

31
2 ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

CULTIVO IN VITRO DE TRES ESPECIES
DE PALMA CAÑEDOR
(*Chamaedorea* spp.)

TESIS PROFESIONAL
que para obtener el título de:

B I O L O G O

presenta

JUAN ROMERO ARREDONDO

México, D. F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

CONTENIDO

	página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	2
ANTECEDENTES	
Diversidad biológica de México	3
El bosque tropical perennifolio	4
Alteración ecológica	5
El problema de la extinción	6
La Familia Palmae (Arecaceae)	9
El Género <i>Chamaedorea</i>	11
Usos	17
Problemática e importancia económica	18
Cultivo de tejidos vegetales	22
Antecedentes del cultivo <u>in vitro</u> de la familia Palmae	23
MATERIALES Y METODOS	
1.- Obtención de material biológico	
1.1 Semillas	29
1.1.1 Pruebas de almacenamiento	29
1.1.2 Contenido de humedad (H)	29
1.2 Obtención de plántulas	30
1.2.1 Pruebas de viabilidad	30
1.2.1.1 Pruebas de germinación	30
1.2.1.2 Prueba de viabilidad de icos embriones ..	33
1.3 Obtención de plantas adultas	33
2.- Cultivo <u>in vitro</u>	34
2.1 Siembra de embriones	
2.1.1 Pruebas de desinfección	34
2.1.2 Cultivo <u>in vitro</u> de embriones	35
2.2 Cultivo <u>in vitro</u> de inóculos de órganos	
2.2.1 Pruebas de desinfección	35
2.2.2 Cultivo <u>in vitro</u> de células y órganos	
a) cultivo <u>in vitro</u> de órganos de plántulas	37
b) cultivo <u>in vitro</u> de inóculos de hoja de plántulas y palmas adultas	38
c) cultivo <u>in vitro</u> de anteras	41

d) cultivo <u>in vitro</u> de microsporas aisladas	43
e) cultivo <u>in vitro</u> de inflorescencias (flóres y raquillas)	44
3.- ANÁLISIS HISTOLÓGICO	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1.- Semillas	
1.1 Contenido de humedad	50
1.2 Pruebas de viabilidad	50
1.2.1 Pruebas de germinación	51
1.2.2 Pruebas de viabilidad de los embriones ...	54
2.- Cultivo <u>in vitro</u>	
2.1 Siembra de embriones	56
2.1.1 Pruebas de desinfección	56
2.1.2 Cultivo <u>in vitro</u> de embriones	57
2.2 Cultivo <u>in vitro</u> de inoculos de órganos	
2.2.1 Pruebas de desinfección	57
2.2.2 Cultivo <u>in vitro</u> de células y órganos	
a) cultivo <u>in vitro</u> de inoculos de plántulas	60
b) cultivo <u>in vitro</u> de inoculos de hoja de plántulas y palmas adultas	61
c) cultivo <u>in vitro</u> de anteras	65
d) cultivo <u>in vitro</u> de microsporas aisladas	66
e) cultivo <u>in vitro</u> de inflorescencias (flóres y raquillas)	71
3.- Análisis histológico	77
CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFÍA	85
APENDICE I	
TABLAS DE COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS NUTRITIVOS USADOS	
TABLAS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA (ANDEVA)	94
APENDICE II	
SECCIÓN DE FOTOGRAFÍAS	120

R E S U M E N .

Las palmas del género *Chasmodon* poseen un gran prestigio internacional como plantas ornamentales. Su propagación se realiza únicamente por medio de semillas, las cuales se obtienen principalmente de las zonas naturales donde crecen.

En México se encuentran aproximadamente 43 especies pertenecientes a este género, de las cuales 9 están consideradas dentro de alguna categoría de las plantas mexicanas en peligro de extinción. La causa de esto es la explotación indiscriminada a que están sujetas, así como la devastación de su hábitat natural.

Por su gran importancia económica y ecológica es necesario desarrollar tecnologías que permitan la optimización de su uso, sin detrimento de las poblaciones naturales. En la presente investigación se empleó el cultivo de tejidos vegetales, por las ventajas que ofrece para la recuperación y/o propagación masiva de plantas de este género.

Las plantas de las cuales se obtuvieron los tejidos que fueron cultivados *in vitro* pertenecieron a las especies *Chasmodon oblongata* Mart., *Chasmodon elegans* Mart., y *Chasmodon* sp. Las palmas de la especie *Chasmodon oblongata* Mart., se obtuvieron a partir de semillas, mientras que los tejidos de *Chasmodon elegans* Mart., y *Chasmodon* sp., provinieron de plantas adultas.

Con las semillas de *Chasmodon oblongata* Mart., se realizaron pruebas de almacenamiento y se probaron 4 diferentes tipos de sustrato para germinación; las semillas que fueron almacenadas a 7°C, prerremojadas 15 días antes de sembrarlas y germinadas en agrolita con ventilación presentaron el porcentaje de germinación más alto (77.6%).

El mejor tratamiento de desinfección fue aquel donde los tejidos recibieron un pretratamiento de 1 hora en fungicida (Tecto 60 o Leguan 30-30, 1 g/l), antes de la siembra, posteriormente se sumergieron por 5 minutos en etanol al 70 %, y finalmente se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial (1.2 % de cloro activo) durante 15 minutos; con este tratamiento se logró obtener un porcentaje de contaminación del 4.0 %, así como disminuir el oscurecimiento del tejido al 15 %.

Como inóculos se emplearon tejidos de embriones, raíz, tallo y hoja de palmas de la especie *Chamaedorea oblongata*: tejidos de hojas, inflorescencias de *Chamaedorea elegans* e inflorescencias, anteras y microsporas de *Chamaedorea* sp.

Los medios con que se experimentó fueron: El Murashige y Skoog (62), para cultivar embriones, raíces, tallos, hojas e inflorescencias; el medio Anderson (31), y el medio Mitch (66), para cultivar anteras y microsporas, adicionados con diferentes concentraciones de fitoreguladores del crecimiento (auxinas y citoquininas).

También fue utilizado el medio Y2 (20) en el cultivo *in vitro* de tejidos de hojas e inflorescencias (con distintas concentraciones de auxinas y citoquininas). Además, para el cultivo de este tipo de órganos, se realizó un experimento de amplio espectro que estuvo conformado por 81 medios diferentes, en los cuales se probaron 3 concentraciones diferentes de macro y microelementos, auxinas, citoquininas, vitaminas, aminoácidos y azúcares.

Los tejidos que presentaron una respuesta positiva al cultivo *in vitro* fueron los provenientes de hojas de *Chamaedorea oblongata*, y de flores y raquillas de *Ch. elegans*.

Los medios con los que se obtuvo algún tipo de respuesta positiva al cultivo *in vitro* fueron el medio T3 y algunos del experimento de amplio espectro (del medio 35 al 81).

Con el tejido proveniente de las hojas se logró un alto porcentaje de sobrevivencia (del 75 al 80 % a los 120 días), así como un escaso desarrollo de tejido calloso.

El tejido con el cual se obtuvo la mejor respuesta fue el de las inflorescencias, induciéndose el desarrollo de tejido calloso en los inóculos de raquillas y la formación de estructuras a partir del gineceo de las flores femeninas de *Chamaedorea elegans*.

Al realizar el análisis histológico de las estructuras obtenidas *in vitro* se observó que éstas surgían a partir de cada carpelo del pistilo y su desarrollo tendía hacia la formación de semillas.

INTRODUCCION.

En México las palmas del género *Chamaedorea* (representadas por aproximadamente 43 especies), se distribuyen en zonas del bosque tropical perennifolio. Se desarrollan en condiciones de escasa luminosidad y alta humedad relativa. Su reproducción, en condiciones naturales, se realiza únicamente por semilla y es un proceso lento. Por su belleza, resistencia y durabilidad son utilizadas, a nivel internacional, como plantas ornamentales, uso que les ha proporcionado un alto valor económico (88, 91).

Se han hecho exportaciones masivas de estas palmas a los Estados Unidos desde hace cincuenta años. Actualmente las cantidades extraídas de la palma caesdor se han incrementado sorprendentemente y ya no sólo se comercializa con las plantas y las hojas sino también con las semillas, no permitiendo la regeneración natural (2).

La disminución grave de este recurso se debe a diferentes factores entre los que se encuentran (91):

- a) Manejo inadecuado.
- b) Sobres explotación.
- c) Desmontes e incendios forestales.
- d) Ganadería y monocultivos.
- e) Falta de una coordinación institucional.

Estos factores, sumados al impacto de las actividades humanas sobre el bosque tropical perennifolio, colocan a este género en peligro de extinción, por lo que es necesario implementar opciones técnicas y científicas que puedan permitir el estudio y conservación del recurso. Una de estas opciones es el cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que abarca, de manera general, el cultivo en condiciones asépticas in vitro de semillas, órganos, embriones, tejidos, células o protoplastos, en un medio nutritivo artificial, complementado, principalmente, con fitohormonas y vitaminas, bajo condiciones ambientales controladas, con el fin de lograr su desarrollo y/o producción de plantas completas (37).

En lo concerniente al género *Chamaedorea* son escasos los reportes en donde se utiliza el cultivo de tejidos, desconociéndose la mayoría de los aspectos de su cultivo in vitro, por lo cual es necesario realizar estudios básicos para saber hasta donde puede ser útil esta técnica con el fin de lograr su propagación.

Con base en la gran importancia ecológica y económica de la palma caesdor, y considerando las potencialidades que proporciona

el cultivo de tejidos para su propagación masiva, se planteó el presente trabajo cuyos objetivos fueron:

OBJETIVOS.

GENERALES.

- Propagar masivamente a través de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, las especies de la palma caedera *Chamaedorea elegans* Mart., *Chamaedorea oblongata* Mart., y *Chamaedorea* sp.
- Disminuir el peligro de extinción del gescoplasm silvestre de estas especies.
- Proporcionar una alternativa de obtención rápida y masiva de este recurso.

ESPECIFICOS.

- Establecer las metodologías de cultivo de tejidos vegetales para la propagación masiva de las especies selectas de la palma caedera (*Chamaedorea elegans* Mart., *Chamaedorea oblongata* Mart., y *Chamaedorea* sp.)
- Disminuir el tiempo de propagación de las plantas de la palma caedera.

ANTECEDENTES.

Nuestro planeta está constituido por distintas regiones naturales que han sido forjadas durante miles de años por la interacción de factores bióticos y abióticos. Estas regiones o biomas son muy heterogéneas debido a que la relación entre clima, suelo y vegetación es muy estrecha por lo que cualquier alteración en alguno de ellos tendrá como consecuencia la alteración de los otros dos, dando como resultado una amplia gama de comunidades vegetales con distinta composición de especies. En un bioma determinado la vegetación es uniforme reflejando, por una parte, los rasgos principales del clima y, por otra, el carácter estructural del hábitat para los animales. De esta manera, un bioma es una unidad total de comunidad y considera tanto a plantas como animales (7).

DIVERSIDAD BIOLÓGICA DE MÉXICO

La riqueza biológica de un área determinada es resultado directo de la variedad de sus ambientes, encargada de proporcionar una diversidad de hábitats (10). La variedad de ambientes en nuestro país es el resultado de factores físicos y biológicos que se fusionan e interactúan entre sí. Dentro de estos factores se encuentran:

- a) Ubicación geográfica.
- b) Clima
- c) Edafología.
- d) Topografía.
- e) Vegetación.

La conjugación de todos estos factores concede una gran riqueza de especies vegetales y animales al país. Aquí sólo se hablará de la vegetación.

La cubierta vegetal de México es una de las más variadas de la tierra, pues en su territorio están representados prácticamente todos los grandes biomas que se han descrito de la superficie del planeta. El conocimiento impreciso de la flora de México hace imposible definir, ni siquiera con aproximación, el número de especies que la componen (8).

Desafortunadamente, durante los últimos cincuenta años, los hábitats naturales de México han sido transformados a tal punto, que menos del 40 % del territorio contiene una población natural sin disturbios.

Desde el punto de vista ecológico los hábitats naturales más

afectados con los bosques mesófilos de montaña, los manglares y sobre todo los bosques tropicales perennifolios, cuya área ya ha sido reducida al 10% de su distribución original (10).

EL BOSQUE TROPICAL PERENNIFOLIO

El bosque tropical perennifolio es un tipo de vegetación que presenta la máxima diversidad de especies de plantas por unidad de superficie, y su presencia y extensión determinan la riqueza florística de una región.

Bajo el nombre de bosque tropical perennifolio usado por Rzedowski (88), quedan incluidos tanto el "tropical rain forest" y el "tropical evergreen forest" de Leopold (46), como la "selva alta perennifolia" y la "selva alta o mediana subperennifolia" de Miranda y Hernández X. (56). Estos últimos autores han preferido usar el término "selva" para este tipo de vegetación; el criterio básico que parece preponderar en su clasificación para diferenciar selva y bosque no es la estructura de la comunidad, sino las afinidades geográficas de las especies arbóreas dominantes, de tal forma que en las comunidades bióticas donde prevalecen géneros de origen o afinidad boreal (holárticos) se consideran como bosques, mientras las comunidades cuyos principales árboles muestran vínculos neotropicales se denominan selvas (90).

Los sistemas de clasificación de la vegetación más usados en México son los de Miranda y Hernández X. (56) y el de Rzedowski (88) por lo que serán los que aquí se emplearán indistintamente, pero aclarando que se está haciendo referencia a tipos de vegetación equivalentes.

El bosque tropical perennifolio ocupa (o ocupaba hace un siglo) una amplia extensión en el este y sureste de México; desde la región de Tamaulachale y Oaxaca (al sureste de San Luis Potosí y norte de Veracruz), a lo largo de Veracruz y algunas regiones limítrofes de Hidalgo, Puebla y Oaxaca, hasta el norte y noroeste de Chiapas, porciones de Tabasco, la mayor parte de Campeche y de Quintana Roo y sobre una franja de la Sierra Madre de Chiapas. Ocupa entre el 10 y el 11% del territorio nacional (fig 1), aunque Leopold (46) lo estimó en 12.8 % y Beltrán (5) en 6.8%. La decima parte de esta 11% ostenta una vegetación climax, mientras el resto está ocupada por zonas agrícolas, pastizales artificiales y comunidades secundarias (86).

Se encuentra distribuido en zonas que tienen dos características esenciales: estas libres de heladas y reciben una cantidad de lluvia considerable por año. Más específicamente, se desarrolla en altitudes entre 0 y 1 000 m, aunque en algunas partes de Chiapas asciende hasta 1 500 m s.n.m. La temperatura media anual es igual o mayor a 24°C. La precipitación media anual es de 1 500 a 3 000 mm y en algunas zonas sobrepasa los 4 000 mm. El número de meses secos es menor de tres por año, aunque en las regiones limítrofes puede ser de 4 a 5. De acuerdo a la clasificación de Köppen los climas correspondientes son del tipo

As, Af, Cw y Aw. En cuanto al tipo de suelos que ocupan, los grupos de lateritas y redizinas son los que se citan para este tipo de vegetación (7, 14 y 28).

En el bosque tropical perennifolio predominan Árboles siempre verdes de más de 25 m de alto; no todos sus componentes son perennifolios, algunos pierden sus hojas durante la época seca. El número de especies que componen el estrato superior es por lo general grande y a menudo no es fácil determinar cual de los árboles es realmente el dominante; en muchas comunidades no hay especies dominantes y el número total de componentes arbóreos es elevado. Otra de sus características es la abundancia de trepadoras leñosas que a menudo alcanzan tamaños tan grandes que su follaje compete con los Árboles de los estratos superiores. Posee también especies epífitas entre las cuales predominan dos familias: Bromeliaceas y Orchidaceas. Por lo común se presentan tres estratos arbóreos más o menos bien definidos, además de otros dos o tres arbustivos y herbáceos. El estrato superior mide por lo general más de 30 m de alto; los otros dos estratos arbóreos ocupan los espacios correspondientes entre alturas de 5 y 20 m. La enorme masa de ramas y hojas de los Árboles mantiene a nivel del suelo condiciones microclimáticas de una penumbra acentuada, así como una temperatura y humedad constante durante el día y el año. Las plantas más conspicuas, que soportan estas condiciones, son algunas palmeras (como *Chasmodon* spp.), helechos y algunas gramíneas, que en conjunto no ocupan mucho espacio, de tal manera que casi todo el suelo queda descubierto (28).

El problema más grave al que se enfrentan los bosques tropicales perennifolios es el de ser considerados, sólo en la actualidad, áreas de altísima productividad. Se cree que son sistemas extremadamente fértiles y que tirando su vegetación se pueden obtener producciones agrícolas monumentales, está demostrado que esto es falso; las tierras tropicales, con excepciones muy contadas, son suelos que una vez desprovistos de su vegetación original se vuelven en extremo pobres e infértiles. No es ha entendido que este tipo de bosques existe precisamente porque hay Árboles y condiciones físicas, ambientales y biológicas específicas que los mantienen. Su riqueza reside principalmente en su variedad, la cual al mismo tiempo le confiere una extraordinaria fragilidad (14 y 32).

ALIBACIÓN ECOLÓGICA

Durante millones de años los ecosistemas han sufrido transformaciones. Cualquier ecosistema que observemos, es el resultado de un proceso continuo de cambios ocurridos en el pasado. Estos cambios pueden ser de muy diversas índole, como variaciones en el número de individuos de las especies, el remplazo de unas especies por otras, cambios macro y microclimáticos, modificaciones en la topografía, la presencia de un herbívoro o un fuego que modifica drásticamente la composición del estrato herbáceo, etc. Estos cambios están relacionados entre sí y forman una compleja red ecológica en el tiempo y en el

espacio (109). Pero los ecosistemas son capaces, lo mismo que sus poblaciones y organismos componentes, de resistir los cambios y permanecer en estado estacionario. Esta capacidad de autoconservación y autorregulación es denominada homeostasia (homeo=igual; stasia=estado) (71).

EL PROBLEMA DE LA EXTINCIÓN

Las plantas han resentido el impacto de la actividad humana sobre el ambiente y muchas especies ya se han extinguido o corren serio peligro de desaparecer. El gran número de especies existentes y el escaso conocimiento que se tiene de la flora no ha permitido precisar la tasa de extinción actual y elaborar una lista de aquellas especies que se encuentran en mayor peligro. Hasta ahora la actividad humana ha afectado fundamentalmente a especies de distribución geográfica restringida que requieren de condiciones ambientales muy peculiares. Las especies que se encuentran más amenazadas por el hombre son aquellas de lento crecimiento, ciclo de vida largo y poca potencialidad reproductiva o que presentan semillas de corta viabilidad (109).

Una de las características fundamentales de la vida es el fenómeno de la reproducción. Todos los organismos tienen la capacidad de generar otros similares a sí mismos y en esta forma perpetuar la existencia de su especie, aún cuando los organismos mueren, antes dan origen a nuevas generaciones. Por esta razón, y desde el punto de vista de nuestros intereses, catalogamos a los seres vivos como "recursos naturales renovables". Las especies de plantas no corren, en principio, el peligro de agotarse, siempre y cuando no falten las condiciones propicias para su perpetuación. Sin embargo, las especies son afectadas también por los procesos de nacimiento, vida y muerte. La diferencia principal entre especie y organismo es, en este sentido, que bien cuantitativa que cualitativa y aunque un determinado linaje vegetal puede vivir varios millones de años, al final se extingue. Si bien, la desaparición de las especies biológicas en condiciones naturales es lo suficientemente lenta como para resultar bien nivelada y a menudo superada por el desarrollo de formas nuevas, cuando la humanidad intensifica sin ningún control la desaparición de los organismos con que convive, debilita las bases mismas de su propio bienestar y de su futuro (89).

Los mecanismos mediante los cuales el hombre determina la extinción de los organismos son variados, pero a grandes rasgos pueden agruparse en dos categorías principales: directos e indirectos. Entre los primeros se encuentran la explotación y la recolección excesiva de plantas y animales. En el caso de las plantas, algunas poblaciones vegetales, por ejemplo ornamentales (orquídeas, cactáceas y palmas) y medicinales, han disminuido tan drásticamente que son difíciles de encontrar. Las formas indirectas son más devastadoras que las directas, ya que no sólo eliminan directamente a los individuos o a las poblaciones, sino también modifican las condiciones ambientales a tal grado que

hacen imposible su sobrevivencia. En México los procedimientos desordenados de colonización, de industrialización, de urbanización y sobre todo de utilización de la tierra y de los recursos acuíferos han conducido, en vastas regiones, a la extinción no sólo de especies de plantas y animales, sino de comunidades bióticas completas. Entre las más amenazadas se encuentran algunas propias del bosque tropical perennifolio que año tras año sufren una fuerte reducción; se estima que en el país no existe más del 10% de las áreas del bosque tropical perennifolio originales. Estas zonas se reducen a la zona lacandona en Chiapas (3 312 Km); la frontera de Chiapas con Oaxaca y Veracruz; algunos parches aislados en Tabasco, parte de Campeche y la zona de "Los Tuxtlas" (700 Ha) en Veracruz (34 76).

Debe mencionarse que en 1973, 21 naciones firmaron en Ginebra el Convenio Internacional sobre el Comercio de Especies Amenazadas o en Peligro de Extinción (CITES), en el cual se restringe el comercio de determinadas especies (vegetales y animales) entre los países afiliados. Sin embargo, a pesar de que en México existe un gran contrabando de este tipo de especies, es el único país latinoamericano que aún no firma este tratado, no sólo en su perjuicio ecológico sino también en perjuicio de los países afiliados ya que se ha constituido en el país donde se traen las especies contrabandeadas y de aquí se distribuyen "legalmente" a los compradores.

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), ha establecido una serie de categorías para indicar el grado de amenaza en que están las especies individuales en su hábitat natural (195). Estas categorías son:

EXTINTA (EX). - Esta categoría se utiliza únicamente para las especies que, tras repetidas búsquedas en las localidades tipo u otros lugares conocidos o probables, ya no existen en su ambiente natural. En esta categoría se incluyen a las especies que, a pesar de estar extintas en su ambiente natural, sobreviven en cultivo.

EN PELIGRO (E). - Son las especies reducidas numéricamente hasta un nivel crítico o cuyos hábitats han experimentado una reducción tan drástica que se les considera en peligro inmediato de extinción y aquellas cuya supervivencia es poco probable si siguen operando los factores causales. Esto se refiere a especies cuyas poblaciones han quedado tan limitadas que un colapso en su reproducción debida a falta de diversidad genética, las convierte en una posibilidad de extinción, independientemente de si están o no amenazadas por el hombre.

VULNERABLE (V). - Dentro de esta categoría están aquellas especies que se considera probable que pasen a la categoría "EN PELIGRO" en un futuro próximo si siguen operando los factores causales. Están incluidas: las especies de las cuales la mayoría o todas las poblaciones experimentan una disminución debida a una explotación excesiva, a una extensa destrucción de su hábitat o a otras perturbaciones ambientales; las especies cuyas poblaciones

han sido objeto de una grave reducción y cuya seguridad no se ha garantizado todavía y las especies cuyas poblaciones son aún abundantes, pero están en peligro debido a factores adversos graves en todo su hábitat.

RARA (R).- Son aquellas especies con pequeñas poblaciones mundiales que no están actualmente "EN PELIGRO" o que no son "VULNERABLES", pero que están sujetas a riesgo. Estas especies se encuentran generalmente dentro de zonas geográficas o hábitats limitados, o están distribuidas a través de zonas más amplias pero en número muy reducido. La categoría "RARA" y "VULNERABLE" se han confundido frecuentemente o se ha considerado que representan meras etapas en una escala lineal de grados crecientes de amenaza para las especies en peligro. Sin embargo, estas categorías representan el estado de las especies que se encuentran en situaciones fundamentalmente diferentes y que pueden conducir a la categoría "EN PELIGRO". Las especies "RARAS" puede que no necesiten protección activa, pero sí necesitan una vigilancia continua para garantizar su supervivencia.

INDETERMINADA (I).- Son las especies que se están incluyendo en las categorías anteriores pero sobre las cuales no se dispone de información suficiente para determinar cuál de las cuatro categorías es la correcta.

INSUFICIENTEMENTE CONOCIDA (K).- Son las especies que se desconocen, sin saberlo a ciencia cierta, que pertenecen a cualquiera de las cinco categorías precedentes, pero sobre las cuales se carece de información.

FUERA DE PELIGRO (O).- Las especies incluidas anteriormente en una de las cinco categorías, pero que actualmente se consideran relativamente seguras debido a que se han adoptado medidas eficaces de conservación o que se ha eliminado la amenaza anterior que ponía en peligro su sobrevivencia.

Un grupo de plantas que está seriamente amenazado es el de las palmas, que son componentes de muchos ecosistemas tropicales, entre ellas se encuentra el género *Chamaedorea*, bien representado en México y centroamérica, el cual comprende un grupo de palmas que por su belleza y durabilidad se han explotado en el país con fines ornamentales, exportándose a los Estados Unidos desde fines de los años cuarenta, y que han alcanzado una gran importancia económica, llegando a considerarse como "verdaderas gemas hortícolas" o "el sueño paisajístico de los arquitectos" (3 y 4).

La familia PALMACE (Arecaceae).

Una de las familias más antiguas y de más noble estirpe es la de las palmas, Linnaeus elogió a las palmas como "los príncipes del reino vegetal" y realmente merecen este título. Exceptuando la familia de las gramíneas, ningún otro grupo de vegetales es tan útil al hombre por los grandes recursos económicos que proporciona (80).

Se encuentran dentro de la clase de las Monocotiledóneas (Liliopsida), porque sus semillas tienen sólo una hoja embrionaria, la cual es gruesa y dura. Las palmas son de las primeras familias de plantas con flores que se han reconocido en el registro fósil. Las palmas más primitivas conocidas en la actualidad, son nativas de América del Sur con géneros relacionados en el sureste de los Estados Unidos, Europa y sureste de Asia (19 y 38).

La familia palmace (Arecaceae) comprende unos 211 géneros y aproximadamente 4 000 especies. Su clasificación taxonómica adaptada de Conzatti y Smith (19) y Bohlgren y Claflord (12) es:

Reino: Vegetal
Subreino: Fanerógamas
Tipo: Angiospermas
Clase: Monocotiledóneas
Superorden: Arecifloras
Orden: Arecales
Familia: Arecaceae (Palmas)

Existen cuatro formas básicas de crecimiento (hábitos) de las palmas, que son útiles para las descripciones de campo y que son: Palmas arbóreas, palmas arbustivas, palmas aculisscentes y palmas trepadoras. Para encuadrarlas dentro de los hábitos de las Monocotiledóneas pueden ser simpodiales (cespitosas o coloniales) o monopodiales (tallos solitarios). Sus tallos varían ampliamente en altura, diámetro y dureza. Son siempre "leñosas" aunque no comparables con los de las dicotiledóneas, cuya dureza es debida al xilema secundario mientras que en las palmas depende de la abundancia de fibras y esclerenquemas. La presencia de sílica en muchas palmas puede ser también un factor para su dureza (38).

La hoja es el órgano más conspicuo y distintivo de las palmas. Se caracteriza por una cubierta que envuelve el tallo. Generalmente presentan un peciolo y una lámina formada por un eje central (costa o raquí) el cual es corto en las hojas palmadas, más desarrollado en las hojas costapalmadas y prominente en las hojas pinnadas. La lámina o limbo de las hojas maduras puede ser completa, bifida en el ápice o dividida en unidades que se denominan segmentos, en las hojas palmadas y costapalmadas, y pinnas o folíolos en las hojas pinnadas. La evolución de la hoja no es clara y esta sujeta a especulación. Eames (19) y Moore y Whi (58) indican que si se compara la distribución de palmas con los dos tipos de láminas es claro que aquellas con láminas palmadas y costapalmadas muestran una marcada asociación con

climas estacionales (especialmente tropicales) o hábitats más abiertos, mientras que las de lámina pinnadas tienen relación con climas tropicales, lo cual sugiere que la presencia de hojas pinnadas es una adaptación a condiciones de menor luminosidad ya que tales hojas exponen una mayor superficie fotosintética en relación con el tamaño y volumen del tallo, suministrando mayor energía.

El patrón floral básico en las palmas es trimero con tres sépalos imbricados, tres pétalos imbricados, seis estambres y tres distintos carpelos uniovulados. La reducción de la flor perfecta a la flor unisexual es producida por la absorción ó pérdida del gineceo ó del androceo. El polen es monolepido, a excepción del grupo Nipoide. El número cromosómico (n) va de 18 en las palmas más primitivas (línea Coryphoide) a 17, 16, 15, 14 y 13 en los grupos más avanzados. El fruto generalmente tiene una pared carnosa y una o, menos frecuentemente, dos a diez semillas. Su tamaño es muy variable (de 4.5 mm a 50 cm). El mesocarpo contiene cristales, fibras, escleroides fibrosas, esclerénquimas, y taninos, posiblemente tiene una función de protección. La semilla es ovoida, elipsoide o globosa, varía en tamaño pero siempre contiene abundante endospermo, el cual puede ser homogéneo o ruminado. Para germinar, la mayoría, requieren de humedad y oscuridad, por lo que son muy vulnerables cuando el bosque es cortado (56).

En la siguiente tabla se presenta una lista con las principales líneas y grupos de palmas, según Moore (53), y adaptada de Moore y Uhl (58) y Voviden (112).

GRUPO	G E N E R O S		
	Nuevo mundo	Viejo mundo	Total
Línea Coryphoide			
Grupo Coryphoide	16	16	32
Grupo Phoenicoide	--	1	1
Grupo Borasoide	--	6	6
Línea Lepidocaryoide			
Grupo Lepidocaryoide	3	20	23
Línea Nyppoide			
Grupo Nyppoide	--	1	1
Línea Caryotoide			
Grupo Caryotoide	--	3	3
Línea Arcoide			
Grupo Pseudophoenicoide	1	--	1
Grupo Ceraxoide	2	2	4

CONTINUA ...

Continuación ...

GRUPO	GÉNEROS		Total
	Nuevo mundo	Viejo mundo	
Grupo Chamaedoreoide	5	1	6
Grupo Iriarteoide	0	--	0
Grupo Podococcoide	--	1	1
Grupo Arecoide	10	78	88
Grupo Cocoseide	24	3	27
Grupo Geocoseide	6	--	6
Grupo Philtelephantoide	3	--	3
			313

EL GÉNERO *Chamaedorea*.

El género *Chamaedorea* pertenece al grupo Chamaedoreoide de la línea (subfamilia Arecoideae. Por su extensión es el género más numeroso del grupo de las palmas y a la vez uno de los más deficientemente conocidos. Comprende más de 100 especies que se extienden desde el centro de México hasta Brasil y Bolivia, encontrándose la mayoría en centroamérica, especialmente en México, que posee 43 especies, Costa Rica, con 16 especies y Panamá, con 19 especies (10, 54, 70 y 96).

Son plantas no ramificadas (a excepción de *Ch. palmetiformis* Mart., que es dicotómicamente ramificada), erectas ó prostradas; los tallos son solitarios (monopodiales) ó pueden presentarse en grupos (simpodiales), muy delgados pero fuertes, verdes y presentan cicatrices foliares anulares; sus hojas son simples ó bifidas, raramente redondeadas en el ápice ó pinnatifidas; las pinas son anchas ó angostas, escasas ó numerosas, frecuentemente un poco oblicuas ó sigmoides, acuminadas, nervoplegadas, con venación esencialmente paralela; el peciolo es usualmente delgado y cilíndrico, con base corte ó alargada, tubular; espádices (inflorescencias) nacidos entre ó debajo de las hojas, simples ó ramificados, con pedúnculo corto ó alargado, las ramas escasas ó densamente floridas; espatas en número de tres ó más, elongadas y cubriendo el pedúnculo, hendidas en el ápice, coriáceas ó membráceas, más ó menos persistentes; flores dioicas, sésiles ó subsésiles en el espádice, pequeñas ó diminutas, abracteadas y abracteadas; cáliz estaminado cupuliforme, entero, trilobado ó tripartido, los tres pétalos libres ó connatos de distintas formas, los lóbulos ó segmentos valvados; seis estambres, el filamento corto, amplio ó subulado, las anteras fijas dorsalmente; cáliz pistilado parecido al de las flores estaminadas, los pétalos generalmente connatos, valvados ó imbricados; ovario trilocular, estigma diminuto, recurvado; el estilo solitario, basal, erecto; fruto pequeño, compuesto de 1 ó

algunas veces 2 ó 3 carpelos, globoso u oblongo, los estigmas basales, el pericarpio coriáceo (meco) ó carnoso, escasamente fibroso; semillas pequeñas (en promedio 0.85 cm), erguidas, globosas ó elipsoides, con un hilum basal pequeño, las fosificaciones del rafe oscuras, el endospermo cartilaginoso, uniforme, embrión basal ó dorsal; se reporta un número cromosómico haploide (n) de 13 (10, 54, 58, 94 y 95).

En México las especies de palma cascador se distribuyen en zonas de selva alta y selva baja perennifolia y en zonas de selva alta o mediana subperennifolia. La distribución actual (fig. 2) de la palma se concentra en las áreas de la serranía de los estados de Oaxaca, Tabasco, Chiapas, Veracruz, Campeche y Quintana Roo, entre los 750 y 1 800 m.s.n.m. Se han encontrado a 92 m.s.n.m. en Santo Domingo, Oaxaca, dentro de un área de selva virgen (91).

Las palmas cascador se desarrollan en el estrato inferior del bosque tropical perennifolio en condiciones de escasa luminosidad y alta humedad relativa. Son consideradas como constituyentes de la vegetación primaria; la naturaleza primaria o secundaria no es definitiva ya que se pueden comportar como una o como otra indistintamente (33). Aunque se adaptan a diferentes condiciones de suelo y clima son muy susceptibles a las perturbaciones, naturales o artificiales, de su ambiente. Presentan un mejor desarrollo en suelos con buen drenaje, como los laterocólicos féreos, los redimicos y los vertisoles. La mayoría de estos suelos son someros pero contienen gran cantidad de materia orgánica en descomposición. En lo referente a clima, su distribución se circunscribe al Área delimitada por García (29) como la zona cálida-húmeda de México con tipos de clima cálido (A) y semicálidos (A/C y A/C' en sus diferentes subtipos en cuanto a regímenes de humedad, que van desde lugares con lluvia todo el año hasta regiones subhúmedas en donde llueve únicamente en verano (88 y 91).

Las especies mexicanas de este género, como muchas otras de la familia, son muy poco conocidas. Algunas de ellas han sido descritas a partir de plantas cultivadas y todas están pobremente representadas en herbarios (94).

Para México, Guero (78), registra las siguientes 43 especies, aunque indica que este número no es exacto pues existen sinonimias dentro del género, además que se han colectado especies que antes sólo se conocían en Centroamérica:

Ch. adspedens (Cavender) Burret	Ch. metallica Cook ex Moore
Ch. affinis Lieke	Ch. micropedix Burret
Ch. alacranus Wendl.	Ch. monstachya Burret
Ch. areoligemma Wendl.	Ch. nodosa Lieke
Ch. alicicoides Mart.	Ch. osucobliana Burret
Ch. catenocarpus Lieke	Ch. rubrus St & Ste.
Ch. condolae Mart.	Ch. shiodesma Mart.
Ch. elatior Mart.	Ch. scopioides Lieke, ex Mart.
Ch. sissens Mart.	Ch. serotina Wendl.



Fig.1 Regiones Tropicales de México.



Fig.2 Distribución y Zonas de Cultivo de la Palma Comedor (Batúla y Cherbonnier, 1981).

Ch. crumena Moore
Ch. crinito-augustii Wendl.
Ch. fuscum Moore
Ch. flavovirens Wendl.
Ch. spongosa Forst. Wendl.
Ch. glaucifolia Wendl.
Ch. humilis Mart.
Ch. karwinskyana Wendl.
Ch. macrochaeta Wendl.
Ch. lapidata Wendl.
Ch. liebmannii Wendl.
Ch. tessellata Liebm.

Ch. buchulensis Liebm.
Ch. radicalis Mart.
Ch. polystachya St & Ste.
Ch. sectorii Liebm.
Ch. scandens Liebm. ex Burret
Ch. schubertiana Mart.
Ch. schippii Burret
Ch. seifritzii Burret
Ch. simplex Burret
Ch. stolonifera Wendl.
Ch. stellata Wendl.
Ch. tuncubensis (Dowd) Burret
Ch. wendlandiana Carst.

Debe mencionarse que, a pesar de los esfuerzos realizados, la clasificación botánica de estas palmas se presta todavía a confusión por lo que es necesario que los especialistas establezcan una ordenación del género en forma definitiva.

El género está formado por palmas de diferentes tamaños, desde pequeños, como *Ch. humilis* de 30 cm de altura, a nodosados, como *Ch. tessellata* de 1.5 m (3). Oyama (72) señala que en los Tuxtlas, Veracruz, llegan a alturas máximas de 6 m.

Tomando en cuenta las características del tallo de algunas especies, Mc Currah (54) hace la siguiente clasificación :

a) Palmas de tallo múltiple (p.ej. *Ch. crumena*, *Ch. seifritzii* y *Ch. stolonifera*).

b) Palmas de tallo o de tallos trepadores (p.ej. *Ch. desmanoides* y *Ch. elatior*).

c) Palmas de tallo simple con hojas no divididas (p.ej. *Ch. crinito-augustii* y *Ch. spongosa*).

d) Palmas de tallo simple con hojas pinnadas (p.ej. *Ch. sectorii* y *Ch. tessellata*).

e) Palmas de tallo corto o ausente (p.ej. *Ch. sessilis* y *Ch. radicalis*).

La germinación de la semilla en condiciones naturales varía de acuerdo a la especie, pero de manera general puede decirse que es un proceso lento cuya duración puede ser de 2 a 7 meses (p.ej. *Ch. crumena* tarda 222 días en germinar) (3, 54 y 59).

Cuando el fruto está maduro, el embrión comienza a tener una pequeña diferenciación: pueden distinguirse, como una pequeña masa cilíndrica, los ápices del tallo y de la raíz; el primero apunta hacia adentro del endospermo y el segundo con dirección hacia el exterior. En esta etapa el embrión, a través del cotiledón, procede a nutrirse del endospermo de la semilla. Aparentemente, la superficie del cotiledón secreta enzimas que hidrolizan las proteínas, aceites y la reserva de celulosa de

las células del endospermo, por lo cual estas células mueren y son más o menos asimiladas; el cotiledón se ensacha y continúa digiriendo hasta que absorbe prácticamente todo el endospermo y ocupa su lugar. Este proceso hace que se desarrolle una papilla en la región de contacto entre el cotiledón y el endospermo. No es fácil indicar el momento en que el embrión está absorbiendo al endospermo, sino hasta que otras partes son expulsadas de la semilla. Entonces es evidente que la plántula emerge por la elongación del epicótilo. La plántula no tiene dificultad en forzar su salida fuera de la semilla ya que la delgada capa fibrosa del endocarpo es fácilmente rota e incluso puede caerse sola durante la etapa de germinación. La plántula es empujada fuera de la semilla y, al mismo tiempo, se desarrolla la radícula para fijarse al suelo. La raíz primaria es de vida corta y es seguida por la aparición de raíces adventicias formadas en la base del tallo de las plántulas, las cuales se originan en el pericilio que se encuentra opuesto a los polos del xilema y surgen por pequeñas rupturas de la epidermis. Así son añadidas raíces adventicias durante toda la vida de la planta (10 y 12).

Las hojas se desarrollan de la única yema apical a manera de conos invertidos, uno sobre el otro; el más pequeño y joven hacia adentro y el más desarrollado hacia afuera. El primordio foliar surge como un recrecimiento del ápice del tallo. El joven primordio pronto parece más una caperuza que un casco. La superficie externa, que queda más a la vista, corresponde a la superficie inferior de la futura lámina de la hoja, su superficie interior, más estrecha, será la futura superficie superior de la lámina. Las futuras pinnas aparecen primero como una serie de rizos o crestas sobre la superficie de la lámina, algo separadas de sus bordes. Lo que hace singular en el desarrollo foliar a esos pliegues es su restricción espacial: nunca se extienden, por ejemplo, hasta los bordes de la lámina, con lo que la hoja un crecimiento lleva una banda de tejido no plegada alrededor del perímetro. De igual forma, en el asentamiento de las pinnas, los pliegues se extienden hasta una distancia muy corta del nervio medio foliar. A medida que crece la hoja, aparecen nuevos pliegues. La mayoría se añaden hacia la base de la lámina, pero algunos pueden aparecer hacia el ápice. El número total de pliegues corresponde normalmente al número de pinnas que se encuentran en la hoja madura y, por lo tanto, el desarrollo de los pliegues adicionales termina cuando se ha alcanzado aquel número. En esta etapa los pliegues se hallan fuertemente comprimidos. El proceso de separación se realiza a lo largo de las crestas de la superficie externa de lo que será la superficie foliar interior (envés); en la parte superior de la cresta se forma una indentación que, a medida que se efectúa la separación, se transforma en una ranilla muy nítida. El proceso da lugar a pinnas individuales en forma de "V" (45).

La siguiente fase, la más complicada, tiene lugar cuando los pliegues se han hecho más profundos. Las etapas son dos: separación de los pliegues en pinnas individuales y pérdida del tejido de la banda periférica de la lámina foliar que sus enlaces a las pinnas por sus puntas. En la primera etapa los pliegues adyacentes se separan entre sí, aunque no se conocen en detalle

las peculiaridades celulares del proceso, se supone que la separación se efectúa por desintegración de la sustancia cementante intercelular a lo largo de la línea de separación. Se sabe con certeza que no está implicada la muerte selectiva de las células, pues no hay señal de daño o destrucción celular a lo largo de la separación. Aún cuando las pinnas permanecen unidas a la banda de tejido marginal de la lámina. Esta situación no durará mucho tiempo, aunque tras el inicio de la ruptura del tejido puedan permanecer unidas a las puntas de las crestas de las pinnas, bandas casi separadas del margen (45).

Existen dos hipótesis acerca de la forma en que se originaron los plegamientos de la hoja. La primera propone que el plegamiento resulta de un doblez inicial producido por crecimiento diferencial en la lámina joven de la hoja. La segunda sugiere que el plegamiento comienza con un proceso inicial de separación de tejidos, al que sigue un crecimiento diferencial. De estas dos hipótesis la primera es la más factible (45 y 112).

Las pinnas son reduplicadas (tipo techo) y no existe una penna terminal en la hoja. Al brotar la hoja joven está apretada en forma de espada, después se extiende adquiriendo su forma típica. Existe un número de hojas, relativamente constantes, que forman la corona. Este número es el mismo para las hojas en formación sobre la yema apical: entonces cuando muere y cae una hoja vieja, ya está extendiéndose una nueva en el centro de la corona. Las hojas viejas, al desprenderse, dejan un patrón de diatrices que dan un relieve particular al tallo (112).

La época de floración depende de la especie y de su ambiente. Para *Ch. lepidiote*, Oyama (73) indica que es de septiembre a octubre. Para las especies de la selva lacandona, Saldívar y Charbonier (91) reportan los meses de enero y abril, encontrando el fruto maduro en junio-agosto; en Iamazunchale, San Luis Potosí, la semilla se colecta durante la temporada de septiembre-noviembre. La forma de dispersión de la semilla no se conoce con exactitud, pero probablemente es realizada por aves debido al síndrome de dispersión que presentan sus frutos maduros (33 y 103).

Las inflorescencias (espádices) son de muchos tipos. Algunas se extienden por arriba de la corona de hojas, mientras otras crecen debajo de la misma. Las flores y espádices varían de especie a especie e incluso entre individuos de la misma especie, pero de distinto sexo.

La polinización de este tipo de palmas parece ser realizada por insectos ó por el viento, aunque no se ha confirmado. Se ha encontrado que las inflorescencias esterilizadas aparecen polen viable durante una semana. Durante este tiempo los pétalos adquieren un color brillante (anaranjado ó amarillo) y las flores emiten un fuerte olor dulce, mientras que las flores pistiladas toman también un color brillante pero despiden un leve olor aromático picante. Los estigmas se tornan hómidos y permanecen perceptivos por una semana, lo cual sugiere que algunas especies

pueden ser polinizadas por insectos. Por otro lado, *Ch. chinensis* Wendl., y otras especies producen grandes cantidades de polen seco y pueden ser polinizadas por el viento (38).

El jugo de los frutos maduros tiene efectos sobre la mucosa nasal y al ponerse en contacto con la piel provoca la sensación de ardor y cohesión, sin embargo, no existe información sobre la composición química de este líquido (95).

USOS.

En un estudio realizado por Caballero et al (4) sobre la flora útil y el uso tradicional de las plantas, se reportan los siguientes usos para el género *Chamaedorea*: doméstico (*Ch. chinensis*) y comestible (*Ch. repens*). El uso doméstico comprende la utilización de la raíz para la elaboración de utensilios domésticos ó para elaborar materiales de empleo común en la casa, tanto para la cocina como para el aseo en general y otros fines. Como comestibles son utilizadas las inflorescencias estaminadas, blanquecinas y tiernas; se consumen como ensalada, preparadas con huevo y de otras maneras. En el occidente de Guatemala se venden grandes cantidades de inflorescencias estaminadas que no han abierto (las inflorescencias pistiladas no son usadas) y con ellas se elabora un platillo llamado "bojón" que es elaborado con estambres jóvenes y, algunas veces, yemas foliares (95). Estos usos se les dan entre los lacandones (Chiapas), chinastecos (Quetzal) y totonacos (Veracruz) y es debido a ellos que las palmas caesler se han constituido como un vegetal excelente y muy popular localmente.

Sin embargo, el uso que les ha proporcionado un prestigio internacional y les ha establecido como plantas de una gran importancia económica es el ornamental. En todo el mundo han sido utilizadas como plantas de interior por muchos años, siendo común encontrarlos en hogares, hoteles, oficinas, etc. Algunos jardines de los E.U. (p. ej. Balboa Park, Huntington Garden y Fairchild Tropical Garden) poseen ejemplares de este género (4 y 86).

Su gran importancia ornamental reside en que posee las siguientes características(3 y 4):

- Belleza. La variedad de formas y estructuras, que se caracterizan por ser pequeñas y delicadas, les hace tener una escala arquitectónica agradable. Cuando son jóvenes poseen el atractivo de una miniatura y cuando entran a su ciclo reproductivo este atractivo se incrementa por la presencia de flores y frutos coloridos que contrastan con el verde follaje.

- Tolerancia a la sombra. Una de las virtudes principales de las *Chamaedoreas* es su capacidad para crecer exitosamente en sitios donde la cantidad de luz es poca, como el interior de hogares, patios, etc. Esta característica les está dada naturalmente ya que son especies que viven en el piso de la

salva.

- Resistencia al frío. Numerosas especies del género *Chamaedorea* sobreviven a temperaturas un poco menores de 0°C. lo que les permite crecer en áreas semitropicales y templadas, mientras que palmas de otros géneros nativos del mismo tipo de vegetación son afectadas ó mueren a esta temperatura e incluso a algunos grados arriba de ella. Esta resistencia no es común a todas las especies del género pero sí en muchas de ellas, como las que se encuentran en cultivo al sureste de Francia, Italia y los E.U. (Florida y California) las cuales, en su mayoría, son nativas de México y centroamérica. Se reporta que una especie, *Ch. acrostichoides*, puede soportar temperaturas de -7 °C. Una teoría para explicar la dureza de este género indica que hace miles de años estas plantas habitaban tierras altas y estaban adaptadas al frío y que poco a poco fueron desplazadas a tierras bajas pero retuvieron su resistencia al frío a pesar del cambio altitudinal.

- Resistencia a la sequía. Muchas especies provienen de regiones donde son escasas las lluvias en ciertas estaciones, lo que las hace resistentes a la sequía y, en consecuencia, resistentes al abandono, es decir, no requieren de riegos continuos.

Otro tipo de uso que se les da a estas plantas es el utilizar sus grandes hojas con fines decorativos en ocasiones festivas, tanto en el interior como en el exterior de los hogares, en adornos y arreglos florales y para formar arcos en calles y casinos (88). También se les puede ver en los mercados del país como un adorno de los puestos.

PROBLEMÁTICA E INESTABILIDAD ECONOMICA.

En el país, la palma casador es un recurso no agotable cuyo follaje se ha explotado con fines de ornato. La exportación masiva de estas palmas a los E.U. se ha mantenido desde los años cuarenta hasta la fecha. Por su manejo sencillo y su relativa abundancia resulta altamente atractiva para los intermediarios y exportadores, siendo una alternativa económica para los campesinos, la cual les permite obtener ingresos en forma inmediata dada su fácil comercialización, esto, aunado al hecho de que la recolección de las hojas no los distrae de sus labores agrícolas, ya que es realizada por las mujeres y los niños (91).

Lo anterior ha atraído fuertemente el interés por su explotación provocando, como consecuencia, la destrucción de las poblaciones debido a las labores de colecta. En la actualidad las cantidades extraídas de palmas casador se han incrementado sorprendentemente poniendo a este género al borde de la extinción. El agotamiento de este recurso, extendido ya a nivel nacional, se debe a factores tanto técnicos como socioeconómicos, los cuales han influido directa e indirectamente en su

disponibilidad.

Entre otros factores, Saldivia y Charbonier (91) mencionan los siguientes:

a) MANEJO INADECUADO.

Como ya se mencionó, el corte de las hojas se realizado muchas veces por cortadores inexpertos (principalmente niños) lo que provoca daños a las plantas e incluso su muerte. Así también la recolección masiva de las semillas para su venta reduce las posibilidades de regeneración y extensión de las poblaciones naturales, ya que su propagación se realiza principalmente por semillas.

b) SOBREEXPLOTACION.

Esta es la causa principal del agotamiento del recurso, ya que no se respetan los ciclos de corte de hoja (dos o máximo tres al año), defoliando la planta hasta su muerte.

c) DESMONTES E INCENDIOS FORESTALES.

La agricultura y los efectos resultantes de los incendios han ido limitando y reduciendo paulatinamente, y de forma irreversible, las áreas naturales de desarrollo de las palmas.

d) CAMADERIA Y MONOCULTIVOS COMERCIALES.

A este tipo de actividades se las da mayor importancia, tanto de parte de particulares como del gobierno, lo que repercute negativamente en la preservación de los hábitats de la palma.

e) FALTA DE COORDINACION INSTITUCIONAL.

La falta de disposiciones legales, o el solo caso que se hace de las ya existentes, para acabar con las irregularidades en la explotación de la palma y con el contrabando de la misma, también a contribuido para que se presente la carencia de medidas que ayuden en la conservación y aprovechamiento de este recurso natural.

Los principales estados donde se extrae la palma cameder, las regiones así como los nombres comunes que se aplican a la palma cameder en México son:

Estado	Región	Nombre común
Chiapas	Selva Lacandona	Cambray, maya, palada y shate o xate.
	Arriaga	Chiapas, cazador, tepe, caracocillo, chapana, oreja de conejo, jada, cola de pescado y cambray
Veracruz	Los Tuxtlas	Carricillo, mayan, negrita y tepajilote.
	Juchitán de Ferrer	Brillisco, tepajilote, ancho y penatillo.
San Luis Potosí	Tamazunchale	Palmilla y corceillo.
Oaxaca	Tuxtpec	Ancho o tepe suave ancho y cazador.
Tabasco	Tenosique	Shate, cambray y guayita.
Tamaulipas	Midalgo	Tepe duro, brillante y ancho.
Yucatán		Xiat.

En algunas de estas regiones existen viveros comerciales donde se propaga por semillas a la palma cazador con fines comerciales.

Los bosques tropicales perennifolios de nuestro país son el principal proveedor de palma cazador a los E.U. y, según datos aportados por el "Market News Division Fruit Vegetable", organismo oficial estadounidense (ya que en México no existen datos oficiales), se estima que las exportaciones mexicanas de palma cazador pasaron en el período de 1982 a 1986, de 246 millones de hojas a 309 millones, alcanzando un valor comercial de 17 millones de dólares. Actualmente se sigue explotando la palma cazador, sobre todo en las reservas "El triunfo" y "La Lacandona" del estado de Chiapas, zonas en donde se corta el 33% (160 millones de hojas anuales) de la producción nacional (2).

Como un ejemplo de la metodología de comercialización de este recurso se tiene lo siguiente: de acuerdo a datos proporcionados por el Sr. Francisco Alvarez (1) en Oaxaca, los campesinos forman paquetes de 125 hojas. Estos paquetes los dejan a la orilla de la carretera, son recogidos y llevados al centro de acopio en donde se realiza la selección de las hojas, desechando las maltratadas, amarillas, etc. Con las hojas seleccionadas se forman "atados" de 25 piezas con los cuales se hacen bultos de diez (250 hojas) por los cuales pagan 30 dólares. A la semana salen del centro tres camiones cargados con 200 bultos cada uno (3 camiones X 200 bultos X 250 hojas = 150 000

hojas) y un casión refrigerador (Fersolkín) del cual no se especificó la cantidad que transporta.

En un documento oficial de la SARN con fecha del 24 de mayo de 1965 se autorizó la primera de seis anualidades para el aprovechamiento de 47 toneladas anuales de hoja verde de palma cascador en el ejido "El vergel" municipio de Filiztapan, Chiapas, distribuidas en tres cortas por anualidad. El documento está avalado por sellos oficiales y por la firma del Delegado estatal de la SARN.

En otros documentos oficiales se autorizó a diferentes intermediarios, la comercialización de 234 238 Kg de hojas (en 4 meses) (1).

Por otra parte, Balboa (2) hace la siguiente denuncia: "Las palmas cascador recolectadas en las reservas naturales de Chiapas son transportadas a E.U. por casiones refrigeradores de la empresa "Transportes Unidos S.A." y "Transportes Aguirre S.A." propiedad del carpintero Carlos René González. La mayoría de las hojas recolectadas son transportadas a San Antonio Texas, lugar en donde se encuentra establecida la única compañía importadora de palma que existe en E.U.; "The Continental Wholesale Florist", por lo que el comercio de la palma cascador constituye un negocio lucrativo para un grupo de políticos mexicanos y estadounidenses, quienes a través de la explotación y deforestación de las selvas mexicanas, obtienen ganancias exorbitantes."

A lo anterior se debe agregar la extracción "legal" o ilegal, de una gran cantidad de semillas de este género, tanto para el consumo local como internacional, para su germinación en viveros.

En últimas fechas los E.U. compran a México directamente las plántulas de las palmas por lo que ha disminuido el contrabando de semillas (3). Sin embargo, las semillas de donde provienen estas plántulas son originarias del mismo sitio, la selva, por lo que el saqueo continúa sólo que el dinero cambia de mano.

En los E.U. la venta de plantas ornamentales registra un alto orden de importancia. Económicamente, la industria de plantas ornamentales ocupa un segundo lugar comparado con el cultivo de plantas para la alimentación; cerca del 1% o más del producto nacional bruto es gastado en la compra de plantas ornamentales. La demanda de cormos, bulbos, rizomas y herbáceas perennes es constante. La producción de arbustos ornamentales y árboles de sombra es el sostén de la industria de los viveros y comprende aproximadamente la mitad de los cultivos; abarca el 40% de este tipo de agricultura (44).

Estos datos dan una idea de la devastación y explotación indiscriminada e irracional que sufren las palmas cascador en México, así como el alto grado de corrupción existente en su manejo.

Lo anterior ha puesto en peligro de extinción a las especies del género *Chamaedorea*, por lo que es necesaria la implementación de opciones técnicas, científicas y socioeconómicas que permitan una utilización que sea redituable y al mismo tiempo racional de este recurso, ya que de otra manera dentro de poco tiempo se perderá. En 1981 Vovides (113) reportó, en una lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción, ocho especies del género *Chamaedorea* en diversos niveles de peligro:

Especie	Categoría	Localización
<i>Ch. gigantea</i> Mart.	(indeterminada)	Veracruz y Oaxaca.
<i>Ch. coccinifera</i> Wendl.	(vulnerable)	Veracruz, Chiapas.
<i>Ch. ligustrioides</i> Wendl.	(rara)	Veracruz
<i>Ch. aculeata</i> G.F.Cook	(extinta)	SE de México.
<i>Ch. coccinifera</i> Burret	(indeterminada)	Veracruz.
<i>Ch. schottiana</i> Mart.	(indeterminada)	Veracruz.
<i>Ch. aculeata</i> Burret	(vulnerable)	Tabasco y Yucatán.
<i>Ch. biologicata</i> Wendl. Hook	(indeterminada)	Sur de México.

Para 1988 el INIREB (41) agregó una especie más:

<i>Ch. leucostachya</i> Burret	(extinta)	Veracruz.
--------------------------------	-----------	-----------

Debido al peligro de extinción de la palma caedera el gobierno de México, a través de la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDEUE) está propiciando y apoyando, los estudios técnico-científicos que permitan la optimización del uso de este recurso natural.

La técnica que se propone para emplear en México, y otros países en situación similar en lo referente a recursos bióticos utilizados indiscriminadamente, es el cultivo de tejidos vegetales, que aplicado a la recuperación y/o propagación masiva de germoplasma valioso pueda tener importantes repercusiones a nivel ecológico, económico y social.

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

En la naturaleza las plantas superiores se conservan a lo largo del tiempo siguiendo dos mecanismos principales: la reproducción sexual y la propagación vegetativa, con diferentes características entre sí (33).

El Cultivo de Tejidos es una descripción genérica que abarca el cultivo, en condiciones asépticas, in vitro de semillas, órganos, embriones, tejidos, células o protoplastos en un medio nutritivo artificial complementado con fitoreguladores del crecimiento y vitaminas, bajo condiciones ambientales controladas, con el fin de lograr el desarrollo de plantas completas o obtener sus metabolitos secundarios (37).

El cultivo de tejidos ha sido empleado en estudios de anatomía vegetal, citodiferenciación, en la producción de plantas

haploides, para crear híbridos por fusión de protoplastos, para duplicar el número cromosómico, en el estudio del "cáncer" de las plantas, la fisiología de los tumores y la producción de plantas libres de patógenos (15, 65 y 92). Sin embargo, posiblemente en ninguna otra área del aprovechamiento se ha utilizado tan eficientemente con fines de propagación como en el cultivo de flores y plantas ornamentales. Este proceso consiste en el incremento masivo de individuos mediante su fragmentación y posterior desarrollo en plantas completas de dichos fragmentos en condiciones artificiales. Esta aplicación sólo se justifica en aquellas especies de alto valor individual, de lenta o deficiente propagación en condiciones naturales, para obtener poblaciones genéticamente uniformes (clonas) o para disponer de plantas durante todo el año (56).

Esta eficacia se explica fácilmente por las ventajas que ofrece la técnica, entre las que están :

- Multiplicación masiva (miles o millones de plantas en un espacio reducido).
- Disminución del tiempo de propagación de cada planta.
- Obtención de plantas durante todo el año.
- Producción de plantas libres de patógenos.
- Preservación y multiplicación de germoplasmas valiosos.
- Exportación de plantas in vitro.
- Clonación de híbridos exitosos o de alto valor económico.

ANTECEDENTES DEL CULTIVO IN VITRO DE LA FAMILIA PALMAE.

Los estudios que utilizan la técnica del cultivo de tejidos sobre palmas son poco comunes debido a las dificultades que presentan. Las palmas son monocotiledóneas y se considera que este tipo de plantas son más difíciles para cultivar in vitro, en comparación con las dicotiledóneas. Las investigaciones se concentran principalmente en tres especies debido a su ancestral importancia económica y alimenticia: *Cocos nucifera* (palma de coco); *Eoenix dactyloifera* (palma datilera) y *Elaeis guineensis* (palma aceitera) (24, 48, 49 y 86).

Los estudios sobre *Cocos nucifera* fueron iniciados a principios de los años cincuenta por Cutter y Wilson (11), quienes estudiaron los efectos del endospermo de coco y otros estimulantes del crecimiento natural sobre el desarrollo in vitro de embriones de esta especie. Posteriormente Bouvens (20 y 21) utilizó indúlcios de palmas maduras para cultivarlos in vitro

y determinar sus requerimientos minerales, así como su respuesta a diferentes fitohormonas. En 1977, Eeuwens y Blake (22) cultivaron *in vitro* inoculos de esta palma, con el fin de propagarla masivamente. Fisher y Tsai (25), en 1978, elaboraron un medio nutritivo para germinar embriones y obtener tejido calloso. Jagadeesan y Padmanabhan (42) en 1982 al trabajar con embriones obtuvieron callo cotiledonar el cual logró enraizar. En el mismo año, D'Souza obtuvo la embriogénesis somática (17) y Fennetier y Buffard lograron lo mismo pero utilizando tejido foliar (74). En 1983, Branton y Blake (6) y Gupta et al., en 1984 (38), obtuvieron estructuras organizadas (organogénesis) y embriogénesis somática. Entre los avances que se han logrado está la organogénesis, la embriogénesis somática, el rescate de embriones, así como los inicios en el cultivo de anteras y en el aislamiento y fusión de protoplastos (49).

Las investigaciones sobre el cultivo *in vitro* de *Eoenias dentriflora* las han realizado, entre otros, Eeuwens (21), Eeuwens y Blake (22) quienes estudiaron los efectos de los nutrientes orgánicos y de las fitohormonas sobre los inoculos de esta especie. Euwani (85), investigó la embriogénesis somática y la organogénesis. Reynolds y Murashige (57) demostraron que el geroporo de las semillas contiene secciones de óvulo que son capaces de producir callo a partir del cual, al subcultivarlo, se puede lograr la embriogénesis somática. En 1979, Tissarat (97) obtuvo plántulas al utilizar inoculos de yemas laterales, puntas de brotes, embriones y porciones de tallo y raquilla. Tissarat y De Mason (100) en 1980, realizaron un estudio histológico comparativo entre los embriones zigóticos y somáticos en diferentes estados de desarrollo. En 1982, Ulrich et al., (106) aplicaron un tratamiento criogénico sobre el callo embriogénico y observaron su respuesta *in vitro*. En 1983, Tissarat (98) propuso un nuevo método para propagar cultivos comerciales adultos de esta especie. En 1985, Gehr y Tissarat (27) estudiaron la influencia del tamaño del inoculo, la composición y estado físico del medio nutritivo sobre el establecimiento de puntas de brotes de estas palmas. Los logros obtenidos han sido la embriogénesis somática, organogénesis y el cultivo de meristemas apicales (49).

En cuanto a *Elaeis guineensis* se ha logrado el cultivo de meristemas apicales, embriogénesis somática y el rescate de embriones (49). Hebochault junto con otros científicos (79 y 80) viene realizando estudios sobre los requerimientos minerales y la fisiología *in vitro* de esta palma desde 1962. Staritsky (96), en 1970, describió un procedimiento para estimular la formación de plántulas a partir de ápices de tallo; la técnica tiene el inconveniente que el corte del ápice produce la muerte de la planta donadora y sólo se obtiene una plántula por cada ápice. Turham y Northcote (104) correlacionaron los cambios en la composición de la pared celular con la actividad de la acetil-CoA carboxilasa y la aplicaron como un indicador de embriogénesis. Hanover y Hanover (36) en 1984 investigaron la inhibición y la estimulación de la embriogénesis en inoculos foliares. En 1986, Mwankwo y Erikorian (70) investigaron el potencial morfogenético de embriones y plántulas derivadas de callo obtenido *in vitro* de

Platanus guianensis. En 1988, Duval et al., publican un artículo acerca de las estrategias y resultados obtenidos en la multiplicación vegetativa de esta especie (18).

Con lo que respecta a las palmas ornamentales, los primeros en aplicar el cultivo de tejidos para realizar estudios sobre su posible regeneración fueron Reynolds y Murashige (87), quienes utilizaron las especies *Howea forsteriana* y *Chamaedorea seifritziana*; ellos reportaron haber obtenido embriogénesis somática a partir de callo obtenido de inóculos de embriones; observaron también regeneración de plantas a partir de inóculos de inflorescencias de *Ch. seifritziana*. Las dos especies respondieron a la regeneración al aplicarles el siguiente método: Los inóculos de inflorescencias cultivados en presencia de 100 mg/l de 2,4-D produjeron callo y embriones somáticos; el subcultivo de estos tejidos en un medio carente de 2,4-D permitió el desarrollo de los embriones a plántulas. Los mismos tipos de inóculos formaron brotes de manera directa debido probablemente a una reversión de los meristemas regenerativos. Estos brotes continuaron multiplicándose en un bajo porcentaje (86).

Recientemente se logró cultivar in vitro otra especie de palma ornamental, la llamada palma de navidad (*Yuletia parvifolia* (Becc) H.E. Moore) utilizando el medio Murashige y Skoog (82) logrando la embriogénesis somática y la formación de plántulas a partir de callo obtenido a partir de embriones somáticos (93).

Zaid y Tissierat (118) en 1982 estudiaron la respuesta morfológica de embriones de diversas palmas in vitro. Los resultados de ese trabajo son ampliados por Tissierat en 1988 (99). En el mismo artículo, Tissierat (99) presentó un sumario en donde enumera las palmas que han sido trabajadas con la técnica del cultivo de tejidos. En la siguiente tabla se presenta un resumen de esta lista.

PLANTA	INOCULO	RESPUESTA
<i>Ambrosia acetosifolia</i>	embrión	elongación del cotiledón
<i>Andropogonis</i>		
<i>axillaris</i>	embrión	callo o germinación
<i>subcristatus</i>	embrión	callo o germinación
	punta apical	callo
<i>Arundo donax</i>	embrión	germinación
<i>Arundo donax</i>	embrión	elongación del cotiledón
<i>Brotis</i>		
<i>arvensis</i>		
<i>arvensis</i>	embrión	callo, embriogénesis
<i>Bulla saginata</i>	embrión	callo o germinación
<i>Canna</i>		
<i>arvensis</i>		
<i>arvensis</i>	embrión	callo o germinación
<i>Chenopodium</i>		
<i>arvensis</i>	embrión	callo/embriogénesis
	inflorescencia	
<i>arvensis</i>	punta apical	callo
<i>arvensis</i>	embriones	callo o germinación
<i>arvensis</i>	embriones	elongación del cotiledón
<i>arvensis</i>	embriones	elongación del cotiledón
<i>Chenopodium</i>	embriones	callo o germinación
<i>Cocos nucifera</i>	punta apical	diferenciación de brotes y raíces
	callo	protoplastos
	inflorescencia	callo/raíces
		callo/brotes
		protoplastos/regeneración de callo
	hoja/pecíolo	callo/raíces
	raíz	raíces laterales
	tallo	callo/raíces
	embrión	embriogénesis
		germinación
<i>arvensis</i>	embrión	callo
<i>Corypha alata</i>	embrión	callo o germinación
<i>Chromolaena odorata</i>	embrión	callo o germinación
<i>Dactyloctenium aegyptium</i>	embrión	callo
<i>Echinochloa crusgalli</i>	punta apical	callo/embriogénesis
		diferenciación foliar
		e iniciación de raíces
	inflorescencia	desarrollo de flores
	hoja	callo/embriogénesis
	polvo	germinación
	raíz	callo/embriogénesis
		raíces/pneumatóforos
		elongación
	embrión	callo/embriogénesis
		germinación
<i>Echinochloa crusgalli</i>	punta apical	hoja y raíz
	embrión	callo/embriogénesis
		germinación

PLANTA	INOCULO	RESPUESTA
<i>Mesembryanthemum crinita</i>	embrión	callo o germinación
<i>Hesperis matronalis</i>	embrión	callo/embriogénesis
<i>Hedysarum sp.</i>	embrión	callo o germinación
<i>Lycium spinosum</i>	embrión	callo
<i>Livistona</i>		
<i>decipiens</i>	embrión	callo/embriogénesis
<i>perillii</i>		callo
<i>scaberr</i>		callo o germinación
<i>Mesocarpus</i>		
<i>lactucoides</i>	embrión	callo o germinación
<i>truncatellum</i>		callo o germinación
<i>Mesembryanthemum laurifolium</i>	embrión	callo
<i>Opocarpus horridus</i>	embrión	germinación
<i>Passiflora sara</i>	embrión	callo/germinación
<i>Phonnia senecioides</i>	punta apical	callo o raíz y hoja
	embrión	callo/embriogénesis
	punta apical	callo
	anteras	embriogénesis
	punta apical	hoja y raíces
		ramificaciones
		diferenciación
	punta apical	foliar y producción
	y yemas la	de raíces; callo/
	terales	embriogénesis e
		iniciación de
		de inflorescencias
<i>Phonnia dentrifera</i>	plántulas sexuales	ramificaciones
	yemas florales	antédis
	asocarpo	callo
	inflorescencia	callo/embriogénesis
	hoja	callo/raíces
	estricta	callo
	pecíolo	callo/raíces
embriones	poliembrionicos	callo/embriogénesis
	raíces	callo/plántulas
	semillas	callo/embriogénesis
	embriones	callo/embriogénesis
		y formación de
		inflorescencias;
		germinación
<i>basifera foetida</i>	embriones	callo o germinación
<i>bulbifera</i>	punta apical	callo
<i>bulbifera</i>	embrión	callo/embriogénesis
<i>reticulata</i>	punta apical	callo
<i>rotundifolia</i>	embrión	callo
	punta apical	callo
<i>truncata</i>	embrión	callo o germinación
<i>viridifolia</i>	punta apical	callo/embriogénesis
		hojas y raíces
<i>Pisifera filaris</i>	embrión	callo/embriogénesis
<i>Pisifera senecioides</i>	embrión	callo o germinación
		germinación

PLANTA	INOCULO	RESPUESTA
<i>Cratogeomys</i> sp.	embrion	callo/embriogénesis
<i>Eriochorda heales</i>	embrion	germinación
<i>Eratocoma microrhiza</i>	embrion	germinación
<i>Rhynchospora tenuis</i>	embrion	callo o germinación
<i>Sabal</i>		
<i>domingensis</i>	embrion	elongación del cotiledón
<i>etonia</i>	embrion	callo o germinación
<i>major</i>	punta apical	diferenciación foliar
<i>palmetto</i>	embrion	callo/embriogénesis
<i>Ilex</i> <i>edulis</i>	embrion	elongación del cotiledón
<i>Ixonotus laxus</i>	embrion	callo o germinación
<i>Yucca</i> <i>glauca</i>	embrion	germinación
<i>serotina</i>	embrion	callo o germinación
<i>Washingtonia filifera</i>	punta apical	callo
		diferenciación foliar
		formación de raíces
	embrion	callo o germinación
<i>robusta</i>	punta apical	diferenciación foliar
		formación de raíces
		callo
	embrion	germinación

MATERIALES Y METODOS

1.- OBTENCION DE MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1.- SEMILLAS.

Se utilizaron semillas de *Chamaedorea ciliolata* Mart. provenientes de la zona "La Lacandona", en Chiapas. Las semillas se encontraron intactas, aún con la pulpa fresca, sin haberse observado contaminación por hongos o insectos. Fueron recibidas en bolsas negras de plástico perforadas.

Las semillas de palmas, debido a que poseen tejidos blandos, pueden hospedar gran cantidad de hongos y de bacterias, por lo que no remover las cubiertas de las semillas es una de las causas por la que se contaminan más fácilmente, lo cual provoca que no lleguen a germinar debido a los organismos contaminantes que compiten con el embrión tanto por el oxígeno como por los nutrientes del endospermo (68 y 117).

Por esta razón se procedió a eliminar de los frutos el mesocarpio papiráceo y el mesocarpio fibroso; ya que este proceso no es fácil y con frecuencia llega a quedar un poco de residuos de estas capas, las semillas fueron colocadas bajo la sombra a temperatura ambiente durante una semana con el fin de secarlas y facilitar la resección total del pericarpio (91). Durante el tiempo de secado se hizo una selección de semillas con la finalidad de homogenizar la muestra, eliminando aquellas que tenían diferentes características morfológicas.

1.1.1 PRUEBAS DE ALMACENAMIENTO.

Debido a que las semillas no se iban a ocupar en su totalidad de forma inmediata, fue necesario almacenarlas. Para determinar las mejores condiciones de almacenamiento, y con base a lo reportado por Poole y Coanover (77) quienes estudiaron el efecto de la temperatura de almacenamiento en semillas de *Gh. glaggans*, la mitad de ellas se almacenó a temperatura ambiente (tem. amb) y la otra mitad en refrigeración (7 °C). Durante el almacenamiento se colocaron en frascos amber para evitar cualquier tipo de efecto provocado por la luz (aunque Moreno, op.cit. reporta que las semillas no son fotoblásticas).

1.1.2 CONTENIDO DE HUMEDAD (H).

Nagao *et al* (63) reportan que el porcentaje y la velocidad de germinación de las semillas de las palmas aumenta cuando son sometidas a un tratamiento de prerresado en agua. Por otra parte, Nuzume (67) y Nuzume y Erikorian (68 y 69) indican que el prerresado es una técnica adecuada para almacenar el material en un estado de asepsia, aumentando de este modo el porcentaje de germinación (al eliminar a los microorganismos responsables de la contaminación que llegan a interferir en la germinación).

Para determinar la influencia del contenido de humedad sobre el porcentaje de germinación las semillas se sometieron a cuatro

pruebas de almacenaje:

- Semillas almacenadas a temperatura ambiente (tratamiento A).
- Semillas almacenadas en refrigeración a 7°C (tratamiento B).
- Semillas almacenadas a temperatura ambiente prerrejadas 15 días (tratamiento A1).
- Semillas almacenadas en refrigeración a 7°C prerrejadas 15 días (tratamiento B1).

El contenido de humedad de cada tipo de semillas fue obtenido con base en el peso seco empleando la fórmula de Huanto y Krikorian (68):

$$\% \text{ contenido de humedad} = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}} \times 100$$

De cada tratamiento se tomaron 15 semillas (con una repetición); las cuales fueron pesadas para obtener el peso fresco.

El peso seco fue determinado sometiendo a las semillas a una deshidratación gradual en una estufa a 60°C pesándolas periódicamente hasta que mantuvieron un peso constante. Para evitar que absorbieran humedad, al sacarlas de la estufa, las semillas eran trasladadas a un desecador. El peso seco se obtuvo de la siguiente manera:

$$\text{Peso seco} = \text{PF} - \text{PSD}$$

Donde:

PF = Peso fresco

PSD = Peso de las semillas deshidratadas

1.2 OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS.

1.2.1 PRUEBAS DE VIABILIDAD.

Para tener éxito en la obtención de plantas a partir de semillas es primordial contar con semillas viables y capaces de germinar (37). La viabilidad puede conocerse directamente al obtener el porcentaje de germinación y a través de métodos bioquímicos (tinción con tetrazolio) o físicos (rayos X, medición del CO₂).

2

Se efectuaron dos pruebas de viabilidad para conocer la calidad de la semilla con la que se iba a trabajar: Una consistió en obtener el porcentaje de germinación y la otra en realizar una prueba de viabilidad a los embriones con cloruro de tetrazolio.

1.2.1.1 PRUEBAS DE GERMINACIÓN.

Un factor importante que influye en la germinación de las semillas es el sustrato, por lo que se decidió realizar pruebas con diferentes sustratos para obtener aquel que proporcionara los más altos índices de respuesta.

Los siguientes son los sustratos que se eligieron y algunas de sus características:

a) Tierra (1.1.1 tierra negra, tierra de hoja, agrolita).

- Firmeza y densidad adecuada para la germinación.
- Su volumen no varía mucho ya sea seco ó húmedo.
- Posee un grado de retención de humedad suficiente.
- Provee nutrientes.
- Su aereación no es muy elevada.
- Hospeda microorganismos.
- Su pH es variable.
- Dificulta el trasplante.

b) Agrolita.

- Es completamente inerte.
- Posee excelente retención de humedad (3 a 4 veces su peso).
- Permite una buena aereación (tiene un 94.75 % de espacio poroso total).
- Su pH en agua es prácticamente neutro (de 7.0 a 7.5).
- Facilita el trasplante.
- No tiene capacidad para el intercambio catiónico.
- No contiene nutrientes minerales.
- No tiene capacidad de amortiguamiento.

c) Algodón.

- Es inerte.
- Su manejo es fácil.
- No presenta una buena aereación.
- Retiene mucha humedad.
- Hospeda microorganismos.
- Dificulta el trasplante.

Previo a las siembras, a las semillas se les aplicó un tratamiento de desinfección el cual consistió en lavarlas bajo el chorro del agua corriente para eliminar el polvo, tallarlas suavemente con detergente para disminuir la tensión superficial, sumergirlas en etanol al 70 % durante 5 min., para facilitar la penetración del agente desinfectante, y posteriormente desinfectarlas con una solución comercial de hipoclorito de sodio (NaClO) comercial (1.2 % de cloro activo) complementado con un abridor de la tensión superficial (jabón líquido 1.0 ml/l) por 15 min. Finalmente se enjuagaron con agua corriente. El agente desinfectante se eligió por su alta efectividad y su facilidad de remoción.

Las semillas del tratamiento A1 y del B1 se desinfectaron de igual forma antes de ponerlas a remojar. Durante el tiempo de remojo el agua fue cambiada diariamente y en caso de observar indicios de contaminación (hongos o turbidez en el agua) se les aplicaba de nuevo el tratamiento de desinfección. Los recipientes que contenían a las semillas en remojo fueron sellados con plástico autoadherente y mantenidos en oscuridad

para impedir su contaminación (67 y 68).

Poco antes de realizar la siembra, las semillas recibieron un pretratamiento el cual consistió en sumergirlas en agua caliente (50 °C) durante 1 min., y la aplicación de fungicida en polvo (Fecto 60, 1 g/l).

Los tiempos de exposición a las sustancias empleadas para la desinfección se eligieron con base en la bibliografía, usando las metodologías empleadas para la palma cocotera, la palma cocotera y la palma datilera (11, 22, 33, 34, 39, 99 y 106), ya que no exista información para la palma ceceador.

En las pruebas de germinación las semillas fueron sembradas en los diferentes sustratos mediante las siguientes técnicas:

a) Tierra: El sustrato se esterilizó en autoclave durante 30 min., a una presión de 1.5 atm y a una temperatura de 115 °C, para eliminar a los organismos que pudiera contener.

Para la prueba se emplearon 30 semillas del tratamiento A (no refrigeradas) y 30 del tratamiento B (refrigeradas); las cuales fueron sembradas a 0.5 cm de profundidad en el sustrato, sin guardar una posición determinada (3).

Las sacetas donde fueron colocadas se desinfectaron con una solución de NaClO comercial.

El material fue colocado bajo condiciones de invernadero, aplicándoseles controles fitosanitarios.

b) Agrolita: La agrolita fue lavada con detergente y esterilizada con NaClO comercial (1.2 % de cloro activo) por 15 min., enjuagándola muy bien con agua.

Con este sustrato se hicieron dos pruebas:

En la primera prueba la agrolita fue colocada en bolsas de plástico, previamente desinfectadas con etanol (95 %).

Las semillas (32 del tratamiento A y 32 del tratamiento B) fueron enterradas en este sustrato. No se dejó ningún tipo de ventilación.

En la segunda prueba, la agrolita fue colocada en semilleros limpios y desinfectados con NaClO comercial, asegurándose que tuviera un drenaje y una ventilación adecuada. Las semillas fueron sembradas, siguiendo las recomendaciones de Yocum (117), a una profundidad de 0.5 cm (aproximadamente su propio diámetro). Las semillas elipsoides se acomodaron con el eje largo de forma horizontal, lo cual facilita la emergencia de las plántulas dada la posición dorsal del embrión. Se emplearon 50 semillas de cada uno de los cuatro tratamientos (con cuatro repeticiones).

c) Algodón: Las semillas fueron colocadas en algodón (no estéril), se mantuvo una alta humedad relativa y se evitó la depositación de polvo. Se utilizaron 50 semillas del tratamiento A.

Las semillas colocadas en algodón y agrolita permanecieron bajo condiciones ambientales controladas (luz difusa, temperatura de 25-30 °C, 80-90 % de humedad relativa) y controles sanitarios (redesinfecciones, aplicación de fungicida, eliminación de semillas contaminadas, etc.).

La humedad se mantuvo constante, con agua destilada, el porcentaje de germinación se evaluó cada 15 días. El criterio utilizado para considerar que una semilla había germinado fue la emergencia de la radícula.

Cuando las plántulas alcanzaron un tamaño de 1.5 a 2.0 cm fueron trasplantadas a un sustrato de tierra estéril (1:1:1 tierra negra, tierra de hoja, agrolita) contenida en macetas de 250 g. mediante el siguiente procedimiento:

Las plántulas se sumergieron por unos instantes en una solución de fungicida (Captán 1 g/l) y fueron trasplantadas, cuidadosamente para no dañarlas, procurando que la raíz quedara en contacto íntimo con el sustrato.

1.2.1.2 PRUEBA DE VIABILIDAD DE LOS EMBRIONES.

Para obtener la viabilidad de los embriones se aplicó la prueba bioquímica que utiliza la tinción del 2,3,5 trifenil cloruro de tetrazolio (TTC) al 0.1% (1 g/l). Esta prueba demuestra la viabilidad por el color rojo que aparece en los tejidos vivos cuando se les aplica a las semillas esta solución (37). Se usaron embriones de los cuatro tratamientos colocándolos en cajas de Petri con papel filtro, se agregó la solución de TTC de forma tal que cubriera sólo la parte basal de los embriones, los cuales se incubaron en la oscuridad (ya que la luz puede provocar el cambio de color del tetrazolio). Se efectuaron revisiones cada 24 horas estableciéndose que los embriones que presentarían una tinción de rosada a roja se considerarían viables.

Para obtener el porcentaje de viabilidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{E_c}{E_t} \times 100$$

donde:

E_c = No. de embriones teñidos

E_t = No. total de embriones

1.3 OBTENCIÓN DE PLANTAS ADULTAS.

Las plantas adultas fueron seleccionadas basándose en su estado fitosanitario y fenológico. Las plantas pertenecientes a la especie *Ceanothus elegans* Hart., provenían de un vivero comercial y tenían una altura de 90 cm, cobertura de 80 cm y ocho años de edad. No se observaron síntomas de enfermedades ni de parásitos. Poseían, entre todas, siete hojas jóvenes e inflorescencias inmaduras (femeninas y masculinas).

Las plantas jóvenes (provenientes de semillas) y maduras, se mantuvieron en una cámara de crecimiento, bajo condiciones ambientales controladas (luz difusa, a 25-30 °C, humedad ambiental) y bajo controles fitosanitarios y nutricionales periódicos (aplicación de fungicidas, insecticidas, fertilizantes, etc.).

2.- CULTIVO IN VITRO.

Como existe muy poca información bibliográfica acerca del cultivo de tejidos del género *Chusquea* y sólo se reporta, con poco éxito, el cultivo de embriones de inoculos de inflorescencias y ápices de brotes (87 y 99), se decidió experimentar con una mayor diversidad de inoculos con el fin de obtener aquel que proporcionara la mejor respuesta al cultivo in vitro, seleccionando a diferentes órganos y tipos celulares para ser evaluados en sus respuestas como fuente de tejidos o como inoculos directamente, eligiendo los siguientes:

- a) Embriones sexuales (provenientes de semillas de *Ch. glaberrima*).
- b) Raíz, tallo y hoja (provenientes de plántulas de *Ch. glaberrima*).
- c) Hoja (de palmas adultas de *Ch. glaberrima*).
- d) Anteras (de flores de *Ch. sp.*).
- e) Microsporas aisladas (de *Ch. sp.*).
- f) Inflorescencias (flores y brácteas de *Ch. glaberrima* y *Ch. sp.*).

Puede observarse que se cubre casi la totalidad de la planta a excepción de los ápices de brotes y meristemas ya que su empleo requería el sacrificio de las plantas donadoras.

2.1 SIEMBRA DE EMBRIONES.

2.1.1 PRUEBAS DE DESINFESTACION.

Con el objetivo de lograr el cultivo aséptico de embriones, se realizaron pruebas de desinfección usando semillas de *Ch. glaberrima*, hidratadas y refrigeradas, debido a que con éstas fue más fácil la extracción de los embriones sin dañarlos.

Las semillas fueron lavadas con detergente y agua corriente, se trasladaron a un ambiente aséptico (campana de flujo laminar) procediendo a sumergirlas en etanol al 70 % por 5 min., desinfectarlas con hipoclorito de sodio comercial (1.2 % de cloro activo) adicionado con un emulsificador (jabón líquido, 1ml/l) durante 10 min., enjuagándolas por tres ocasiones con agua destilada estéril.

Posteriormente se extrajeron los embriones realizando cortes cuidadosamente alrededor del micrópilo hasta que eran aislados. Los embriones, por lo general, requieren de una desinfección suave (88) por lo que siguiendo la metodología de Hoelzl (39), primero se desinfectaron con una solución fuerte de NaClO al 5.0 % durante diferentes tiempos de prueba (0, 5, 10, 15 y 30 min.) y después por 1 min., con una solución suave al 1.0 %. Finalmente fueron lavados con agua destilada estéril en tres ocasiones, sembrándolos en medio nutritivo M.E complementado y adicionado con carbón activado (3 g/l) como antioxidante (tabla 1 y 2), el número de embriones sembrados por tratamiento fue de 10. Sólo se hicieron repeticiones del tratamiento que dio mejores resultados.

2.1.2 CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES.

El cultivo de embriones consiste en el desarrollo *in vitro* de embriones aislados de las semillas y se utiliza para incrementar la población de plántulas por medio de la germinación controlada, para producir cruces raras, para rescatar embriones incompatibles con el endospermo y como inóculos para iniciar cultivos (31, 39, 64, 99 y 115).

Se realizó el cultivo de embriones de *Ch. oblongata* con el fin de obtener su desarrollo *in vitro* o de que formaran tejido.

Establecida la técnica más efectiva de desinfección y aplicada a los embriones, éstos fueron sembrados en medio N.S complementado (tabla 1 y 2). se probaron 15 tratamientos experimentales en los cuales se variaron las concentraciones de los fitoreguladores del crecimiento sembrándose 15 embriones por tratamiento de acuerdo al cuadro 1.

		A B A				
		(mg/l)				
		0.0	0.1	1.0	10.0	100.0
D & P (mg/l)	0.0	A	B	C	D	E
	1.0	F	G	H	I	J
	3.0	K	L	M	N	O

CUADRO 1.- Tratamientos empleados en el cultivo *in vitro* de embriones de *Chusqueira oblongata*.

2.2 CULTIVO IN VITRO DE INOCULOS DE ORGANOS.

2.2.1 PRUEBAS DE DESINFESTACION.

Previamente a la siembra de los tejidos *in vitro* fueron efectuadas diversas pruebas de desinfección para así obtener cultivos asepticos. Las pruebas consistieron en hacer variaciones en los tiempos de exposición de los órganos a los agentes desinfectantes, utilizando inóculos de raíz, hoja y tallo de plántulas de *Ch. oblongata*.

La desinfección de las plántulas a partir de las cuales se obtuvieron los inóculos se realizó lavándolas con detergente al chorro del agua corriente, posteriormente se tallaron suavemente para eliminar la tierra. En seguida se sumergieron en una solución de fomicida (Fecto 60 o Legosan 30-30, 1 g/l) durante una hora, de donde fueron trasladadas a un ambiente estéril (cámara de flujo laminar) en donde se procedió a sumergirlas en etanol al 70 % probando los tiempos de 1, 3, 5, 10 y 15 min., transcurridos los cuales se desinfectaron con NaClO

comercial 11.2 % de cloro activo) suplementado con un abetidor de la tensión superficial (jabón líquido, 1.0 ml/l) durante 9, 15, 20, 25 y 30 min. Finalmente se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril para eliminar el agente desinfectante.

Un problema asociado con el cultivo in vitro de palmas es el rápido oscurecimiento del tejido después de haber sido estirado, el cual es provocado por la oxidación de los compuestos fenólicos cuando el tejido es lesionado, y que provoca en un principio intoxicación de las células y posteriormente su muerte.

Para reducir tanto el oscurecimiento de los tejidos como la contaminación, una vez escindidos éstos recibieron un baño con una solución antioxidante de L-cisteína (100 mg/l) y fungicida (Tecto 60 o Legutan 30-30, 1 g/l), reposando en esta solución hasta el momento de ser sembrados.

Como ya se indicó, evitar el oscurecimiento del tejido es de gran importancia para lograr el establecimiento in vitro de los tejidos en palmas. Con este fin se agregan sustancias antioxidantes al medio de cultivo. Algunos autores reportan que el uso de carbón activado (3.0 g/l) y de una mezcla de ácido ascórbico (100 mg/l) y ácido cítrico (150 mg/l) adicionados al medio han dado buenos resultados (24, 25, 29 y 115).

Se experimentó agregándole al medio carbón activado (3.0 g/l) y/o L-cisteína (100 mg/l) en lugar de la mezcla de ácido ascórbico-ácido cítrico con base en que George y Sherrington (90) indican que el ácido ascórbico es degradado por las altas temperaturas que se alcanzan durante la esterilización en autoclave. La L-cisteína ha probado ser un buen antioxidante ya que disminuye el potencial redox del medio, además que remueve cualquier quinona que sea formada (31).

Para las pruebas de desinfectación, con la finalidad de favorecer, en caso de contaminación, el desarrollo de los microorganismos, se escogió el medio M.8 (que es muy rico en sales) el cual fue complementado con una alta concentración de sacarosa, 30 g/l (tablas 1 y 3).

Para cada tratamiento se utilizaron 20 inóculos de hoja, 20 de tallo y 20 de raíz de 1 cm de longitud. Con el fin de facilitar el registro de la contaminación, los inóculos se dividieron en dos clases: los provenientes de la parte aérea (tallo y hoja) y los provenientes de la parte subterránea (raíz).

Se evaluó el grado de oscurecimiento para determinar la influencia del NaClO y de los agentes antioxidantes en su aumento o disminución. Para evaluarla se filieron parámetros cualitativos, los cuales se indican a continuación:

PAR A M E T R O	% de Oscurecimiento (valor)
Oscurecimiento de las zonas de corte	10
Oscurecimiento de las zonas de corte y puntos oscuros en el tejido	11 al 30
Oscurecimiento en zonas más grandes hasta el 50 % del tejido.	31 al 50

PARAMETRO	% de Obscurecimiento (valor)
Obscurecimiento en más de la mitad del inóculo hasta un 75 %.	51 al 80
Obscurecimiento del 75 % hasta su totalidad	81 al 100

3.2.2 CULTIVO IN VITRO DE CELULAS Y ORGANOS.

a) CULTIVO IN VITRO DE ORGANOS DE PLANTULAS.

Se realizó el cultivo de tejidos de raíz, tallo y hoja de plántulas de *Chenopodium album*, para rastrear y obtener el órgano que diera la mejor respuesta a la inducción de dediferenciación, morfogénesis y/u organogénesis.

El medio de cultivo empleado fue el M.S complementado (tablas 1 y 4), se experimentó con diferentes concentraciones hormonales de BAP (0.0, 1.0 y 3.0 mg/l) y de 2,4-D (0.0, 0.1, 1.0, 10.0, y 100.0 mg/l) aplicadas como indica el cuadro 2.

		2,4-D (mg/l)				
		0.0	0.1	1.0	10.0	100.0
BAP (mg/l)	0.0	1	2	3	4	5
	1.0	6	7	8	9	10
	3.0	11	12	13	14	15

CUADRO 2.- Tratamientos empleados en el cultivo in vitro de inóculos de órganos de *Chenopodium album*.

La composición del medio de cultivo así como el suplemento de fitorreguladores se eligieron con base en lo reportado por Reynolds y Murashige (87) quienes obtuvieron embriogénesis somática en *Chenopodium destitutum*, *Hemiphaea frutescens* y *Chenopodium quinoa*.

Para la siembra se tomó un lote de 10 plántulas las cuales, después de recibir el tratamiento de desinfección ya establecido, fueron disectadas en segmentos de aproximadamente 1 cm³. Los inóculos se dejaron reposando hasta su siembra sumergidos en una solución de L-cisteína (100 mg/l) y fungicida (Fecto 60 o Leguzan 30-30, 1 g/l). Fueron sembrados los inóculos de raíz, de tallo y de hoja incubándolos posteriormente a 25-30

°C, en ausencia de luz para evitar la oxidación de los fenoles.

b) CULTIVO *IN VITRO* DE INÓCULOS DE HOJA DE PLANTULAS Y PALMAS ADULTAS.

Para estas pruebas se emplearon inóculos de aproximadamente 1 cm² de plantulas de *Ch. elongata* y plantas adultas de *Ch. sissago*. La técnica de desinfección y la técnica para evitar el oscurecimiento fueron las mismas del inciso anterior. Las siembras se realizaron en los siguientes medios experimentales de cultivo.

1) Medio Y3 (tabla 5) que está reportado como un medio en el que ha dado buen resultado la siembra de inóculos de hoja de *Cocco thuyifera* y *Phenacis dactylifera* (22 y 25). Se experimentó con tres concentraciones hormonales de BAP: 0.0, 1.0 y 3.0 mg/l y cinco de 2,4-D: 0.0, 0.1, 1.0, 10.0 y 100.0 mg/l de acuerdo a las combinaciones del cuadro 3.

		2,4-D (mg/l)				
		0.0	0.1	1.0	10.0	100.0
B A P (mg/l)	0.0	1	2	3	4	5
	1.0	6	7	8	9	10
	3.0	11	12	13	14	15

CUADRO 3.- Tratamientos empleados en el cultivo *in vitro* de inóculos de hoja de plantulas (*Ch. elongata*) y palmas adultas (*Ch. sissago*).

La incubación fue a 25-30°C, en ausencia de luz para disminuir el oscurecimiento del tejido.

2) Experimento de Amplio Espectro. Teniendo como base los estudios realizados por De Foucard (11), se experimentó con una prueba de amplio espectro, la cual estuvo constituida por 21 medios de cultivo distintos. Este tipo de experimento se utiliza para probar en un sólo experimento varios (en este caso 21) medios diferentes, en los cuales sucesivamente se encuentran aquellos en donde los tejidos de especies que no han respondido al cultivo *in vitro*, tendrán mayor probabilidad para hacerlo.

El experimento consistió en probar cuatro categorías de constituyentes que son comúnmente usados en los medios nutritivos:

(1) Minerales (divididos en dos grupos)

Macronutrientes:

- Nitrato de amonio.
- Sulfato de magnesio.
- Fosfato de sodio.
- Nitrato de potasio.
- Cloruro de potasio.
- Cloruro de calcio.
- Sulfato ferroso.
- Etilendinitrilotetracetato disódico.
- Sulfato de sodio.

Micronutrientes:

- Acido bórico.
- Sulfato manganoso.
- Sulfato cúprico.
- Sulfato de cinc.
- Molibdato de sodio.
- Cloruro de cobalto.
- Yoduro de potasio.

(2) Auxinas:

- Acido indolacético (A I A).
- Acido indolbutírico (A I B).
- Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).
- Acido p-clorofenoxiacético (pCPA).

(3) Citoquininas:

- Adenina
- Kinetina
- 6-bencilaminopurina (B A P).
- 6-(4-metil-3butenilamino) purina (2-IP)

(4) Vitaminas, aminoácidos y azúcares.

- Inositol.
- Acido nicotínico.
- Piridoxina.
- Tiamina.
- Biotina.
- Acido pantoténico.
- Riboflavina.
- Acido ascórbico.
- Cloruro de colina.
- Glicina.
- L-cisteina.
- Sacarosa.

Cada uno de los cuatro categorías anteriores fue empleada en tres niveles de concentración: Baja (B), Media (M) y Alta (A).

La tabla 6 enlista los reactivos empleados en la preparación de los medios, así como la concentración básica empleada de cada uno de ellos de la cual se partió.

En la tabla 7 se da la composición de cada uno de los 81 medios.

En cada medio fueron sembrados dos inoculos de hoja joven de

plantas adultas de *Ch. glaberr.* de 1 cm³ (porción de foliolo con o sin raquis) realizando 3 repeticiones. La incubación se realizó a 25-30°C, en la obscuridad.

3) Para ampliar el rango de experimentación de medios de cultivo se decidió adicionar extractos naturales que frecuentemente son empleados para enriquecer dichos medios después que los tejidos cultivados no han respondido satisfactoriamente en medios con ingredientes definidos (55). Con base en la literatura reportada se decidió probar la mayor cantidad de los extractos ya probados con buenos resultados por otros autores y que al menos parte de su composición estuviera definida. Los extractos fueron:

- Endosperma de coco.
- Endosperma de maíz.
- Extracto de papa.
- Extracto de naranja.
- Fulpa de plátano.
- Extracto de piña.
- Extracto de tomate.
- Extracto de limón.

El medio salino seleccionado para la prueba fue el número 56 del experimento de amplio espectro (tabla 7) en el cual los inóculos se habían mantenido en mejores condiciones y con menor grado de oscurecimiento.

Los extractos naturales se agregaron al medio solos o mezclados con otro u otros extractos, manteniéndose constante el volumen final de 150 ml/l en ambos casos. El cuadro 4 muestra los 17 tratamientos que constituyeron esta prueba.

Para la siembra se emplearon inóculos de 1 cm³, de hojas jóvenes de plantas adultas de *Ch. glaberr.* La incubación fue a 25-30°C, en condiciones de obscuridad.

4) Se realizó otra prueba con el medio N.S (tabla 1) que ha sido empleado con éxito en el cultivo de *Spore sulfifera* (6 y 25), *Elea guineensis* (70), *Excentis deliziana* (77) y *Chaetochytrium spathuligerum* (87). El medio se suplementó con extracto de plátano (tabla 8) sembrando inóculos de 1 cm³, tomados de hojas jóvenes de palmas adultas de la especie *Ch. glaberr.*, incubándose en las mismas condiciones que los anteriores.

	Coco	Malz	Papa	Naranja	Plátano	Piña	Jitomate	Limón	Testigo
Coco:	1	2	3	4	5	6	7		
Malz:		8							
Papa:		15							
Nar.:			9						
Plá.:		16		10					
Piña:					11				
Jit.:						12			
Lim.:							13		
Test.:								14	
									17

CUADRO 4.- Tratamientos empleados en el cultivo *in vitro* de inóculos de hoja de palmas adultas (Cb. *glauca*).

c) CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS.

Las anteras de *Chamaedorea* sp. fueron probadas como fuente de inóculos, ya que a partir de estas y por medio de la androgénesis es posible obtener plantas completas, además de que el tejido del saco polínico puede dediferenciarse y formar tejido calloso (54 y 107).

Inflorescencias jóvenes de *Chamaedorea* sp. (con flores verdes y cerradas) fueron lavadas con detergente y agua corriente y sumergidas en una solución de fungicida Tecto 60 (1 g/l) durante una hora. Posteriormente, bajo condiciones de asepsia (campana de flujo laminar) se desinfectaron sumergiéndolas en etanol al 70 % por 5 min., y en NaClO comercial con 1.2 % de cloro activo adicionado con un agente emulsificador (jabón líquido 1 ml/l) durante 15 min., enjuagándolas en tres ocasiones con agua destilada estéril. Las flores se mantuvieron en reposo en una

solución de fungicida (Premil. 1 g/l) hasta ser removidas para secarlas al cáliz, la corola y extraer las anteras, sin filamento pero con tejido conectivo. En un principio se había convenido eliminar todo el tejido materno (diploide) pero dada la dificultad para cortar el conectivo, éste se dejó.

Los medios experimentales para esta prueba fueron:

- Medio Mitch (66)
- Medio Anderson (31)

Ambos medios se usaron líquidos y complementados (tablas 9 y 10), se experimentó en cada uno un gradiente en la concentración de sacarosa (0.0, 30.0, 60.0, 90.0 y 120 g/l), sembrando 100 anteras por tratamiento e incubándolas a 25-30°C en ausencia de luz.

Se probó el gradiente de sacarosa ya que esta sustancia afecta principalmente el potencial osmótico del medio de cultivo el cual debe ser ajustado para prevenir la lisis del polen.

-Medio N.S (tabla 11).

Con este medio se variaron las concentraciones hormonales de BAP (0.0, 1.0 y 3.0 mg/l) y de 2,4-D (0.0, 25.0, 50.0, 75.0 y 100.0 mg/l), sembrándose 20 anteras por tratamiento. Los tratamientos empleados se indican en el cuadro 5. Las condiciones de incubación fueron 25-30°C y en la oscuridad.

		2,4-D (mg/l)				
		0.0	25.0	50.0	75.0	100.0
B A P (mg/l)	0.0	1	2	3	4	5
	1.0	6	7	8	9	10
	3.0	11	12	13	14	15

CUADRO 5.- Tratamientos empleados en el cultivo *in vitro* de anteras de *Cb. sp.*

-Medio Anderson sólido (tabla 12).

En este medio se sembraron 20 anteras las cuales fueron incubadas a 25-30°C bajo condiciones de oscuridad.

Empleando el mismo medio también se sembraron anteras maduras (ya abiertas) empleando 20 anteras y manteniéndolas en las mismas condiciones de incubación que las anteriores.

d) CULTIVO IN VITRO DE MICROSPORAS AISLADAS.

Por medio del cultivo de microsporas aisladas se pueden obtener varios tipos de androgénesis, las cuales van de la formación de haploides directamente por embriogénesis, ó indirectamente vía la formación de callo. El experimento que se realizó se basó en el reporte de Hitch (1961) quien modificó el desarrollo normal de las microsporas forzándolas a comportarse como células somáticas que dieron origen a plántulas. La idea fue que las microsporas no formaran un núcleo generativo, pensando que, liberándolas de la influencia de la célula generativa, la célula vegetativa podría crecer como una célula somática. Para aumentar las probabilidades de que se tuviera éxito fue necesario determinar la etapa de desarrollo en que se encontraban las microsporas al momento de sembrarlas; recomendándose en la literatura que la siembra se realice cuando las microsporas se encuentren en la primera división mitótica o inmediatamente después de ella (84 y 107).

Para determinar la etapa microsporogénica en que se encontraban las microsporas fue utilizada la siguiente técnica:

Las anteras, extraídas de flores inmaduras (verdes y cerradas) de *Chamaedorea* sp., fueron colocadas en filador Garner (etanol absoluto y ácido acético glacial en proporción 3:1) por 24 horas. Posteriormente, las anteras se sometieron a un proceso de hidrólisis con HCl 5N que duró 10 min., y se tñieron con acetocarbina (2 g de acetocarbina, 45 ml de ácido acético glacial y 55 ml de agua destilada) durante 15 min. Una vez teñidas fueron aplastadas sobre un portaobjetos (aquash) y observadas al microscopio.

Seleccionadas aquellas inflorescencias cuyas microsporas estuvieran en la etapa de la primera división mitótica se procedió a la siembra in vitro de sus microsporas. Las inflorescencias recibieron un pretafiamiento de frío (7 °C) durante 72 horas antes de realizar la siembra (107). Fueron lavadas con agua corriente y jabón, se sumergieron durante 1 hora en fungicida Tecto 60 (1 g/l). Se trasladaron a una cámara de flujo laminar (condiciones asépticas) y se desinfectaron con etanol al 70 % (5 min.) y con una solución de hipoclorito de sodio comercial (1.2 % de cloro activo) suplementado con un agente abtador de la tensión superficial (jabón líquido, 1ml/l) por 15 min., lavándolas después en tres ocasiones con agua destilada estéril y sumergiéndolas en una solución de fungicida Frosil (1 g/l) en tanto se les extraían las anteras a las flores. Las anteras, conforme eran extraídas, fueron colocadas en un poco de agua destilada estéril.

Alrededor de 500 anteras desinfectadas se acomodaron en una malla de nylon, con un diámetro de poro de 40 micrones, colocada en un estubo cuya salida daba a un matraz colector (Erlenmeyer), se aplastaron con un tubo de vidrio, forrándose en el matraz donde era recibido el filtrado, una suspensión de microsporas, la cual fue centrifugada a 700 r.p.m., en dos ocasiones, desechando el sobrenadante. Las microsporas fueron resuspendidas en medio nutritivo fresco y lavado con 4l dos veces por centrifugación.

Las microsporas sedimentadas se mezclaron con 5 ml de medio de cultivo fresco.

Para la inducción de la respuesta se eligieron dos medios nutritivos: el medio Anderson (tabla 10) y medio Mitch (tabla 13) complementados y líquidos, probándose 5 concentraciones diferentes de sacarosa (0.0, 30.0, 60.0, 90.0 y 120.0 g/l) para cada medio.

Un mililitro de la solución con las microsporas fue agregado a cada uno de los tratamientos a probar usando 40 ml de cada medio. Se sembraron 10 frascos de cultivo con 4 ml de medio cada uno, por tratamiento, incubándolos a 25-30°C en ausencia de luz.

e) CULTIVO IN VITRO DE INFLORESCENCIAS (FLORES Y RAQUILLAS).

El cultivo de flores e inflorescencias ha tenido éxito en la obtención de embrionemas somática con varias especies de palmas como *Coccothrinax* (6, 21, y 35); *Elasia guineensis* (24); *Eleocharis acicularis* (97) y *Chamaedorea costaricensis* (47).

Los medios utilizados por estos investigadores han sido el M.S y el Y3. Tratando de ampliar el rango de prueba se decidió experimentar con los medios M.S, Y3, Anderson y del medio 46 al 61 de la prueba de amplio espectro.

- DESINFESTACION.

Las inflorescencias de *Ch. elegans* y *Ch.* sp., fueron lavadas con agua y detergente, posteriormente se sumergieron durante una hora en una solución de fungicida (Leguzan 30-30, 1 g/l) y, bajo condiciones asépticas, se sumergieron en etanol al 70 % durante 5 min., desinfectándolas con una solución de NaClO comercial (1.2 % de cloro activo) adicionado con una solución emulsificadora (jabón líquido, 1 ml/l) por 15 min. Posteriormente fueron enjuagadas, en tres ocasiones, con agua destilada estéril. Finalmente se realizaron los cortes dejando el material en reposo en una solución de L-cisteína (100 mg/l) y fungicida (Leguzan 30-30, 1 g/l) hasta el momento de ser sembrados. Para la siembra se utilizó el medio M.S complementado (tabla 14), sembrando todas las flores (105) de una inflorescencia.

- CULTIVO IN VITRO.

1) Medio Anderson (tabla 12).

Se realizaron tres pruebas en las que se variaron las condiciones ambientales de cultivo como la temperatura y la cantidad de luz durante la etapa de incubación.

En la primera prueba se sembraron 125 inóculos (2 flores con su porción de raquilla), incubándolos a 25-30°C con luz difusa.

La segunda prueba consistió en incubar 201 inóculos a 7°C bajo condiciones de oscuridad.

Para la tercera prueba fueron sembrados 650 inóculos, manteniéndolos a 25-30°C en la oscuridad.

Las flores utilizadas se encontraban cerradas, verdes y fueron tanto pistiladas como estaminadas, y pertenecían a *Chamaedorea* sp.

2) Medio M.S.

Empleando como medio basal el medio M.S complementado (tablas 1 y 4) y variando las concentraciones hormonales de BAP y de 2,4-D, fueron elaborados 15 tratamientos (indicados en el cuadro 6) utilizando 150 flores de *Chamaedorea* sp.

		2,4-D (mg/l)				
		0.0	0.1	1.0	10.0	100.0
B A P (mg/l)	0.0	1	2	3	4	5
	1.0	6	7	8	9	10
	3.0	11	12	13	14	15

CUADRO 6.- Tratamientos empleados en el cultivo *in vitro* de inóculos de inflorescencias de *Chamaedorea* sp. (Medio basal: M.S).

En otra prueba también fue usado el medio M.S (Tabla 1) complementado (Tabla 4) variando las concentraciones hormonales de BAP y de 2,4 D, de acuerdo al cuadro 7, sembrando en cada uno de los 15 tratamientos 60 flores de *Chamaedorea* sp..

		2,4-D (mg/l)				
		0.0	25.0	50.0	75.0	100.0
B A P (mg/l)	0.0	1	2	3	4	5
	1.0	6	7	8	9	10
	3.0	11	12	13	14	15

CUADRO 7.- Tratamientos empleados en el cultivo *in vitro* de inóculos de inflorescencias de *Chamaedorea* sp. (Medio basal: M.S).

Los inóculos de estas pruebas se mantuvieron a 25-30°C, en ausencia de luz.

3) Medio Y3

Fueron preparados 15 tratamientos en donde, empleando el medio basal Y3 (20), ver tabla 5, se variaron las concentraciones hormonales, como se indica en el cuadro 8, sembrándose 150 inóculos de inflorescencias femeninas de *Cb. gigantea* (2 flores con porción de raquilla), incubándose a 25-30 °C, en la oscuridad.

		2,4-D (mg/l)				
		0.0	0.1	1.0	10.0	100.0
	0.0	1	2	3	4	5
B A P	1.0	6	7	8	9	10
(mg/l)	3.0	11	12	13	14	15

CUADRO 8.- Tratamientos empleados en el cultivo *in vitro* de inóculos de inflorescencias de *Cbanassora gigantea*. Medio basal: Y3).

4) Medio del experimento de amplio espectro.

Para esta prueba se utilizaron 36 medios (del 46 al 81) de la prueba de amplio espectro (tablas 6 y 7). Al igual que en la prueba con medio Y3 sólo fueron sembrados inóculos (2 flores y un segmento de raquilla) de inflorescencias femeninas de *Cb. gigantea*, con dos repeticiones por medio. La incubación se realizó a 25-30 °C, bajo condiciones de oscuridad.

3.- ANALISIS HISTOLOGICO.

Las estructuras obtenidas *in vitro* a partir de flores de *Cb. gigantea*, el embrión sexual y el ovario fueron examinados histológicamente usando las técnicas de microscopía de luz descritas por Johansen (43) con la finalidad de realizar una comparación anatómica y determinar si se había logrado inducir la embriogénesis en las flores. Para el estudio fue necesario procesar el material biológico de la siguiente forma:

a) Fijación: El material biológico fue fijado en FAA (formaldehído-ácido acético-etanol) al 50% durante 24 h. La fijación se realiza para provocar la muerte de las células de tal manera que se preserve su organización morfológica y contenido

químico sin cambios, y poder observarlos al microscopio (30). El FAA es una de las más importantes mezclas fijadoras ya que posee una buena acción endurecedora y una excelente potencia de penetración (trasciende sobre todo con las proteínas haciéndolas insolubles) mientras que el ácido acético hincha los tejidos.

- Preparación 1 FAA al 100 %.
- Etanol al 96 % 50 ml
- Ac. acético glacial 5 ml
- Formaldehído (37-40 %) 10 ml
- Agua 10 ml

Transcurridas las 24 h. el fijador fue eliminado, para evitar que continuara actuando sobre el tejido, lavando éste durante 1 h con agua corriente.

b) Deshidratación: Como el tejido se iba a infiltrar e incluir en un medio no miscible con el agua, como la parafina, era esencial remover toda el agua libre del tejido fijado y lavado, reemplazándola con un solvente orgánico adecuado.

En este caso los tejidos fueron deshidratados gradualmente en etanol por medio de la siguiente serie: 30, 50, 70, 80, 95 y 100 %, sumergiendo los tejidos por una hora en cada uno.

c) Inclusión en parafina: La finalidad de la inclusión es facilitar el corte de los tejidos al proporcionar un soporte o sostén adicional interno. El medio de inclusión no solamente infiltra el tejido sino que también sirve a éste a un bloque lo suficientemente fuerte como para manejarlo con seguridad durante el proceso de corte.

La inclusión en parafina es una de las más usuales en las técnicas histológicas, ya que es la que da mejores resultados. La parafina tiene un punto de fusión de 55-58°C y es insoluble en el agua y alcohol. Para que la parafina impregne una pieza, es necesario que esté deshidratada y haya sufrido la impregnación con algún disolvente de la parafina que sustituya al alcohol.

En este caso se usó xilol como disolvente. La infiltración se logró aumentando gradualmente la concentración de parafina y disminuyendo la del xilol, el cual se elimina totalmente por evaporación (29).

La inclusión consistió en sumergir los tejidos en el siguiente grupo de soluciones:

- 1.- Xilol al 100 %
- 2.- 9.0 ml de xilol; 1 ml de parafina
- 3.- 7.5 ml de xilol; 2.5 ml de parafina
- 4.- 6.6 ml de xilol; 3.3 ml de parafina
- 5.- 5.8 ml de xilol; 4.2 ml de parafina
- 6.- 5.0 ml de xilol; 5.0 ml de parafina
- 7.- 4.2 ml de xilol; 5.8 ml de parafina
- 8.- 3.3 ml de xilol; 6.6 ml de parafina

- 9.- 3.5 ml de xilol: 7.5 ml de parafina
10.- 1.0 ml de xilol: 9.0 ml de parafina
11.- Parafina al 100 %

El material biológico se mantuvo de 2 a 3 h. en cada solución.

Después de sumergir los tejidos en parafina pura, éstos se colocaron en parafina fundida dentro de moldes de cartón, orientándolos de la manera deseada (una vez solidificados, los moldes se pueden conservar durante tiempo indefinido).

d) Cortes al microtomo: Los cortes se realizaron con el microtomo de deslizamiento. El bloque de parafina con el tejido incluido se fijó a la platina con ayuda de calor y se ajustó el microtomo al grosor deseado de corte (en este caso de 15 a 20 micras).

Al ir realizando los cortes, éstos se recogieron en un recipiente con agua caliente (entre 38-45°C), a la cual se le había espolvoreado un poco de gelatina, para extenderlos; se colocaron cuidadosamente sobre un portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h.

e) Desparafinar: Para eliminar la parafina los cortes se lavaron con xilol al 100 % durante 5 min., en dos ocasiones. Para eliminar el xilol el tejido se lavó primero con una mezcla de xilol-etanol (1:1) por 5 min., y finalmente con etanol absoluto durante 5 min. De esta manera el corte del tejido, sin parafina, quedó pegado al portaobjetos.

f) Tinción: La mayoría de los tejidos, después de incluirlos y cortarlos, se vuelven transparentes y no pueden observarse sus estructuras al microscopio; Para poder observarlas es necesario tefirlos. Para que un compuesto actúe como colorante su molécula debe tener dos grupos: (1) Un grupo auxocromo, el cual le confiere al colorante la capacidad de unirse al componente celular y para disolverse y disociarse en el agua, y (2) un grupo cromóforo, el cual produce en sí, el color.

Según el tipo de cromóferos los colorantes pueden ser básicos o ácidos. Los colorantes básicos constan de una base orgánica colorida combinada con un acetato, cloruro o sulfato incoloros (p. ej. safranina), que colorean a las estructuras de carácter ácido. Los colorantes ácidos constan de una base metálica generalmente de sodio o de potasio, que se combina con un radical orgánico ácido. Un colorante ácido tinte sustancias básicas, p. ej. verde rápido (28, 30 y 43).

Para tefir el material biológico se usó una tinción de contraste empleando safranina (acuosa) y verde rápido (alcohólico). La safranina tinte lignina, cutina, suberina, xilema y cromocomas. El verde rápido tinte celulosa, pectina, parénquima, hueso acromático y citoplasma.

A continuación se indican los pasos que se siguieron para la tinción:

1.- Rehidratación: Al ser la safranina un colorante acuoso fue necesario rehidratar los tejidos con el fin de que la safranina penetrara al tejido. Esta rehidratación se realizó con etanol siguiendo la siguiente serie: etanol al 95, 70, 50 y 30 % durante 5 min., en cada uno.

Finalmente se lavó el tejido con agua destilada por 2 min.

2.- Tinción con safranina al 1 % por 30 min.

3.- Eliminación del exceso de colorante con agua destilada.

4.- Deshidratación: La deshidratación es necesaria para que el verde rápido pueda penetrar a las células. Fue realizada gradualmente al lavar el tejido en la siguiente serie de etanol: 30, 50, 70, 95 y 100 %, durante 1 min., cada uno en dos ocasiones.

5.- Eliminación del exceso de verde rápido con tres cambios de etanol absoluto (1 min., cada uno).

7.- Aclaramiento: Se realizó con el fin de obtener una imagen de mayor precisión. Para aclarar el tejido se empleó aceite de clavo (10 min.) y xilol (3 cambios, de 1 min., cada uno).

8.- Montaje: Una vez que el tejido fue teñido se montó en Bálsamo de Canadá, para su estudio bajo el microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSION

1.- SEMILLAS.

1.1 CONTENIDO DE HUMEDAD.

Los contenidos de humedad obtenidos (tomando como base el peso seco) con las semillas de *Ch. oblongata* sometidas a cuatro tratamientos de almacenamiento, fueron los siguientes:

Semillas tratamiento A	= 6.14 %
Semillas tratamiento B	= 6.84 %
Semillas tratamiento A1	= 41.52 %
Semillas tratamiento B1	= 41.14 %

Al comparar las medias de los tratamientos por medio de un análisis de variancia (ANDEVA) de un factor y una prueba de Duncan (tabla 15), se observó que no existió diferencia significativa (con una interdicumbre del 5 %) en el contenido de humedad entre las semillas almacenadas a temperatura ambiente (tratamiento A) y las semillas almacenadas en refrigeración a 7°C (tratamiento B). Lo mismo ocurre entre las semillas sometidas a remojo (tratamiento A1 y B1), lo cual indica que el contenido de humedad de las semillas no es afectado por una temperatura de almacenamiento entre 7 y 28°C.

Las diferencias en el contenido de humedad entre las semillas preremojoadas (tratamientos A1 y B1) y no remojoadas (tratamientos A y B) fue la esperada: un incremento superior al 30 % en el contenido de humedad en las semillas remojoadas debido al proceso natural de imbibición.

Las semillas del género *Chamaedorea* son de vida corta y, de acuerdo a Hartman y Kester (37), muchas semillas de este tipo pierden su viabilidad si se reduce su contenido de humedad, por lo que el resultado obtenido es importante, pues indica que se pueden almacenar semillas de *Chamaedorea oblongata* a una temperatura entre 7 y 28°C sin que disminuya su contenido de humedad, reduciendo así las probabilidades de la pérdida de viabilidad. Por otra parte, se aumenta hasta 6 meses el tiempo de almacenaje.

1.2 PRUEBAS DE VIABILIDAD.

Cualitativamente la diferencia entre una semilla viable y una no viable no siempre es clara. Son una serie de características las que van a hacer conspicua esta diferencia, por ejemplo, la declinación gradual en el vigor, la aparición de necrosis o lesiones en áreas localizadas de la semilla, etc. Cuando se trabaja con semillas es primordial conocer la viabilidad del lote experimental. El método más confiable y directo para establecer el porcentaje de viabilidad de las semillas, es determinando su porcentaje de germinación, el cual indica el número de plántulas que se pueden obtener a partir de un número dado de semillas (37).

1.2.1 PRUEBAS DE GERMINACIÓN.

Las semillas de especies tropicales en su gran mayoría tienen vida corta y latencia breve o inexistente (la excepción de algunas leguminosas). Lo que hace que su conservación con fines de experimentación se dificulte en extremo (103 y 108).

Es importante conocer la longevidad de las semillas para poder planear cuidadosamente el tiempo de su recolección, además de tener un control adecuado en su almacenamiento. Algunas semillas tropicales tienen dificultades de tipo fisiológico (presencia de inhibidores, etc.) para su germinación por lo que es necesario, si se desea disparar su germinación la aplicación de pretratamientos para optimizarla y homogeneizarla (110).

Las condiciones de almacenamiento que hacen más lentos los procesos de respiración y otros procesos metabólicos, y que no provocan daño al embrión, son los que contribuyen a mantener por más tiempo la viabilidad de las semillas. En este sentido las condiciones más importantes son el contenido de humedad, la temperatura y la atmósfera de almacenamiento (37); de éstas, las relaciones de las dos primeras son las de mayor significado práctico y fueron las que se probaron en esta investigación.

Los porcentajes de germinación obtenidos con las semillas de *Cb. oblongata* se indican en el cuadro 9.

Sustrato :	TIPO DE SEMILLA			
	A	B	A1	B1
Tierra :	0.0	0.0	-	-
Agrolita :				
s/vent. :	12.5	12.5	-	-
Algodón :	16.0	-	-	-
Agrolita :				
c/vent. :	61.2	72.5	61.2	77.6

CUADRO 9.- Porcentajes de germinación obtenidos con semillas de *Cb. oblongata* sometidas a cuatro tratamientos de almacenamiento.

La falta de germinación en el sustrato de tierra no coincide con los resultados reportados por Vega et al (110) y Moreno (59), quienes obtuvieron entre el 60-70 % de germinación, en el primer caso, y el 72 % en el segundo. Esto probablemente se debió a que ellos realizaron las pruebas bajo condiciones ambientales naturales propias del género, mientras que esta prueba se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero en las cuales la temperatura y humedad no pudieron mantenerse en los rangos

óptimas.

Al utilizar el sustrato de algodón se obtuvo un porcentaje de germinación bajo (16 %), el cual puede atribuirse principalmente a que las semillas se contaminaron en mayor proporción (tanto con hongos como por bacterias), que en los otros sustratos, lo que ocasionó que se deterioraran rápidamente. La contaminación fue favorecida por el alto grado de retención de humedad del algodón, que al mismo tiempo disminuyó la disponibilidad de oxígeno a las estriccias.

En el sustrato de agrolita sin ventilación los porcentajes de germinación también fueron bajos (13.6 %) . lo cual se atribuye a la mala aireación, ya que la cantidad de oxígeno disponible para las semillas se fue reduciendo paulatinamente e incrementándose la cantidad de gases tóxicos (como el dióxido de carbono producto de la respiración) los cuales inhibieron la germinación.

Los mejores porcentajes de germinación (61.2, 72.8 y 77.6), fueron obtenidos en el sustrato de agrolita con ventilación y manteniendo a las semillas en condiciones ambientales controladas. Los resultados obtenidos superan a los reportados por Moreno (59) quien en condiciones de laboratorio obtuvo un porcentaje de germinación, para semillas de *Chasmodon sp.* del 5 %; a los de Poole y Conover (77), quienes en una prueba donde usaron semillas de *Cd. glaberrima* obtuvieron el 61 % de germinación; y a los de Wagner (114), quien trabajó con semillas de *Cd. glaberrima* y obtuvo un porcentaje de germinación del 53.3 %.

Los datos que se obtuvieron en esta prueba (con sus 4 repeticiones) fueron sometidos a un ANOVA de un factor (diseño completamente aleatorio) y se les aplicó una prueba de rango múltiple de Duncan para determinar si hubo o no diferencia entre las medias obtenidas (tabla 16). Las pruebas indicaron que existió una diferencia significativa (con una incertidumbre del 5%) entre todos los pares de medias, a excepción de dos pares: el de las semillas tratamiento A y A1 y el de las semillas tratamiento B y B1 cuyas medias no resultaron significativamente distintas.

Por lo anterior puede decirse que el almacenamiento a 7 °C aumenta significativamente el porcentaje de germinación de las semillas de *Chasmodon oblongata* mientras que el contenido de humedad no afecta significativamente al mismo.

Estos resultados indican que la germinación de las semillas de *Chasmodon oblongata* no es bloqueada por un alto contenido de humedad y que una temperatura de 7°C incrementa su porcentaje de germinación, lo cual es contrario a los resultados obtenidos por Poole y Conover (77) quienes reportan que las semillas de *Chasmodon glaberrima* almacenadas a temperatura ambiente presentan un porcentaje de germinación dos veces mayor que las semillas almacenadas a 7°C. Lo anterior puede indicar que las semillas de las especies del género *Chasmodon* tienen características y necesidades metabólicas diferentes, siendo necesario aplicarles tratamientos de almacenamiento y germinación específicos a cada

una de ellas.

En lo referente al número de días necesarios para que se inicie la germinación se puede observar en la figura 3, donde se presentan las curvas de germinación de los cuatro tipos de semillas sembradas en agrolita con ventilación, que para los cuatro tratamientos, la germinación se inicia a los 30 días de realizada la siembra. El porcentaje de germinación se va incrementando paulatinamente hasta alcanzar su máximo a los 150 días (3 meses).

Para calcular el número de días requeridos para que emerja la radícula se utilizó la siguiente fórmula (37):

$$\text{No. de días} = \frac{N1T1 + N2T2 + \dots + NnTn}{\text{No. total de semillas germinadas}}$$

donde:

- N = Número de semillas que germinaron dentro de los intervalos de tiempo consecutivos.
- T = Tiempo transcurrido entre el inicio de la prueba y el fin del intervalo determinado de medición.

Aplicando la fórmula anterior se obtuvo lo siguiente:

Tratamiento	No. de días promedio para la germinación
A	109.5
B	86.7
A1	117.5
B1	128.7

Siendo en promedio para los cuatro tratamientos de 114 días.

Esto puede indicar que, al contrario de lo que reporta Escobar (23) para *Elaeis guineensis*, si bien el alto contenido de humedad no inhibe la germinación, sí la retrasa.

Durante las pruebas de germinación pudieron observarse en la semilla algunas características de los procesos de la misma, los cuales se describen a continuación:

Las semillas presentan un embrión curvado, rodeado por endospermo, al cual puede localizarse encontrando al micrópilo. El embrión está formado por un eje de crecimiento y el cotiledón o haustorio que se mantiene absorbido en el endospermo. La función del haustorio es servir como un órgano de succión. Conforme el haustorio crece la plántula es expulsada en forma de una masa o botón de tejido. El haustorio se elonga y la planta se desarrolla adyacente a la semilla. Una ligula prominente se desarrolla en ángulo recto al eje cotiledonar y la plántula sobresale a través de esta ligula. Debido a que el embrión es curvado, la radícula crece en un ángulo oblicuo respecto a la plántula, la cual desarrolla dos vainas antes de que aparezca la primera hoja. Presentando una germinación tipo *Archontophoenix* (102) ó germinación tipo C (87), ver fotografías I a II.

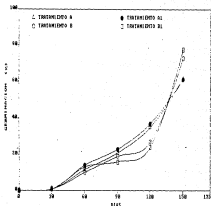


Fig. 3 Curvas de germinación obtenidas con semillas de *Chenopodium album*, sembradas en agrolita con ventilación.

1.3.2 PRUEBA DE VIABILIDAD DE LOS EMBRIONES.

Para determinar la viabilidad de los embriones de *Ch. album* se utilizó la prueba bioquímica del 2,3,5 trifenil tetrazolio (TTC). El TTC es absorbido por las células del tejido vivo, donde es transformado (debido al proceso de respiración), en un compuesto insoluble de color rojo (trifenil formazán) por

medio de una reacción de reducción (37).

Esta prueba permite distinguir los tejidos vivos de una semilla.

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 10.

Tipo de semillas	% de viabilidad
A	32.0
B	28.0
A1	77.3
B1	66.6

CUADRO 10.- Porcentajes de viabilidad de los embriones de *Ch. chilobaccata*.

La respuesta al TTC apareció después de 24 horas y no fue muy homogénea ya que los embriones se teñían en distintas zonas y con diferentes grados de intensidad.

Al comparar estos resultados con los de la prueba de germinación se observó que no coincidían, principalmente en lo que respecta a los de las semillas del tratamiento A y del tratamiento B, registrándose, al emplear la prueba del TTC, valores muy por debajo a los obtenidos en las pruebas de germinación. Por lo anterior (duración, tinción del tejido no homogénea y resultados no confiables) esta clase de prueba bioquímica no es adecuada al menos para semillas de la especie *Chamaecrista chilobaccata*.

Las palmas son plantas de lento crecimiento lo cual se refleja en el tiempo necesario para la germinación de sus semillas. Al respecto se han hecho estudios para acelerarla, por medio de las técnicas de "cama caliente", escarificación, aplicación de ácido giberélico, almacenaje en agua destilada y el crecimiento *in vitro* de embriones (25, 63, 67, 68, 69 y 117), las cuales han dado buenos resultados en algunas especies.

Sin embargo, en México son escasos los reportes sobre germinación de semillas, no sólo de palmas sino en general de especies tropicales, por lo que los resultados aquí obtenidos serán de gran utilidad en el conocimiento del comportamiento de las semillas en lo referente a su germinación a través del tiempo, así como en la determinación de técnicas de almacenaje que favorezcan la conservación de estas especies.

2.- CULTIVO IN VITRO.

2.1 SIEMBRA DE EMBRIONES.

2.1.1 PRUEBAS DE DESINFESTACION.

En el cuadro 11 se muestra el porcentaje de contaminación y el porcentaje de obscurecimiento de los tejidos cuando los embriones de *Ch. glaucus* fueron expuestos al NaClO durante cinco tiempos distintos:

Tiempo de exposición al NaClO (minutos)	Contaminación (%)	Obscurecimiento (%)
0	70	10
5	20	10
10	20	50
15	0	100
20	0	100

CUADRO 11.- Porcentajes de contaminación y obscurecimiento de los embriones de *Ch. glaucus* obtenidos durante las pruebas de desinfección.

Como puede observarse conforme aumentó el tiempo de exposición al NaClO disminuyó la contaminación pero a la vez se incrementó el grado de obscurecimiento del tejido.

Con base en estos resultados se eligió el tratamiento de desinfección con el cual se obtuvo menor obscurecimiento de los embriones y menor porcentaje de contaminación, que consistió en sumergirlos en NaClO durante 5 min. Al realizar una repetición de esta prueba con 200 embriones, se logró disminuir la contaminación del 20 % al 15 %, aunque el valor del grado de obscurecimiento del tejido se mantuvo constante (10 %).

La inhibición de la oxidación puede atribuirse, más que al empleo de carbón activado, al hecho de haber utilizado embriones intactos, sin daño, ya que pudo observarse que cuando un embrión era lesionado accidentalmente sufría un fuerte obscurecimiento sin que la presencia de carbón activado lo evitara.

2.1.2 CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES.

Los embriones de *Ch. oblongata*, después de 165 días, no presentaron respuesta alguna en ninguno de los medios experimentales empleados ya que continuaban sin cambios e incluso no se observó oscurecimiento en su tejido (fotografías 12, 13 y 14).

Esta falta de respuesta puede ser atribuida tanto a la composición del medio nutritivo, como a las condiciones de cultivo empleadas.

2.2 CULTIVO IN VITRO DE INOCULOS DE ORGANOS.

2.2.1 PRUEBAS DE DESINFESTACION.

El cultivo de tejidos involucra una serie de parámetros de tipo físico, químico y biológico (composición del medio, condiciones de cultivo, tipo de inóculo, etc.) que deben considerarse en toda investigación, sin embargo, dado que esta técnica implica la inoculación o siembra de material vegetal en un medio de cultivo que por su composición química favorece la proliferación de microorganismos, lo primero que debe tomarse en cuenta cuando se inicia un trabajo de cultivo in vitro es el establecimiento de un método que permita la desinfección del material biológico sin causarle daño, ya que las plantas llevan, de modo invariable, en su superficie externa diversos microorganismos (bacterias, hongos, levaduras, etc.) que al llegar a contaminar los medios de crecimiento, compiten con los inóculos por los nutrientes y el espacio, además de afectarlos con las sustancias tóxicas producto de su metabolismo (16).

Por desinfección debe entenderse el tratamiento al cual son sometidos los inóculos para eliminar a los organismos presentes en su superficie (37).

Tomando en cuenta lo antes dicho se realizaron pruebas de desinfección, las cuales produjeron los siguientes resultados:

a) Inóculos de hoja, tallo y raíz (plántulas de *Ch. oblongata*).

En el cuadro 12 se resumen los resultados obtenidos durante las pruebas de desinfección.

Como puede observarse tanto los inóculos de la parte subterránea como los de la parte aérea presentaron porcentajes de contaminación semejantes (en promedio 20 %), mientras el oscurecimiento del tejido fue variable dependiendo del tratamiento, registrándose el valor más bajo (25.0 %) al exponer los inóculos 5 min. al etanol al 70 % y 15 min. al NaClO al 1.2 %.

Etanol :		Hipoclorito de sodio 1.3 % (v/v)				
		Tiempo de exposición (min)				
(min.)	0	5	10	15	20	30
1	a=14.28	a=11.11	a=10.0	a=12.5	a= 9.0	
	s=21.42	s=11.11	s=20.0	s=8.33	s=40.9	**
	o=38.57	o=38.89	o=37.0	o=39.8	o=52.7	
3	a=14.29	a=16.16	a=25.0	a=80.0	a=20.0	
	s=30.0	s= 8.33	s= 8.33	s= -	s= -	**
	o=70.0	o=61.11	o=88.88	o=30.0	o=88.0	
5	a=28.57	a=50.0	a=18.57	a= 9.1	a=60.0	
	s=35.71	s= -	s=33.33	s=37.5	s= -	**
	o=45.71	o=80.0	o=65.0	o=25.0	o=64.0	
10				a=0.0	a=0.0	
				s= -	s= -	**
				o=68.7	o=80.0	
15				a= 7.1	a= -	
				s=35.7	s=30.0	**
				o=42.86	o=41.3	

a = % de contaminación de la parte aérea (tallo y hoja).
s = % de contaminación de la parte subterránea (raíz).
o = % de obscurecimiento total de los tejidos.
--- la prueba no se realizó
** Todos los inóculos se obscurecieron fuertemente después del primer día de incubación.

CUADRO 12.- Resultados obtenidos durante las pruebas de desinfección empleando inóculos de órganos de *Ch. blattaria*.

Por lo anterior, el tratamiento para la desinfección de los inóculos se eligió, principalmente, con base en el tratamiento que había provocado un menor porcentaje de obscurecimiento del tejido.

Se corroboraron los resultados del mejor tratamiento al realizar una repetición de éste, en la cual se logró disminuir la acción de la oxidación sobre el tejido al 15 %. Los resultados de la contaminación no variaron: 9.0 % para la parte aérea y 37.5 % de la parte subterránea (Fotografía 15).

Debe mencionarse que conforme se adquirió mayor experiencia en el manejo de la técnica el porcentaje de contaminación se logró disminuir hasta el 0.4 %, por lo que puede decirse que la mayor parte de la contaminación se debió a errores de

manipulación.

Reynolds (26) indica que la desinfección de inóculos de palmas es difícil y que incluso el tejido embrionario requiere desinfección, por lo que, con base en los resultados obtenidos, puede considerarse que la técnica utilizada es la más adecuada para desinfectar tejidos aéreos (hojas y tallos) de palma caedera (*Chamaedorea obconoides*, Ch. *glauca* y Ch. sp.).

Otro de los problemas asociado con el cultivo *in vitro* de las palmas, y quizás el más difícil de resolver, fue el rápido oscurecimiento que sufrieron los inóculos después de haber sido escindidos. Muchos investigadores han reportado el oscurecimiento de tejidos de palmas y concluyen que es debida a compuestos fenólicos producidos por la acción de enzimas (oxidases) que contienen cobre (p. ej. las polifenoloxidasas y la tirosinasa) las cuales son liberadas o sintetizadas cuando los tejidos son lesionados.

Uno de los atributos más sobresalientes de estas enzimas es su especificidad de acción, de manera que tan sólo ciertos reactantes (substratos) experimentan su acción y únicamente tiene lugar un tipo de reacción sin que se produzcan reacciones laterales o subproductos (27).

Las enzimas y los sustratos se encuentran generalmente retenidos en las células y concurren cuando las células están dañadas o moribundas. La toxicidad de los fenoles, es probablemente debida, principalmente a la reversibilidad del hidrógeno enlazado a las proteínas. Cuando los fenoles son oxidados forman compuestos altamente activos (como las quinonas), que posteriormente ciclan, polimerizan y/u oxidan a las proteínas, formando más y más compuestos melánicos, provocando que los inóculos se tornen café o negro poco después de ser escindidos. Cuando esto ocurre el crecimiento es inhibido irreparablemente y el tejido generalmente muere (31).

Existen varias técnicas para prevenir el oscurecimiento de los inóculos *in vitro*, pero desafortunadamente ningún método por sí sólo es efectivo para todas las especies y en algunas, como es el caso de las palmas del género *Chamaedorea*, puede ser muy difícil. Por esto se decidió probar conjuntamente algunas técnicas de prevención mencionadas por George y Sharringtons (31), con las cuales se han producido buenos resultados con otras especies, y que permitieron disminuir hasta el 15 % la oxidación/oscurecimiento del tejido en las zonas de corte y puntos oscurecidos lo cual se considera satisfactorio. Las técnicas empleadas fueron:

- Reducción de los compuestos fenólicos reducidos. La reacción se logró al dejar reposar los inóculos recién escindidos en una solución de l-cisteína (100 mg/l).

- Modificación del potencial redox de la solución. La tendencia de los compuestos a ser oxidados o reducidos depende

del potencial de oxidación-reducción (redox) de la solución donde se encuentran. Para disminuir este potencial redox se usaron agentes reductores (antioxidantes) que han probado ser efectivos para reducir el oscurecimiento de los tejidos o de los extractos vegetales al prevenir la oxidación de los fenoles.

La modificación del potencial redox se realizó de dos formas: al reducir temporalmente el oxígeno disponible a los inoculos cuando se sumergieron los inoculos en L-cisteína (100 mg/l) inmediatamente después de ser cortados y al adicionar L-cisteína (100 mg/l) al medio de cultivo.

- Inhibición de la acción de las enzimas fenoloxidasas. Los agentes quelantes ofrecieron otros medios para interferir en la acción de enzimas peroxidasas, ya que tienen la capacidad de captar iones que están débilmente ligados a los sistemas biológicos.

Se empleó NaFeEDTA como agente quelante; esta sustancia capta el cobre requerido para el funcionamiento de las fenolasas, por lo que previene el oscurecimiento de los tejidos.

- La actividad enzimática, que afecta tanto a la biosíntesis como a la oxidación de los fenoles, es incrementada por la luz. Por tal razón, para disminuirla, los inoculos fueron incubados en la oscuridad.

Por los resultados obtenidos en el cultivo *in vitro* de los embriones se decidió no utilizar carbón activado, a pesar que se recomienda para disminuir la oxidación (26 y 115).

3.2.2 CULTIVO *IN VITRO* DE CELULAS Y ORGANOS.

a) CULTIVO *IN VITRO* DE INOCULOS DE PLANTULAS.

Treinta días después de ser cultivados *in vitro* los inoculos provenientes de plántulas de *Ch. chilensis*, presentaban un grado bajo de oxidación (10 R), oscureciéndose sólo los bordes del inoculo, en las zonas de corte (Fotografía 16 y 17).

A partir de los treinta días los inoculos comenzaron a oscurecerse a una velocidad variable, la muerte del tejido fue a los 90 o 120 días después, sin haberse registrado las respuestas esperadas (crecimiento, desarrollo, formación de tejido calloso, etc), en ninguno de los 15 tratamientos hormonales usados.

b) CULTIVO IN VITRO DE INOCULOS DE HOJA DE PLANTULAS Y PALMAS ADULTAS.

1) Medio Y3 (20).

- Inóculos de tejidos vegetativos de plántulas de *Cb. glaucostata*.

A los 120 días se detectó tejido calloso (granular y de color blanco) en el 5 % de los inóculos de los tratamientos: 6, 8, 13 y 14 (fotografía 18). Todos el material biológico viable fue trasplantado a medio fresco, no se registró desarrollo de este material, el cual se oxidó completamente a los 210 días. El porcentaje de contaminación en esta prueba fue bajo (de 1.25 %).

En el cuadro 13 se indica como fue desarrollándose la prueba.

Tratamiento*	% de sobrevivencia			
	30 días	120 días (trasplante)	180 días	210 días
1	30	0	---	---
2	30	0	---	---
3	55	0	---	---
4	30	0	---	---
5	0	---	---	---
6	80	50 (callo)	0	---
7	75	0	---	---
8	60	50 (callo)	---	---
9	100	50	0	---
10	100	0	---	---
11	90	45	0	---
12	100	45	15	5
13	100	75 (callo)	15	2
14	100	55 (callo)	0	---
15	75	0	---	---

* Los números indican el tratamiento empleado de acuerdo al cuadro 3.

CUADRO 13.- Desarrollo del cultivo in vitro de inóculos de hoja de *Chamaedorea glaucostata*.

- Inóculos de tejidos de palmas adultas de *Cb. glauca*.

Este tipo de inóculo no respondió favorablemente en ninguno de los 15 tratamientos hormonales experimentales. El porcentaje de sobrevivencia a lo largo de la prueba se muestra en el cuadro 14.

Tratamiento	% de sobrevivencia		
	90 días	120 días	150 días
1	20	12	0
2	66	0	--
3	20	0	--
4	40	0	--
5	50	20	0
6	70	0	--
7	60	40	0
8	60	44	0
9	0	--	--
10	14	0	--
11	60	60	0
12	100	80	0
13	50	50	0
14	75	40	0
15	0	--	--

CUADRO 14.- Resultados obtenidos en el cultivo *in vitro* de inóculos de hoja de *Chenopodium giganteum*.

2.- Experimento de amplio espectro.

El experimento de amplio espectro proporcionó los siguientes resultados:

A partir del tejido de la hoja de *Ch. giganteum* se indujo la dediferenciación del tejido formándose a los 20 días, en los medios 50, 44, 69, 71 y 72, tejido calloso (en el 10 % de los inóculos de cada medio). El callo obtenido era granular, de color blanco y formado por muy pocas células. El callo fue oscureciéndose lentamente muriendo todo el material a los 60 días.

En los demás tratamientos los inóculos presentaron un oscurecimiento variable en cuanto a velocidad de oxidación y a cantidad de tejido afectado (desde las zonas de corte hasta un 75 % de tejido dañado). A los 90 días se realizó el trasplante del material biológico a medio fresco. Todos los inóculos de los medios 1 al 27, 43, 51, 62, 71 y 72 murieron antes de los 90 días. Los inóculos trasplantados no presentaron algún tipo de respuesta de crecimiento o desarrollo registrándose, a los 120 días, el 100 % de muerte celular.

Al realizar las repeticiones, tres, de esta prueba (únicamente del medio 28 al 51) se confirmaron los resultados anteriores, los inóculos murieron a los 120 días. Los resultados se resumen en el cuadro 7.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)		
	90 días	150 días	180 días
20	30	10	0
29	80	60	0
30	80	20	0
31	40	20	0
32	40	0	-
33	50	30	0
34	60	40	0
35	80	40	0
36	40	0	-
37	20	20	0
38	20	0	-
39	60	20	0
40	20	0	-
41	20	0	-
42	30	10	0
43	0	-	-
44	60	10	0
45	10	10	0
46	70	30	0
47	100	0	-
48	50	0	-
49	80	30	0
50	80	60	10
51	0	-	-
52	0	-	-
53	30	30	0
54	30	30	0
55	100	50	0
56	80	0	-
57	80	30	0
58	100	50	0
59	80	30	0
60	50	0	-
61	80	0	-
62	50	30	0
63	50	0	-
64	100	30	0
65	80	30	0
66	20	0	-
67	50	60	0
68	50	0	-
69	20	0	-
70	50	0	-
71	0	-	-
72	0	-	-
73	50	0	-
74	50	20	10
75	80	0	-

CONTINUA...

CUADRO 15.- Resultados obtenidos con la prueba de espillo espectro empleando inóculos de hoja de *Chamaedorea glauca*.

CONTINUACION...

Tratamiento	Sobrevivencia (%)		
	90 días	150 días	180 días
76	50	20	0
77	50	0	-
78	50	25	0
79	20	20	10
80	100	0	-
81	50	50	0

CUADRO 15.- Resultados obtenidos con la prueba de amplio espectro empleando inóculos de hoja de *Chasmodon siliqua*.

Un dato importante que se registró fue que los inóculos que no estaban en contacto directo con el medio (sembrados encima de otro inóculo, ver fotografía 17) permanecieron vivos y sin oxidación por más tiempo en comparación con los que estuvieron en contacto con el medio, los cuales se oscurecieron en un 100 % a los 90 días.

3) Medio 58 del experimento de amplio espectro suplementado con extractos naturales.

A pesar de la gran amplitud de esta prueba, donde se experimentó con extractos naturales (8 tipos y 8 mezclas de ellos), ver cuadro 4, que reporta la literatura que producen resultados satisfactorios con otras especies, la edición de ellos al medio de cultivo no indujo ningún tipo de respuesta positiva en los inóculos de hoja de *Chasmodon siliqua*.

Algo interesante que se observó fue que en los tratamientos en donde se emplea endospermo de maíz, sólo o mezclado con otro extracto, el oscurecimiento de los inóculos y del medio fue mayor comparado con los otros tratamientos.

En el cuadro 16 se puede observar el comportamiento de los inóculos en los 17 tratamientos a lo largo de 120 días.

Tratamiento	% de sobrevivencia			
	30 días	60 días	90 días	120 días
coco	75	40	15	0
co-na	35	30	0	-
co-pa	45	30	15	-
co-na	40	25	5	0
co-pl	25	25	20	0
co-pi	35	15	0	-
co-ji	60	45	30	0
maíz	40	10	0	-
papa	10	10	0	-
naranja	20	10	0	-
plátano	5	5	0	-
piña	15	5	0	-
jitomate	40	25	20	-
linón	15	0	-	-
co-na-pa	50	10	0	-
co-na-na	55	30	0	-
testigo	60	60	10	-

co = coco; na = maíz; pa = papa; na = naranja; pl = plátano
 pi = piña; ji = jitomate.

CUADRO 16.- Resultados obtenidos en el cultivo in vitro de inóculos de hoja de *Ch. glaucus* al adicionar al medio de cultivo extractos naturales.

4) Medio M.E suplementado con plátano.

Los inóculos de hoja de *Ch. glaucus* no respondieron favorablemente a esta prueba manteniéndose vivos en cultivo durante 120 días.

c) CULTIVO IN VITRO DE ANTERAS.

- En los medios empleados, Hitch (66) y Anderson (31), líquidos, aunque están reportados para obtener el cultivo exitoso de anteras, los inóculos de *Chasmodon* sp., comenzaron a oscurecerse en todos los tratamientos a los tres días de cultivo sin registrarse algún tipo de respuesta posterior.

- Medio M.Z (61), sólido.

Las anteras de *Chasmodon* sp., colocadas en este medio no sufrieron oscurecimiento durante 40 días y en algunos tratamientos adquirieron un color verde. No se registró ninguna otra respuesta favorable. A continuación, en el cuadro 17, se indica el porcentaje de anteras que cambiaron de coloración:

Tratamiento	% de anteras
1	15
3	5
4	10
8	20
12	15
14	5

CUADRO 17.- Porcentaje de anteras de *Chamaedorea* sp. que cambiaron de coloración al ser cultivadas en medio M.S.

- Medio Anderson (31), sólido.

En el 57.5 % de anteras jóvenes de *Chamaedorea* sp., a los 6 días se presentó hinchamiento del tejido conectivo y sólo un 10 % de tejido oboscurecido.

Respecto a las anteras maduras (es decir, ya abiertas) de *Chamaedorea* sp., que fueron sembradas, aunque sufrieron un fuerte oboscurecimiento se observó que el polen que cayó sobre el medio en el momento de la siembra, desarrolló el tubo polínico a los 8 días, lo cual indica que el polen era viable (dato que sirvió para plantear la siembra de microsporas), sin embargo, no siguió desarrollándose (fotografía 19).

d) CULTIVO IN VITRO DE MICROSPORAS AISLADAS.

En ninguno de los medios Mitch y Mitch (66) y Anderson(31), así como en ningún tratamiento (gradiente de sacarosa), se observó alguna respuesta por parte de las microsporas de *Chamaedorea* sp..

Como puede observarse en los resultados anteriores, ningún tipo de inóculo hasta aquí probado (raíz, tallo, hoja, anteras y microsporas), respondió a los medios experimentales de forma favorable al ser cultivado in vitro, sólo se logró un desarrollo excesivo de tejido calloso (en los inóculos provenientes de hoja), de *Ch. chilensis* y *Ch. elegans*, el cual no proliferó ni se desarrolló.

Dado que el cultivo de tejidos es un sistema de detalles, el establecimiento y desarrollo exitoso de las células vegetales, in vitro, está determinado por varios factores, que pueden actuar por sí solos o en combinación. Entre éstos se encuentran:

- Fuente y tipo de inóculo.
- El pH del medio.
- Tipo de esterilización del medio.
- Luz.
- Temperatura.

- f) La composición del medio de cultivo.
- g) Factores genéticos.

Analizando la influencia de estos factores en los resultados obtenidos, se encontró lo siguiente:

a) Fuente y tipo de inóculo.

La planta madre de la cual se extraerán los inóculos debe de estar lo más sana posible y al principio de su crecimiento activo para aumentar las probabilidades de respuesta (40). También es muy importante tomar en cuenta su edad fisiológica ya que es, junto con el medio nutritivo, la que determina el tipo y rapidez de la morfogénesis. De manera general se dice que los tejidos jóvenes tienen mayor capacidad de diferenciación y crecimiento que los viejos (50).

En este sentido se considera que este factor no tuvo un efecto determinante en los resultados, ya que se experimentó principalmente con tejidos jóvenes aunque también se utilizaron inóculos de plantas maduras (se usaron sus hojas jóvenes).

En lo referente al tipo de tejido empleado como fuente de inóculos se probaron 7 diferentes tipos de órganos de la planta: raíz, tallo, hoja, flor, raquilla, anteras y microsporas, por lo que este factor tampoco fue determinante.

Con respecto al tamaño del inóculo, Loyola (50) indica que mientras más pequeño sea éste, menos probabilidades de contaminación existen, aunque por otra parte las posibilidades de prendimiento y desarrollo disminuyen.

Para determinar el tamaño de los inóculos se tomaron en cuenta los resultados obtenidos durante las pruebas de desinfección, donde se observó que aquellos menores de 1 cm se oscurecían más rápidamente, mientras que los de 1 cm o más permanecieron vivos más tiempo.

Por lo anterior se considera que estos factores tampoco tuvieron injerencia en los resultados.

b) pH del medio.

El pH del medio debe ser tal que no debe interrumpir la función de la membrana celular o el pH del citoplasma y además debe permitir que las sales se mantengan en forma soluble. También interviene en la asimilación de los ingredientes del medio, pudiendo llegar a afectar la eficiencia gelificante del agar. El pH del medio puede ser alterado durante la incubación, esterilización y gelificación. Para disminuir el riesgo de que el cambio de pH afecte la respuesta de los tejidos, se puede hacer lo siguiente:

La acidez de los medios de cultivo se puede ajustar entre 5.0 y 6.5 antes de esterilizarlo, habiéndose observado que fuera

de este rango se pierde la disponibilidad de algunos nutrientes para el inóculo. Además ajustando previamente el pH a 5.7 resulta en un pH aproximado de 5.6 después de esterilizarlo en autoclave (31, 73 y 111).

Tomado como referencia lo anterior se decidió usar un pH de 5.7 que es el más empleado y con el que se tiene mayor probabilidad de permanecer dentro del rango donde todas las sales se mantienen solubles, por lo que este factor no se considera determinante en los resultados que se obtuvieron.

c) Tipo de esterilización del medio.

Algunos componentes del medio de cultivo pueden ser descompuestos, alterados o pueden reaccionar con otros componentes cuando son expuestos al calor. Además de este tipo de esterilización existen otros como la radiación, la esterilización con gas y la ultrafiltración (16, 55 y 73).

Todos los medios utilizados durante la investigación fueron esterilizados en autoclave, dado el volumen de los medios con que se trabajó, manteniéndose este factor como una constante, por lo que se considera que no pudo haber influido en la respuesta de los inóculos al cultivo *in vitro*, ya que si bien existen trabajos en donde se reporta que algunos componentes del medio son termolábiles, si luego haber alguna pérdida de estas sustancias por la acción del calor ésta fue compensada por el amplio rango de concentraciones que fueron empleadas.

d) Luz.

Se decidió incubar los inóculos en la oscuridad para reducir uno de los principales problemas del cultivo *in vitro* de las plantas: el oscurecimiento del tejido.

La falta de luz pudo haber afectado el metabolismo de los tejidos pero de una manera favorable lo cual quedó demostrado por los bajos porcentajes de oxidación registrados en los experimentos.

Al no haber realizado pruebas con diferentes intensidades luminosas no puede decirse si ésta afecta o no la respuesta de los tejidos, por lo que sería importante experimentar con este factor.

e) Temperatura.

Se descarta este factor como determinante en los resultados que se obtuvieron ya que como lo menciona Lozoya (50), cuando el calor es un factor de variación o estudio, una temperatura que oscile entre 25 y 30°C es aceptable para la incubación. Las temperaturas empleadas estuvieron dentro de este rango.

f) Composición del medio de cultivo.

Al separar un fragmento de tejido de la planta donadora con la finalidad de cultivarlo *in vitro* se ve afectado su metabolismo al perder ésta su capacidad para sintetizar su propia fuente de carbohidratos, vitaminas, fitorreguladores del crecimiento, etc., y es necesario suministrar todas estas sustancias de forma artificial, a través del medio de cultivo (73).

El medio de cultivo debe estar constituido básicamente por sales, macro y micronutrientes, pudiendo ser complementado con fitorreguladores del crecimiento, vitaminas, aminoácidos y fuente de carbohidratos.

Si se considera que los requerimientos de los tejidos vegetales crecidos *in vitro* son, o deben ser, similares (de manera general) a aquellos de las plantas intactas, no existen razones obvias del porque el medio basal no pueda ser elaborado para satisfacer las características metabólicas de cada especie, sin embargo la forma empírica de abordar el problema (generalmente se toman como referencia medios ya probados), hace que el proceso sea en algunos casos lento y arduo, ya que no se pueden hacer extrapolaciones exitosas.

En el caso de las tres especies del género *Chamaedorea* con las que se trabajó, puede decirse que la falta de respuesta al cultivo *in vitro*, se debió a la composición de los medios nutritivos sólo en la muestra de embriones, anteras y microsporas, ya que con los embriones sólo se empleó el medio M.S. (62) y en el de las anteras y microsporas el medio Anderson (31) y Nitch y Nitch (66), líquidos, no obstante que el medio M.S. es recomendado por permitir una buena respuesta en casi todas las especies, lo mismo que el medio Anderson y Nitch y Nitch para el cultivo de anteras y microsporas. En el primer caso se variaron las concentraciones hormonales y en el segundo la concentración de sacarosa. Con las anteras también se probaron estos medios pero sólidos, en los cuales las anteras permanecieron durante mayor tiempo viables e incluso presentaron señales de respuesta (cambio de color, hinchazón, germinación del polen). Estas distintas formas de respuesta dan indicios de que este tipo de inóculos pueden responder favorablemente al cultivo *in vitro*, por lo que es necesario probar con otros medios y observar la respuesta de estos inóculos.

Por otra parte, la falta de respuesta de los inóculos de hoja (folículos y raquis) no puede ser adjudicada a la composición de los medios de cultivo ya que en total se probaron 38 medios distintos. Tan sólo en el experimento de amplio espectro se usaron 9 macronutrientes, 7 micronutrientes, 4 auxinas, 4 citoquininas y 12 componentes más (agrupados en el grupo de las vitaminas, aminoácidos y azúcares), todos suministrados en tres concentraciones, lo cual produjo 81 medios diferentes, de los cuales por lo menos uno debía cubrir las necesidades nutritivas mínimas de los tejidos. Además se emplearon extractos naturales solos o mezclados, con los cuales se constituyeron 16

tratamientos. Este tipo de sustancias son usadas cuando ningún medio artificial de composición química definida da resultado, por su posible aportación de sustancias desconocidas al medio, las cuales en determinados casos son necesarias para iniciar la respuesta al cultivo *in vitro* (35).

Con respecto a la forma física del medio, en esta investigación se utilizaron medios solidificados con agar. Se reporta (7) que uno de los problemas de utilizar medios sólidos o semisólidos estriba en que el agar no es fisiológicamente inerte, puesto que contiene significantes impurezas de macromoléculas e inhibidoras no definidas. Este problema puede ser solucionado al agregar al medio sustancias como el carbón activado y l-cisteína. Lozoya (50) menciona que las células, en un medio sólido tienden a crecer más lentamente que en medios líquidos, sin embargo el empleo de medios sólidos ha dado mejores resultados en la organogénesis. Debe tomarse en cuenta la cantidad de agar que se utilice ya que el medio debe quedar firme para soportar los inoculos pero no duro, puesto que puede impedir el contacto adecuado del inoculo con el medio especialmente después de secarse (40). Los medios empleados en esta investigación cumplieron con esta última característica.

Las anteras y las microsporas fueron sembradas en medios líquidos porque estos son los reportados como los más adecuados para este tipo de inoculos, aunque debe mencionarse que las anteras respondieron mejor en los medios sólidos.

En cada caso particular el estado físico del medio fue elegido al considerar que sería el más adecuado para cada clase de inoculo. No se considera que este factor haya determinado la falta de respuesta, sin embargo, no debe descartarse el hacer pruebas con los dos tipos de medios ya que ambos poseen ventajas y desventajas.

g) Factores genéticos.

El crecimiento de órganos y tejidos cultivados y la morfogénesis *in vitro*, están probablemente más influenciados por el genotipo (constitución genética) que por cualquier otro factor (31).

Si bien, numerosas especies han sido cultivadas *in vitro* satisfactoriamente, existen aún muchas que o no han respondido o su respuesta ha sido pobre (40). La facilidad de regeneración varía con el genotipo y aún entre las células de la misma planta (debido a alteraciones genéticas). En los tejidos de plantas de diferente sexo existen disimilitudes intrínsecas en los niveles de sustancias de crecimiento, lo que implica diferencias metabólicas y fisiológicas aún entre plantas de la misma especie. George y Sherrington (31) señalan que han dado mejor resultado los inoculos provenientes de plantas femeninas.

La totipotencialidad es el atributo de las plantas que proporciona valor al cultivo de tejidos en el área de la micropropagación. Sería lógico pensar que todas las células

vegetales poseen totipotencialidad o por lo menos tienen una capacidad inherente para producir una planta completa. Sin embargo, la expresión de esa potencialidad está limitada a relativamente muy pocas células llamadas "meristemoides". Realmente éstas son las únicas células morfogenéticamente competentes: sólo ellas responden a variaciones en el medio para formar brotes, raíces o embriones. Así para regenerar plantas el tejido cultivado debe contener estos meristemoides o células que sean fácilmente transformadas a meristemoides. Los meristemoides son escasos; para cada planta el contenido de meristemoides varía aún entre tejidos y órganos; de manera general las células morfogenéticamente competentes son encontradas con mayor probabilidad en órganos y plantas jóvenes más que en órganos viejos o plantas en floración. El porqué se da esta especificidad regenerativa sólo en algunas células no se sabe, sin embargo algunas observaciones confirman la opinión que algunos genes están siendo expresados y que ellos son probablemente desreprimidos por proteínas no histónicas. Los mecanismos específicos para la desrepresión de genes y su secuencia de desrepresión no se conocen. La aparición de ciertas poliaminas en conjunción con la iniciación del proceso de organogénesis sugiere que estas sustancias pueden ayudar a regular este mecanismo (61).

En el género *Chamaedorea* probablemente el número de meristemoides es escaso y su distribución en la planta se limita a algunos órganos, por lo cual su respuesta a las condiciones in vitro fue tan pobre.

e) CULTIVO IN VITRO DE INFLORESCENCIAS (FLORES Y RAQUILLAS).

- Desinfección.

Con el método de desinfección empleado se obtuvo una contaminación por hongos y bacterias, del 4.0 % de los inoculos de *Ch. elegans* y *Ch. sp.* y un oscurecimiento en el 20 % del tejido, principalmente en el perianto, después de 15 días.

- Cultivo in vitro.

1.- Medio Anderson (31):

- Prueba de incubación con luz difusa.

Las flores de *Chamaedorea sp.* adquirieron su color amarillo, característico de las flores maduras. A los 4 días presentaron antemia observándose receptividad a la polinización evidenciada por la aparición de una gota de néctar secretada por los estigmas, cuya función es captar los granos de polen que son transportados por el viento o los insectos (fotografía 20). Las flores que mostraron receptividad fueron polinizadas manualmente tomando el polen de otra flor. El polen que cayó al medio nutritivo germinó, y desarrolló el tubo polínico lo cual indicó que el polen era viable y con capacidad para realizar la

fecundación.

El oscurecimiento se empezó a observar a los 10 días de realizada la siembra. Después de 30 días, el perianto (corola y cáliz) se oxidó totalmente aunque las anteras se conservaron sin síntomas de oxidación. A los 40 días se oscurecieron totalmente. No se observó otro tipo de respuesta.

- Prueba de incubación a 7°C.

Las flores de *Chamaedorea* sp., abrieron a los 30 días pero no cambiaron de color manteniéndose verdes. El oscurecimiento de los inóculos se presentó a los 80 días progresando rápidamente, llegando al 53.5 % a los 80 días. El resto de las flores continuaron verde durante 100 días a partir de los cuales empezaron a oscurecerse en un 100 % sin registrarse la respuesta esperada.

- Prueba de incubación en la oscuridad.

El 35.4% de las flores de *Chamaedorea* sp., permanecieron sin oxidarse por 60 días. A los 90 días este porcentaje se redujo al 33.6 %. El 4.5% de las flores mostraron hinchamiento de los pétalos, los cuales no modificaron este estado.

2) Medio M.S. (62).

- Al emplear el medio M.S. suplementado (tabla 1, cuadro 6) después de 30 días las flores de *Chamaedorea* sp., sufrieron un oscurecimiento muy fuerte, incluso de las estructuras internas: todas las inóculos murieron a los 40 días sin haberse presentado respuesta.

- Con el medio M.S. suplementado (tabla 1, cuadro 7) las flores de *Chamaedorea* sp., lograron sobrevivir más tiempo, sin embargo a los 50 días presentaban un fuerte oscurecimiento en todas sus estructuras sin respuesta positiva alguna.

De todos los órganos de la palma probados como fuente de inóculos, las inflorescencias de *Chamaedorea* sp. y *CC. lissanæ* (fotografía 21) fueron con las que se obtuvieron las respuestas más significativas al cultivo. A continuación se indican los resultados obtenidos:

a) Este tipo de inóculo mostró menor incidencia de contaminación:

b) El oscurecimiento del tejido empezó a manifestarse después de 15 días en tan sólo el 20 % de los inóculos únicamente el perianto fue afectado, lo cual hizo que la probabilidad de respuesta aumentara.

c) El experimento con medio Anderson (en donde se variaron las condiciones de incubación) produjo resultados muy interesantes:

- La receptividad polínica mostrada por las flores de *Chamaedorea* sp., bajo condiciones de luz difusa es un resultado de gran importancia ya que las flores que se usaron eran masculinas (el género *Chamaedorea* es dioico). Esta respuesta puede explicarse ya que en el origen de su desarrollo ontogénico las flores del género *Chamaedorea* eran monoicas, sin embargo con el tiempo sufrieron una definición sexual, manteniéndose los brácteos de un sexo sólo de una forma vestigial. Lo que probablemente ocurrió fue que el pistilo vestigial fue afectado por el medio nutritivo en su desarrollo, ya que se encontraba en una fase muy temprana (flor inmadura) por lo que la predeterminación fenotípica de la flor se modificó.

- Las flores incubadas a 7°C se conservaron vivas durante 80 días lo cual indica que una temperatura baja retarda el proceso de oxidación. Se presentó además lo cual es una de las características de la maduración de la flor.

- La prueba en donde las flores se incubaron en la oscuridad viene a resaltar que el proceso de oxidación es inhibido por la falta de luz permitiendo que el tejido permanezca viable por más tiempo.

En el Medio M.S no se obtuvo ningún tipo de respuesta lo cual puede indicar que la composición del medio basal sea un factor importante en el cultivo *in vitro* de las flores y que el medio M.S (rico en nutrientes) no fue el más adecuado para este tipo de inóculos.

3) Medio Y3.

A los 80 días las flores de *Ch. elegans*, mostraban oscurecimiento en el cáliz y la corola pero el gineceo mostraba un bajo grado de oscurecimiento.

En los tratamientos 6, 8 y 12 se observó que el ovario de la flor, de color verde, se transformó para dar lugar a tres estructuras blancas, de textura lisa las cuales surgieron a partir de los carpelos y que llegaron a tener, cada una, el mismo tamaño del ovario; su forma era muy parecida a los embriones sexuales (fotografías 13, 14 y 22 a 27). El porcentaje de este tipo de respuesta fue del 10.0 % en el tratamiento 6, 20.0 % en el tratamiento 8 y del 10.0 % en el tratamiento 12.

Las neoformaciones fueron separadas del resto de la flor y transplantadas, de manera individual, a medio nutritivo Y3 fresco carente de hormonas en donde no se registró desarrollo, oscureciéndose a los 80 días.

En el cuadro 16 se resumen los resultados obtenidos:

Tratamiento	% de sobrevivencia 60 días	Respuesta
1	80	---
2	70	---
3	70	---
4	70	---
5	80	---
6	70	10 % neoformaciones
7	100	---
8	70	20 % neoformaciones
9	70	---
10	30	---
11	10	---
12	50	10 % neoformaciones
13	30	---
14	40	---
15	50	---

CUADRO 18.- Resultados obtenidos al cultivar 10 yemas flores femeninas de *Chaparraca gigas*, empleando el medio Y3.

4) Medios 46 al 54 del experimento de amplio espectro.

De los medios 46 al 54 no se registró respuesta alguna en los inoculos de *Ch. gigas*, pero a lo 60 días del medio 35 en adelante (excepto en los medios 60, 71, 72, 77, 80 y 81) se observó la transformación del ovario en tres estructuras blancas formadas aún cuando en algunas flores el perianto ya se encontraba totalmente oxidado. Si bien a los 60 días algunas de las estructuras formadas aún mantenían una similitud morfológica con el ovario, ya que sólo habían cambiado de color (de verde a blanco), a los 90 días ya eran diferenciables debido a que habían crecido y adquirido una forme muy parecida a la de los estriones sexuales, (como las obtenidas en los tratamientos 8, 9 y 12 con medio Y3). Esta vez las estructuras no fueron separadas del resto de la flor, continuando su incubación en la oscuridad a 25-30 °C. En estas condiciones las estructuras surgidas en el tratamiento 73 se tomaron fotosintéticas. Después de 180 días de su aparición se mantuvieron con un bajo grado de obscurecimiento y presentaron un ligero crecimiento por lo que fueron utilizadas para analizarlas histológicamente (fotografías 22 a 27).

Otro tipo de respuesta que se presentó en esta prueba fue el surgimiento de tejido calloso de color blanco y textura granular en los medios 71, 73, 80 y 81. Este tejido surgió a partir de la raquilla en la zona de abscisión de la flor (fotografía 28 y 29). El callo no proliferó aunque sí aumentó de tamaño y después de 120 días empezó a obscurecerse sin haber presentado otro tipo de respuesta. En el cuadro 19 se muestran los resultados de esta prueba:

Tratamiento	RESPUESTA		
	60 días	90 días	120 días
46	----		
47	----		
48	----		
49	----		
50	----		
51	----		
52	----		
53	----		
54	----		
55	*66.6		
56	*50.0		
57	*16.6		
58	*66.6		
59	*16.6		
60	---		
61	*50.0		
62	*50.0		
63	*33.3		
64	*33.3		
65	*66.6		
66	*50.0		
67	*100.0		
68	*16.6	oxidación 100 %	
69	*16.6		
70	*66.6	oxidación 50 %	
71	** calle 33.3 %		
72	---		
73	*50.0	** calle 33.3 %	los embricados se tornaron verdes
74	*33.3		
75	*16.6		
76	*50.0		
77	---		

* % de flores en donde surgieron estructuras.

** El calle que apareció en estos medicos surgió a partir de la raquilla en la zona de abscisión de la flor. El tejido calloso no fue abundante y no se logró que proliferara, aunque en el medic 69 se observó un aumento en su tamaño y su posterior oscurecimiento.

CUADRO 16.- Resultados obtenidos al cultivar 10 líneas flores femeninas de *Chenopodium glaucum*, empleando los medicos (46 al 81) del experimento de amplio espectro.

CONTINUA...

CONTINUACIÓN...

Tratamiento	RESPUESTA		
	60 días	90 días	120 días
79	*16.6		
79	*33.3		
80	** callo 66.6 %	crecimiento del callo y aparición en el 33.3 % restante	oxidación parcial del callo
81	** callo 33.3 %		

* % de flores en donde surgieron estructuras.

** El callo que apareció en estos medios surgió a partir de la raquilla en la zona de abscisión de la flor. El tejido calloso no fue abundante y no se logró que proliferara, aunque en el medio 80 se observó un aumento en su tamaño y su posterior oscurecimiento.

CUADRO 19.- Resultados obtenidos al cultivar *in vitro* flores femeninas de *Chenopodium album*, empleando los medios 146 al 81 del experimento de amplio espectro.

El porcentaje de formación de estructuras dependió del medio empleado. Como puede observarse, mientras que en el medio 73 estas neoformaciones surgieron en los medios 6, 8 y 12 en donde el rango de concentraciones de 2,4-D fue de 0.0 a 1.0 mg/l, y el de BAP de 1.0 a 3.0 mg/l, en los medios del experimento de amplio espectro (EAAE) éstas se desarrollaron en los medios 25 hasta el 79. Por lo que es evidente que las altas concentraciones de vitaminas, aminoácidos y azúcares favorecieron su desarrollo ya que en los medios donde la concentración de estas sustancias fue media o baja no hubo tal tipo de respuesta.

Para determinar qué otro grupo de sustancias pudieron incidir para la aparición de las estructuras, se realizó un ANDEVA de un factor (diseño completamente aleatorio) obteniéndose los siguientes resultados:

Grupo 1.- Macro y micronutrientes.

Se obtuvo que existió una diferencia significativa (con un nivel de confianza de 0.95) cuando se emplearon concentraciones bajas de estas sustancias comparadas con las concentraciones medias y altas. Por otra parte, no existieron diferencias significativas (0.95 de nivel de confianza) cuando se emplearon concentraciones medias y altas de estas nutrientes (tabla 17).

Esto indicó que las concentraciones bajas de macro y micronutrientes favorecieron la aparición de las estructuras.

Grupo 2.- Auxinas.

Los resultados del ANDEVA (tabla 19) indicaron que no existieron diferencias significativas (con un nivel de significancia de 0.95) al usar concentraciones bajas, medias o altas de auxinas lo cual indica que la concentración de estas sustancias no afectan al desarrollo de las estructuras.

Grupo 3.- Citocininas.

Se obtuvieron los mismos resultados (tabla 19) que con el grupo 2, por lo que tampoco la concentración de citocininas que se utilizó fue determinante para que las estructuras aparecieran.

Comparando el medio Y3 con los medios del EDAC se puede observar que el medio Y3 tiene concentraciones altas de macro y micronutrientes; abarca concentraciones bajas, media y altas de auxinas y citocininas, concentraciones medias de vitaminas y aminoácidos y una concentración alta de sacarosa.

Por lo anterior podría decirse que es la concentración con que sea usada la sacarosa la que tiene mayor influencia para que se desarrollen las estructuras.

3.- ANALISIS HISTOLOGICO.

En un principio se pensó que las estructuras obtenidas in vitro podrían ser embriones (dada su morfología). Para saber que tipo de estructuras se habían desarrollado y su interpretación se realizó un análisis histológico de ellas. Además, para tener un punto de referencia y así poder hacer una comparación, se hicieron cortes histológicos del gineceo y del óvulo sexual obtenidos de flores de *Ch. gigantea* y semillas frescas de *Ch. schubertii*, es decir que no habían sido cultivadas in vitro.

Los resultados que se obtuvieron con el análisis histológico fueron los siguientes:

A.- GINECEO:

Con fines descriptivos se dividió al carpelo en tres zonas: estigmas (parte superior); nucela y tegumento (cuerpo del carpelo) y saco embrionario (parte interna).

El gineceo estaba constituido por tres carpelos uniovulados, cada uno con su estigma basal. Los estigmas estaban conformados por papilas estigmáticas unicelulares (fotografía 30). Las células que bordeaban el conducto por donde penetra el tubo polínico hasta la altura de la placentación del óvulo, tenían una pared muy engrosada y citoplasma muy denso. Continuando por este conducto se observó el micrópilo y enseguida el tapete tegumentario muy bien definido. La placentación fue axial. Cada carpelo era irrigado por cuatro haces vasculares (en posición

lateral), dos a cada lado del carpelo. Cada carpelo estaba limitado internamente por una epidermis de una sola hilera de células conformando la cavidad o óvulo, en donde se encontraba el óvulo. Cada óvulo era delimitado por una epidermis del tegumento. Hacia adentro del óvulo se localizó el tejido del saco embrionario. El óvulo fue anatropo. En la nucela y tegumento de los carpelos se observaron idioblastos y rafidios (Fotografías 31, 32 y 33).

B.- EMBRION SEXUAL:

En el embrión pudieron distinguirse claramente dos tipos celulares: uno de células parenquimáticas, isodiamétricas y con citoplasma denso, que correspondieron al haustorio; y otro con células alargadas y núcleos condensados localizadas al centro del haustorio y que eran el embrión propiamente dicho. La forma y estructura que presentó el embrión es muy parecida a la que reporta Rees (82) para el embrión de la palma de cocote (Fotografías 34 y 35).

C.- ESTRUCTURAS SURSIDAS A PARTIR DEL OVARIO DE LA FLOR DE *Cl. alizaga* MANTENIDAS EN CULTIVO DURANTE TRES MESES.

a) Corte sagital (fotografías 36 y 37).

A nivel del estigma se observa que en esta etapa ya existía un proceso de senescencia o necrosamiento.

La nucela y tegumento estaban conformados por células parenquimáticas. Inmersas en este tejido se encontraban las tramas vasculares que divergían en la zona superior hacia ambos lados del carpelo. Las tramas vasculares estaban constituidas por vasos y traqueidas, estas últimas con engrosamientos en espiral, sobre todo en la parte terminal. Eran acompañadas por cristales de sílice (cuerpos de estigmas). También incluidos en este tejido fundamental se localizaron idioblastos (células especializadas en acumular cristales) en donde grupos de cristales de oxalato de calcio (macras) eran frecuentes.

La pared interna de la nucela se distingue claramente, a diferencia de las otras células del carpelo, ya que estaban muy compactas y eran de forma cúbica; caracterizándose por tener un núcleo muy grande y denso así como por su organización tan precisa y continua, formando una epidermis interna en el carpelo.

Los límites del saco embrionario se distinguen muy claramente por un grupo de células muy compactas, en hilera, con núcleo muy grande y denso similares a las células de la pared interna de la nucela. Hacia adentro se localizaron células isodiamétricas, laxas. En la parte central del saco embrionario se observaron claramente un grupo de células con un alto contenido de sustancias orgánicas, por ejemplo lípidos.

b) Corte sagital de un carpelo (fotografías 38 y 39).

Este tejido también había permanecido in vivo durante 3 meses, sin embargo mostró un grado de desarrollo más avanzado al anterior. Prácticamente todo el estigma había desaparecido, pudiéndose hablar de una suberización de este tejido. A

diferencia del estadio anterior se observó, a nivel de la placenta, un suplemento vascular.

Las células contiguas a los trazos vasculares, tanto de las paredes de la nucela como de las que estaban al saco embrionario, contenían núcleos muy densos claramente visibles, a diferencia de las otras células de la nucela en donde el núcleo no era tan evidente. Las células con núcleo denso eran más pequeñas y alargadas por lo que el tamaño relativo del núcleo también era mayor.

Las células de la epidermis externa de la nucela y del tegumento estaban organizadas de manera compacta y formaban una capa muy uniforme. En ellas se observó un proceso de suberización muy claro. En algunas zonas se observó actividad de división celular en las células periféricas.

Las células de la pared interna de la nucela habían sufrido una transformación: La epidermis bien definida se desorganizó. A este nivel había una acumulación de sustancias orgánicas.

La parte central del saco embrionario sobresalía porque las células estaban mucho más compactas y contenían núcleos muy densos, dándole una apariencia granular.

D.- ESTRUCTURAS SURCIDAS A PARTIR DEL OVARIO DE LA FLOR DE C.D. SIEMPRE MANTENIDAS EN CULTIVO DURANTE SEIS MESES.

a) Corte sagital a nivel medio de dos carpelos.

-Carpelo menos desarrollado

(a la izquierda, fotografías 40 y 41).

La epidermis externa de la nucela y el tegumento muy bien definida, apenas había indicios de suberización (salvo el extremo que estaba en contacto con el otro carpelo). La epidermis interna de la nucela se había diferenciado en una hilera continua de esclereidas (visibles entre otras cosas por la deposición de lignina).

-Carpelo más desarrollado

(a la derecha, fotografías 40, 42 y 43).

La pared externa de la nucela y el tegumento estaba totalmente suberizada. La suberización era tan avanzada que los trazos del tejido vascular desaparecieron. Las células que se mantenían parenquimáticas mostraron un alto contenido de sustancias orgánicas. Las esclereidas, comparadas con las del carpelo anteriormente descrito, eran más cortas y se tiñeron más intensamente.

En el tejido interno del saco embrionario se observó de un 80 al 90 % de células con un alto contenido de sustancias orgánicas, lípidos y granulos no definidos, lo que dió indicios de desarrollo de tejido de reserva "endosperma".

El grado de desarrollo de ambos carpelos no fue el mismo. En el primero la pared del carpelo contenía un mayor número de células que el segundo.

b) Corte sagital a nivel externo (sólo se observan las paredes de la nucela y el tegumento. Fotografías 44 y 45).

Se observó una clara suberización del tejido periférico de las células externas hacia las internas. Se perdió el arreglo definido de la epidermis de la etapa anterior (tres meses). Hacia adentro las células estaban desorganizadas y habían perdido su núcleo. Los cristales de oxalato de calcio estaban desorganizados.

En la parte media aún se mantenían organizadas las células isodiamétricas. En la parte central las células sufrieron una transformación, en dirección centripeta, para la formación de esclereidas, visibles por la deposición, entre otras cosas, de lignina y el desarrollo de una pared secundaria engrosada; de tal manera que hacia el centro del carpelo se observaron esclereidas perfectamente definidas.

El primer investigador que empleó la técnica del cultivo de flores y ovarios fue La Rue en 1942 y a partir de entonces se ha empleado principalmente para estudiar las interacciones del crecimiento del embrión así como para tener un mejor conocimiento de la fisiología de la formación del fruto. Desde entonces los ovarios de un buen número de especies han sido cultivados (75 y 81).

El desarrollo del embrión generalmente es producto de la fertilización, sin embargo puede surgir de células del esporofito o del gametofito, por medios que no involucran la unión sexual. El fenómeno de la sustitución de la reproducción sexual (Amphimixis) por un proceso asexual en el que no está implicada ningún tipo de fusión nuclear es denominada apomixis.

Maheshwari (52) indica que, con fines prácticos, la apomixis puede dividirse en cuatro clases.

En la primera o apomixis no recurrente la célula madre de la megaspora sufre una división meiótica y así es formado el saco embrionario. El nuevo embrión puede surgir de la célula huevo (partenogénesis haploide) o de alguna otra célula del gametofito (apogamia haploide). Las plantas producidas por este método contienen un sólo juego de cromosomas siendo generalmente estériles, lo que impide que el proceso se repita de una generación a otra.

El segundo tipo o apomixis recurrente es cuando el saco embrionario puede surgir tanto de una célula del arqueosporio (aposporia generativa) o de alguna otra parte de la nucela (apogamia somática). Como no hay reducción en el número de cromosomas y el embrión puede surgir de la célula huevo

(parthenogénesis diploide) o de alguna otra célula del gametofito (apogamia diploide). todas las células del saco embrionario son diploides por lo que el proceso puede repetirse en las siguientes generaciones.

En el tercer tipo cualquiera que sea el método por el cual el embrión es formado, ya sea haploide o diploide, el embrión no proviene de ninguna célula del gametofito sino de células diploides que se encuentran fuera del saco embrionario, ya sea de la nucela o del tegumento, pudiendo surgir en adición al embrión sexual. Este fenómeno es denominado embriónia adventicia. En este tipo de apomixis no hay alternancia de generaciones ya que el nuevo embrión surge directamente del tejido parental diploide.

En el cuarto tipo o apomixis vegetativa las flores son reemplazadas por bulbillos u otros propágulos vegetativos los cuales generalmente crecen sobre la planta madre.

La apomixis ocurre en la naturaleza en muchas familias de plantas. La apomixis proporciona un medio de asegurar uniformidad en la propagación por semilla, ya que cualquier cultivar apomictico es en realidad un tipo de clon. Otra ventaja de la apomixis es que muchas enfermedades virales no son transmitidas por semillas, en consecuencia, cultivando plántulas apomicticas se tiene un medio para rejuvenecer clones viejos que están muy afectados por virus (37).

Después de realizar un análisis de los resultados obtenidos en las pruebas histológicas y en el cultivo *in vitro* puede decirse lo siguiente:

Las flores femeninas de *Ch. gigans*, no fecundadas cultivadas en el medio Y3 (tratamiento 5, 6 y 12) y en los medios del EDAT (52 en adelante excepto 60, 71, 73, 77, 80 y 81) fueron inducidas a desarrollar semillas por algún tipo de apomixis, lo cual es evidente por las siguientes características:

a) Desarrollo del tejido esclerenquimático, a partir de las células del tegumento, que son el origen de las cubiertas de la semilla.

b) Desarrollo del endospermo lo cual pudo observarse por la presencia de células que contienen lípidos. lo cual fue un hecho interesante ya que en la naturaleza para que apiece a desarrollarse el endospermo es necesaria la fecundación del ovario o la presencia de apomixis, y, si bien no se observaron células que indicaran claramente la presencia del embrión en el tejido, es probable que éste estuviera presente ya que si se logró inducir la formación del endospermo también pudo haberse inducido el desarrollo del embrión.

Otro aspecto interesante es que si bien las palmas coseedor producen una semilla por flor, el análisis histológico mostró desarrollo de 3 semillas (una en cada carpelo), aunque debe mencionarse que el desarrollo no fue sincrónico en los tres

carpelos ya que uno presentó un grado de desarrollo más avanzado que los otros dos, lo cual pudo observarse por el distinto grosor de la pared del ovario: mientras que en uno la pared era más delgada, en los otros dos la absorción de la pared apenas se iniciaba. Este fenómeno podría deberse a que en la naturaleza dos carpelos degeneran y sólo uno es el que produce semilla. Sin embargo *in vitro*, probablemente después que se ha asegurado el desarrollo de un carpelo, se evita la degeneración de los otros dos, estimulándose su desarrollo.

Debe mencionarse que las flores empleadas no habían sido fecundadas por lo que la apomixis (de cualquier clase) sólo puede ser adjudicada al efecto provocado por el medio de cultivo empleado. Al respecto Naghevan (32) indica que las flores y ovarios no fertilizados cultivados *in vitro* no se desarrollan; aunque en algunas plantas, como el algodón, las hormonas del crecimiento han provocado un crecimiento limitado de los óvulos.

En muchas especies las partes florales como las brácteas y las raquillas juegan un papel importante en el desarrollo del fruto *in vitro* (75) lo cual también pudo haberse presentado en este caso.

La reversión espontánea, de un crecimiento generativo a uno vegetativo, a sido observada en algunas palmas cuando los brotes terminales han sido destruidos de manera natural (49 y 86). Lo anterior podría indicar que las células morfogenéticamente competentes (meristemoides) se localizan, quizás preponderantemente, en las inflorescencias.

Por lo anterior, la abundancia de flores en el género *Coccothrinax* hace que el empleo de este tipo de inoculos en el cultivo *in vitro* sea un método prometedor, con una frecuencia moderada de propagación.

Es claro que para tener resultados más concluyentes debe continuarse estudiando al respecto. Sin embargo el presente trabajo puede contribuir al conocimiento y entendimiento del cultivo *in vitro* de la palma caedora para estudios posteriores.

CONCLUSIONES .

- Las semillas de *Chamaedorea oblongata* pueden ser almacenadas hasta 6 meses a temperatura ambiente sin que su viabilidad se vea afectada.

- Si bien un alto contenido de humedad en las semillas de *Chamaedorea oblongata* no inhibe la germinación, si la retrasa.

- La prueba con tetracloruro de tetraesilo no es adecuada para realizar pruebas de viabilidad a las semillas de *Chamaedorea oblongata*, siendo más efectivas las pruebas de germinación.

- El mejor sustrato para germinar semillas de *Chamaedorea oblongata* en condiciones de laboratorio fue la agrolita con ventilación.

- Las condiciones ambientales con las que se lograron los mejores porcentajes de germinación de las semillas de *Chamaedorea oblongata* fueron: alta humedad relativa, temperatura de 28 a 30°C y una buena aereación.

- El tratamiento de desinfección más adecuado para lograr cultivos asépticos de tejidos de *Chamaedorea oblongata*, *Chamaedorea ciliaris* y *Chamaedorea* sp. es aquel donde el tejido se deja reposar 1 hora, antes de su excisión y siembra, en fungicida (Tecto 60 o Lagutam 30-30), después sumergirlo durante 5 minutos en etanol al 70 % y desinfectarlo con hipoclorito de sodio al 1,2 % v/v por 15 minutos.

- Para evitar el oscurecimiento del tejido es necesario someter el material biológico, una vez excidido, a un pretratamiento que consiste en mantenerlo en un baño de L-cisteína (100 mg/l) hasta el momento de su siembra. Además se debe emplear L-cisteína (100 mg/l) como agente antioxidante, la cual es adicionada al medio de cultivo.

- Los mejores tipos de tejidos para ser empleados en el cultivo *in vitro* son los provenientes de las inflorescencias (flores femeninas y raquillas). En este sentido se recomienda investigar con este mismo tipo de tejido pero empleando inflorescencias femeninas de diferentes estadios de desarrollo.

- Los medios nutritivos más eficaces para obtener algún tipo de respuesta in vitro son el Y3 y los medios S8 al 81 del experimento de amplio espectro.

- No obstante que las concentraciones de sales y fitorreguladores del crecimiento tienen un papel muy importante en la respuesta de los tejidos de las hojas, flores y raquillas de *Chamaedorea elegans* cultivados in vitro, es necesario suministrar concentraciones altas de vitaminas, aminoácidos y sacarosa para tener respuesta positiva. De estos componentes, la sacarosa es la que parece tener una mayor influencia en el tipo de respuesta.

-Es posible lograr, bajo condiciones in vitro que las flores de *Chamaedorea elegans* y *Chamaedorea sp.* alcancen su madurez fisiológica, así como inducir la receptividad polínica.

- La apomixis puede ser inducida en flores femeninas (no fecundadas) de *Chamaedorea elegans* siendo importante la formación de tres semillas por flor (una semilla por carpelo) en lugar de una. Este fenómeno de apomixis múltiple proporciona nuevos caminos para la propagación de esta especie.

- La técnica histológica establecida para el estudio anatómico de los embriones de *Chamaedorea obligata* y flores de *Chamaedorea elegans* es otra aportación importante de esta investigación ya que puede ser extrapolada para ser utilizada, con altas probabilidades de éxito, con otras especies del género *Chamaedorea*.

- Si bien no se obtuvo la propagación masiva del género *Chamaedorea*, se lograron establecer las bases técnicas para obtener cultivos asepticos, así como el procedimiento para disminuir el efecto de la oxidación sobre los tejidos, las cuales aumentan las probabilidades de que se presente algún tipo de respuesta al permitir que los tejidos permanezcan vivos más tiempo. Además con los resultados obtenidos se pueden abrir nuevas líneas de investigación que ayudarán a conocer aspectos fisiológicos no estudiados en estas palmas, que permitirán tener un mayor conocimiento del género *Chamaedorea*.

- Es necesario realizar investigaciones en todas las áreas (fisiología, taxonomía, ecología, propagación, etc) con las especies del género *Chamaedorea*, ya que pese a su gran importancia son muy escasos los estudios sobre ellas.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alvarez, F. 1987. Comunicación personal.
- 2.- Balboa, J. 1987. Ganancias exorbitantes con la deforestación en la Lacandona. *La Jirada*. Junio 18. México, pág 8.
- 3.- Barry, D. Jr. 1957. Comments on *Chamaedorea palms*. *Eriogonum* 1 (3):91-93.
- 4.- Barry, D. Jr. 1961. Palms for home and greenhouse. *Eriogonum* 5:13-20.
- 5.- Beltrán, E. 1968. Report on the caribbean region. *En: Problems of humid tropical regions*. UNESCO, pág 25-45.
- 6.- Branton, B. L. y J. Blake, 1983. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. *Annals of Botany* 52:673-679.
- 7.- Caballero, J.; A. Subino; J. Carabias; D. Mander; V. Silva; A. Aljola; E. C. Castañeda; V. Gama y Z.M. Rodríguez. 1985. Aprovechamiento integral del trópico húmedo mexicano. *ICYT* 7 (111):21-24.
- 8.- Caballero, H. J. y V. H Toledo. 1978. Estudio Botánico y ecológico de la región del río Uxpanapa. Ver. México. No. 6. Flora útil o el uso tradicional de las plantas. *Biótica* 3 (2):103-144.
- 9.- Conzatti, C. y L. G. Smith. 1981. Flora silvática mexicana. IPN. México. 335 pp.
- 10.- Corner, E. J. H. 1946. *The Natural History of palms*. H. Carrington (Ed.). London, Great Britain.
- 11.- Cutler, V. M. y S. K. Wilson. 1984. Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon the development in vitro of embryos of *Cocos nucifera*. *Botanical Gazette* (115):234-240.
- 12.- Dahlgren, T. M. R. y T. H. Clifford. 1982. *The monocotyledons. A comparative study*. Academic Press Inc. London. 378 pp.
- 13.- De Fossard, R. A. 1985. *Tissue culture for plant biologists*. University of New England, Printery.
- 14.- Sirio, E. y H. Martínez. 1985. Las interrogantes de Darwin, en Veracruz. *ICYT* 7(106):21-24.
- 15.- Sood, H. J. y W. R. Loria. 1982. *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press, E. U.

- 16.- Doods, H. J. y W. L. Roberts. 1982. *Embryology in plant tissue culture*. Cambridge University Press. E. U. 178 pp.
- 17.- D'Souza, L. 1982. Organogenesis in coconut embryo callus. *Proc. 2nd Intl. Conf. Plant Tissue and Cell Culture*. pag 178-180.
- 18.- Duval, Y., G. T. Durand, E. Konan y C. Pannetier. 1988. Multiplication végétative du palmier à huile (*Elais guineensis* Jacq.) par culture in vitro. *Stratégie et résultats*. *Biogéométrie* 43 (2):39-47.
- 19.- Eames, J. A. 1957. How old are the palms?. *Evolution* 1 (4):146-147.
- 20.- Eeuwens, C. J. 1974. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature Coconut palm (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. *Physiological Plantarum* 36:23-28.
- 21.- Eeuwens, C. J. 1978. Effects of nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from Coconut (*Cocos nucifera*) and Date palm (*Phoenix dactylofera*) palms cultured in vitro. *Physiological Plantarum* 42:173-178.
- 22.- Eeuwens, C. J. y J. Biale. 1977. Culture of coconut and date palm tissue with a view to vegetative propagation. *Acta Horticulturae* 76:277-286.
- 23.- Escobar, R. s/a. Manejo de semillas precalentadas de palma aceitera. Folleto.
- 24.- FAO. 1984. Micropropagation of selected rootcrops, palms, citrus and ornamental species. In: Plant production and protection. FAO, Paper 59.
- 25.- Fisher, J. B. y J. M. Tsai. 1978. In vitro growth of embryos and callus of coconut palm. *In Vitro* 14 (3):307-311.
- 26.- Fridborg, J., H. Pedersen, L. Lundstrom y T. Eriksson. 1975. The effect of activated charcoal on tissue cultures: Adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiol. Plant* 43:104-106.
- 27.- Gabr, M. F. y B. Tisserat. 1984. Propagating palms in vitro with special emphasis on the date palm (*Phoenix dactylofera* L.). *Scientia Horticulturae* 25:233-262.
- 28.- Garcia, A. V. 1977. *Manual de técnicas citocultúricas*. Colegio de Postgraduados, Chapingo.
- 29.- Garcia de Miranda, E. 1983. *apuntes de citocultura*. Enriqueta Garcia de Miranda. México. 153 pp.
- 30.- Gaviño, G.; J. C. Juárez y T. M. Figueroa. 1982. *Técnicas*

Biológicas colectas de laboratorio y campo. LINUSA. México.
251 pp.

- 31.- George, F. E. y D. P. Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetica Limited. 690 pp.
- 32.- Gill, T. 1955. Los bosques tropicales de México. En: *Mesas redondas sobre problemas del trópico mexicano*. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. A. C. México. Pág 57-102.
- 33.- Gomez-Pompa, A.; S. S. Guevara; B. M. Rico; C. Y. Esponde; A. Ocegueda y R. A. Ramos. 1972. Introducción a la ecología de algunas especies tropicales. En: *Problemas biológicos de la región de Los Tuxtlas*. Veracruz. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. UNAM. México. pág 5-39.
- 34.- Granillo, V. S. 1985. Uso y abuso de la selva. ICYI 7 (111):26-38.
- 35.- Gupta, P. K.; S. V. Khandarkar; V. M. Kulkarni; M. V. Shirkurkar y A. F Mascarenhas. 1984. Somatic embryogenesis and plants from syzygy embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro*. *Plant Cell Research* 3 (4):223-225.
- 36.- Hanover, J. y P. Hanover. 1984. Inhibition et stimulation, en culture *in vitro*, de l'embryogenèse des couches issues d'explants foliaires de Palmier à Huile. *C. R. Acad. Sc.* 298(3):43-48
- 37.- Hartman, T. H. y E. D. Kester. 1980. *Propagación de plantas. Principios y prácticas*. CECSA. México. 814 pp.
- 38.- Henderson, A. 1986. A review of pollination studies in the Palmae. *The Botanical Review* 52 (3):221-259.
- 39.- Hodel, D. C. 1977. Notes on embryo culture palm. *Cruciferae* 2:103-108.
- 40.- Hussey, G. 1980. *In vitro* Propagation. En: *Tissue culture methods for plant pathologists*. Ingram, D. S. y Helgeson, J. P. Blackwell Scientific Publications. E. U. pág 51-61.
- 41.- INIBER. 1986. *Plantas Mexicanas en peligro*. INIBER. Folleto.
- 42.- Jagadeesan, M. y D. Padmanabhan. 1982. Induction of rooting in cotyledon callus of coconut. *CYBERNETICS* 51 (11):267.
- 43.- Johansen, D. A. 1960. *Plant Microtechnique*. Mc. Graw Hill Book Co. New York. 523 pp.
- 44.- Jules, J.; W. S. Schery; W.F. Woods y W. V. Suttan. 1974. *Plant Science. An introduction to world crops*. W. H. Freeman and Company. San Francisco. E. U. 740 pp.

- 45.- Kaplan, D. B. 1983. The development of palm leaves. *Scientific American* 249 (1):88-95.
- 46.- Leopold, A. S. 1950. Vegetation Zones of Mexico. *Ecology* 31:507-510.
- 47.- Leminger, L. A. 1982. *Biogenética*. Ed. Omega. Barcelona, España. 1117 pp.
- 48.- Licret, C. 1985. Palmeras en probeta por millones. *Mundo Científico* 2 (18):1012-1016.
- 49.- Litz, R. E.; G. A. Moore y C. Srinivasan. 1983. In vitro systems for propagation and improvement of tropical fruit and palm. *Horticultural Review* 7:187-200.
- 50.- Lozoya, S. H. 1985. Micropropagación de especies herbáceas. [En: El cultivo de tejidos vegetales en México. Manual, I. Robert y Victor Manuel Loyola (coords.). CONACYT. México. pág 65-79.
- 51.- Luna, R. S. 1987. Cultivo de anteras y poles. [En: Cultivo de tejidos vegetales. Daniel V. Hurtado M. y María Eugenia Marino M. (eds.). LIMUSA. México. pág 101-110.
- 52.- Maheshwari, P. 1960. *An introduction to the embryology of angiosperms*. Mc. Gram Hill. New York. 453 pp.
- 53.- Martín, C. 1985. Cultivo de plantas en probeta. *Mundo Científico* 2 (44): 160-169.
- 54.- Mc. Gurrach, J. C. 1970. *Palms of the world*. Harper Brothers. New York. 390 pp.
- 55.- Marino, M. M. 1987. Medio de cultivo. [En: Cultivo de tejidos vegetales. Daniel V. Hurtado M. y María Eugenia Marino M. (eds.). LIMUSA. México. pág 67-68.
- 56.- Miranda, F. y E. Hernández, E. 1963. Los tipos de vegetación y su clasificación. [En: Boletín de la Sociedad Botánica de México. No. 28 pág: 29-179
- 57.- Moore, H. E. Jr. 1973. The major groups of palms and their distribution. *Genes Heredity* 11 (2):127-141.
- 58.- Moore, H. E. Jr. y M. W. Uhl. 1982. Major trends of evolution in palms. *The Botanical Review* 48 (1):1-69.
- 59.- Moreno, C. P. 1983. Latencia y Viabilidad de semillas de vegetación primaria. [En: Regeneración de selvas. Gomez-Pompa, A.; Vazquez-Yanes, C.; Del Amo, R. S. y Betanda, C. A. (eds.). CECOA. México. Pág 327-348.
- 60.- Moscoso, R. M. 1945. *Palmas dominicanas*. Ed. Montalvo. Cd. Trujillo, Rep. Dominicana. 82 pp.

- 61.- Murashige, T. y L. Huang. 1965. Organogenesis in vitro: Structural, physiological and biochemical aspects. Ed: Biotechnology in international agriculture research. Proceeding of the Inter. Center Seminar on International Agricultural Research Centers (IARC) and Biotechnology. Manila, Philippines. pág 227-239.
- 62.- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and blossom with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.
- 63.- Nagao, M. A.; K. Kanegawa y M. S. Sakai. 1980. Accelerating palm seed germination with gibberellic acid, scarification, and bottom heat. *HortScience* 15 (2):200-201.
- 64.- Narayanaswami, S. y K. Norstog. 1964. Plant embryo culture. *Botanical Review* 30:587-628.
- 65.- Navarro, U. S. y E. S. Vera. 1967. Historia del cultivo de tejidos vegetales. Ed: Cultivo de tejidos vegetales. Daniel V. Hurtado M. y Maria Eugenia Merino M. (eds.). LIMUSA. México. pág 15-34.
- 66.- Mitch, C. 1977. Culture of isolated microspores. Ed: Plant cell, tissue and organ culture. J. Reinert y Y. P. S. Bajaj (comps.) ed. Springer-Verlag, Germany. pág 268-277.
- 67.- Nwankwo, B. A. 1981. Facilitated germination of *Elaeis guineensis* var. *pisifera* seeds. *Annals of Botany* 48:251-254.
- 68.- Nwankwo, B. A. y A. D. Krikorian. 1982. Water as a storage medium for *Elaeis guineensis* (*pisifera*) seeds under aseptic conditions. *Annals of Botany* 50:793-798.
- 69.- Nwankwo, B. A. y A. D. Krikorian. 1983. Aseptic storage of *Elaeis guineensis* from *pisifera* seeds. *Cruciferae* 27 (1):26-37.
- 70.- Nwankwo, B. A. y A. Krikorian. 1986. Morphogenetic potential of embryo -and seedling- derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc. *Annals of Botany* 51:65-76.
- 71.- Odum, P. E. 1973. *Ecología*. Ed. Interamericana. México. 639 p.
- 72.- Oyama, H. K. 1984. Biología comparativa entre individuos masculinos y femeninos de *Chamaedorea luteopilosa* (palmas). Tesis. Ins. Biol. UNAM. México.
- 73.- Ozias-Akins y K. I. Vasil K. 1985. Nutrition of plant tissue cultures. Ed: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vasil, I. K. (ed.). Academic press, Inc. USA. Vol. 2. pág 129-147.

- 74.- Pannetier, C. y J. Buffard-Morel. 1982. Premiers résultats concernant la production d'embryons somatiques à partir de tissus foliaires de cocotier. (*Cocos nucifera* L. *Oligoneux* 37 (7):349-354.
- 75.- Parok, M. L.; M. G. Govil y N. Chandra. 1980. Growth and morphogenesis in cultured ovaries and callus of *Sida acuta* L. In: Plant cell culture: results and perspectives. F. Sala, D. Pagani, R. Calla y O. Clifardi (eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pág 79-86.
- 76.- Pérez, C. B. 1979. Especies en cultivo. *Maquialia* 10 (1):15-19.
- 77.- Poole, R.T. y C. A. Conover. 1974. Germination of "Mantle balls" palm seeds. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 87:429-430.
- 78.- Guero, R. J. 1987. Notas sobre el género *Chorizanthe* en México. In: Memorias del X Congreso Mexicano de Botánica. Contribución 541. ENEP Intecol. México.
- 79.- Bebechault, H. y J. Ahee. 1968. Recherches sur la culture in vitro des embryons de palmier à huile. (*Elaeis guineensis* Jacq.) III.- Effets de la grosseur et de l'âge des graines. *Oligoneux* 21:729-734.
- 80.- Bebechault, H.; G. Guenin y J. Ahee. 1969. Recherches sur la culture in vitro des embryons de palmier à huile. (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.) VI.- Effets de la déshydratation naturelle et d'une rehydratation de noix dormantes et non dormantes. *Oligoneux* 24 (2):263-268.
- 81.- Pughavan, V. 1976. Experimental embryogenesis in vascular plants. Academic Press, London. 403 pp.
- 82.- Rees, A. H. 1960. Early development of the oil palm seedling. *Fringsia* 4:148-150.
- 83.- Sagalado, E. 1987. Comunicación personal.
- 84.- Reinert, J. y Y. P. S. Rajab. 1977. Anther culture. Haploid production and its significance. In: Plant cell, tissue and organ culture. J. Reinert y P. S. Rajab (comps.) ed. Springer-Verlag, Germany. pág 282-287.
- 85.- Seuveni, O. 1979. Embryogenesis and plantlets growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) derived from callus tissue. *Plant Biotechnology* 79 (63):138 suplemento.
- 86.- Reynolds, J. F. 1982. Vegetative propagation of palm trees. In: Tissue culture in forestry. J. M. Soups y D. J. Dargan (eds.). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. London, Great Britain.

- 87.- Reynolds, J. F. y T. Murashige. 1979. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. In *Vitro* 15 (2):383-387.
- 88.- Rzedowski, J. 1979. *Vegetación de México*. Ed. LINUSA, México 432 p.
- 89.- Rzedowski, J. 1979. La extinción. *Naturalista* 10 (11):19-22.
- 90.- Rzedowski, J. 1979. Los bosques secos y semihúmedos de México con afinidades neotropicales. En: *Tópicos de Ecología contemporánea*. Sabinevich, J. y Walffer, G. (comp.). Fondo de Cultura Económica, México. pág 37-46.
- 91.- Saldívar G. T. y C. Cherboussier. De la recolección silvestre al cultivo de la palma cascador. Perspectivas de su aprovechamiento. En: *Alternativas para el uso del suelo en áreas forestales del trópico húmedo*. INEF. publicación especial No. 34. sept. 1981. México. Tomo II.
- 92.- Sharp, W. E. y P. O. Larsen. 1977. *Plant call and tissue cultures*. W. R. Sharp, P. O. Larsen Ed. al (eds.). Ohio State University Press, Columbus. E. U.
- 93.- Srinivasan, C.; H. E. Litz; J. Barker y E. Morstog. 1985. Somatic embryogenesis and plantlet formation from Christmas palm callus. *HortScience* 20 (2):278-280.
- 94.- Standley, P. C. 1926. *Trees and shrubs of México*. J. Cramer (ed.). Germany.
- 95.- Standley, P. C. y A. J. Steyermark. 1958. *Flora de Guatemala*. EILENBERG: *Botany* vol. 24, part 1. Published by Chicago Natural History Museum. pág 217-253.
- 96.- Staritsky, G. 1970. Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for its vegetative propagation. *Euphytica* 19:288-292.
- 97.- Tisserat, B. 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* 30 (119):1275-1283.
- 98.- Tisserat, B. 1983. Tissue culture of Date palms -- a new method to propagate an ancient crop-- and a short discussion of the California date industry. *Eridania* 27 (3):105-117.
- 99.- Tisserat, B. 1988. *Eala tissue culture*. Department of agriculture, Agricultural Research Service. ARS-55. E. U. 60 pp.
- 100.- Tisserat, B. y B. A. De Mason. 1980. A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. *Annals of Botany* 46:463-473.
- 101.- Toledo, V. M. 1988. La diversidad biológica de México.

- 102.- Tomlinson, P. B. 1960. Essays on the morphology of palms. *Biological Journal* 4:56-61.
- 103.- Trejo, P. L. 1969. Bisminación de semillas por aves en "Los Tuxtlas". Ver. Ed: Regeneración de selvas. Gomez-Pompa, A.; Vazquez-Yanes, C.; Del Amo, R. S. y Butanda, C. A. (eds.). CECSA, México. Pág 447-470.
- 104.- Turnham, S. y D. H. Northcote. 1982. The use of acetyl-Co A carboxylase activity and changes in wall composition as measure of embryogenesis in tissue cultures of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Electronical Journal. Cellular aspects* 206 (2): 323-332.
- 105.- UICN. s/a. Como usar las categorías del libro rojo de la UICN. Folleto.
- 106.- Ulrich, H. J.; J. B. Finkle y H. B. Timmeret . 1982. Effects of cryogenic treatment on plantlet production from frozen and unfrozen Date palm callus. *Plant Physiology* 69:624-627.
- 107.- Vasil, I. K. 1973. Planta: Haploid tissue cultures. Ed: Tissue Culture, Methods and Applications. Kruse, P. F. y H. K. Patterson. Academic Press Inc. E. U. pág 157-161.
- 108.- Vázquez-Yanes, C. 1974. Estudios sobre ecofisiología de la germinación en una zona cálida-húmeda de México. Ed: Regeneración de selvas. Gomez-Pompa, A.; Vázquez-Yanes, C.; Del Amo, R. S. y Butanda, C. A. (eds.). CECSA, México. Pág 279-288.
- 109.- Vázquez-Yanes, C. 1979. Extinción de plantas. *Naturaleza*. 10 (11):18.
- 110.- Voss, E. C.; V. F. Patiño y P. A. Rodríguez . 1983. Viabilidad de semillas en 72 especies forestales tropicales almacenadas al medio ambiente. Ed: Reunión sobre problemas en semillas forestales tropicales. INIF. Publicación especial No. 40. Sept. México. D. F. Tomo 1.
- 111.- Villalobos, A. V. 1985. Las bases morfogenéticas en la propagación de especies perennes. Ed: El cultivo de tejidos vegetales en México. Manuel L. Robert y Victor Manuel Lacey (comp.). CICY-CONACYT. México. pág 55-64.
- 112.- Vovides, A. P. Notas didácticas del Jardín Botánico Fco. J. Clavijero, No. 4. INIREB. México.
- 113.- Vovides, A. P. 1981. Lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción. *Biología* 6(2)

- 114.- Wagner, I. R. 1982. Raising ornamental palms. *Ericcides* 26 (2):96-101.
- 115.- Wang, P. J. y C. L. Huang. 1976. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. *In Vitro* 12 (6):260-262.
- 116.- Withers, A. L. 1984. Minimum requirements for receiving and maintaining tissue culture propagating material. *In: Micropropagation of selected rootcrops, palm, citrus and ornamental species. FAO, Roma.*
- 117.- Yocus, H. G. 1961. A method for germinating palm seeds. *Ericcides* 5:31-32.
- 118.- Zaid, A. y B. Tinsurat. 1984. Survey of the morphogenetic potential of excised palm embryos *in vitro*. *Crop Res.* 24:1-9.

APENDICE I

TABLAS DE COMPOSICION DE LOS
MEDIOS DE CULTIVO USADOS.

TABLAS DEL ANALISIS DE VARIANZA
(ANDEVA).

Tabla 1. Composición del medio basal de Murashige y Skoog (1962).

Componente	Fórmula	Cantidad (mg/l)
Macroelementos		
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	1650.0
Nitrato de potasio	KNO_3	1900.0
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.0
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.0
Fosfato de sodio	NaH_2PO_4	170.0
Hierro		
Etilén-dinitrilo-tetracetato disódico	$\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.9
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Microelementos		
Acido bórico	H_3BO_3	6.20
Sulfato manganoso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	8.20
Yoduro de potasio	KI	0.630
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
Sulfato cúprico	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025

Tabla 2. Medio basal para el cultivo *in vitro* embriones.

Componente	Concentración (mg/l)
Macroelementos M.S	Completos
Microelementos M.S	Completos
FaEDTA M.S	Completo
Tiamina-HCl	0.4
Inositol	100.0
Sacarosa	10 000.0
Carbón activado	3 000.0
B A P	0.0, 1.0 y 3.0
A M A	0.0, 0.1, 1.0, 10.0 y 100.0
Agar (BIOXON)	8 000.0
pH	5.7

Tabla 3. Medio basal para las pruebas de desinfección de tejidos.

Componente	Concentración (mg/l)
Macroelementos M.S	Completos
Microelementos M.S	Completos
FaEDTA M.S	Completo
Tiamina	0.4
Inositol	100.0
L-cisteína	100.0
Sacarosa	10 000.0
Agar (BIOXON)	10 000.0
pH	5.7

Tabla 4. Medio basal para el cultivo *in vitro* de tejidos.

Componente	Concentración (mg/l)
Macroelementos H.S	Completos
Microelementos H.S	Completos
FeEDTA H.S	Completo
Tiamina	0.4
Inositol	100.0
B A P	0.0, 0.1 y 3.0
2,4-D	0.0, 0.1, 1.0, 10.0 y 100.0
Carbón activado	3 000.0
Sacarosa	15 000.0
Agar (Bioxon)	10 000.0
pH	5.7

Tabla 5. Medio basal Y3 (Daumen, 1976).

Componente	Concentración (µg/l)
Macroelementos	
NH ₄ Cl 4 2	535.0
KNO ₃ 3	2 020.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O 2 2	294.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O 4 2	247.0
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 2 4 2	312.0
KCl	1 492.0
Hierro	
Na ₂ EDTA 2	18.65
FeSO ₄ · 7H ₂ O 4 2	13.9
Microelementos	
MnSO ₄ · H ₂ O 4 2	8.300
H ₂ BO ₃ 3 3	3.100
ZnSO ₄ · 7H ₂ O 4 2	7.200
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O 2 4 2	0.240
CuSO ₄ · 5H ₂ O 4 2	0.160
CoCl ₂ · 6H ₂ O 2 2	0.240
NiCl ₂ · 6H ₂ O 2 2	0.024
Suplemento	
Tiamina	0.50
Inositol	100.00
Piridoxina	0.05
Ac. pantoténico	0.05
Ac. nicotínico	0.05
Biotina	0.05
B ₆ P	0.0, 1.0 y 3.0
2,4-D	0.0, 0.1, 1.0, 10.0 y 100.0
Sacarosa	25 000.00
Agar (BIOXON)	12 000.0
pH	5.5

Tabla 6. Concentración básica de las sustancias empleadas en el experimento de amplio espectro (De Fosgard, 1985).

Componente	Concentración (mg/l)
(1) MINERALES	
Macronutrientes:	
NH ₄ NO ₃	400.25
4 3	
MgSO ₄ .7H ₂ O	123.25
4 2	
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	156.01
2 4 2	
KNO ₃	191.11
3	
KCl	141.66
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.47
2 2	
FeSO ₄ .7H ₂ O	2.78
4 2	
Na ₂ EDTA .2H ₂ O	3.72
2 2	
Na ₂ SO ₄	5.68
2 4	
Micronutrientes:	
H ₂ BO ₃	0.0194
3 3	
MnSO ₄ .H ₂ O	1.0902
4 2	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2876
4 2	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025
4 2	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0025
2 4 2	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0238
2 2	
KI	0.0830
(2) AUXINAS	
A I A	0.0175
A I B	0.0203
A B A	0.0186
2,4-D	0.0221
pCPA	0.0197

Nota: A partir de estas concentraciones se hicieron las variaciones para las pruebas de amplio espectro.

CONTINUA ...

Continuación ...

Tabla 8. Concentración básica de las sustancias empleadas en el experimento de amplio espectro (De Fouard, 1985).

Componente	Concentración (mg/l)
(3) CITOCININAS	
Adenina	0.0184
Kinetina	0.0210
B A P	0.0236
2-IP	0.0203
(4) VITAMINAS, SACAROSA Y AMINOCIDOS	
Inositol	18.0160
Ac. Nicotínico	0.4925
Piridoxina	0.1236
Tiamina	0.0337
Biotina	0.0098
Ac. Pantoténico	0.0477
Riboflavina	0.0377
Ac. Ascórbico	0.0176
Cloruro de colina	0.0139
Glicina	0.0376
L-Cisteína	1.5760
Sacarosa	2 054.0000

Nota: A partir de estas concentraciones se hicieron las variaciones para las pruebas de amplio espectro.

Tabla 7. Composición de los sedos del experimento de amplio espectro.

Componente	M E D I O								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nitrato de amonio	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4
Sulfato de magnesio	X1	X2	X6	X1	X2	X6	X1	X2	X6
Fosfato de sodio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Nitrato de potasio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Cloruro de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--
Fosfato de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--
Cloruro de calcio	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3
Sulfato ferroso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
EDTA-Na	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de sodio	X1	X11	X16	X1	X11	X16	X1	X11	X16
Acido bórico	X1	X5	X15	X1	X5	X15	X1	X5	X15
Sulfato manganeso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de zinc	X1	X20	X40	X1	X20	X40	X1	X20	X40
Sulfato cáprico	X1	X10	X150	X1	X10	X150	X1	X10	X150
Molibdato de sodio	X1	X10	X100	X1	X10	X100	X1	X10	X100
Cloruro de cobalto	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Yoduro de potasio	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
A I A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A I B	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A F A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
2,4-D	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
pCPA	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
Adenina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Kinacina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
B A P	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
2 ip	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Inositol	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Ac. Nicotínico	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Piridoxina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Tiamina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Biotina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Ac. Pantoténico	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Riboflavina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Ac. Ascórbico	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Colina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Glicina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
L-Cisteina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Sacarosa	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

X = Concentración basal de cada sustancia (ver tabla 6).

El número indica las veces que fue empleada la concentración basal.

-- = No fue adicionada al medio.

CONTINUA...

Tabla 7. Composición de los sedios del experimento de amplio espectro (continuación).

Componente	M E D I O									
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Nitrato de sodio	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4	
Sulfato de magnesio	X1	X3	X6	X1	X3	X6	X1	X3	X6	
Fosfato de sodio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2	
Nitrato de potasio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2	
Cloruro de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--	
Fosfato de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--	
Cloruro de calcio	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3	
Sulfato ferroso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10	
EDTA-Na	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10	
Sulfato de sodio	X1	X11	X16	X1	X11	X16	X1	X11	X16	
Acido bórico	X1	X5	X15	X1	X5	X15	X1	X5	X15	
Sulfato manganeso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10	
Sulfato de zinc	X1	X20	X40	X1	X20	X40	X1	X20	X40	
Sulfato cáprico	X1	X10	X150	X1	X10	X150	X1	X10	X150	
Molibdato de sodio	X1	X10	X100	X1	X10	X100	X1	X10	X100	
Cloruro de cobalto	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10	
Yoduro de potasio	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10	
A I A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100	
A I B	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100	
A M A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100	
2,4-D	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100	
pCPA	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100	
Adenina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
Kinetina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
B A P	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
2 Ip	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
Inositol	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	
Ac. Nicotínico	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	
Piridoxina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	
Triamina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	
Biotina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	
Ac. Pantoténico	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	
Riboflavina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	
Ac. Ascórbico	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	
Colina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	
Glicina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	
L-Cisteína	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	
Sacarosa	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	

X = Concentración basal de cada sustancia (ver tabla 6).

El número indica las veces que fue expresada la concentración basal.

-- = No fue adicionada al medio.

CONTINUA...

Tabla 7. Composición de los medios del experimento de amplio espectro (continuación).

Componente	M E D I O								
	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Nitrato de amonio	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4
Sulfato de magnesio	X1	X3	X5	X1	X3	X5	X1	X3	X5
Fosfato de sodio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Nitrato de potasio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Cloruro de potasio	X1	--	--	X3	--	--	X1	--	--
Fosfato de potasio	X1	--	--	X3	--	--	X1	--	--
Cloruro de calcio	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3
Sulfato ferrroso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
EDTA-Na	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de sodio	X1	X11	X16	X1	X11	X16	X1	X11	X16
Acido bórico	X1	X5	X15	X1	X5	X15	X1	X5	X15
Sulfato manganesoso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de zinc	X1	X20	X40	X1	X20	X40	X1	X20	X40
Sulfato còprico	X1	X10	X150	X1	X10	X150	X1	X10	X150
Molibdato de sodio	X1	X10	X100	X1	X10	X100	X1	X10	X100
Cloruro de cobalto	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Yoduro de potasio	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
A I A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A I B	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A N A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
2,4-D	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
pCPA	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
Adenina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Kinetina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
B A P	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
2 ip	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Inositol	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Ac. Nicotínico	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Piridoxina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Timina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Biotina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Ac. Pantoténico	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Riboflavina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Ac. Ascórbico	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Colina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Glicina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
L-Cisteina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Sacarosa	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

X = Concentración basal de cada sustancia (ver tabla 6).

El número indica las veces que fue empleada la concentración basal.

-- = No fue adicionada al medio.

CONTINUA...

Tabla 7. Composición de los medios del experimento de amplio espectro (continuación).

Substancia	M E D I O								
	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Nitrato de amonio	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4
Sulfato de magnesio	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4
Fosfato de sodio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Nitrato de potasio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Cloruro de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--
Fosfato de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--
Cloruro de calcio	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3
Sulfato ferroso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
EDTA-Na	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de sodio	X1	X11	X16	X1	X11	X16	X1	X11	X16
Acido bórico	X1	X5	X15	X1	X5	X15	X1	X5	X15
Sulfato manganeso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de cinc	X1	X20	X40	X1	X20	X40	X1	X20	X40
Sulfato cáprico	X1	X10	X150	X1	X10	X150	X1	X10	X150
Molibdato de sodio	X1	X10	X100	X1	X10	X100	X1	X10	X100
Cloruro de cobalto	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Yoduro de potasio	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
A 1 A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A 1 B	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A M A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
2,4-D	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
pCPA	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
Adenina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Kinetina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
B A P	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
2 ip	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Inositol	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2
Ac. Nicotínico	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5
Piridoxina	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5
Tiamina	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20
Biotina	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5
Ac. Pantoténico	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Riboflavina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Ac. Ascórbico	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Colina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Glicina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
L-Cisteína	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5
Sacarosa	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10

X = Concentración basal de cada sustancia (ver tabla 6).

El número indica las veces que fue empleada la concentración basal.

-- = No fue adicionada al medio.

CONTINUA...

Tabla 7. Composición de los medios del experimento de amplio espectro (continuación).

Componente	M E D I O									
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	
Nitrato de amonio	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4	
Sulfato de magnesio	X1	X3	X6	X1	X3	X6	X1	X3	X6	
Fosfato de sodio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2	
Nitrato de potasio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2	
Cloruro de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--	
Fosfato de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--	
Cloruro de calcio	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3	
Sulfato ferroso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10	
EDTA-Na	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10	
Sulfato de sodio	X1	X11	X16	X1	X11	X16	X1	X11	X1	
Acido fórico	X1	X5	X15	X1	X5	X15	X1	X5	X15	
Sulfato manganoso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10	
Sulfato de cinc	X1	X20	X40	X1	X20	X40	X1	X20	X40	
Sulfato cúprico	X1	X10	X150	X1	X10	X150	X1	X10	X150	
Molibdato de sodio	X1	X10	X100	X1	X10	X100	X1	X10	X100	
Cloruro de cobalto	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10	
Yoduro de potasio	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10	
A I A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100	
A I B	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100	
A N A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100	
2,4-D	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100	
pCPA	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100	
Adenina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
Kinetina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
B A P	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
2 ip	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
Inositol	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	
Ac. Nicotínico	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	
Piridoxina	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	
Tiamina	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	
Biotina	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	
Ac. Pantoténico	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
Riboflavina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
Ac. Ascórbico	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
Colina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
Glicina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	
L-Cisteina	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	
Sacarosa	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	

X = Concentración basal de cada sustancia (ver tabla 6).

El número indica las veces que fue empleada la concentración basal.

-- = No fue adicionada al medio.

CONTINUA...

Tabla 7. Composición de los medios del experimento de amplio espectro (continuación).

Componente	M E D I O								
	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Nitrato de sodio	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4
Sulfato de magnesio	X1	X3	X6	X1	X3	X6	X1	X3	X6
Fosfato de sodio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Nitrato de potasio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Cloruro de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--
Fosfato de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--
Cloruro de calcio	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3
Sulfato ferroso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
EDTA-Na	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de sodio	X1	X11	X16	X1	X11	X16	X1	X11	X16
Acido bórico	X1	X5	X15	X1	X5	X15	X1	X5	X15
Sulfato manganoso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de zinc	X1	X20	X40	X1	X20	X40	X1	X20	X40
Sulfato cúprico	X1	X10	X150	X1	X10	X150	X1	X10	X150
Hidróxido de sodio	X1	X10	X100	X1	X10	X100	X1	X10	X100
Cloruro de cobalto	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Yoduro de potasio	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
A I A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A I B	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A N A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
2,4-D	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
pCPA	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
Adenina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Kinetina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
B A P	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
2 ip	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Inositol	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3	X3
Ac. Nicotínico	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5
Piridoxina	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5
Tiamina	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20
Biotina	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5	X5
Ac. Pantoténico	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Riboflavina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Ac. ascórbico	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Colina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Glicina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
L-Cisteína	X6	X6	X6	X6	X6	X6	X6	X6	X6
Sacarosa	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10

X = Concentración basal de cada sustancia (ver tabla 6).

El número indica las veces que fue empleada la concentración basal.

-- = No fue adicionada al medio.

CONTINUA...

Tabla 7. Composición de los medios del experimento de amplio espectro (continuación).

Componente	M E D I O								
	55	56	57	58	59	60	61	62	63
Nitrato de amonio	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4
Sulfato de magnesio	X1	X3	X6	X1	X3	X6	X1	X3	X6
Fosfato de sodio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Nitrato de potasio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Cloruro de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--
Fosfato de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--
Cloruro de calcio	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3
Sulfato ferroso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
EDTA-Na	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de sodio	X1	X11	X16	X1	X11	X16	X1	X11	X1
Acido bórico	X1	X5	X15	X1	X5	X15	X1	X5	X15
Sulfato manganeso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de zinc	X1	X20	X40	X1	X20	X40	X1	X20	X40
Sulfato cúprico	X1	X10	X150	X1	X10	X150	X1	X10	X150
Molibdato de sodio	X1	X10	X100	X1	X10	X100	X1	X10	X100
Cloruro de cobalto	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Yoduro de potasio	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
A I A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A I B	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A R A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
2,4-D	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
pCPA	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
Adenina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Kinetina	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
B A P	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
3 ip	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
Inositol	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Ac. Nicotínico	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Piridoxina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Tiamina	X400	X400	X400	X400	X400	X400	X400	X400	X400
Biotina	X25	X25	X25	X25	X25	X25	X25	X25	X25
Ac. Pantoténico	X50	X50	X50	X50	X50	X50	X50	X50	X50
Riboflavina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Ac. Ascórbico	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Colina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Glicina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
L-Cisteina	X12	X12	X12	X12	X12	X12	X12	X12	X12
Sacarosa	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20

X = Concentración basal de cada sustancia (ver tabla 6).

El número indica las veces que fue empleada la concentración basal.

-- = No fue adicionada al medio.

CONTINUA...

Tabla 7. Composición de los medios del experimento de amplio espectro (continuación).

Componente	64	65	66	67	68	69	70	71	72
Nitrato de amonio	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4
Sulfato de magnesio	X1	X2	X6	X1	X2	X6	X1	X2	X6
Fosfato de sodio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Nitrato de potasio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Cloruro de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--
Fosfato de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--
Cloruro de calcio	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3
Sulfato ferroso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
EDTA-Na	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de sodio	X1	X11	X16	X1	X11	X16	X1	X11	X1
Acido bórico	X1	X5	X15	X1	X5	X15	X1	X5	X15
Sulfato sanganoso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de cinc	X1	X20	X40	X1	X20	X40	X1	X20	X40
Sulfato nítrico	X1	X10	X150	X1	X10	X150	X1	X10	X150
Molibdato de sodio	X1	X10	X100	X1	X10	X100	X1	X10	X100
Cloruro de cobalto	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Yoduro de potasio	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
A I A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A I B	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A N A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
X,4-D	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
pCPA	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
Adenina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Kinetina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
B A P	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Z ip	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Inositol	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Ac. Nicotínico	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Piridoxina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Tiamina	X400	X400	X400	X400	X400	X400	X400	X400	X400
Biotina	X25	X25	X25	X25	X25	X25	X25	X25	X25
Ac. Pantoténico	X50	X50	X50	X50	X50	X50	X50	X50	X50
Riboflavina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Ac. Ascórbico	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Colina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Glicina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
L-Cisteína	X12	X12	X12	X12	X12	X12	X12	X12	X12
Sacarosa	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20

X = Concentración basal de cada sustancia (ver tabla 6).

El número indica las veces que fue empleada la concentración basal.

-- = No fue adicionada al medio.

CONTINUA...

Tabla 7. Composición de los medios del experimento de amplio espectro (continuación).

Componente	M E D I O								
	73	74	75	76	77	78	79	80	81
Nitrato de amonio	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4
Sulfato de magnesio	X1	X3	X6	X1	X3	X6	X1	X3	X6
Fosfato de sodio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Nitrato de potasio	--	X1	X2	--	X1	X2	--	X1	X2
Cloruro de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--
Fosfato de potasio	X1	--	--	X1	--	--	X1	--	--
Cloruro de calcio	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3
Sulfato ferroso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
EDTA-Ma	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de sodio	X1	X11	X16	X1	X11	X16	X1	X11	X16
Acido bórico	X1	X5	X15	X1	X5	X15	X1	X5	X15
Sulfato manganeso	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Sulfato de cinc	X1	X20	X40	X1	X20	X40	X1	X20	X40
Sulfato cáprico	X1	X10	X150	X1	X10	X150	X1	X10	X150
Molibdato de sodio	X1	X10	X100	X1	X10	X100	X1	X10	X100
Cloruro de cobalto	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
Yoduro de potasio	X1	X5	X10	X1	X5	X10	X1	X5	X10
A I A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A I B	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
A M A	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
2,4-D	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
pCPA	X1	X1	X1	X10	X10	X10	X100	X100	X100
Adenina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Kinacina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
B A P	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
2 Ip	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Inositol	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Ac. Nicotínico	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Piridoxina	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10	X10
Tiamina	X400	X400	X400	X400	X400	X400	X400	X400	X400
Biotina	X25	X25	X25	X25	X25	X25	X25	X25	X25
Ac. Pantoténico	X50	X50	X50	X50	X50	X50	X50	X50	X50
Riboflavina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Ac. Ascórbico	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Colina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
Glicina	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100	X100
L-Cisteina	X12	X12	X12	X12	X12	X12	X12	X12	X12
Sacarosa	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20	X20

X = Concentración basal de cada sustancia (ver tabla 6).

El número indica las veces que fue empleada la concentración basal.

-- = No fue adicionada al medio.

CONTINUA...

Tabla 8. Medio basal para el cultivo *in vitro* de hojas.

Substancia	Concentración (mg/l)
Macroelementos M.S	Completos
Microelementos M.S	Completos
FaEDTA M.S	Completo
Tiamina	0.4
Inositol	100.0
Niacina	0.5
Piridoxina	0.1
Sacarosa	15 000.0
Carbón activado ¹	2 000.0
Extracto de plátano	150 000.0
Agar (BIOXOM)	10 000.0
pH	5.9

Tabla 9. Medio basal Nitch (1977) para el cultivo de anteras.

Componente	Concentración (mg/l)
Macroelementos	
KNO ₃	950.0
NH ₄ NO ₃	720.0
KH ₂ PO ₄	60.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	185.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	166.0
FaEDTA H. S	Completo
Microelementos	
H ₂ SO ₄ .H ₂ O	25.0
H ₂ BO ₃	10.0
ZnSO ₄ .4H ₂ O	10.0
Na MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Suplemento	
Inositol	100.0
Ac. nicotínico	5.0
Ac. fólico	5.0
Glicina	2.0
Piridoxina	0.5
Tiamina	0.5
Biotina	0.05
Sacarosa	0.0, 30.0, 60.0, 90.0 y 100.0 (g/l)
pH	5.7

Tabla 10. Medio basal empleado para el cultivo de anteras y microsporas aisladas.

Componente	Concentración (mg/l)
Macroelementos Anderson	Completos
Microelementos Anderson	Completos
FaEDTA Anderson	Completo
Tiamina	0.4
Inositol	100.0
Sacarosa	0.0, 30.0, 60.0, 90.0 y 120.0 (g/l)
pH	5.7

Tabla 11. Medio MSI.

Componente	Concentración (mg/l)
Macroelementos M.S	Completos
Microelementos M.S	Completos
FaEDTA M.S	Completo
Tiamina	0.4
Inositol	100.0
L-Cisteina	100.0
Adenina	40.0
B A P	0.0, 1.0 y 3.0
2,4-D	0.0, 25.0, 50.0, 75.0 y 100.0
Carbón activado	3 000.0
Sacarosa	10 000.0
Agar (BIOXON)	9 000.0
pH	5.7

Tabla 12. Medio basal Anderson (George y Sherrington, 1984).

Componente	Concentración (µg/l)
Macroelementos	
MH NO ₃ 4 3	400.0
KNO ₃	400.0
HgSO ₄ .7H ₂ O 4 2	370.0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O 2 4 2	380.0
CaCl ₂ .2H ₂ O 2 2	440.0
Hierro	
Na EDTA 2	74.5
FerSO ₄ .7H ₂ O 4 2	55.7
Microelementos	
MnSO ₄ .H ₂ O 4 2	16.900
ZnSO ₄ .7H ₂ O 4 2	8.600
K ₂ SO ₄ 3 3	6.200
KI	0.30
Na MoO ₄ .2H ₂ O 2 4 2	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O 2 2	0.025
CuSO ₄ .6H ₂ O 4 2	0.025
Suplemento	
Timina	0.4
Inositol	100.0
L-Cisteína	100.0
B & P	1.0
Sacarosa	30 000.0
Agar (BIOXON)	12 000.0
pH	5.7

Tabla 13. Medio Mitch para el cultivo de microsporas aisladas (Reinert y Saja, 1977).

Componente	Concentración (mg/l)
KNO ₃	950.0
NH ₄ NO ₃	725.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	185.0
CaCl ₂	168.0
KH ₂ PO ₄	68.0
FeEDTA M.S	Completo
Inositol	4 505.0
Ac. glutámico	918.0
Serina	105.1
Sacarosa	0.0, 30.0, 60.0, 90.0 y 120.0 (g/l)
pH	5.7

Tabla 14. Medio basal para las pruebas de desinfección de inflorescencias.

Componente	Concentración (mg/l)
Macroelementos M.S	Completos
Microelementos M.S	Completos
FeEDTA M.S	Completo
Tiamina	0.4
Inositol	100.0
L-cisteina	100.0
B ₆	0.6
Sacarosa	30 000.0
Agar (BIOMON)	10 000.0
pH	5.7

Tabla 15.

CONTENIDO DE HUMEDAD DE SEMILLAS ALMACENADAS
A TEMPERATURA AMBIENTE Y 7°C.

	SIN PRESEMOJO		CON PRESEMOJO		
	A	B	A1	B1	
	6.1296	6.4501	41.5650	41.1571	
	6.1192	6.6317	41.4692	41.1171	
n _j	2	2	2	2	n=8
x. j	12.2788	13.0818	83.0342	82.2742	x...=192.059
K. j	6.1395	6.5409	41.5171	41.1371	

TABLA DE ANDEVA PARA LOS DATOS DE CONTENIDO DE HUMEDAD.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Varianza (C.H.)	Fc	Ft 0.95,16
Tratamientos	2	2343.0037	781.0019		5.99
Error residual	4	0.0023	0.0057	136419.5	
Total	7	2343.0286			

Resultado: Se rechaza H₀: Las medias de los tratamientos no son iguales.

PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN:

Rangos significativos mínimos

D₄ = 0.437166
D₃ = 0.43499
D₂ = 0.425676

Comparación de rangos.

XA	XB	XB1	XA1
6.1394	6.5409	41.1371	41.5171

XA1 - XA = 36.4777	> D ₄	XA1 ≠ XA
XA1 - XB = 36.0762	> D ₃	XA1 ≠ XB
XB1 - XA = 34.9977	> D ₃	XB1 ≠ XA
XB1 - XB = 34.5962	> D ₂	XB1 ≠ XB
XB - XA = 0.6075	< D ₂	XB = XA
XA1 - XB1 = 0.39	< D ₂	XB1 = XA1

Tabla 10.

PRUEBAS DE GERMINACION EN AGROLITA
(SEMILLAS SOMETIDAS A CUATRO TRATAMIENTOS)

	A	B	A1	B1	
	60	72	62	76	
	62	74	60	78	
	62	76	60	78	
	60	70	62	78	
	62	72	62	76	
n _j	5	5	5	5	n=20
x _{.j}	306	364	306	388	x _{..} =61.6
X _{.j}	61.2	72.8	61.2	77.6	X _{..} =68.2

TABLA DE ANDEVA PARA LAS PRUEBAS DE GERMINACION
EN AGROLITA.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Varianza (C.M)	F ₀	F _t 0.99, 16
Tratamientos	3	1037.6	345.86		3.24
Error residual	16	33.6	2.1	164.69	
Total	19	1071.2			

Resultado: Se rechaza H₀: No todas las medias son iguales.

PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN:

Rangos significativos mínimos

D₄ = 8.3850

D₃ = 8.1501

D₂ = 7.7717

Comparación de rangos.

	KA	KA1	KB	KB1
	61.2	61.2	72.8	77.6
KB1 - KA	= 16.4	> D ₄	KB1 ≠ KA	
KB1 - KA1	= 16.4	> D ₃	KB1 ≠ KA1	
KB - KA	= 11.4	> D ₃	KB ≠ KA	
KB - KA1	= 11.4	> D ₂	KB ≠ KA1	
KB1 - KB	= 4.8	> D ₂	KB1 ≠ KB	
KA1 - KA	= 0.0	< D ₂	KA1 = KA	

Tabla 17.

ANDEVA PARA MACRO Y MICRONUTRIENTES DE LA PRUEBA DE
AMPLIO ESPECTRO (inflorescencias femeninas).

	BAJA (B)	MEDIA (M)	ALTA (A)	
	4	3	1	
	4	1	0	
	3	3	2	
	5	4	3	
	6	1	1	
	4	0	0	
	3	2	1	
	3	0	1	
	2	0	0	
n _j	9	9	9	n=27
X _{.j}	34	14	9	X _{...} =37
X _{.j}	3.77	1.55	1.0	X _{...} =3.11

TABLA DE ANDEVA PARA LOS DATOS.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Varianza (C.M)	Fc	Ft 0.92, 3, 26
Tratamientos	2	38.88	19.44		3.37
Error residual	24	37.78	1.574	12.35	
Total	26	76.66			

Resultado: Se rechaza H₀; H₀ todas las medias son iguales.

PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN:

Rangos significativos mínimos

$$D3 = 1.28219$$

$$D2 = 0.9198$$

Comparación de rangos.

	BAJA	MEDIA	ALTA
	3.77	1.55	1.00

$$XB - XA = 3.77 > D3 \quad XB \neq XA$$

$$XB - XM = 3.22 > D2 \quad XB \neq XM$$

$$XM - XA = 0.55 < D3 \quad XM = XA$$

Tabla 18.

ANDEVA PARA AUXINAS DE LA PRUEBA DE
AMPLIO ESPECTRO (Influencias femininas).

	BAJA (B)	MEDIA (M)	ALTA (A)	
	9	5	8	
	12	8	4	
	6	4	2	
n _j	3	3	3	n=9
x _{.j}	20	17	14	x _{. .} =57
X _{.j}	6.66	5.66	4.66	X _{. .} =6.33

TABLA DE ANDEVA PARA LOS DATOS.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Varianza (C.M)	Fc	Ft 0.92, 2.8
Tratamientos	2	36.00	18	1.5	4.46
Error residual	6	52.00	8.666		
Total	8	26.00			

Resultado: Se acepta Ho: todas las medias son iguales.

Tabla 19.

ANDEVA PARA CITOCININAS DE LA PRUEBA DE
AMPLIO ESPECTRO (inflorescencias femeninas).

	BAJA (B)	MEDIA (M)	ALTA (A)	
	8	12	6	
	5	8	4	
	8	4	2	
n _j	3	3	3	n=9
N. _j	21	24	12	K ₁ =57
X. _j	7.00	8.00	4.00	K ₂ =6.33

TABLA DE ANDEVA PARA LOS DATOS.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Varianza (C.M)	Fc	Ft 0.02, 2, 8
Tratamientos	2	26.00	13	1.5	4.46
Error residual	6	92.00	6.666		
Total	8	26.00			

Resultado: Se acepta Ho: todas las medias son iguales.

APENDICE II.

SECCION DE FOTOGRAFIAS.

PROCESO DE GERMINACION EN SEMILLAS DE *Chasmodon glaberrima* Mart.

No. de fotografia

- 1 a 3.- Estadios del desarrollo temprano del embrión.
- 4 y 5.- Aparición de la ligula y la plúmula.
- 6.- Desarrollo de la raíz.
- 7, 8, 9 y 10.- Plántulas listas para ser trasplantadas.
- 11.- Plántulas bajo condiciones de invernadero.
- 12.- Extracción del embrión. El recuadro indica la zona de corte.
- 13 y 14.- Embriones sexuales sembrados *in vitro*.
- 15.- Contaminación por bacterias.
- 16 y 17.- Inóculos de hoja *in vitro*.
- 18.- Callo surgido a partir de inóculos de hoja.
- 19.- Cultivo *in vitro* de anteras.
- 20.- Flor cultivada *in vitro* mostrando receptividad para la polinización. Recuadro: gota de néctar.
- 21.- Inflorescencias de *Chasmodon glaberrima* Mart.
- 22.- Flor y porción de raquilla *in vitro*.

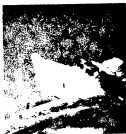
CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS CARPELOS DE LA FLOR DE *Chasmodon glaberrima* Mart.

- 23 y 24.- Flores mantenidas *in vitro* durante 3 meses.
- 25 a 27.- Flores cultivadas *in vitro* durante 6 meses.
- 28 y 29.- Desarrollo de tejido calloso a partir de raquilla. Recuadro: Hinchamiento previo al surgimiento del callo.

Abreviaturas empleadas:

a) anteras b) pétalos c) conectivo d) cáliz e) embrión
f) flor g) callo h) hoja i) peciolo j) ligula m) mesocarpo
fibroso p) plúmula q) raquilla r) raíces adventicias
r'1 raíces secundarias s) semilla t) tapa u) testa v) vaina
primaria
C) Carpelos E) Estigmas P) Polen Q) Raquilla R) raíz
V) vaina secundaria



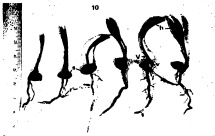








10



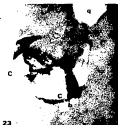
11











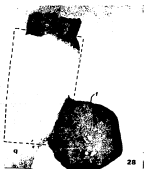
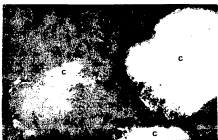
23



129



26



ANÁLISIS HISTOLÓGICO

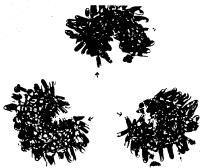
No. de fotografía

- 30.- Estigmas de *Chamaedorea glaucos*. Se pueden observar las papilas estigmáticas unicelulares. X 10.
- 31.- Corte sagital del gineceo de una flor de *Chamaedorea glaucos* (sólo se observa un carpelo). X 6.3.
- 32.- Corte transversal del gineceo (*Chamaedorea glaucos*). X 2.5.
- 33.- Corte transversal del gineceo (*Chamaedorea glaucos*). X 6.3.
- 34.-Embrión sexual (*Chamaedorea oblongata*). X 2.5.
- 35.-Embrión sexual (*Chamaedorea oblongata*). X 6.3.
- 36.- Corte sagital de un carpelo cultivado *in vitro* durante 3 meses. X 2.5.
- 37.- Corte sagital de un carpelo mantenido *in vitro* durante 3 meses. X 6.3.
- 38 y 39.- Corte sagital de un carpelo con 3 meses de cultivo *in vitro*. Se puede observar un mayor grado de organización y desarrollo a nivel del saco embrionario. (X 2.5, X 10, respectivamente).
- 40.- Corte sagital de dos carpelos cultivados *in vitro* durante 6 meses. Izquierda: Carpelo menos desarrollado. Derecha: Carpelo más desarrollado. X 2.5.
- 41.- Corte sagital del carpelo menos desarrollado. X 6.3.
- 42 y 43.- Corte sagital de un carpelo cultivado *in vitro* durante 6 meses con mayor grado de desarrollo. X 6.3.
- 44 y 45.- Corte sagital de un carpelo a nivel externo. (X 2.5, X 6.3, respectivamente).

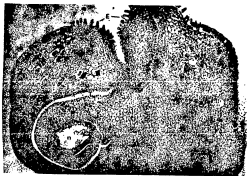
Abreviaturas empleadas:

A) Tejido periférico B) Placenta C) Carpelo E) Estigmas
G) Endosperma H) Haustorio L) Lácula M) Micrópilo
T) Conducto por donde penetra el tubo polínico

a) embrión i) tegumento j) rafidias n) posición del saco embrionario y de la nucela o) funículo w) trozas vasculares x) cuerpos de estigmas y) lípidos z) esclereidas



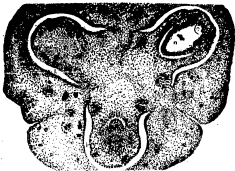
30



31



32



33



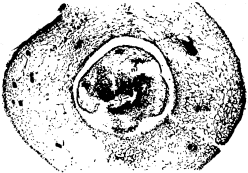
24



25



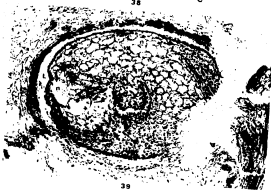
36



37



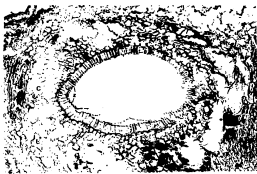
28



29



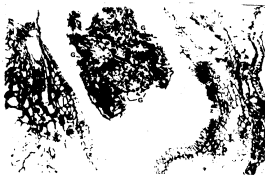
40



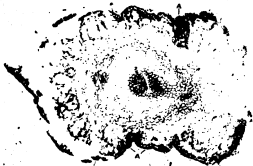
41



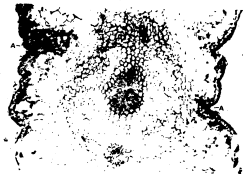
42



43



44



45