havir, 1981), en el endospermo (peroxisomas y glioxisomas), en germinación, tejidos en dormancia o latencia. Hay evidencias de que ciertos compuestos fenólicos incluyendo los flavonoides son sintetizados en cloroplastos por lo tanto PAL tiene que ser localizada en estos organelos (Camm y Towers, 1977).

El número de compuestos fenólicos naturales que se conocen es de o excede los 3,000 y PAL ocupa el lugar central en la biosíntesis de éstos compuestos por Thorne (1978). En el siguiente esquema se explicá algunos trabajos fisiológicos de PAL. Según Camm y Towers, (1977).

Modelo para aclarar algunos trabajos fisiológicos del PAL según Camm y Towers, 1977.



## OBJETIVOS

En vista de los antecedentes señalados, se diseñó el presente -- trabajo para lograr el establecimiento de cultivos in vitro de palmas mexicanas en peligro de extinción.

El logro de la instalación del estado I es el primer requisito - para el éxito de los cultivos in vitro, en este estado y particularmen -- te en palmas silvestres la oxidación de los tejidos que provoca la -- muerte y cancelación de toda expresión morfogenética debe ser controla da.

Las palmas mexicanas elegidas son:

- Chamaedorea humilis Linn. indeterminada
- Chamaedorea tepejilote Liemb. sobre colecta
- Ganssia gomez-pompae Quero. vulnerable

De las cuales se analizaron varios explantes tratando de estable- cer el estado I de los cultivos in vitro.

## MATERIAL

Material biológico

Plántulas (aproximadamente de 6 meses de edad), colectadas en tuxtepec Oaxaca y Yucatán y mantenidas en el invernadero del Jardín Botánico de la UNAM.

Chamaedorea humilis - hojas (inmaduras de 8 días de expandidas).

Chamaedorea tepejilote - hojas (inmaduras de 8 días de expandidas) e inflorescencias inmaduras (verdes).

Gaussia gomez-pompa - hojas (inmaduras de 8 días de expandidas).

Material de laboratorio

## Reactivos

AIA - ácido indolacético

ANA - ácido naftalenacético

2,4-D - 2,4-Diclorofenoxiacético

BAP - 6 Bencil aminopurina

K - Cinetina

BA - Bencil adenina

GA<sub>3</sub> - ácido giberélico

agar bacteriológico DIFCO

HCl - ácido clorhídrico a 0.1 y 0.5 U

NaOH - hidróxido de sodio a 0.1 y 0.5 U

NaClO - hipoclorito de sodio al 6% de cloro activo

alcohol etílico a 96°

agua destilada estéril

L-cisteína

ácido ascórbico

ácido cítrico

medio basal (anotado con detalle en los apendices I, II y III)

carbón activado

Equipo e instrumental de laboratorio

Balanza analítica

potenciómetro digital (cornig)

campanas de flujo laminar

cámara de cultivo para control de fotoperiodo

autoclave

frascos de vidrio de boca ancha

vasos de precipitados (diferentes capacidades)

matraces exlemmeyer (diferentes capacidades)

matraces aforados

frascos de reactivos blancos y color ámbar

frascos goteros

papel filtro

cajas petri

pipetas (diferentes medidas)

bisturís

parrilla de agitación magnética

## MÉTODOS

Para este trabajo se seleccionaron 2 géneros que pertenecen a la familia Palmae: *Chamaedorea* del cual se trabajaron 2 especies *Chamaedorea humilis* Linn y *Chamaedorea tepejilote* Liemb. y del género *Gaussia*, se seleccionó a *Gaussia gomez-pompae*. Quero

El criterio aplicado para la selección de este material fué: el control con material biológico suficiente en nuestro Jardín Botánico ya que éstas pruebas necesitan de mucho material, además de ser especies vulnerables e indeterminadas (Vovides, 1981; IUCN, 1985), sobrecolecta de *Ch. tepejilote* (Zandobal, comunicación personal). *Gaussia gomez-pompae* y *Chamaedorea tepejilote* presentaban respuestas antagónicas a los tratamientos previamente efectuados en nuestro laboratorio (Loyola, comunicación personal).

El material biológico fué obtenido de colectas realizadas en Yucatán y Oaxaca y posteriormente mantenidas en el invernadero del Jardín Botánico de la UNAM.

Debido a que cada especie presentó una problemática particular - en lo que se refiere a las diferentes necesidades se decidió manejarlas por separado.

### Pruebas de oxidación

#### *Chamaedorea humilis*

##### Material biológico

Para los ensayos se tomaron hojas jóvenes de aproximadamente 8 - días de expandidas de plántulas de aproximadamente 6 meses de edad.

##### Condiciones de asepsia

Las hojas fueron lavadas, frotándolas con agua y jabón líquido, cortadas en segmentos de más o menos 2 cm<sup>2</sup> y llevadas a partir de ese momento a condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar que se había puesto a funcionar 30 minutos antes de iniciar cualquier actividad.

Toda su superficie fué esterilizada con alcohol etílico al 96%, así como el instrumental, vasos de precipitados, frascos para siembra,

etc., al igual que las manos y antebrazos, evitando así la presencia de bacterias y hongos. Las secciones de hoja se agitaron en alcohol al 70% durante 1 minuto y enseguida fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.5% de cloro activo, enjuagadas con agua destilada esterilizada por lo menos 3 veces.

#### Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fué el de Murashige y Skoog (1962) (MS) líquido. Para su preparación fueron utilizados soluciones concentradas de los nutrientes (ver apéndice I). Estas se conservaron en frascos de tapón esmerilado a 6°C, de los cuales se tomaron las alicuotas respectivas para llevarlas a la concentración y volumen deseados, el único regulador de crecimiento agregado a los medios de cultivo fué la amina 2,4-D (5µM). Con un pH ajustado a 5.7 con la ayuda de un potenciómetro digital utilizando soluciones de HCl y NaOH a 0.1 y 0.5 N. El medio fué vaciado en frascos de vidrio de boca ancha de 125 ml de capacidad total, con solo 50 ml de medio por frasco, dentro de estas fueron colocados puentes de papel filtro con el propósito de evitar el hundimiento del material biológico, los frascos se sellaron, finalmente se esterilizaron en un autoclave a la presión de 1.4 kg/cm<sup>2</sup> (20Lb/pulg<sup>2</sup>), a temperatura de 126°C, durante 15 minutos.

#### SIEMBRA

Ya desinfectadas las hojas se colocaron en diferentes tratamientos con antioxidantes. Se trabajaron varias concentraciones de L-cisteína y ácido ascórbico, con el objeto de desactivar la enzima PAL (fenilalanina amonio liasa) y así evitar la formación de polifenoles y por lo tanto la oxidación del explante, estos antioxidantes se filtraron a través de membranas millipore con poros de 0.45 µ para evitar su degradación en la autoclave.

Las combinaciones utilizadas fueron 50,100 y 150 mg/l para L-cisteína, ácido ascórbico y ácido cítrico respectivamente (ver tablas Nos. 1, 2, 3, 4, 5 y 6).

Antes de la siembra los explantes se remojaron en las diferentes soluciones antioxidantes durante 5 minutos, 12 y 24 horas a  $4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , de cada combinación se hicieron 10 repeticiones con 2 explantes por cada frasco exponiendo 5 de ellos a 300 lux de intensidad luminosa y 5 en oscuridad total continúa. Con la finalidad de que el explante fuera eliminando las sustancias tóxicas o fenoles se realizaron 4 re-siembras con períodos de 15 días por cada una.

### Pruebas de contaminación

#### Ch. tepejilote y G. gómez-pompae

Los explantes se tomaron de plantas cultivadas en invernadero del Jardín Botánico de la UNAM, utilizando hojas jóvenes que recientemente habían brotado (8 días) y no estaban expandidas en forma total ya que en las pruebas preliminares se comprobó que éstas reaccionaban mejor a los tratamientos.

#### Condiciones de asepsia (pretratamiento)

Las hojas completas fueron lavados con agua y jabón líquido enjuagadas y colocadas en un vaso de precipitados para lavarlas en agua corriente durante una hora, posteriormente colocándolas en agua destilada estéril en la campana de flujo laminar previamente desinfectada dejándolas durante 2 horas, trabajando en condiciones asépticas se pasaron a los diferentes tratamientos de hipoclorito de sodio enjuagándolos al menos 3 veces con agua destilada estéril, los explantes se cortaron con navaja nueva dentro de una caja de petri que contenía agua destilada estéril, posteriormente fueron sembradas.

#### Medio de cultivo

Se utilizó el medio MS modificado de acuerdo a Reynold y Murashige, (1979) sin hormonas con adenina 0.4 g/l, tiamina 0.4 g/l (ver apéndice II), fué preparado como en las indicaciones anteriores adicionando agar (DIFCO) 8 g/l disolviendo por calentamiento y agitado en una parrilla de agitación magnética.

Ya sembrados los explantes y sellados los frascos con tapas de plástico, se colocaron en la cámara de cultivo a  $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  a 300 lux

de intensidad luminosa. Posteriormente los explantes fueron resembrados a medio MS modificado con auxinas (ver ápendice II).

La concentración hormonal utilizada fué 50 mg/l de 2,4-D los explantes de cada uno de los distintos lotes del tratamiento anterior - se sembraron respetando su ubicación original en cada frasco. Los cultivos fueron colocados en una cámara de cultivo en las condiciones señaladas.

### Pruebas de oxidación

#### G. gomez-pompa

Una vez controlado el problema de contaminación (mencionado en las pruebas de contaminación) el objetivo siguiente fué evitar la oxidación en los explantes. El plan de trabajo consideró principalmente aquellos factores o variables que disminuyen el proceso de acción de los fenoles entre otros, responsables de la oxidación. George y Sherrington, 1984).

Hojas jóvenes de 8 días de esta especie colectadas de las plantas del invernadero del Jardín Botánico de la UNAM, se sometieron al mismo pretratamiento que en las especies anteriores.

### Medio de cultivo

MS modificado (ver ápendice II) sin hormonas, pH5, agar (DIFCO) 8 g/l y esterilizado en autoclave.

Se analizaron diferentes factores para poder controlar la oxidación en estos explantes, estas fueron: días de obscuridad, concentraciones de sacarosa (1, 10, 20 y 30 g/l) concentraciones de EDTA (65.1 y 130 .2 mg/l) presencia o ausencia de carbón activado así como una combinación de cantidades adicionales de  $\text{KNO}_3$ . La interacción de todos estos factores se da en la tabla 9 (sin resultados todavía).

TABLA 9 (Sin resultados)

TRATAMIENTOS DE OXIDACION  
GAUSSIA GOMEZ-POMPAE. QUERO

TRATAMIENTOS DE EXPLANTES DE *Gaussia gomez-pompaе*. Quero CULTIVADOS EN MEDIO MS MODIFICADO, pH 5 Y EXPUESTOS A DIFERENTES CONDICIONES. INCUBADOS A 27 ± 2°C.

Cultivos 14/04/21 osc.	1						10						20						30											
	EDTA <sub>1</sub>			EDTA <sub>2</sub>			EDTA <sub>1</sub>			EDTA <sub>2</sub>			EDTA <sub>1</sub>			EDTA <sub>2</sub>			EDTA <sub>1</sub>			EDTA <sub>2</sub>								
	Co	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>																											
8																														
12																														
16																														
20																														

EDTA<sub>1</sub> - 65.1 mg/l (concentración usual MS)

EDTA<sub>2</sub> - 130.2 mg/l

C<sub>1</sub> - sin carbón activado y 50% de KNO<sub>3</sub> concentración MS ó KNO<sub>3</sub> 950 mg/l

C<sub>0</sub> - sin carbón activado

C<sub>2</sub> - con carbón activado 3 g/l

Los explantes sembrados en las condiciones de la tabla 9 fueron colocados primero 8 días en obscuridad y después transferidos a luz constante a 300 lux de intensidad luminosa durante 22 días más, después de lo cual fueron resembrados en un medio MS modificado y suplementando (ver apéndice II), con las combinaciones de BAP 0, 1, 5, 10 mg/l con 2,4-D 0, 10, 20 y 50 mg/l.

Otras combinaciones probadas fueron K a concentraciones 0,0.5 y 1 mg/l adicionada de 2,4-D a 0, 10, 20 y 50 mg/l.

#### Inflorescencias de Ch. tepejilote

Se utilizaron inflorescencias inmaduras aún verdes y sin abrir de aproximadamente 15 días, colectadas de plantas de invernadero del Jardín Botánico de la UNAM.

#### Condiciones de asepsia

Las inflorescencias de Ch. tepejilote fueron sometidas al mismo pretratamiento descrito para las hojas de G. gomez-pompa.

#### Medio de cultivo

Las inflorescencias se sembraron en un medio de cultivo Vacin y Went. (VW) (ver apéndice III) y MS (ver apéndice I) suplementado con diferentes combinaciones hormonales de acuerdo a los tratamientos que se muestrasn en la tabla 8 (18 inflorescencias por repetición, se hicieron 5 repeticiones, 90 explantes en total).

#### Tabla 8

Tratamientos a inflorescencias de Ch. tepejilote con medio VW y MS a diferentes concentraciones hormonales, pH 5.8-6.0. Incubadas a  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  con un fotoperiodo 16 horas luz (300 lux intensidad luminosa) 8 oscuridad

MEDIO	HORMONAS	CONCENTRACIONES
VW	2,4-D	1, 5, 10 $\mu$ M
VW	BA	1, 5, 10 $\mu$ M
VW	ANA	1, 5, 10 $\mu$ M
VW	AIA	1, 5, 10 $\mu$ M
MS	2,4-D	1, 5, 10 $\mu$ M
MS	K	1, 5, 10 $\mu$ M
MS	GA <sub>3</sub>	1, 5, 10 $\mu$ M
MS	sin reguladores de crecimiento	
VW	sin reguladores de crecimientos	

Todas las combinaciones con 3 g/l de sacarosa. Antes del sembrado las inflorescencias se colocaron en antioxidantes (50 mg/l ac. ascórbico + 50 mg/l de ac. cítrico) durante 14 horas aproximadamente de inflorescencias las cuales contenían alrededor de 6 flores, cada segmento en un frasco de cada combinación hubo 5 repeticiones mismas que se colocaron en la cámara de cultivo.

## RESULTADOS

Con el propósito de encontrar una forma de control de la oxidación en explante obtenidos a partir de hoja de Ch. humilis se utilizaron diferentes combinaciones y concentraciones de L-cisteína, ácido cítrico y ácido ascórbico/L-cisteína, los resultados de estos experimentos se aprecian en las tablas 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

En la tabla No. 1 se muestra la respuesta obtenida para los explantes de hoja de Ch. humilis a los tratamientos con ac. cítrico y L-cisteína sumergidos por 5 minutos, el control de la oxidación se observa en las combinaciones 50 mg/l de ac. cítrico con 50 mg/l de L-cist; 50 mg/l de ac. cítrico con 100 mg/l de L-cist. y 150 mg/l de ac. cítrico y 100 mg/l de L-cist. solo en fotoperiodo conservándose el explante verde hasta 3 meses.

Tabla No. 1

PRUEBAS DE OXIDACION

Chamaedorea humilis

SELECCIÓN DE EXPLANTES DE HOJA DE Ch. humilis SUMERGIDOS POR 5 MINUTOS EN SOLUCIONES ANTIOXIDANTES AC. CITRICO Y L-CISTEINA Y SEMBRADOS EN UN MEDIO ESTERILIZADO CON 5µM DE 2,4-D, INCUBADOS A 28°± 2°C, CON FOTOPERIODO DE 8 HORAS LUZ (300 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA) 8 HORAS OSCURIDAD.

Conc. cit. µg/l	50		100		150	
	OSC	FOTOP.	OSC	FOTOP.	OSC	FOTOP.
50	—	+	—	—	—	—
100	—	+	—	—	—	+
150	—	—	—	—	—	—

+ 8 días sin oxidación, explante verde

— oxidación inmediata (8 días)

En la tabla 2, se observa una respuesta pobre para los tratamientos con ácido cítrico y L-cisteína para controlar la oxidación de los tejidos de Ch. humilis. Sin embargo hubo un control de la oxidación hasta por 3 meses cuando se utilizó la combinación 50 mg/1 ácido cítrico con 100 mg/1 de L-cist. en fotoperiodo y con 150 mg/1 de ácido cítrico con 50 ó 100 mg/1 de L-cisteína, ésta respuesta se presentó - tanto es oscuridad como en presencia de fotoperiodo.

TABLA No. 2

## PRUEBAS DE OXIDACION

Chamaedorea humilis

RESPUESTA DE EXPLANTES DE HOJA DE Chamaedorea humilis SUMERGIDAS POR 12 HORAS EN REFRIGERACION A  $4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  EN LOS ANTIOXIDANTES AC. CITRICO Y L-CISTEINA Y SEMBRADOS A  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  CON FOTOPERIODO 16 HORAS LUX (300 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA) 8 HORAS OSCURIDAD.

L-cist. mg/1	ac. cítrico mg/1		50		100		150	
	OSC	FOTOP	OSC	FOTOP	OSC	FOTOP	OSC	FOTOP
50	—	—	—	—	+	+		
100	—	+	—	—	—	+		
150	—	—	—	—	—	—		

+ 3 meses sin oxidación, explante verde

— oxidación inmediata (8 días).

En nuestros resultados (tabla 3) hay un control de la oxidación en todas las combinaciones de ac. cítrico y 50 mg/l de L-cisteína solamente y nuevamente en fotoperíodo sin ninguna respuesta en oscuridad, manteniéndose en estas combinaciones verdes hasta 3 meses.

TABLA No. 3

## PRUEBAS DE OXIDACION

Chamaedorea humilis

RESPUESTA DE EXPLANTES DE HOJA DE Ch. humilis SUMERGIDOS POR 24 HORAS EN REFRIGERACION A  $4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  EN LOS ANTIOXIDANTES AC. CITRICO Y L-CISTEINA Y SEMBRADOS EN UN MEDIO MS ADICIONADO CON  $5\mu\text{M}$  DE 2,4-D E INCUBADOS A  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , CON FOTOPEDIODO 16 LUZ (300 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA) 8 HORAS OSCURIDAD.

ac. cítrico mg/l	50		100		150	
	OSC	FOTOP.	OSC	FOTOP.	OSC	FOTOP.
50	—	+	—	+	—	+
100	—	—	—	—	—	—
150	—	—	—	—	—	—

+ 3 meses sin oxidación, explante verde  
 — oxidación inmediata (8 días)

Las respuestas observadas en la tabla 4 corresponden a las combinaciones 50 mg/l de ac. ascórbico con 150 mg/l de L-cisteína, 100 mg/l de ac. asc. con 50 mg/l de L-cist. y 150 mg/l con 100 mg/l todas en fotoperiodo donde se controló hasta 3 meses la oxidación.

TABLA No. 4

## PRUEBAS DE OXIDACION

Chamaedorea humilis

RESPUESTA DE EXPLANTES DE HOJA DE Ch. humilis SUMERGIDOS POR 5 MINUTOS EN LOS ANTIOXIDANTES AC. ASCORBICO Y L-CISTEÍNA Y SEMBRADAS EN UN MEDIO MS ADICIONADO CON 5 $\mu$ M DE 2,4-D, INCUBADOS A 28°  $\pm$  2°C CON FOTOPERIODO 16 HORAS (300 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA) 8 HORAS OSCURIDAD.

ac. asc. mg/l L-cist. mg/l	50		100		150	
	OSC	FOTOP	OSC	FOTOP	OSC	FOTOP
50	—	—	—	+	—	—
100	—	—	—	—	—	+
150	—	+	—	—	—	—

+ 3 meses sin oxidación, explante verde  
 — oxidación inmediata (8 días)

En la tabla 5 se observan las combinaciones en las que se controló la oxidación hasta 3 y 4 meses estas fueron 50 mg/l de ac. asc. con 50 mg/l de L-cist. en oscuridad y fotoperiodo; 50 mg/l de ac. asc. con 100 y 150 mg/l de L-cist. en fotoperiodo; 100 mg/l de ac. asc. con 100 mg/l de L-cist. y 150 mg/l de ac. asc. con 100 mg/l de L-cist. en fotoperiodo.

TABLA No. 5

## PRUEBAS DE OXIDACION

Chamaedorea humilis.

RESPUESTA DE EXPLANTES DE HOJA DE Ch. humilis SUMERGIDOS POR 12 HORAS EN REFRIGERACION A  $4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  EN LOS ANTIOXIDANTES AC. ASCORBICO Y L-CISTEINA Y SEMBRADOS EN UN MEDIO MS ADICIONADO CON  $5\mu\text{M}$  DE 2,4-D E INCUBADOS A  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  CON FOTOPERIODO 16 HORAS LUZ (300 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA) 8 HORAS OSCURIDAD.

L-cist. mg/l \ ac. asc. mg/l	50		100		150	
	OSC	FOTOP	OSC	FOTOP	OSC	FOTOP
50	+	+	—	—	—	—
100	—	++	—	+	—	+
150	—	++	—	—	—	—

- + 3 meses sin oxidación, explante verde
- ++ 4 meses sin oxidación, explante verde
- oxidación inmediata (8 días)

En las condiciones de los explantes de esta tabla 6 las pruebas salieron casi en su totalidad sin respuesta aunque el tiempo de refrigeración haya sido de 24 horas, la única respuesta se presentó a 50 mg/l de ac. ascórbico con 100 mg/l de L- cist.

TABLA No. 6

## PRUEBAS DE OXIDACION

Chamaedorea humilis

RESPUESTA DE EXPLANTES DE *Ch. humilis* SUMERGIDOS POR 24 HORAS EN REFRIGERACION A  $4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  EN LOS ANTIOXIDANTES ACIDO ASCORBICO Y L-CISTEINA Y SEMBRADOS EN UN MEDIO MS ADICIONADO CON  $5\mu\text{M}$  DE 2,4-D E INCUBADOS A  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  CON FOTOPERIODO 16 HORAS LUZ (300 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA), Y 8 HORAS OSCURIDAD.

ac L-cist. mg/l	50		100		150	
	OSC	LUZ	OSC	LUZ	OSC	LUZ
50	—	—	—	—	—	—
100	—	+	—	—	—	—
150	—	—	—	—	—	—

+ 3 meses sin oxidación  
— oxidación inmediata

## DISCUSION

Ch. humilis

En general se apreció una respuesta pobre en cuanto al control de oxidación. El efecto de la combinación del ac. cítrico con L-cisteína (Tablas 1, 2 y 3) y la luz de baja intensidad (300 lux) se observó una tendencia favorecedora al control de oxidación; (George y Sherrington, 1984), obtuvieron resultados similares tratando sus explantes en oscuridad por 14 días y transferirlos a baja iluminación (500-100 lux) reduciendo o evitando la oxidación de la superficie cortada en meristemos de eucalipto. Muy semejante es el tratamiento que menciona Peregrina (1984) en sus explantes; manteniéndolas a 750 lux 24 días y posteriormente pasándolos a 3000 lux por 6 días, esto evita la estimulación de producción de fenoles y es debido a que en baja intensidad luminosa, la enzima PAL se inhibe y en oscuridad se desactiva (Camm y Towers, 1977). Así mismo las bajas concentraciones de L-cisteína parecen actuar también en este sentido, en tanto que la acción del ácido cítrico parece ser independiente de la concentración utilizada.

Anderson, (1975); citado por George y Sherrington, (1984) trabajando con meristemos apicales de Rhododendron encontró que se inhibía la oxidación sumergiendo los explantes en una solución de 150 mg/l de ac. cítrico y 150 mg/l de ac. ascórbico; Jones y Murashige (1974) tisserat et al (1979b), utilizaron también como antioxidantes 150 mg/l de ac. cítrico + 100 mg/l de ac. ascórbico en medio líquido y dejando estos explantes en remojo en el antioxidante 3 días antes del sembrado.

En los resultados obtenidos (Tabla 1, 2 y 3) el tiempo de exposición a los antioxidantes y su refrigeración no parece ser parámetro de mucho peso.

El resultado en la combinación del ac. ascórbico con L-cisteína - (Tablas 4, 5 y 6) muestra una tendencia a resultados más favorables en baja intensidad luminosa que en oscuridad encontrándose los mejores resultados en las bajas concentraciones de ac. ascórbico y altas para L-cisteína parecen ser las mejores para controlar la oxidación (Tabla -- 5) expuestos durante 12 horas en refrigeración a 4°C.

El tiempo máximo de nuestras respuestas a los antioxidantes por -

por los explantes se muestra en las tablas 1, 2, 3, 4, 5 y 6, después de este tiempo indicado los explantes murieron desechando este material.

Antes de iniciar las pruebas o experimentos con los explantes de hoja se efectuaron pruebas de contaminación cuyos resultados se muestran en las tablas 7 y 8..

PRUEBAS DE CONTAMINACION

Chamaedorea tepejilote y Gaussia gomez-pompa

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE CONTAMINACION CON HIPOCLORITO DE SODIO CON EXPLANTES DE HOJA DE Chamaedorea tepejilote y Gaussia gomez-pompa. INCUBADOS A  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  FOTOPERIODO 16 HORAS LUX (300 LUX) 8 HORAS OSCURIDAD.

TABLA No. 7 Ch. tepejilote

tiempo hipoclorito de sodio % activo \ minutos	1'	5'	10'	15'
0.5	---	+	---	++**
1	++***	++++***	+++***	++***
1.5	+++**	+++**	+++**	++++**

TABLA No. 8 G. gomez-pompa

tiempo hipoclorito de sodio % activo \ minutos	1'	5'	10'	15'
0.5	---	++***	++**	+++***
1	++***	+++***	+++**	+++**
1.5	+++***	+++***	+++***	+++**

- ++++ explante no contaminado durante 5 meses
- +++ explante no contaminado durante 4 meses
- ++ explante no contaminado durante 3 meses
- + explante no contaminado durante 1 mes
- explante contaminado

- \*\*\* muy verde
- \*\* levemente amarillo
- \* explante oxidado

Referencias de éste tipo de control de contaminación las aportan Tisserat, (1984) usó hipoclorito de sodio al 2.6% por 15 minutos en explantes de brotes basales, Nagao, (1980) desinfectó semillas de palmas con hipoclorito de sodio al 5% por 5 minutos. Hodel, D. (1977) - en cultivo de embriones de *Pritchardia Kaalae* Rock y *Veitchia joannis* H. wend. como solución 1% por 1 minuto, entre otros.

Las combinaciones usadas para estas pruebas (Tablas 10 y 11) fueron en un porcentaje bajo de cloro activo para no dañar el tejido y observar en cual de éstas combinaciones, además de no presentar contaminación, permanecían más verdes los explantes. Como se observa en la tabla 10 los explantes de Ch. tepejilote respondieron favorablemente en concentraciones medias y altas de hipoclorito de sodio, el tiempo de exposición no influye mucho ya que éstos resultados son similares en todas las concentraciones mencionada.

En la tabla 8 con G. gomez-pomape, la respuesta de los explantes fué mejor ya que a excepción de las concentraciones muy bajas de hipoclorito de sodio 0.5 % de cloro activo 1', 5' y 10' de tiempo de exposición, los explantes están levemente amarillos y en el primero oxidado, las otras combinaciones mantienen los explantes muy verdes.

Con estos resultados de no contaminación y los explantes sin lesiones, el siguiente paso es buscar que estos no se oxiden para así posteriormente buscar la respuesta morfogénica con reguladores de crecimiento.

TABLA No. 9

PRUEBAS DE OXIDACION  
GAUSSIA GOMEZ-POMPAE. QUERO

RESPUESTAS DE EXPLANTES DE GAUSSIA GOMEZ-POMPAE. QUERO CULTIVADOS DURANTE 1 MES EN MEDIO MS MODIFICADO A pH 5.0 Y EXPUESTOS A DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES. INCUBADOS A 27°± 2°C CONSTANTES Y A 300 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA.

* E2 osc. dias 9/11	1						10						20						30					
	EDTA <sub>1</sub>			EDTA <sub>2</sub>			EDTA <sub>1</sub>			EDTA <sub>2</sub>			EDTA <sub>1</sub>			EDTA <sub>2</sub>			EDTA <sub>1</sub>			EDTA <sub>2</sub>		
	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
8	++	++	-	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
12	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
16	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
20	++	+	++	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++

++ EXPLANTE VERDE, DAÑO POR OXIDACION MINIMO  
 + EXPLANTE VERDE, DAÑO POR OXIDACION REGULAR  
 - OXIDACION TOTAL DEL EXPLANTE  
 \* DESPUES DEL PERIODO DE OSCURIDAD LOS EXPLANTES FUERON PASADOS A LAS CONDICIONES SEÑALADAS.

EDTA<sub>1</sub> 65.1 mg/l (concentración usual MS).  
 EDTA<sub>2</sub> 130.2 mg/l  
 C<sub>1</sub> SIN CARBON ACTIVADO+ KNO<sub>3</sub> 950 mg/l, LA MITAD DE LA CONCENTRACION NORMAL DEL MS  
 C<sub>0</sub> SIN CARBON ACTIVADO  
 C<sub>2</sub> CON CARBON ACTIVADO 3 g/l

Para intentar establecer los cultivos in vitro de Gaussia gomez-pompae se efectuó un experimento cuyo objetivo final era probar la interacción de diferentes factores que pudieron conducir a controlar la oxidación de los tejidos manteniendo los explantes vivos el tiempo suficiente como para poder exponerlas posteriormente a la acción de reguladores de crecimiento. Los resultados se muestran en la tabla 9 en la cual se puede observar que las respuestas a los tratamientos fueron favorables.

Como se mencionó en la metodología los explantes se sometieron a un pretratamiento y cortes del tejido de hoja de acuerdo a lo propuesto por George y Sherrington (1984). Estos cortes no exponiéndolos al medio ambiente se evita el aumento de oxígeno no disuelto del potencial redox de la solución que acelera la oxidación, esto se observó - en el retardo en lo que a oxidación se refiere ya que no obstante que los cortes tenían 15 días, su estado era similar al primero. Lo anterior posiblemente influyó en los buenos resultados que se observan en la tabla 9.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Linderman et al (1970) quienes observaron que podrían preveer la oxidación al realizar la disección de meristemas apicales de Cattleya sumergidos en agua estéril o de coco. Por otro lado Ichihashi y Kako, (1977) usaron en principio cultivos en medio líquido y subcultivaron a medio líquido evitando la oxidación.

El carbón activado tiene la propiedad de absorber compuestos inhibitorios del crecimiento, presentes en el medio tales como aquellos - resultantes del autoclaveo o producidos por el tejido en cultivo (George loc cit.). Para incrementar la efectividad del carbón deben hacerse varias resiembras para ir eliminando éstos compuestos fenólicos que son atrapados por el mismo.

Evidencias de la actividad de este compuesto las muestran Fridborg et al (1978); citado por George loc cit., el carbón activado puede absorber comúnmente algunos fenoles producidos por tejidos - cortados, confirmado más tarde por Wetherhed et al (1979). También Reuveni y Lilien-Kipnis (1974) encontraron que la adición de carbón activado en el medio mejora el desarrollo de cultivos de palma datilera.

Así mismo Reynolds y Murashige (1979) evitaron la oxidación con 3 g/l de carbón activado en el medio, al igual que el cultivo de embriones de palmas de Wang y Huang, (1976).

En nuestro caso no se observó una diferencia clara entre la presencia y ausencia del carbón activado ya que se obtuvieron buenos resultados con o sin la presencia de este compuesto.

Los resultados más pobres (niveles de mayor oxidación) se presentaron en la concentración 1 g/l de sacarosa así como cuando los explantes fueron mantenidos por 20 días en oscuridad (tabla 9), nuestros resultados están en desacuerdo con lo generalmente propuesto para el efecto de la sacarosa. Camm y Towers, (1977) informan que al disminuir las concentraciones de sacarosa a 1 g/l pueden decrecer los polifenoles dentro de los tejidos (Davies, 1972; citado por George loc cit) por lo que los mejores controles de oxidación estarían en los niveles bajos de sacarosa, sin embargo estos autores trabajaron con otro tipo de tejidos como (Xanthium) en tanto que al trabajar con palmas, Arias y Huete, 1983; Tisserat, 1984; Reynolds y Murashige, 1979, entre otros informan buenos resultados en concentraciones relativamente altas de sacarosa 30 g/l. Además nuestros resultados podrían ser interpretados como la interacción de los diversos factores que se involucran (Tabla 9), particularmente la luz. Ya que los mismos autores (Camm y Towers, 1977) informan que al transferir los explantes a luz, se incrementan los niveles de PAL con la consecuente aparición de la oxidación, esto podría explicar nuestros resultados de pobre respuesta después de 20 días de oscuridad cuyos explantes al ser expuestos a la luz sufrieron la oxidación excepto aquellos tratamientos con altas concentraciones de sacarosa (Tabla 9). Estos razonamientos pueden aplicarse también cuando se analiza el efecto de EDTA, en el cual se ve (Tabla 9) que no hubo diferencia notoria entre EDTA<sub>1</sub> y EDTA<sub>2</sub>. El objetivo por el cual se incluyó esta variable es que los agentes quelantes pueden proporcionar otro mecanismo de interferencia con la acción de las enzimas peroxidasa, cada molécula puede secuestrar o atrapar iones que están sueltos solamente limitados por sistemas biológicos.

Weinstein et al. (1951) descubrieron que el EDTA puede inhibir la

la actividad de polifenol oxidasa de tejidos de hoja de girasol in vitro y sugiere que el agente quelante compite removiendo metales es enciales para la actividad de la enzima oxidasa. Estos mismos auto res señalan que el NaFe EDTA y el EDTA previenen la oxidación de me-- ristemos apicales de Carex.

La oxidación de los explantes también puede llevarse a cabo por la presencia de grandes niveles de potasio en el medio MS, esto fué observado por Anderson (1975); citado por George loc cit., en tejidos de Rhododendron por lo que éste autor probó reducir a la mitad las - concentraciones normales de  $\text{KNO}_3$ . En nuestras pruebas con tejidos de hoja de palma se probó este factor y se procedió a modificar el medio MS con la mitad de la concentración de  $\text{KNO}_3$ , observando en los resultados (Tabla 9) que no hubo diferencia en los tejidos obteniéndose -- respuestas favorables esto puede atribuirse al pH, concentraciones de sacarosa, o la cantidad de EDTA adicionada al medio.

El pH es uno de los factores importantes en el desarrollo del te jido, además que la actividad de polifenol oxidasa es mejor cuando es te es de 6.5 pero no si es más ácido (Ichihashi y Kako, 1977).

Hanson y Havier, (1981) encontraron que el pH para PAL en la saturación en concentraciones de substratos es cerca de 8.7. El punto isoelectrico de PAL para mostaza muestra un pico mayor a pH 5.6 y el menor a 5.3 (Kerneth y Havir, 1981).

De lo anterior se concluyó que el explante debe ser aislado y -- cultivado en un medio más ácido para evitar que la enzima tenga un me dio propicio para su funcionamiento o actividad (George loc cit.), -- por lo que se eligió un pH de 5 donde los explantes no tenían ninguna dificultad para su desarrollo, por los resultados obtenidos se compro bó la efectividad del pH5. Este hecho también fué importante para -- evitar la oxidación en la mayoría de los casos.

Los resultados para el efecto la luz se muestran en la tabla 9, la cual es indispensable para los vegetales sin embargo en cultivo de tejidos vegetales es perjudicial para algunas especies y particular-- mente es afectado el grupo de monocotiledonas dentro del cual se en-- encuentran las palmas. Por lo cual es conveniente que se mantengan en oscuridad total o a baja intensidad de luz (Creasy, 1968, citado por

George loc cit.); (Camm y Towers, 1977); (Hanson y Havir, 1981); (Staba, 1982); (Thorpe, 1978); (Pieper y Zimmerman, 1976; citados por George loc. cit.), estos últimos controlan la oxidación de tejidos de tejidos de nodos aislados de Palaenopsis; las primeras 2 semanas en oscuridad a 26°C y posteriormente.

Los cambiaron a luz y temperatura de 22°C.

En nuestros tratamientos los explantes permanecen verdes y aunque la mayoría dan buena respuesta los mejores resultados se encuentran en 8, 12 y 16 días de oscuridad (Tabla 9).

Los resultados muestran para esta especie (G. gomez-pompae), que la interacción de todos los factores que se manejaron en esta fase de experimentación tuvieron un efecto favorable para el control de la oxidación teniendo así la posibilidad de una manipulación posterior para utilizar reguladores de crecimiento y poder disparar la división celular.

### G. gómez-pompae

#### Pruebas con reguladores de crecimiento

Con el objeto de intentar la respuesta morfogénica de los explantes de Gaussia gómez-pompae y debido a que la respuesta en los diferentes tratamientos de la tabla 9 fué similar se seleccionaron solamente aquellos explantes que habían sido desarrollados durante 8 días de obscuridad.

Los explantes fueron subcultivados a medio basal MS fresco adicionado de BAP a 0, 1, 5 y 10 mg/l con 2,4-D a 0, 10, 20 y 50 mg/l. Otra combinación fué "K" a 0, 0.5 y 1.0 mg/l con 2,4-D a 0, 10, 20 y 50 mg/l.

PRUEBAS CON REGULADORES DE CRECIMIENTO  
Gaussia gomez-pompa. Quero

RESPUESTA DE EXPLANTES SOMETIDOS A PRUEBAS DE OXIDACION Y 8 DIAS DE OSCURIDAD EN MEDIO MS MODIFICADO, SUPLEMENTADO CON REGULADORES DE CRECIMIENTO, pH 5.0. INCUBADOS A  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  A 300 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA.

TABLA No. 10

2,4-D BAP mg/l	0	10	20	50
0	++	++	++	—
1	++	++	++	++
5	++	+	+	++
10	+++	+++	++	++

TABLA No. 11

2,4-D K mg/l	0	10	20	50
0	++	++	++	++
0.5	+++	++	++	++
1.0	+++	+++	+++	++

- +++ 8 meses de duración del explante verde después se oxida
- ++ 6 meses de duración del explante verde después se oxida
- + 4 meses de duración del explante verde después se oxida
- no respuesta, oxidación

Las combinaciones hormonales usadas en las tablas 10 y 11 se diseñaron tomando como base el trabajo de Arias y Huete, (1983) quienes trabajaron con ápices (meristemas apicales) de palma Pejibaye, obtuvieron callo después de 2 y 4 meses de cultivo, en el presente experimento se ampliaron las combinaciones hormonales, con objeto de tener una respuesta, desafortunadamente los explantes de las pruebas como lo indican las tablas 10 y 11 sólo se mantuvo el tejido un tiempo verde sin aparecer alguna respuesta de división celular o formación de callo. Lo que puede notarse en los resultados es que los explantes se conservaron mayor cantidad de tiempo verdes en concentraciones iguales de BAP y 2,4-D y altas de BAP sin 2,4-D (Tabla 10), en la combinación 1 mg/l con bajas concentraciones de 2,4-D, fué donde hay mejor resultado durando el explante verde hasta 8 meses, aunque sin respuesta.

Esto puede indicar que la posible respuesta morfogenética tendría que buscarse en más alta concentración de BAP (de 10 mg/l en adelante) y bajas de 2,4-D (de 0-10 mg/l).

## DISCUSION

Inflorescencias de Ch. tepejilote.

Basándonos en los resultados observados en la hoja de G. gomez-pompe donde el pretratamiento juega un papel importante, se decidió aplicar éste en las inflorescencias con el propósito de evitar la oxidación junto con antioxidantes como ácido ascórbico 50 mg/l + ácido cítrico 50 mg/l y los medios de cultivo mencionados en la metodología.

Nuestros explantes se mantuvieron verdes aún en la cámara de cultivo, luego cambiando a coloración blanca, señalando con esto que el pretratamiento y el uso de los antioxidantes inhibieron la oxidación del tejido.

En relación a la temperatura Kenneth y Havir (1981), mencionan que PAL disminuye levemente su actividad si el explante es mantenido por 24 horas a 4°C en la oscuridad y posteriormente es transferido a oscuridad pero a 25°C, lo cual no fué necesario en nuestros explantes.

Las inflorescencias presentaron color blanco con una duración variable durante 3 a 5 meses de cultivo, después de aproximadamente 8 días después del sembrado, el escapo floral se abrió, el ovario comenzó a hincharse con coloración verde y después del tiempo total ya señalado no se presentó otro cambio en los explantes.

Sin embargo de las 5 repeticiones de cada combinación solamente en 1 frasco (7%) de la combinación 5µM de AIA y en (7%) otro de la 10 µM de ANA en medio (VW) aparecieron en la base del escapo floral un conjunto de células muy semejantes a un pequeño callo blanquecino, resembrando cuando el medio comenzaba a secarse sin desarrollarse más-- éste callo, alcanzando un tamaño máximo de 0.5 cm aproximadamente.

Se ha demostrado la respuesta para las hormonas AIA y ANA ya que son específicas en la mayoría de las veces para formación de callo. George loc cit., menciona que estos reguladores de crecimiento son favorables para obtención de callo de monocotiledoneas, Zaid A y B --- Tisserat, 1984 obtuvieron callo con 0.1 mg/l ANA ó ANA y AIA de ex---plantes de embriones sin mencionar la cantidad de callo obtenido. Kumar et al, 1985, trabajó con endospermo de Cocos nucífera, utiliza-

ron 2,4-D, ANA, BA y K como reguladores de crecimiento, el mejor resultado de 2,4-D 50 mg/l y K 2.0 mg/l de AIA la respuesta es pobre y tampoco mencionaron el rendimiento.

Nuestro resultado fué un callo muy pequeño pero no tenemos un punto de comparación con otros resultados.

## PRUEBAS DE REGULADORES DE CRECIMIENTO

Chamaedorea tepejilote

INFLORESCENCIAS DE Chamaedorea tepejilote EN DIFERENTES TRATAMIENTOS DE MEDIOS DE CULTIVO Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO. INCUBADOS EN UNA CAMARA DE CULTIVO A pH 5.7 CON UN FOTOPERIODO 16 HORAS LUZ (300 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA) 8 HORAS OSCURIDAD A UNA TEMPERATURA DE  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

MEDIO	REGULADOR DE CRECIMIENTO	CONCENTRACIONES	RESPUESTAS
VW	2,4-D	1 $\mu\text{M}$	—
VW	2,4-D	5 $\mu\text{M}$	+
VW	2,4-D	10 $\mu\text{M}$	+
VW	BA	1	++
VW	BA	5	++
VW	BA	10	++
VW	ANA	1	++
VW	ANA	5	++
VW	ANA	10	+++
VW	AIA	1	++
VW	AIA	5	+++
VW	AIA	10	++
VW	K	1	—
VW	K	5	—
VW	K	10	++
MS	2,4-D	1	—
MS	2,4-D	5	++
MS	2,4-D	10	++
MS	K	1	++
MS	K	5	++
MS	K	10	++
MS	GA <sub>3</sub>	1	++
MS	GA <sub>3</sub>	5	++
MS	GA <sub>3</sub>	10	++
MS	sin regulador de crecimiento		+
VW	sin regulador de crecimiento		+

- oxidación total, no respuesta  
 + inflorescencia blanca, escapofloral abierto hasta 3 meses  
 ++ inflorescencia blanca, escapofloral abierto hasta 5 meses  
 +++ callo de aproximadamente 0.5 cm blanquecino

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como ya se mencionó en los objetivos de este trabajo se logró alcanzar el estado I de los cultivos in vitro el cual es requisito indispensable para el establecimiento de los explantes en el medio de cultivo que los preconditiona para la respuesta morfogénica.

De nuestros resultados puede derivarse la interacción de factores que favorezcan condiciones para inducir diferentes respuestas morfogénicas en palmas silvestres. Dado que la totipotencialidad de células cultivadas in vitro en la familia Palmae ha sido demostrada, es factible lograr esta meta y obtener plantas a partir de diversos tejidos de las especies amenazadas de extinción que fueron estudiadas. Este trabajo dió el primer paso para lograr este objetivo.

APENDICE I

Medio de Cultivo MS

Macronutrientes

Solución stock 1	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ ———	1,650 mg/l	————	16,500 mg/10 l.
20 litros X400 ml	$\text{KNO}_3$ ———	1,900 mg/l	————	19,000 mg/10 l.
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —	370 mg/l	————	3,700 mg/10 l.
	$\text{KH}_2\text{PO}_2$ ———	170 mg/l	————	1,700 mg/10 l.
Solución stock 2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —	440 mg/l	————	4,400 mg/10 l.
10 litros x 100 ml				

Micronutrientes

Solución stock 3	KI ———	0.83 mg/l	————	8.3 mg/10 l.
10 litros x 100 ml	$\text{H}_3\text{BO}_3$ ———	6.2 mg/l	————	62.0 mg/10 l.
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ —	22.3 mg/l	————	223.0 mg/10 l.
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —	8.3 mg/l	————	83.0 mg/10 l.
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —	0.25 mg/l	————	2.5 mg/10 l.
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ —	0.025 mg/l	————	0.25 mg/10 l.
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —	0.025 mg/l	————	0.25 mg/10 l.

Solución stock 4

20 litros x 100 ml	Na EDTA ———	37.3 mg/l	————	373 mg/10 l.
	$\text{FeSO}_4$ ———	27.8 mg/l	————	278 mg/10 l.

Solución stock 5

20 litros x 100 ml	Inositol ———	100.0 mg/l	————	1000 mg/10 l.
--------------------	--------------	------------	------	---------------

Vitaminas MS

Solución stock 6	ácido nicotínico —	0.5 mg/l	——	5.0 mg/10 l.
10 litros x 10 ml	Piridoxina HCl —	0.5 mg/l	——	5.0 mg/10 l.
	tiamina HCl ———	0.004 mg/l	—	0.04 mg/10 l.
	agar ———	8000.0 mg/l		
	sacarosa ———	30000.0 mg/l		

Nota: en el medio líquido no se agrega agar y se sigue el mismo procedimiento general.

APENDICE II

Medio de Cultivo MS modificado

Macronutrientes

Solución stock 1	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ ———	1,650 mg/1	————	16,500 mg/10 l.
20 litros x 400 ml	$\text{KNO}_3$ ———	1,900 mg/1	————	19.000 mg/10 l.
	$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —	370 mg/1	————	3,700 mg/10 l.
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ———	170 mg/1	————	1,700 mg/10 l.
Solución stock 2	$\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —	440 mg/1	————	4,400 mg/10 l.
10 litros x 100 ml				

Solución stock 3	$\text{KI}$ ———	0.83 mg/1	————	8.3 mg/10 l.
10 litros x 100 ml	$\text{H}_3\text{BO}_3$ ———	6.2 mg/1	————	62.0 mg/10 l.
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ —	22.3 mg/1	————	223.0 mg/10 l.
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —	8.3 mg/1	————	83.0 mg/10 l.
	$\text{Na MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —	0.25 mg/1	————	2.5 mg/10 l.
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ —	0.25 mg/1	————	0.25 mg/10 l.
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —	0.025 mg/1	————	0.25 mg/10 l.

Solución stock 4	$\text{Na EDTA}$ ———	37.3 mg/1	————	373 mg/10 l.
20 litros x 100 ml	$\text{FeSO}_4$ ———	27.8 mg/1	————	278 mg/10 l.

Solución stock 5	$\text{Inositol}$ ———	100.0 mg/1	————	1000 mg/10 l.
20 litros x 100 ml				

Vitaminas MS

Solución stock 6	Adenina ———	0.004 mg/1
10 litros x 10 ml	tiamina ———	0.004 mg/1
	agar ———	8000.0 mg/1
	sacarosa ———	30000.0 mg/1

## APENDICE III

Medio basal Vacin y Went modificado (Hodel, 1977).

$\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$	0.020 mg/1	0.20 mg/10 l
$\text{KNO}_3$	0.0525 mg/1	0.525 mg/10 l
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	0.025 mg/1	0.25 mg/10 l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/1	0.25 mg/10 l
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0.050 mg/1	0.50 mg/10 l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.00057 mg/1	0.0057 mg/10 l

Sacarosa 30 000 mg/1

agar 8 000 mg/1

EDTA  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27.80 mg/1 278 mg/10 l

Na EDTA 37.30 mg/1 373 mg/10 l

pH 5.8 6.0

## BIBLIOGRAFIA

- Anónimo, (1983). Pedregal de San Angel Zona de Reserva Ecológica. Gaceta UNAM, 6a. época vol. 1 (62) 13 oct. pp. 22.
- Arias, O. M. y F. V. Huete (1983). Vegetative Propagation in vitro of Pejibaye (Bactris gasipaes H.B.K.). Turriabla 33 (2), 103-108.
- Camm, E. L. and G. H. N. Towers (1987). Phenylalanine ammonia lyase En: Progress in Phytochemistry (vol 4) L. Reinhold; J. B Harbourne and Y. Swain Eds. 169-188.
- Carabias L. J. y C. J. Meave (1987). La Reserva Ecológica del Pedregal de San Angel En: Información Científica y Tecnológica 9 (125) México 16-32.
- Cutter, V. M. and K. S. Wilson (1954). Effects of Coconut endosperm and other growth stimulants upon the development in vitro of embryos of Cocos nucifera. Bot. Gaz 115: 234-240.
- Debergh, P.C.A. (1987). Recent Trends in the Application of Tissue Culture to ornamentals En: Green C. E., Somers D.A.; W. A. Hackett (Eds.) Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss Inc. New York 383-393.
- Euwens, C. J. (1976). Mineral Requirements for Growth and Callus Initiation of Tissue Explants Excised from Mature Coconuts Palms (Cocos nucifera) and Cultured in vitro. Physiol. Plant 36: 23-28.
- Euwens, C. J. (1978). Effects of Organic Nutrients and Hormones on Growth and Development of Tissue Explants from Coconut (Cocos nucifera) and Date (Phoenix dactylifera) Palms Cultured in vitro. Physiol. Plant. 42: 173-178.
- Fisher J. PH. D. (1980). Our diminishing rain forest. Fairchild Tropical Garden Bulletin 35 (3): 10-15.
- Gautheret, R. J. (1982). Plant Tissue Culture. The History En: Plant Tissue Culture. Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture A. Fujiwara Ed. Japanese Assoc. of Plant. Tissue Culture Tokio 7-12.
- George, F. E, and D. P. Sherrington. (1984). Plant Propagation Tissue Culture Handbook and Directory of Commercial Laboratories pp. 2; 334-340; 472-473.

- Guzman E. V. and D. A. del Rosario. (1964). The Growth and Development of Cocos nucifera L. 'Makapuno' Embryos in vitro. Philipp. Agric. 48: 82-94.
- Hanower J. et. C. Pannetier, (1982). In vitro Vegetative Propagation of the Oil Palm. Elaeis guinensis. Jacq. Plant Tissue Culture A. Fujiwara (Ed.) Japanese Association of Plant Tissue Culture 745-746.
- Hodel D. (1977). Notes on Embryo Culture of Palms. Principes 21: 103-108.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). (1985). Rare and Threatened Plant list. Threatened Plant Committee Botanic. Garden Conservation Coordinating Body Kew, England.
- Jones, L. D.; Barfiedl,; J. Barret; A. Flook,; K. Pollok, and P. Robinson. (1982). Cytology of Oil Palm Cultures and Regenerant Plant En: Plant Tissue Culture. Proc. 5 th. Intl. Tissue and cell Culture (Ed.). A. Fujiwara Japanese 727- 728.
- Jones, L. H. (1983). The Oil Palm and its Clonal Propagation by Tissue Culture Biologist. 30: 181-188.
- Kenneth R. H. and E. A. Havir, (1981). Phenylalanine Ammonia Lyase. The Biochemistry of Plant 7: 577-625.
- Kumar, P. P., C. R. Rajú, Chanadramohan M. and R. D Iyer. (1985). Induction and Maintenance of Friable Callus from the Cellular Endosperm of Cocos nucifera L. Plant Science, 40: 203- 207.
- Langebartels, C. and S. H. Ulrich. (1980). Anthocyanin Accumulation and PAL Activity in A suspension Culture of Daucus carota L. Plant 149; 283- 287.
- Moore H. E. Jr. y N. N. UHL. (1973). The Monocotyledons: their Evolution and Comparative Biology. IV Palms and the Origin and Evolution of Monocotyledons. Q. Rev. Biol. 48: 414-36.
- Murashige T. y F. Skoog. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Biossays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 15: 473-494.
- Murashige, T. (1978). The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture Frontiers of Plant Tissue Culture: T.A. Thorpe, (Ed.). IAPTC Calgary: 15-26.

- Nagao, M. A., Kanegawa K. and Sakai W. S. (1980). Accelerating Palm Seed germination with Gibberelic Acid Scarification, and Bottom Heat. Hort Science 15 (2): 200-201.
- Nwankwo y Krikorian. (1983). Morphogenetic Potential of Embryo and Seelling-Derived Callus of Elaeis guinensis Jacq. var. pisifera Becc. Ann. Bot. 51: (1986) 65-76.
- Osborne R. (1986). Tissue Culture of Cycads En: Abstracts VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Minnesota. Assoc Plant Tissue Culture pp. 281.
- Pannetier, C. and J. Bufford-Morel (1982). Production of Somatic Embryos from Leaf Tissue of Coconut. Cocos nucifera L. En: Fujiwara A. (Ed.) 1982 Plant Tissue Culture pp. 755-756.
- Peregrina B. F. H. (1984). Propagación Vegetativa in vitro de tipos de durazno (Prunus persica (L) Batsch) de Telela del Volcán edo. de Morelos (ensayos preliminares) Tesis profesional En: Universidad de Guadalajara, escuela de Agricultura cap. 4.
- Paranjothy K. and R. Othman. (1982). In vitro Propagation of Oil Palm En: Plant Tissue Culture A. Fujiwara (Ed.). Japanese Association of Plant Tissue Culture, Tokio. 747-748.
- Paranjothy K. (1984). Oil Palm, En: Ammirato P. V. et al. 1984 Handbook of Plant Cell Culture, Mcmillan, Canada Inc. 3: 591-602.
- Prance T. G. y S. T. Elias. (1978). Extinction is Forewer, The New York Botanical (Garden. Millbok New York) 267-279 (Harold E. Moore Jr.). Endargement at the specific and generic levels in Palms.
- Quero, J. H. (1987). Utilization and Status of Palms Mexico, Jardin Botanico Inst. de Biol. UNAM En: Dransfield, (Ed.). J. 1987. Economic Botany and Threatened species of the Palms Family in Latin America and the Caribbean, Final Report WWF 3322.
- Rebechault H. J. Ahee, G. Guwain, (1970). Colonies Cellulaires et formes embryoides obtenues in vitro a partir de Cultures d'embryons de Palmier a Huile (Elaeis guineensis Jacq. var. dura Becc.). C. R. Acad. Sci. 270: 3067-3070.

- Rees, A. R. (1963). Germination of Palm Seeds Using a Method Development for the Oil Palm. *Principes* 7: 27-30.
- Rebechant H. J. Ahee. G. Guenin. (1970). Colonies Cellulaires et Formes Embryoïdes Obtenues in vitro a partir de Cultures d'embryons de Palmera Huile (Elaeis guineensis Jacq. var. dura Buc). *C. R. Gead. Sci.* 270: 3067-3070.
- Reinert J. y YPS Bajaj. (1977). Auther Culture: Haploid Production and its Significance. En Reinert J. y YPS Bajaj. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* eds. Springer-Verlag. Berlin pp. 251-264.
- Reynolds J. T. and T. Murashige, (1979). Asexual Embryogenesis in Callus Cultures of Palms In vitro 15: No. 5 383-387.
- Reynolds J. F. 1980. Asexual Embryogenesis in Callus Derived from Palm Inflorescences En. *Propagation of Higher Plants Through Tissue-Emerging Technologies and Strategies*, Symposium held at University of Tennessee, Knoxville Environmental and Experimental Botany (In. Press).
- Reynolds, J. F. (1982). Vegetative Propagation of Palm Trees. En: J. M. Bonga and D. J. Durgan. *Tissue Culture in Forestry* pp. 182-203.
- Sarukhán, J. y J. R. Bye. (1983). La Unidad de Investigación sobre Recursos Genéticos (UNIRGEN) Justificación. Bases y Estructuras. Jardín Botánico, UNAM. manuscrito.
- Sandoval, Z. E. (1985). Anatomía del Género *Opsiandra*. Tesis Profesional. fac. Ciencias. UNAM. pp.
- Staba E. J. (1982). *Plant Tissue Culture ASA Source of Biochemicals*, C.R.E. Press, Inc. Boca Raton, Florida 27-30.
- Staba E. J. (1977). Flavonoides En: Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj. 1977 *Plant Cell Tissue, and Organ Culture* Springer-Verlag. Berlin 676-693.
- Teixira, J. B., M. R. Sondahl, and E. G. Kirby. (1986). Asexual Embryogenesis in Mature Embryo Callus of Palms (Acrocomia aculeata and Elaeis oleifera) En: Abstracts VI International Congress of Plant Tissue Culture pp. 211.

- Thorpe, T. A. (1978). Physiological and Biochemical Aspects of Organogenesis In vitro: En: Thorpe, T. A. 1978 (Ed.). Frontiers of Plant Tissue Culture. V. of Calgary 49-58.
- Tisserat, B. (1979). Propagation of Date Palm (Phoenix dactylifera L.) in vitro. J. Exp. Bot. 30: 1275-1283.
- Tisserat, B. (1979). Tissue Culture of the Date Palm. The J. of Heredity 70: 211-222.
- Tisserat, B. EB. Esau, and T. Murashige, (1979). Somatic Embryogenesis in (angiosperms En: Horticultural Reviews U. of California 1: 1-78.
- Tisserat, B. (1981). Date Palm. Tissue Culture. U. S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service 50 . (AAT-W-17).
- Tisserat, B. (1983) Tissue Culture of Date Palms-A New Method to propagate and Ancient Crop-And a Short Discussion of the California Date Industry. Principes 27 (3): 105-117.
- Tisserat, B. (1984). Propagation of Date Palms by Shoot Tip Cultures. Hort Science 19 (2); 230-251.
- Tisserat, B. (1984). Date Palm. En: Sharp. R. W., D. A. Evans, P. V. Ammirato, Y. Yamada. (Eds. Handbook of Plant Cell Culture 2: 505-545.
- Vázquez Y. C. (1979). La Biosfera (Extinción de Plantas). Naturaleza. 10 (1): 15-22
- Vovides, A. P. and A. Gómez-pompa. (1977). The Problems of Threatened and Endangered. Plant species of Mexico. In: Extinction is Forever, INIREB. The New York Botanical Garden 77-88.
- Vovides, A. P. (1981). Lista Preliminar de Plantas Mexicanas Raras o en Peligro de Extinción. Biótica 6 No. 2 pp.
- Wang, P. J. and L. C. Huang.(1976). Beneficial Effects of Activated Charcoal on Plant Tissue and Organ Culture. In Vitro 12:260-262.
- Wagner, R. I. (1982). Raising. Ornamental Palms. Principes 26; (2) 86-101.
- Winton, L. L. (1978). Morphogenetic in Clonal Propagation of Woody Plants En: Thorpe, T. A. (Ed.). Frontiers of Plant Tissue Culture Proceeding of the 4th. International Congress of Plant Tissue and Cell Culture U. of Calgary 419-424.

- Wochok. Z. S. (1981). The Role of Culture in Preserving Threatened and Endangered Plant Species. *Biological Conservation* 20: 83-89.
- Zaprometov, M. N. (1978). Enzymology and Regulation of the Syntesis of Poliphenols in Cultured Cells In: Thorpe, T. A. 1978. ed. *Frontiers of Plant Tissue Culture*. U. of Calgary pp. 335-341.