



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

16
2ej.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ESTUDIO DE LA RESPUESTA MORFOGENETICA DE
DIFERENTES INOCULOS Y RESCATE DE
EMBRIONES *in vitro* DE *Chamaedorea elegans* Mart.
(PALMAE).

T E S I S

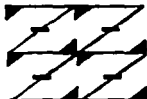
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

SANDRA LUZ HERNANDEZ OJEDA

U N I V E R S I T A D
N A C I O N A L
A U T O N O M A
D E
Z A R A G O Z A



LO HUMANO
ES
DE NUESTRA REFERENCIA

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DE LA Dra. THELMA L. VILLEGAS GARRIDO JEFA DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DEL DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

**In the begining only was the word,
the word was with God,
and the word was God.**

(St. John I: 1)

A Dios

Por concederme el milagro de vivir.

A mis padres

Con un profundo agradecimiento por la mejor herencia que pudieron darme, mis estudios.

A mis hermanos

Rocio, Arturo, Alejandra, Araceli, Silvia, Azucena y Alhell. Con mucho cariño.

A mis sobrinos

Brenda, Gerardo, Alejandro, Martha, Omar, Cristóbal y David. Pequeñas gotas de agua cantarina

A mi mamá Lupe y a Juan

A Gabriel

Por permitirme caminar a tu lado por el sendero de la vida.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Thelma L. Villegas Garrido por alentar la iniciativa y la confianza en los que se inician por el camino de la investigación, así como por su acertada dirección en la realización de este trabajo

Familia Santonus por abrirme las puertas de su casa, y haberme permitido realizar la colecta del material biológico en su Rancho

Gabriel Obregón Molina por su colaboración y apoyo para la realización de este trabajo.

M. en C. Carmen Gonzalez Macias y por su confianza y apoyo

Ing. Carlos F. Valdés Garcia por su confianza y apoyo

Grupo de Trabajo de Estudios Ecologicos, porque de forma directa o indirecta, cada uno de mis compañeros me permitio con su apoyo, terminar con mi tesis de Licenciatura.

Instituto Mexicano del Petróleo que a través del programa Plan Maestro para la Formación de Recursos Humanos para la Industria Petrolera, subprograma III titulación de pasantes, me permitió concluir este trabajo



Chamaedorea elegans Mart.

ÍNDICE	página
ABREVIATURAS	i
LISTA DE CUADROS	ii
LISTA DE GRÁFICAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II. 1 Descripción de la familia Arecaceae (Palmae)	4
II. 2 Descripción del genero <i>Chamaedorea</i> Willd	6
II. 3 Clasificación Taxonómica de <i>Chamaedorea elegans</i> Mart.	8
II. 4 Descripción de <i>Chamaedorea elegans</i> Mart.	9
II. 5 Usos y problemática de la palma camedor	11
II. 6 Cultivo de Tejidos Vegetales	14
II. 6. 1 Embriogénesis somática	15
II. 6. 2 Organogénesis	16
II. 7 Conceptos de Diferenciación celular	16
II. 8 Rescate de embriones	17
II. 9 Oxidación	19
II. 10 El Cultivo de Tejidos Vegetales en la familia Arecaceae (Palmae)	20
III. OBJETIVOS	22
IV. HIPÓTESIS	23

V. MATERIALES Y MÉTODOS	24
V.1 Material biológico	24
V.2. Desinfección	24
V.2.1 Desinfección de los frutos para la disección del embrión	25
V.2.2 Desinfección de las semillas para la germinación <i>in vitro</i>	25
V.2.3 Desinfección de las inflorescencias inmaduras	26
V.3. Cultivo de los inoculos	26
V.3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de embriones	27
V.3.2 Cultivo <i>in vitro</i> de inflorescencias inmaduras	28
V.4. Pretratamientos auxínicos y térmicos	29
V.4.1 En embriones	29
V.4.2 En inflorescencias	31
V.5. Pruebas de germinación	31
V.5.1 Rescate de Embriones (Cultivo <i>in vitro</i> de embriones maduros)	31
V.5.2 Cultivo <i>in vitro</i> de semillas maduras	32
V.6 Cultivo <i>in vitro</i> de ápices de brote	33
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
VII. CONCLUSIONES	69
VIII. PERSPECTIVAS	73
IX. BIBLIOGRAFÍA	74
APÉNDICE I	77

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
ANA	Ácido Naftalenacético
AIA	Ácido Indolacético
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
AIB	Ácido Indolbutírico
K	(Cinetina), 6-furfurilamino purina
BAP	Bencil aminopurina
2-ip	N6-isopenteniladenina
PAL	Fenilalanina amoniliasa
MS	Medio de Cultivo de Murashige y Skoog (1962)

LISTA DE CUADROS

- Cuadro V.1 Tratamientos que se probaron en el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos en diferentes estadios de desarrollo
- Cuadro V.2 Tratamientos que se probaron en el cultivo *in vitro* de inflorescencias inmaduras
- Cuadro V.3 Tratamientos que se probaron en el cultivo *in vitro* de apices de brote
- Cuadro VI.1 Fenología de *Chamaedorea elegans* Mart. en la zona de estudio (Rancho Zacoapan, Huatusco, Veracruz)
- Cuadro VI.2 Porcentajes de germinación, a la 12a semana, de embriones de diferentes edades en el factorial de 18 tratamientos
- Cuadro VI.3 Características de las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 21 semanas
- Cuadro VI.4 Características de las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 26 semanas
- Cuadro VI.5 Características de las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 30 semanas
- Cuadro VI.6 Características de las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 34 semanas
- Cuadro VI.7 Características de las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 41 semanas
- Cuadro VI.8 Características de las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 51 semanas
- Cuadro VI.9 Porcentajes de formación de callo, a la 12a semana, de embriones de diferentes edades en el factorial de 18 tratamientos
- Cuadro VI.10 Características de los diferentes callos obtenidos a partir de embriones de distintas edades en los tratamientos con Picloram
- Cuadro VI.11 Porcentajes de oxidación, a la 12a semana, de embriones de diferentes edades en el factorial de 18 tratamientos
- Cuadro VI.12 Porcentajes de formación de callo y oxidación obtenidos en carbón activado y papel filtro

- Cuadro VI.13 Resultados del experimento con inflorescencias inmaduras en diferentes tratamientos**
- Cuadro VI.14 Resultados del experimento con inflorescencias inmaduras en medio MS (1962) suplementado con 1.5 mg/l de Picloram**
- Cuadro VI.15 Resultados del experimento con pretratamiento térmico en embriones de 26 semanas**
- Cuadro VI.16 Resultados en porcentaje, a la 12a semana, del choque auxínico en embriones de 34 semanas**
- Cuadro VI.17 Resultados en porcentaje, a la 12a semana, de los pretratamientos térmicos en embriones de 34 semanas**
- Cuadro VI.18 Resultados en porcentaje a la 12a semana, del choque auxínico en embriones de 41 semanas**
- Cuadro VI.19 Resultados en porcentaje, a la 12a semana, de los pretratamientos térmicos en embriones de 41 semanas**
- Cuadro VI.20 Resultados en porcentaje, a la 12a semana, del choque auxínico en inflorescencias inmaduras**
- Cuadro VI.21 Resultados en porcentaje a la 12a semana, de los pretratamientos térmicos en inflorescencias inmaduras**
- Cuadro VI.22 Resultados en porcentaje, a la 16a semana, del experimento de Rescate de Embriones**
- Cuadro VI.23 Resultados en porcentaje, a la 4a semana, del experimento de ápices de brote**

LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica VI.1** Porcentajes de germinación vs tiempo, de embriones maduros en cuatro diferentes tratamientos
- Gráfica VI.2** Porcentajes de germinación de embriones maduros y sobrevivencia *in vitro* de las plántulas obtenidas
- Gráfica VI.3** Porcentajes de germinación vs tiempo, de semillas maduras en tres diferentes sustratos
- Gráfica VI.4** Porcentajes de germinación de semillas maduras y sobrevivencia *in vitro* de las plántulas obtenidas
- Gráfica VI.5** Porcentajes de germinación vs tiempo, de semillas de diferentes edades en algodón húmedo estéril
- Gráfica VI.6** Porcentajes de germinación de semillas de diferentes edades, en algodón húmedo estéril, y sobrevivencia *in vitro* de las plántulas obtenidas

LISTA DE FIGURAS

- Figura II.1 Distribución mundial de la familia *Arecaceae* (*Palmae*) (Moore, 1973)
- Figura II.2 Distribución mundial del género *Chamaedorea* Willd (Moore, 1973)
- Figura II.3 Distribución de la palma camedora en México (Barba y Romero 1993)
- Figura II.4 *Chamaedorea elegans* Mart. (Aguilar, 1986)
- Figura VI.1 Respuesta de los embriones de 21 semanas en el factorial de 18 tratamientos, y los tipos de plantulas obtenidas
- Figura VI.2 Respuesta de los embriones de 26 semanas en el factorial de 18 tratamientos, y los diferentes tipos de plantulas obtenidas
- Figura VI.3 A y B, respuesta de los embriones de 30 semanas en el factorial de 18 tratamientos, y los diferentes tipos de plantulas obtenidas
- Figura VI.4 A y B, respuesta de los embriones de 41 semanas en el factorial de 18 tratamientos, y los diferentes tipos de plantulas obtenidas
- Figura VI.5 Respuesta de los embriones de 51 semanas en el factorial de 18 tratamientos y los diferentes tipos de plantulas obtenidas
- Figura VI.6 Formación de callo granular, con desarrollo de raíz, a partir de embriones de 30 semanas de edad. Tratamiento 4 (1.5 mg/l de Picloram + 0.2 mg/l de cinetina), del factorial de 18 tratamientos
- Figura VI.7 Formación de callo granular a partir de embriones de 41 semanas de edad. Tratamiento 4 (1.5 mg/l de Picloram + 0.2 mg/l de cinetina), del factorial de 18 tratamientos
- Figura VI.8 Formación de callo granular a partir de embriones de 41 semanas de edad. Tratamiento 10 (1.5 mg/l de Picloram + 0.2 mg/l de Bencilaminopurina), del factorial de 18 tratamientos
- Figura VI.9 Formación de callo granular a partir de embriones de 41 semanas de edad. Tratamiento 16 (1.5 mg/l de Picloram), del factorial de 18 tratamientos
- Figura VI.10 Formación de callo granular a partir de embriones de 51 semanas de edad. Tratamiento 4 (1.5 mg/l de Picloram + 0.2 mg/l de cinetina), del factorial de 18 tratamientos
- Figura VI.11 Formación de callo granular a partir de embriones de 51 semanas de edad. Tratamiento 16 (1.5 mg/l de Picloram), del factorial de 18 tratamientos

- Figura VI. 12** A y B, formación de callo con raíces a partir de inflorescencias inmaduras, en medio de cultivo MS (1962) suplementado con 1.5 mg/l de Picloram
- Figura VI. 13** Plántula obtenida de la germinación de un embrión maduro en medio de cultivo MS (1962) suplementado con 0.02 mg/l de Ácido giberélico
- Figura VI. 14** Plántula obtenida de la germinación de un embrión maduro en medio de cultivo MS (1962) suplementado con 1 mg/l de 2,4-Diclorofenoxiacético
- Figura VI. 15** Plántula obtenida de la germinación de un embrión maduro en medio de cultivo MS (1962) suplementado con 1 mg/l de Ácido naftalenacético
- Figura VI. 16** Plántula obtenida de la germinación de una semilla madura sobre algodón húmedo estéril
- Figura VI. 17** Plantulas obtenidas de la germinación de semillas maduras sobre algodón húmedo estéril
- Figura VI. 18** Desarrollo de la hoja en ápices de brote en dos diferentes tratamientos. A, medio de cultivo MS (1962) suplementado con 1.5 mg/l de Bencil aminopurina + 0.2 mg/l de Ácido naftalenacético. B, medio de cultivo MS (1962) suplementado con 1.5 mg/l de N6-isopenteniladenina + 0.2 mg/l de Ácido naftalenacético

RESUMEN

La palma *Chamaedorea elegans* Mart. es un recurso forestal no maderable de los bosques tropicales mexicanos, con un alto potencial económico, ya que es muy apreciada como planta ornamental, tanto a nivel nacional como internacional. Lo anterior una de las principales causas, por la que ha sido objeto de una desmedida explotación, que ha provocado una drástica disminución de estas palmas en su hábitat natural, además de la acelerada tasa de destrucción de los bosques tropicales mexicanos.

Aunado al saqueo ilegal del germoplasma y la destrucción de los bosques tropicales, esta especie presenta características inherentes que reducen, considerablemente, sus posibilidades de sobrevivencia, tales como: un ciclo de reproducción anual, un prolongado tiempo de germinación (utilizando métodos tradicionales de propagación), además de ser una planta de lento crecimiento. Por todo lo anterior, resulta de suma importancia establecer nuevos y mejores sistemas de propagación masiva para esta especie.

El Cultivo de Tejidos Vegetales se presenta como una alternativa para la propagación de esta especie. Sin embargo, son muy pocos los estudios que se han realizado utilizando esta técnica en especies del género *Chamaedorea*, por lo que aun es prioritario establecer las bases para el cultivo *in vitro* de la especie y, así, poder ofrecer alternativas reales.

En este trabajo se establecieron las bases y condiciones para el cultivo *in vitro* de *Chamaedorea elegans* Mart. por medio de la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales. Así mismo se logró establecer la metodología para el rescate de embriones a través del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos, y así reducir el tiempo de germinación de estos. Por otro lado también se llegó a reducir el tiempo de germinación *in vitro* de semillas y aumentar la proporción de germinación natural de estas.

Todo esto con la finalidad de cimentar futuras investigaciones acerca de la morfogenética vegetal, así como ofrecer alternativas biotecnológicas para la propagación masiva de esta especie. Su producción por métodos biotecnológicos bajo condiciones controladas, permitirá obtener plantas con condiciones fitosanitarias adecuadas y sin poner en peligro de extinción a las poblaciones naturales ni alterar los ecosistemas, lo que repercute en la solución de un problema de carácter social con implicaciones económicas, bajo una filosofía de promoción del desarrollo sustentable en México.

I. INTRODUCCIÓN

México alberga en su territorio una de las más ricas y variadas floras del mundo, como prueba de esto, en el estado de Chiapas, se han logrado inventariar 8 248 especies de plantas vasculares de un total esperado de 10 mil (Toledo, 1988). Esta gran riqueza de la flora, y en consecuencia de la fauna, está relacionada con la ubicación geográfica de México, justamente en la intersección de dos reinos biogeográficos (Nearctic y Neotropical), así como con su compleja topografía, producto de una intrincada historia geológica, y de los grandes contrastes de su clima. Sin embargo, esta gran riqueza natural se encuentra en inminente peligro de desaparecer a causa de la acelerada tasa de destrucción de los bosques tropicales (el 90% de los bosques tropicales del país ya han sido destruidos, en la mayoría de los casos, sin siquiera conocer sus riquezas). Uno de los muchos casos que se encuentran dentro de esta problemática es el de un recurso forestal no maderable de los bosques tropicales mexicanos: se trata de un género de palmas típicas de este ecosistema, conocidas comúnmente con el nombre de "palma comedor", "xiate" ó "tepejilote". La palma comedor pertenece al género *Chamaedorea*, que significa "regalo sobre el suelo" (Principes, 2(1) 20, citado por Barba y Romero, 1993).

La importancia de estas palmas no sólo se debe a un mero interés biológico, sino también al uso comercial que de ellas se hace (Oyama, 1987). En México se ha explotado el follaje de la mayoría de las especies del género *Chamaedorea*, principalmente con fines de ornato (arreglos florales, adornos para iglesias y mercados, y elaboración de coronas y canastas), en menor medida las yemas florales y las inflorescencias tiernas de algunas especies son consumidas como alimento (Saldivia y Cherbonnier, 1982; Oyama, 1987); en la región de los Tuxtlas, la parte tierna de la palma, conocida comúnmente como el corazón de la palma es utilizada como contraveneno de la mordedura de la nuyaca (Saldivia y Cherbonnier, 1982).

La explotación de estas palmas en México, según se sabe, se ha venido realizando desde fines de los años cuarenta, época en la que se inició su exportación a los Estados Unidos, país en el que se ha mantenido su demanda (Saldivia y Cherbonnier, 1982). De acuerdo con un organismo oficial estadounidense, "Market New Division Fruit Vegetable", México y Guatemala son los únicos países exportadores de palma comedor a los Estados Unidos.

siendo México el principal proveedor (Balboa, 1987). Es importante mencionar que la explotación y la comercialización de la palma camedor están controladas por dos monopolios Norteamericanos, la "Jewel Foliage Co." y la "Continental Wholesale Florists" (Oyama, 1987; Balboa, 1987).

En la República Mexicana se estima que aproximadamente se recolectan un millón de hojas diarias, así como más de 200 kilos diarios de semillas en la época reproductiva, que comprende cerca de 4 meses al año (Oyama, 1987). Según datos de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), actualmente desaparecida, informo que en la recolección de palma se ocupan los campesinos más pobres, con tierra o sin ella. Por otro lado, el Instituto Nacional de Investigación sobre Recursos Bioticos (INIREB), también actualmente desaparecido, asegura que, en todo el país, cerca de 15 mil campesinos se dedican a la recolección de palma, trabajo que les brinda una alternativa económica sin descuidar sus labores agrícolas (Balboa, 1987).

La sobreexplotación, el avance de los desmontes, los incendios forestales y la falta de una coordinación institucional efectiva y coherente (en cuanto a la búsqueda de medidas para la conservación de la palma) han provocado una grave disminución de este recurso en el territorio nacional. Ha sido tal el impacto que un gran número de especies del género *Chamaedorea* se encuentran ahora engrosando las listas de especies en peligro de extinción. Tal es el caso de *Chamaedorea elegans* Mart. (González, 1985; Vovides, 1981; IUCN Botanic Gardens Conservation Secretariat, 1988), considerada como una de las especies de mayor demanda comercial debido a que cuenta con características que la hacen ser muy apreciada como planta de ornato (Saldívar y Cherbonnier, 1982).

Aunado a la destrucción de los bosques tropicales mexicanos, la gran limitante que representa el prolongado tiempo de germinación de la especie utilizando los métodos tradicionales de propagación (en condiciones naturales para todas las especies de este género, la germinación es un proceso muy lento, pues normalmente tarda de tres a nueve meses), así como el saqueo ilegal de germoplasma reduce drásticamente sus probabilidades de sobrevivencia. Con estos antecedentes resulta prioritario establecer nuevos y mejores sistemas de propagación masiva para esta especie.

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) se presenta como una alternativa para esta especie, ya que permite la propagación masiva y rápida de recursos genéticos valiosos y/o en peligro de extinción, debido a que CTV está basado en la teoría de la totipotencialidad y autonomía celular, en donde cada célula de un individuo contiene la información genética requerida para generar un individuo nuevo, idéntico al progenitor (Barba y Luna, 1990)

Sin embargo, no hay que perder de vista que son muy pocos los estudios que se han realizado utilizando la técnica de CTV en especies de este género, por lo que aún, es prioritario establecer las bases para el cultivo *in vitro* de la especie y así poder ofrecer alternativas reales

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue el de poder establecer las bases del cultivo *in vitro* de *Chamaedorea elegans* Mart. con la finalidad de cimentar futuras investigaciones de ciencia básica, así como, en la búsqueda de sistemas alternativos de propagación masiva para esta especie, por medio del Cultivo de Tejidos Vegetales.

II. ANTECEDENTES

II.1 Descripción de la familia *Palmae* (*Arecaceae*)

Después de la familia de las gramíneas, *Arecaceae* es la familia de plantas con mayor importancia para el hombre; a lo largo de su historia, las ha utilizado como alimento y combustible, y le han proporcionado vestido y protección, entre otros. Con estos antecedentes, resulta fácil concluir que las palmas han tenido, y tienen aún, un papel relevante, tanto agrícola como económico. Acertadamente las palmas han sido llamadas los "árboles de la vida" (Tisserat, 1984).

Actualmente, algunos de los miembros de esta familia destacan por su importancia económica, como la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.), la palma de coco (*Cocos nucifera* L.), y la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.), que son cultivadas de manera intensiva por el hombre, por los diversos productos que de ellas se obtienen. En menor proporción, algunas palmas menos conocidas y, por ende, de menor importancia económica, también son objeto de cultivo en algunas comunidades de las zonas tropicales (Tisserat, 1984).

La familia *Arecaceae* (*Palmae*) pertenece a la clase de las *Monocotiledoneas* (*Liliopsida*), pues 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 sudeste de Asia (Muller, 1981, citado por Aguilar, 1986).

La familia *Palmae* comprende unos 211 géneros y aproximadamente 4 000 especies, distribuidas mundialmente en las regiones tropicales y subtropicales, extendiéndose en ocasiones a zonas más calientes o frías (Moore y Uhl, 1982) (Figura II 1).

Existen cuatro formas (hábitos) básicas de crecimiento de las palmas: arbórea, arborescente, arbustiva, acaulescente y trepadora. A fin de ubicarlas dentro de los hábitos de las *Monocotiledoneas*, pueden ser simpodiales (cespitosas o coloniales) o monopodiales (tallos solitarios). Sus tallos pueden presentar diversos aspectos y tipos de crecimiento, varían ampliamente en altura, diámetro y dureza. Tienen un aspecto maderable aunque no

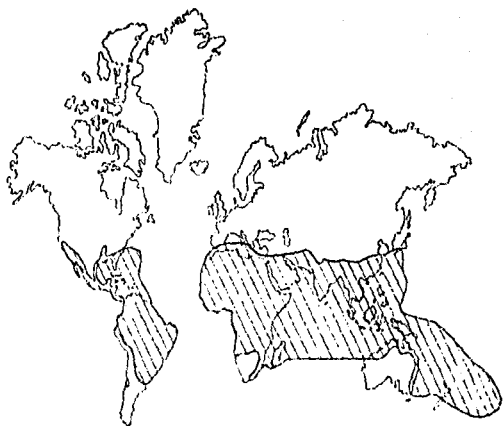


Figura II.1 Distribución mundial de la familia Palmae (Moore, 1973)

comparable con el de las dicotiledóneas, porque no presentan xilema secundario o cambium funcional. En las palmas, esta apariencia depende de la abundancia de fibras y esclerénquima, y la dureza de su tallo de la presencia de sílice debido a esto muchas de ellas semejan árboles (Aguilar, 1986, Moore, 1973)

La hoja es el órgano más sobresaliente y distintivo de las palmas. Se caracteriza por una cubierta que envuelve el tallo. Generalmente presentan un peciolo o una lámina formada por un eje central (costa o raquis), el cual es corto en las hojas palmadas más desarrolladas 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 folíolos o pinnas en las hojas pinnadas (Moore y Uhl, 1982)

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 o pérdida del gineceo o del androceo. El polen es monosulcado, a excepción de un grupo. El número cromosómico (n) va de 18 en las palmas más primitivas a 17, 16, 15, 14 y 13 en los grupos más avanzados (Moore y Uhl, 1982)

El fruto generalmente tiene una pared carnosa y una semilla aunque, con menor frecuencia, pueden tener dos, tres o diez semillas, el tamaño y la forma de la semilla es muy variable. El epicarpio generalmente es liso, raramente peludo, espinoso, o cubierto con escamas sobrepuestas, el mesocarpio contiene cristales, fibras, escleridas fibrosas, esclerénquima y taninos, y posiblemente tiene una función de protección, el endocarpio no está diferenciado o es muy delgado, algunas veces con un operculo arriba del embrión, o grueso, y entonces, frecuentemente con tres o más poros en, por debajo o por arriba de la mitad. El endospermo siempre es abundante en estas semillas y puede ser homogéneo o ruminado, el embrión es apical, lateral o basal. La germinación es remota-tubular, remota-ligular o adyacente-ligular (Moore, 1973).

II. 2 Descripción del género *Chamaedorea* Willd.

El género *Chamaedorea* Willd es el más numeroso de la familia Palmae, es endémico de América y, según Standley (1958) (Citado por Saldivia y Cherbonnier, 1982), se conocen cerca de 116 especies, que se distribuyen desde México hasta Brasil y Bolivia, ocupando principalmente las regiones tropicales y templadas (Figura II 2) La mayoría se encuentra en Centroamérica, particularmente en México, que cuenta con 54 especies (Barba y Romero, 1993), que se concentran en los estados de Oaxaca, Tabasco, Chiapas, Veracruz, Campeche y Quintana Roo (Figura II 3), principalmente entre los 750 y 1 800 m s n m., aunque se han encontrado a 95 m s n m., en Santo Domingo, Oaxaca, dentro de una zona de selva virgen. En México las especies del género *Chamaedorea* Willd se distribuyen en zonas de selva alta y selva baja perenifolia, así como en zonas de selva alta o mediana subperenifolia (Saldivia y Cherbonnier, 1982)

Las especies del género *Chamaedorea* Willd presentan, principalmente, crecimiento arbustivo o herbáceo, según la altura que alcancen las plantas. Muchos autores proponen que el crecimiento herbáceo en las palmas no existe, debido a que casi todas presentan un tallo duro, sin embargo, Aguilar (1986) considera que muchas de ellas semejan hierbas por su baja talla, por ejemplo *Ch tenella* H. Wendl., *Ch. metallica* Cook ex Moore, y *Ch. tuerckheimii* (Dammer) Burret, que alcanzan a medir menos de un metro.

Las especies de este género poseen diferentes tipos de tallo por lo que se pueden clasificar de acuerdo a las características de este. Aguilar (1986) propone tres grupos el primero corresponde a las especies con el tallo erecto largo, solitario y monopodico, como en *Ch. schiedeana* Mart y *Ch. oblongata* Mart, el segundo grupo corresponde a las especies con tallo largo, solitario, monopodico, subtrópico y escandente, muy típico en *Ch. elatior* Mart.; otras especies como *Ch. lepidota* Wendl y *Ch. elegans* Mart, además de presentar tallos largos, como las especies del primer grupo, pueden ser acaules en estados juveniles, el tercer y último grupo corresponde a especies con tallo rizomatoso como en *Ch. tuerckheimii* (Dammer) Burret.

Las hojas presentan una vaina en la base del peciolo que rodea al tallo, esta puede encontrarse muy cerrada o abierta casi en su totalidad, como en *Ch. tuerckheimii* (Dammer) Burret. Los peciolos pueden ser largos, como en la mayoría de las especies, o cortos,

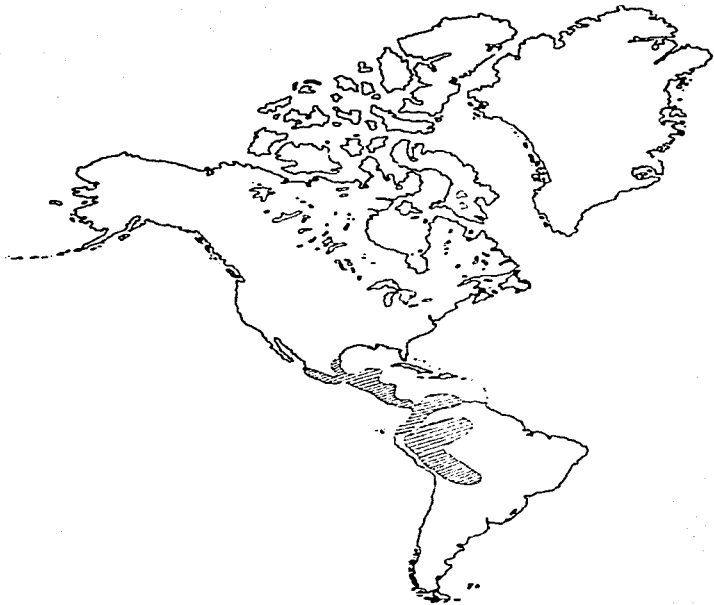


Figura II.2 Distribución mundial del género *Chamaedorea* Willd. (Moore, 1973).

como lo presenta en ocasiones *Ch. elatior* Mart (Aguilar, 1986) En las especies de *Chamaedorea* se presentan dos tipos de hoja simples, con el ápice emarginado o poco bifido (p. ej. *Ch. metallica* Cook ex Moore), y pinnadas, tipo de hoja que presenta la mayoría. En las hojas simples se presentan básicamente dos formas de la lámina, desde cuneado-obovado, como en *Ch. ernesti-augusti* H. Wendl. hasta ligeramente elípticas, como en *Ch. tuerckheimii* (Dammer) Burret. Las pinnas o folíolos son alternos u opuestos, rara vez en grupo frecuentemente un poco oblicuos o sigmoideos, especiulados, con margen entero y con venación esencialmente paralela (Aguilar, 1986).

Las inflorescencias nacen entre (interfoliares) o debajo (intrafoliares) de las hojas, pueden ser simples (espigadas) (p. ej. *Ch. monostachys* Burret) o ramificadas (p. ej. *Ch. elegans* Mart.), con un eje o raquis que se subdivide en raquillas con pedunculo corto o largo, las ramadas son escasas o densamente floridas, presentan brácteas en número de tres o más, alargadas, envolviendo el pedunculo, hendidas en el ápice, coriáceas o membranosas, más o menos persistentes. Algunas especies pueden presentar los dos tipos de inflorescencias, espigadas y/o ramificadas (p. ej. *Ch. metallica* Cook y *Ch. ernesti-augusti* Wendl.), mientras que en otras las raquillas inferiores pueden presentar ramas secundarias (inflorescencias poco paniculadas) como en *Ch. elegans* Mart., y *Ch. topejilote* Liebm. (Standley y Steyermark, 1958. Quero, 1989, citados por Barba y Romero, 1993) Las inflorescencias son de color naranja cuando el fruto es maduro (Aguilar, 1986).

Las flores en las especies de *Chamaedorea* son imperfectas, sésiles o casi embebidas en la raquilla, pequeñas o diminutas sin brácteas y sin bracteolas generalmente numerosas, arregladas en forma densa o aglomerada y menos densa y o laxa en raquis o raquillas, trimeras (tres sépalos, tres pétalos, tres carpelos sincarpicos uniovulados) y seis estambres (Aguilar 1986).

Las flores estaminadas tienen cáliz anular o cupular, de sépalos connados basalmente o imbricados, corola algunas veces estipitada, de pétalos gamófilos o separados, con el ápice libre o unido, 6 estambres, generalmente incluidos, epipetalos, los filamentos separados o connados, anteras dorsifijas, diatecas, con dehiscencia lateral y longitudinal, pistilodio columnar, con ápice expandido truncado, atenuado o lobulado, las flores son pistiladas, con cáliz semejante al de las flores estaminadas, la corola tiene pétalos gamófilos, separados o imbricados, el gineceo es sincarpico (tres carpelos), el estilo está

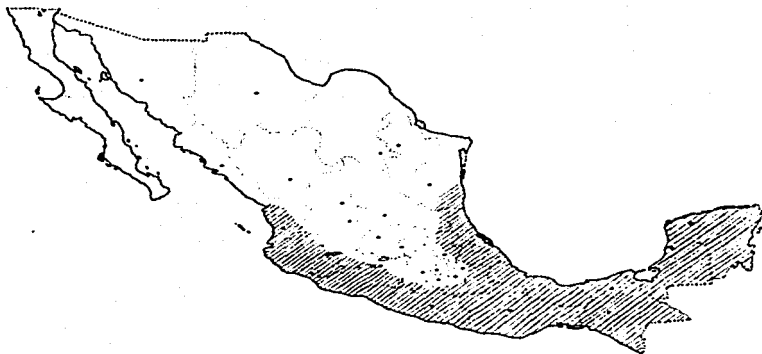


Figura II.3 Distribución de la palma comedor en México (Barba y Romero, 1993).

ausente, poseen ovano supero, trilocular, uniovular, con óvulos axilares, basales y ortótropos o anatropos, los estigmas son sésiles y recurvados. Los estaminodios pueden estar presentes o ausentes (Aguilar, 1986)

El fruto es una pseudodrupa, pequeño, globoso, oblongo, a veces falcado o elipsoide, madurando por lo general un carpelo, pero a veces dos o tres, con remanente estigmatico basal; el pericarpio es coriáceo o carnoso, el epicarpio es liso, el mesocarpio es carnoso, escasamente fibroso, y el endocarpio es membranoso nervado. La forma, tamaño y color son características que pueden servir para diferenciar especies. La semilla es erecta, globosa o elipsoide, hilo pequeño y basal, rafe poco notorio, el endospermo es albuminoso, sólido y liso, no ruminado, posee embrión rudimentario de lateral a poco basal (Aguilar, 1986) (Quero 1989 citado por Barba y Romero 1993)

II. 3 Clasificación Taxonómica de *Chamaedorea elegans* Mart.

Reino Vegetal

Subreino Fanerogamas

Tipo Angiospermas

Clase Monocotiledoneas (Liliopsida)

Superorden: Areciflorae

Orden: Arecales

Familia: Arecaceae (Palmae)

Subfamilia: Ceroxyloideae

Subtribu: Hyopnorbeae

Género: *Chamaedorea*

Subgénero: *Collinia*

Especie: *Chamaedorea elegans*

(Moore, 1973; Dransfield y Uhl, 1986, y Hodel, 1992. Citados por Becerril, 1995)

II.4 Descripción de *Chamaedorea elegans* Mart.

Plantas herbáceas o arbustivas de 0.40 - 2 m de altura, estipe solitario, erecto algunas veces con base decumbente o casi ausente, de 0.8 - 1.5 cm de diámetro con nudos gruesos y prominentes, los entrenudos de 0.5 - 3 cm de longitud (Figura II 4), raíz fulcrante (Aguilar, 1986)

Hojas de 5 - 8 en la parte superior del tallo alternipinnadas a subalternipinnadas, vaina de 8.5 - 20.5 cm de longitud, peciolo de 12 - 42 cm de longitud, con la cara superior poco acanalada a todo lo largo, la cara inferior con una costilla amarilla con inicio en la base de la vaina y prolongada hasta el raquis, raquis 24.6 - 54 cm de longitud, con una quilla delgada y afilada en la cara superior, foliolos 14 - 21 sobre cada lado del raquis alternos pocos subopuestos, a intervalos de 1 - 4 cm, haz verde lustroso lineares a estrechamente lanceolados, de 16 - 31.5 cm de longitud, de 1 - 2.8 cm de ancho, margen entero, el ápice largamente acuminado, escasamente oblicuo, nervadura con nervio central primario más sobresaliente en el envés, nervios secundarios 2 a cada lado del central, nervios terciarios numerosos poco visibles (Figura II 4) (Aguilar, 1986)

Inflorescencias infrafoliales e interfoliales, de 2 - 7 sobre una planta, de ramificadas a poco paniculadas, las raquillas basales con 2 a más ramas, de 18.5 - 113.4 cm de longitud. Las estaminadas llevan 6 brácteas, las pistiladas llevan de 6 - 10 brácteas, delgadas fibrosas, la inferior más pequeña y la penúltima superior más larga hasta de 27.5 cm de longitud, pedúnculo de 13.5 - 91.7 cm de longitud, raquis de 1.6 - 20 cm de longitud, escasamente geniculado, raquillas 5 - 32, generalmente las bajas son las más largas, haciéndose progresivamente cortas hacia el ápice del raquis poco costilladas con el ápice ligeramente geniculado hasta de 14.5 cm de longitud (Figura II 4) (Aguilar, 1986)

Flores estaminadas, hasta 18 sobre una raquilla espiraladas abiertas, en cavidades elíptico-superficiales, de 1 - 1.5 mm de diámetro, aromáticas, globosas; cáliz coroniforme, los sépalos connados en la base y arriba 3 - lobulados cada lóbulo con margen poco angulado, verde claro con el margen castaño, de 0.75 - 1 mm de altura, de 1 - 1.5 mm de ancho, poco delgados y cartilaginosos, nervado por dentro, corola gamopétala con un onficio 3 - angulado en la parte superior, cortamente estipitada, los pétalos amarillo intenso,

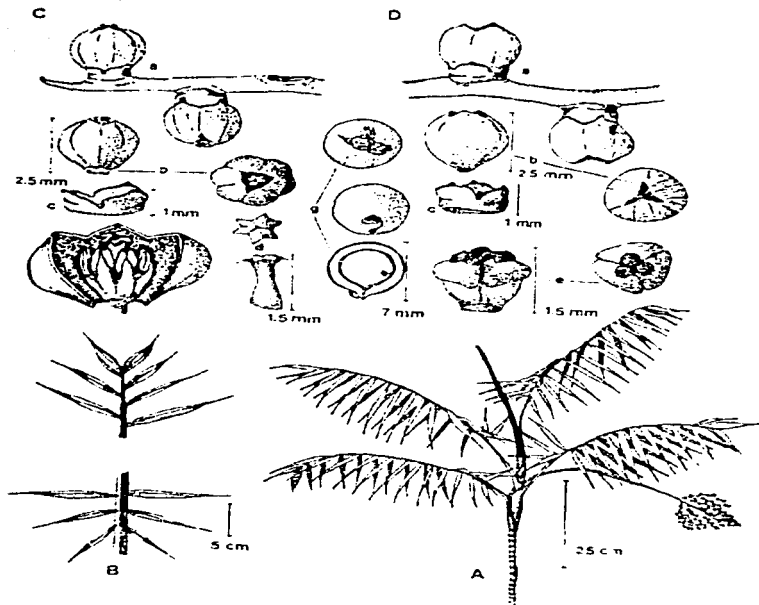


Figura II.4 *Chamaedorea elegans* Mart. A. Planta adulta femenina. B. Detalle de los foliolos terminales y basales. C. Flores estaminadas. D. Flores pistiladas. a, porción de la raquilla; b, corola; c, cáliz; d, pistilodio; e, pistilo; f, flor estaminada; g, frutos (Aguilar, 1886).

de 2.5 mm de altura, de 2 mm de ancho, poco gruesos y carnosos, poco nervados por dentro, estambres incluidos, epipétalos, adnados interiormente con el pistilodio. amarillos, de 1.5 mm de largo, las anteras amarillas de 0.75 - 1 mm de largo, sagitiformes, las tecas con sus bases muy abiertas y los ápices casi completamente unidos. pistilodio de 1.5 mm de largo con el ápice truncado, expandido, 6 - angulado, sobrepasando ligeramente la corola (Figura II 4) (Aguilar, 1986).

Flores pistiladas, hasta 70 sobre una raquilla en cavidades elíptico-redondeadas superficiales, de 1.5 - 2 mm de diámetro, globosas. cáliz coroniforme los sépalos connados en la base, profundamente 3 - lobulados, cada lobulo con margen angulado, verde claro con el margen castaño de 1 mm de altura, de 1 - 1.5 mm de ancho, poco delgados y cartilaginosos nervado por dentro, corola gamopetala con un orificio 3 - angulado en la parte superior, los pétalos amarillos, ligeramente abovados, de 2 - 2.5 mm de altura de 1.5 - 2 mm de ancho, poco gruesos y carnosos fuertemente nervados, en el fruto los pétalos se parten en porciones irregulares y son fibrosos. gineceo amarillo globoso cortamente estipitado, de 1.5 mm de alto, de 1.25 - 1.5 mm de ancho, inserto en la base de los pétalos, estigmas muy separados, con las puntas redondeadas, poco elevadas, recurvadas y aplanadas, de aspecto glandular, estaminodios ausentes (Figura II 4) (Aguilar, 1986).

Fruto negro, esférico, de 4 - 7 mm de diámetro, el exocarpo delgado, no transparente el mesocarpo delgado poco carnoso, mucilaginoso verde aromático, endocarpo membranoso, nervado semilla globosa, café rojiza, de 3.5 - 6 mm de diámetro (Figura II.4) (Aguilar, 1986)

En México, esta especie se distribuye en San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla, Tabasco, Oaxaca, Chiapas y Veracruz, en selva alta perennifolia y subperennifolia, selva mediana perennifolia y subperennifolia, bosque caducifolio, en lugares poco húmedos de laderas de cerros o cañadas, generalmente en suelos pedregosos. En altitudes de 100 a 1,270 m s.n.m (Aguilar, 1986)

II.5 Usos y Problemática de la Palma Camedor

De acuerdo con Connzatti (1946, citado por Saldivia y Cherbonnier, 1982), el nombre *Chamaedorea* significa "palma pequeña", aunque según la revista Principes (2(1) 20, citada por Barba y Romero 1993) por sus raíces etimológicas su significado es "regalo sobre el suelo", este último debido tal vez, al hábitat generalmente bajo de las especies del género o quizás a que sus frutos y hojas son fácilmente recogidos.

Por los significados de su nombre, resulta fácil imaginar su gran importancia y demanda comercial. La palma camedor posee características que le confieren un mayor valor como planta de ornato tales como belleza, tamaño y resistencia entre otras. Estas palmas se caracterizan por ser pequeñas, vistosas y de apariencia delicada, cuando son jóvenes poseen el atractivo de una miniatura, y cuando entran a su ciclo reproductivo este atractivo se incrementa con la aparición de flores y frutos coloridos que contrastan con el follaje verde. Adicionalmente son muy resistentes se desarrollan tanto con poca luz como a pleno sol, y pueden sobrevivir con poca agua. Tal es el caso de *Chamaedorea elegans* Mart., que es muy apreciada como planta de ornato para interiores (Saldivia y Cherbonnier, 1982; Hodel, 1992).

La palma camedor no solo tiene uso como planta de ornato también tiene usos tradicionales de tipo doméstico, alimenticio y medicinal. El uso doméstico comprende la utilización de la raíz para la elaboración de utensilios o materiales de uso común en el hogar como alimento se utilizan las inflorescencias estaminadas tiernas de algunas especies, con las cuales se preparan muy diversos platillos (Caballero y Toledo 1978, Caballero et al. 1985 citados por Barba y Romero 1993) por último, con fines medicinales, Saldivia y Cherbonnier (1982) reportan que en la región de los Tuxtlas se utiliza la parte tierna de la palma conocida comúnmente como el corazón de la palma, como contraveneno de la mordedura de la *nauyaca*.

Por sus usos tradicionales, las camedoras son muy populares a nivel local, en tanto que por su uso ornamental son grandemente demandadas nacional e internacionalmente.

Por sí solas, las hojas de las palmas camedor, principalmente utilizadas en la elaboración de adornos florales, son muy codiciadas; se estima que diariamente se recolecta un millón

de hojas, aproximadamente, en diez Estados de la República Mexicana. Las especies de *Chamaedorea* que se explotan con mayor intensidad para la obtención de follaje son, *Ch. elegans*, *Ch. seifrizii*, *Ch. neurochlamys*, *Ch. ernesti-augusti*, *Ch. radicalis*, *Ch. oblongata* y *Ch. tepejilote* (Oyama, 1987).

De igual manera, las semillas de estas palmas son ampliamente explotadas. Para tal fin se utilizan cerca de 14 especies, aunque la más importante es *Chamaedorea elegans* Mart. (Oyama, 1987), anualmente son distribuidas más de 400 millones de semillas a nivel mundial, de esta especie y casi todas provienen de México (Hodel, 1992)

Con respecto a la producción comercial de palma camedor, el cultivo se hace generalmente por medio de la germinación de semillas en almacigos dentro de invernaderos. Sin embargo, las semillas en su mayoría provienen de la selva. Una de las palmas más comúnmente cultivadas es *Chamaedorea elegans* Mart., se propaga comercialmente a gran escala en Estados Unidos (en Florida sobre todo) y en Europa. Esta especie es muy popular en Estados Unidos, Europa, Australia y el Oriente (Hodel, 1992), y en el idioma inglés se le conoce por "Parlor Palm" o "Good luck Palm" (Saldivia y Cherbonnier, 1982, Hodel, 1992)

En la actualidad las cantidades extraídas de semillas, follaje y plantas de palma camedor se han incrementado sorprendentemente poniendo a muchas especies de este género en vías de extinción.

El agotamiento de este recurso, a nivel nacional, se explica por factores tanto técnicos como socioeconómicos los cuales influyen directa o indirectamente en su disponibilidad. Estos factores son

- a) Manejo inadecuado del recurso. El corte mal efectuado de las hojas que sacrifica a la planta completa, así como la recolección masiva de las semillas, lo que reduce las posibilidades de regeneración de la población.
- b) Sobreexplotación. Es la principal causa del agotamiento del recurso, ya que no se respetan los ciclos de corte llevándose a cabo hasta el fin prematuro de la planta, además del saqueo de plantulas y semillas.

- c) **Avance de los desmontes e incendios forestales.** El avance de la frontera agrícola por efecto de los desmontes ha ido reduciendo el hábitat natural de la planta y sus áreas de distribución, en este mismo sentido han influido los incendios forestales
- d) **Ganadería y monocultivos comerciales,** a los que se les ha dado una mayor importancia en su introducción, lo que ha ido en detrimento de medidas para la conservación de la palma
- e) **Ausencia de una coordinación institucional efectiva y coherente,** en cuanto a la búsqueda de medidas para la conservación de la palma (Saldívar y Cherbonnier, 1982).

Como resultado de la interacción de estos factores Vosters en 1975 ya observaba que *Chamaedorea elegans* estaba amenazada de extinción en México así como otras especies del género Vovides (1981), en su "LISTA PRELIMINAR DE PLANTAS MEXICANAS RARAS O EN PELIGRO DE EXTINCIÓN" reporta ocho especies del género *Chamaedorea* entre las siguientes categorías *Ch monostachys* Burret (Indeterminada), *Ch elegans* Mart. (Indeterminada) *Ch ernesti-augusti* Wendl. Otto & Dietr (Vulnerable), *Ch klotzschiana* Wendl (Rara), *Ch metallica* O.F Cook (En peligro), *Ch schiedeana* Mart (Indeterminada), *Ch seifnzi* Burret (Vulnerable) *Ch estolonifera* Wendl Hook (Indeterminada)

Para Vovides (1981) la definición de Indeterminada es Taxa de los que se sabe muy poco acerca de su situación, pero pueden ser candidatos de las otras categorías cuando se obtenga más información

"IUCN Botanic Gardens Conservation Secretariat" (1988) en un cuestionario titulado "RARE AND THREATENED PALMS OF THE NEW WORLD" reporta tan solo para México, 16 especies del género *Chamaedorea* en la categoría de Amenazadas, 2 especies en la de Vulnerables y 12 especies en la categoría Indeterminada. Este organismo Internacional reporta a *Chamaedorea elegans* Mart como una especie amenazada

Para la "IUCN Botanic Gardens Conservation Secretariat", la definición de amenazada es, taxa en peligro de extinción y cuya sobrevivencia es improbable si los factores causantes

continúan operando. Están incluidas taxas cuyos números han sido reducidos a un nivel crítico o cuyos habitantes han sido tan drásticamente reducidos que ellos son considerados en inmediato peligro de extinción.

El uso que de este recurso se hace es exhaustivo e indiscriminado, por lo que las posibilidades de sobrevivencia de esta especie en su hábitat natural se ven reducidas drásticamente. Aunado a las limitantes inherentes que presenta la especie, ya que *Chamaedorea elegans* Mart. es de ciclo anual con un prolongado tiempo de germinación, además de ser una planta de lento crecimiento.

Por lo que resulta urgente establecer sistemas de propagación alternos a los ya existentes, sin poner en peligro de extinción a las poblaciones naturales, ya que los métodos tradicionales, generalmente, son por medio de la germinación de semillas en almacigos dentro de invernaderos, que en su mayoría son extraídas de su hábitat natural.

Por lo anterior es por lo que el Cultivo de Tejidos Vegetales representa una alternativa de gran potencial, para la propagación de esta especie.

II.6 Cultivo de Tejidos Vegetales

Los principios del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) están basados en la teoría celular, la cual postula la capacidad implícita en cada célula de autonomía y totipotencialidad (Gautheret, 1982), es decir que cada célula vegetal contiene la información genética necesaria para generar un individuo completo, idéntico al progenitor (Bidwell, 1993).

La técnica del CTV es el cultivo que se hace bajo condiciones asepticas de diferentes inóculos (protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones y aún plantas completas) en un ambiente aislado, por medio de un recipiente, el cual contiene un medio de cultivo artificial (compuesto principalmente de nutrientes minerales, vitaminas y reguladores del crecimiento) y que es incubado bajo condiciones ambientales controladas, principalmente luz y temperatura (Barba y Luna, 1990).

Es un hecho que en especies vegetales, las células de algunos órganos mantienen su capacidad para dividirse cuando son separadas de la planta y cultivadas *in vitro*, por lo que

es posible dirigir dichas células, hacia diferentes rutas morfogénicas mediante su desarrollo en condiciones de cultivo adecuadas y controladas (Villegas, 1991).

En el cultivo *in vitro*, las células somáticas pueden responder a un estímulo apropiado que las hace competentes para seguir diferentes rutas morfogénicas. Esto resulta ser un fenómeno muy interesante debido a que una de las grandes limitaciones que en la actualidad tiene la técnica del CTV es el escaso conocimiento de los mecanismos moleculares que inducen competencia, por lo que la técnica del CTV es una metodología de ensayo y error, así que resulta necesario encontrar mecanismos que propicien competencia y posteriormente determinación en células somáticas (Villegas, 1991).

II.6.1 Embriogénesis Somática

La embriogénesis somática o asexual es el desarrollo de embriones a partir de células que no son producto de la fusión gamética y consiste en la formación de una estructura bipolar, meristemo apical y radicular, que no muestra conexión con el tejido que le dio origen. Sharp et al. (1980) describe dos rutas para la embriogénesis somática. La primera es la embriogénesis directa, donde el embrión inicia directamente del tejido en ausencia de proliferación de callo. Esto ocurre a través de "células determinadas pre-embriogénicas" donde las células están ya comprometidas para desarrollar embriones y necesitan solo ser estimuladas. La segunda es la embriogénesis indirecta, donde la proliferación celular (callo) es requerida, en estas células se busca la proliferación de células competentes, por medio de estímulos exógenos, y posteriormente determinación para desarrollar embriones (citado por P. V. Ammirato en 1983).

Los embriones somáticos que se obtienen por cultivo de tejidos presentan una secuencia de eventos durante su formación y desarrollo, que emulan aquellos descritos para embriones cigóticos, los cuales evolucionan del estado globular a corazón, a torpedo y, finalmente, al estado cotiledonar (Villegas, 1991). Esta secuencia de eventos se presenta en dicotiledoneas.

II.6.2 Organogénesis

La organogénesis consiste en la obtención de una estructura unipolar (meristema apical o meristema radicular), el cual generalmente muestra conexión vascular con el tejido que lo originó. En cultivo de tejidos, la organogénesis puede darse en forma indirecta, a través de redeterminación de células diferenciadas, proliferación de callo y determinación subsecuente de órganos, o puede ocurrir en forma directa a partir de células ya determinadas y que sólo tienen que estar en un medio permisivo para desarrollarse.

El tejido de un callo está compuesto de células que presentan un crecimiento desorganizado, hay variaciones en el tamaño, en el número de vacuolas, en el contenido citoplasmático, en las características de la pared celular, en la forma, etc. Típicamente un callo está compuesto de células parenquimatosas, altamente vacuoladas con poco citoplasma, con el núcleo normalmente presionado entre la vacuola y la débil membrana plasmática (Villegas, 1991).

Las células del callo pueden considerarse como las menos diferenciadas de todos los tipos maduros de células en las plantas, pero definitivamente, no son indiferenciadas (Villegas, 1991).

II.7 Conceptos de Diferenciación celular

El término diferenciación tradicionalmente se ha definido como el proceso por el cual las células de un organismo multicelular llegan a ser tanto funcional como estructuralmente diferentes durante la ontogenia. También podemos considerar que una célula es diferenciada con respecto a otra si ambas tienen el mismo genoma, pero expresan diferentes fenotipos (Villegas, 1991).

Existen dos rutas para la obtención de plantas completas a partir de células somáticas, la directa y la indirecta. La primera consiste en que células competentes se encuentran presentes en el inoculo y requieren sólo una pequeña etapa de proliferación para la inducción de su determinación hacia la estructura deseada. La segunda involucra dos fases claves: dediferenciación y rediferenciación (Ramogopal, 1989; citado por Fernández, 1993).

La **desdiferenciación** involucra dos distintos tipos de cambios, la **reactivación de la división celular** en las células maduras y la **modificación de cualquier metabolismo o desarrollo especializado**, que pudo haber adquirido la célula (Weanng y Al-Chalabi, 1985). Durante este proceso es donde se buscara la obtención de células competentes, sin embargo, no todas las células desdiferenciadas son competentes

Villegas en 1991, define en su sentido biológico mas amplio

Inducción es un cambio en el destino de la célula o grupos de células

Competencia es aplicable a aquella célula o grupo de células que están en un estado fisiológico tal que con el estímulo adecuado puede(n) tomar diferentes rutas morfogenéticas

Determinación es el proceso mediante el cual una célula queda comprometida a una nueva ruta de especialización

Desarrollo es la expresión fenotípica, en el espacio y en el tiempo, en los cambios ocurridos en el programa genético, es decir, la **desrepresión y/o represión de grupos de genes**

11.8 Rescate de embriones

El cultivo *in vitro* de embriones cigóticos aislados de la semilla permite superar la dormancia y la estenilidad de muchas especies, rescatar híbridos que resultan de cruza incompatibles, así como la micropropagación clonal (Hu y Wang, 1986)

En muchos casos, la dormancia se debe a la presencia de inhibidores químicos, o bien, a la resistencia mecánica de las estructuras que cubren al embrión, y no al embrión mismo. Una alternativa para eliminar la dormancia en estas especies es el cultivo de embriones escindidos Vanstone y Ronald en 1982, encontraron que al cultivar *in vitro* embriones de *Tilia americana*, especie que presenta problemas de germinación debido a la dormancia, la germinación ocurría sin demora en cualquier estado de madurez de los embriones (citados por Hu y Wang 1986)

Algunas especies producen semillas estériles, las cuales no germinan aún bajo las condiciones apropiadas. La esterilidad de una semilla puede tener su origen, entre otras causas, en un desarrollo incompleto del embrión, en mutaciones en las estructuras que lo cubren (lo que produce eventualmente la muerte del embrión durante el proceso de germinación), o bien, en un tipo de dormancia recalcitrante (Hu y Wang, 1986).

Un ejemplo, particularmente interesante, de semillas estériles, lo constituye el caso de los cocos makapuno. Los cocos makapuno son muy apreciados por su característico endospermo suave, que llena totalmente la semilla. Sin embargo, durante mucho tiempo, su producción estuvo limitada a un 25% del total de cocos obtenidos, ya que el gen responsable de los cocos makapuno es recesivo y todas las "palmas madre" eran heterocigotas para este carácter. La razón por la que no existían "palmas madre" homocigotas para la producción de cocos makapuno, es porque el endospermo de éstos se pudre, invariablemente, antes de que el embrión germine y saiga de la semilla.

Al respecto, de Guzman, en 1971 (citado por Koovor, 1981, y Hu y Wang, 1986), llevó a cabo, con éxito, el cultivo de embriones homocigotos de cocos makapuno, *in vitro*, y encontró que, si bien estos embriones germinan muy bien en medio de cultivo, los embriones heterocigotos, que germinan bien en el suelo, no germinan en medio de cultivo. Por lo que concluyo que el endospermo makapuno es inhibitorio para el crecimiento del embrión, en tanto que el endospermo normal no solo no es inhibitorio, sino que, además, es indispensable para la germinación de los embriones.

El efecto inhibitorio del endospermo, no es inusual, puesto que muchos casos de híbridos incompatibles, en varias especies, han sido atribuidos al efecto letal del endospermo (Brink y Cooper, 1947, citados por Koovor, 1981).

Algunas especies producen semillas que nunca germinan naturalmente o germinan con gran dificultad. Esto debido probablemente a cierto tipo de dormancia recalcitrante. La propagación vegetativa del plátano es un ejemplo. Los problemas que tienen las semillas en la germinación hacen que el plátano sea uno de los cultivos más difíciles para tratar de hacer mejoras por manipuleo genético. Rowe, en 1981 (citado Hu y Wang, 1986), realizó una serie de cruces entre diferentes variedades de plátano y utilizó la técnica de cultivo de embriones para superar los problemas de esterilidad de las semillas, el resultado que

obtuvo fue el 50% de germinación en cruza difíciles, comparado con el 10% de germinación usando métodos normales.

Por otra parte, tenemos que si las semillas de interés provienen de plantas de una especie de desarrollo muy lento y como consecuencia alcanzan una talla muy reducida en varios años; usando la técnica de cultivo de embriones, la germinación puede iniciarse tan solo en algunos días después de su siembra en el medio de cultivo, y posteriormente, en unas semanas las plántulas puedan ser transferidas al suelo, así por ejemplo el manzano silvestre alcanza una talla de 1 m, en el mismo lapso de tiempo (9 meses) que tarda su semilla sembrada en el suelo, tan solo en empezar a germinar (Barba y Luna, 1990)

Por medio de esta técnica es posible obtener en algunas especies, como en la rosa, hasta dos generaciones por año, mientras que, el procedimiento convencional de germinación de semillas requiere de 12 - 18 meses por cada generación. También en muchos caducifolios el cultivo de embriones ha permitido obtener un porcentaje de germinación mucho más alto, comparado con los métodos tradicionales de estratificación de las semillas (Hu y Wang, 1986).

Las cruza interespecíficas e intergenéricas son frecuentes para transferir genes valiosos de una especie a otra, sin embargo regularmente estas cruza presentan incompatibilidad, de donde se obtienen semillas que contienen embriones abortados. El cultivo de embriones híbridos anterior a la abortación, puede superar esas barreras. El cultivo de embriones es frecuentemente utilizado en el rescate de cruza incompatibles entre especies de cereales (Hu y Wang, 1986).

II.9 Oxidación

Los tejidos de palmas cultivados *in vitro* son especialmente susceptibles al oscurecimiento del tejido y del medio de cultivo, debido a sustancias secretadas por el inóculo (compuestos fenólicos en su mayoría).

Todas las plantas contienen un número de compuestos de complejidad variable cuya unidad es el anillo bencénico. El anillo o anillos, pueden estar más o menos reducido y con muchos grupos de sustitución posibles. Muchas hormonas naturales y sintéticas son

fenoles sustituidos o sus derivados. Ciertos aminoácidos, el grupo prostético de ciertas enzimas y la sustancia estructural lignina son compuestos fenólicos (Bidwell, 1993)

Estos compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en las plantas pero sus funciones no son bien conocidas. Algunos tienen propiedades antisepticas y podrían tener un papel en la resistencia a las enfermedades en ciertas plantas. Estos compuestos o sus derivados a menudo pueden ser extremadamente tóxicos para los animales

Una enzima determinante en el metabolismo de los compuestos fenólicos es la fenilalanina amoniliasa (PAL). Esta importante enzima es la entrada al metabolismo secundario en plantas, abriendo un amplio rango de productos secundarios como ligninas, fenoles y cumarinas así como flavonas y antocianinas. La actividad de esta enzima es afectada por una gran variedad de factores externos e internos y varía según el estado de desarrollo de la planta. Es estimulada por las lesiones, la infección y por el compuesto fitorregulador etileno. Los compuestos fenólicos que se forman como resultado de la estimulación de PAL incluyen compuestos bactericidas potentes y los precursores de la lignina necesarios para reparar las heridas. Ciertas hormonas, p. ej. Ácido Indolacético (AIA), inhiben a PAL y su actividad se incrementa con alto contenido de carbono. Además de que se sugiere que la luz estimula su síntesis, sin embargo, la enzima parece estar en un estado de continua síntesis y degradación y el efecto de la luz puede ser la inhibición de su desintegración, más que la estimulación de su síntesis (Ludden y Carlson, 1980; Bidwell, 1993).

II.10 El Cultivo de Tejidos Vegetales en la familia Arecaceae (Palmae)

Los primeros intentos para cultivar palmas *in vitro* se iniciaron con los trabajos de Rabeschault, 1967, en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) cit por Anas y Huete, 1983, (Nwankwo et al., 1986). Posteriormente, otros investigadores han publicado trabajos no sólo de palma de aceite, sino sobre palma de coco (*Cocos nucifera* L.) (Euwens, 1976; Blake, 1981; Kumar et al., 1985; Karunaratne et al., 1989), palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) (Reynolds and Murashige, 1979; Tisserat, 1983; Tisserat, 1984; Dnra et al., 1985), palma camedor (*Chamaedorea costaricana*) (Reynolds, 1979) (Reynolds and Murashige, 1979) (*Chamaedorea elegans*, *Chamaedorea oblongata*, *Chamaedorea* sp.) (Romero, 1990) y pejobaye (*Bactris gasipaes* H B X.) (Anas y Huete, 1983), entre otras.

Romero, 1990 en su tesis titulada "CULTIVO IN VITRO DE TRES ESPECIES DE PALMA CAMEDOR (*Humectorea spp*)", realiza una revisión bibliográfica exhaustiva acerca de las tres especies en las que se han concentrado principalmente las investigaciones del cultivo *in vitro*, debido a su importancia económica y alimenticia. Estas especies son, *Cocos nucifera* (palma de coco); *Elaeis guineensis* (palma aceitera) y *Phoenix dactylifera* (palma datilera) Además Romero también reporta un resumen del sumario que presenta Tisserat, 1988 en su publicación "Palm tissue culture" en donde enlista las palmas que han sido probadas con la técnica de cultivo de tejidos vegetales

III. OBJETIVOS

Objetivo General

La finalidad del presente trabajo fue la de establecer las bases para el cultivo *in vitro* de *Chamaedorea elegans* Mart., que permitan, en un futuro inmediato, desarrollar estudios, tanto en ciencia básica como en la búsqueda de sistemas alternativos de propagación masiva de esta especie, tales como embriogénesis somática, así como determinar las condiciones adecuadas para el rescate de embriones de esta especie, a fin de reducir el tiempo de germinación natural y, subsecuentemente, acelerar su crecimiento *in vitro*. Lo anterior mediante la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales

Objetivos Particulares

Establecer las condiciones adecuadas para obtener cultivos libres de contaminación por microorganismos, con cada uno de los inóculos a utilizar de *Chamaedorea elegans* Mart., así como controlar la oxidación de los inóculos durante el cultivo *in vitro*, tomando como base sistemas ya establecidos en otras especies de la familia palmae.

Determinar las condiciones de cultivo *in vitro*, así como la relación y tipo de reguladores del crecimiento para obtener una respuesta morfogenética (formación de callo, embriogénesis somática y/o organogénesis, directas o indirectas), a partir de inflorescencias inmaduras, embriones cigóticos de diferentes estadios de desarrollo, y ápices de brote

Establecer la metodología para el rescate de embriones de *Chamaedorea elegans* Mart.

Conocer las condiciones de cultivo *in vitro* necesarias para la germinación de semillas maduras de *Chamaedorea elegans* Mart., así como optimizar el tiempo de germinación.

IV. HIPÓTESIS

Si todas las células vegetales son autónomas y totipotentes, capaces de generar un individuo completo, aún cuando durante su diferenciación se lleva a cabo la expresión selectiva del material genético, es posible, mediante el estímulo adecuado, activar la expresión de otros genes y dirigir a las células hacia una ruta morfogénica específica. Por otra parte, si los tejidos embriogénicos y meristemáticos poseen células con menor grado de diferenciación, lo que aumenta las posibilidades de obtener células competentes que puedan generar una respuesta morfogénica diferente a la determinada, entonces, es posible, utilizando la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales y mediante la aplicación de estímulos exógenos (reguladores del crecimiento y pretratamientos térmicos), modificar la ruta de desarrollo especializado de células de embriones, inflorescencias inmaduras y ápices de brotes de *Chamaedorea elegans* Mart. hacia la formación de callos, embriogénesis somática y/o organogénesis, directas o indirectas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Material biológico

El material biológico se obtuvo directamente de plantas en su hábitat natural. La zona de colecta se ubica en los terrenos del rancho Zacoapan, propiedad de la familia Sartorius a 15 km del Municipio de Huatusco, sobre la carretera Huatusco-Conejos, en el Estado de Veracruz, a una altitud de 870 m s n m

La elección de los inoculos a cultivar, en la se realizo tomando en consideración que los tejidos jóvenes (tejidos meristemáticos, brotes en crecimiento y embriones) tienen una mayor probabilidad de respuesta (Tisserat, 1984)

El material biológico colectado consistió en frutos de diferentes estadios de desarrollo, así como inflorescencias inmaduras. Para la obtención de este material fue necesario realizar un seguimiento fenológico, paralelo a la colecta, a fin de conocer las etapas y tiempos aproximados de maduración de las inflorescencias y desarrollo de los frutos

V.2. Desinfección

Para la desinfección de los inoculos se establecieron tres protocolos diferentes, uno para cada tipo de material biológico utilizado (frutos, semillas e inflorescencias envainadas).

En general, los tratamientos de desinfección son agresivos, ya que causan daño al material biológico que se expone a estos. Por tal motivo, el tratamiento de desinfección se aplicó al tejido superficial que cubre a cada tipo inoculo, de tal manera que, una vez realizada la desinfección, el tejido dañado pudiera ser removido, dejando intacto al inoculo.

V.2.1 Desinfección de los frutos para la disección del embrión

Los frutos se lavaron con detergente y se enjuagaron perfectamente al chorro del agua. Posteriormente, en el ambiente aseptico de una campana de flujo laminar, éstos se sumergieron en una solución de etanol al 70%, por 2 minutos, con agitación constante. Transcurrido este tiempo, fueron transferidos a una solución comercial de hipoclorito de sodio (cloralex: 6% de cloro activo), durante 15 minutos, en seguida, con el propósito de eliminar los residuos del agente desinfectante, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Una vez enjuagados los frutos, se disecaron los embriones, procurando no dañarlos, y se mantuvieron sumergidos en una solución estéril, fría, de L-cisteína (100 mg/l) (Romero, 1990), dentro de una caja Petri, hasta el momento de la siembra. Esto último con la finalidad de reducir el riesgo de oxidación de los embriones y evitar la deshidratación de estos.

V.2.2 Desinfección de las semillas para la germinación *in vitro*

Para la desinfección de las semillas, primeramente se eliminó, de manera mecánica, el pericarpio del fruto, es importante la remoción de este tejido pues, por sus características, puede hospedar gran cantidad de hongos y bacterias. Una vez eliminado el pericarpio del fruto, las semillas se lavaron con detergente y se enjuagaron perfectamente al chorro del agua. Posteriormente, en una campana de flujo laminar, estas fueron sumergidas en una solución de etanol al 70%, por 2 minutos con agitación constante. Transcurrido este tiempo, fueron transferidas a una dilución al 30% V/V de una solución comercial de hipoclorito de sodio (cloralex) (1.8% de cloro activo), durante 15 minutos, en seguida, con el fin de eliminar los residuos del agente desinfectante, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Una vez que las semillas fueron desinfectadas y enjuagadas, se introdujeron en un matraz Erlenmeyer con agua destilada estéril, el matraz se selló herméticamente y las semillas se mantuvieron en su interior durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las semillas se pasaron a una dilución de cloralex al 15% V/V (0.9% cloro activo), durante 5 minutos. Por último, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Cuando las semillas fueron disecadas del fruto, se evitó remover la testa o cubierta de la semilla, a fin de que durante la desinfección de éstas no se dañara al embrión.

V.2.3 Desinfección de las inflorescencias inmaduras para la disección de las raquillas

Las inflorescencias inmaduras, aun envainadas, se lavaron con detergente y agua corriente. En seguida, en la campana de flujo laminar, se sumergieron en una solución de etanol al 70%, por 1 minuto, y después en una dilución de cloralex al 30% V/V (1.8% de cloro activo), durante 10 minutos. Finalmente, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se procedió a su disección.

Las inflorescencias se disecaron dentro de una caja Petri, sumergidas en una solución estéril de L-cisteína (100 mg/l), fría, con la finalidad de reducir el riesgo de oxidación y evitar la deshidratación del tejido.

En general, los tratamientos de desinfección son agresivos, ya que causan daño al material biológico que se expone a éstos, y considerando la tendencia que presentan los tejidos de la palma a oxidarse, por lesiones, el tratamiento de desinfección se aplicó a tejidos superficial que cubren a cada tipo de inóculo, de tal manera que, una vez realizada la desinfección, el tejido dañado se pudo remover, dejando intacto al inóculo.

V.3. Cultivo de los inóculos

El medio basal que se utilizó es el propuesto por Murashige y Skoog (MS, 1962) (ver apéndice I), suplementado con 1g/l de Cas-aminoácidos, 30g/l de sacarosa, y diferentes reguladores del crecimiento; el medio basal fue ajustado a un pH de 5.8 ± 0.1 y como material de soporte, se usó agar, (8 g/l).

El medio de cultivo fue estenilizado en autoclave a 121 °C y 1 kg/cm² de presión durante 20 minutos.

V.3.1 Cultivo *in vitro* de embriones

Con el propósito de encontrar la combinación y concentración adecuadas de diferentes auxinas y citocininas en el medio de cultivo, para obtener la formación de callo o alguna respuesta morfológica (embriogénesis somática y/o organogénesis), se probó un factorial de 18 tratamientos (Tabla V.1) En este factorial, considerando que los tejidos jóvenes tienen una mayor probabilidad de respuesta, se utilizaron embriones cigóticos de diferentes edades (de 21, 26, 30, 34, 41 y 51 semanas, aproximadamente, a partir de que las flores presentaron receptividad polínica) como inóculos, a fin de determinar cualitativamente que tipo de respuesta generaban, embriones de diferentes edades, bajo el efecto de los reguladores del crecimiento probados, así como a la combinación de estos

Tabla V.1 Tratamientos que se probaron en el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos en diferentes estadios de desarrollo.

Citocinina (0.2 mg/l)	Auxinas (1.5 mg/l)					
	2,4-D	ANA	AIA	Picloram	AIB	control
K	1	2	3	4	5	6
BAP	7	8	9	10	11	12
control	13	14	15	16	17	18

2,4-D: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, ANA: Ácido Nattalenacético, AIA: Ácido Indolacético, AIB: Ácido Indolbutírico, K: Cinetina, BAP: Bencil aminopurina

El número de repeticiones por tratamiento del factorial, que se probó a lo largo del año con embriones de diferentes edades, dependió de la disponibilidad del material biológico en campo. Por lo tanto, para embriones de 21 semanas se sembraron dos por tratamiento en tubos de ensayo; para los embriones de 26 semanas, seis por tratamiento en tubos de ensayo; para los embriones de 30 semanas, doce por tratamiento en frascos "gerber", para los embriones de 34 semanas, seis por tratamiento en viales de 20 ml, para los embriones de 41 semanas, seis por tratamiento en frascos "gerber", y para los embriones de 51 semanas, seis por tratamiento en frascos "gerber"

Los embriones fueron incubados inicialmente a una temperatura de 25 ± 3 °C y oscuridad total, durante las cuatro primeras semanas para reducir el riesgo de oxidación en los inóculos posteriormente, únicamente se modificó a un fotoperíodo luz - oscuridad de 16/8

horas, proporcionada por lámparas de luz fría, colocadas a 30 cm de los frascos de cultivo, con una intensidad luminosa de 350 lux, manteniendo la misma temperatura de incubación

Se realizaron dos experimentos piloto, con la finalidad de encontrar un sustrato adecuado en el control de la oxidación. En el primero de ellos se adicionaron 2 g/l de carbón activado al medio de cultivo, en tanto que en el segundo se agregaron 6 g/l de agar y se colocó papel filtro en su superficie, a fin de evitar que los inoculos tuvieran contacto directo con el medio y que, debido a la consistencia de este, se hundieran. El medio utilizado fue el MS (1962), suplementado con 0.2 mg/l de 2-IP y 1.5 mg/l de Picloram. Se trabajó con embriones de 41 semanas de edad, y se sembraron cuatro embriones por tratamiento.

La temperatura de incubación fue de 25 ± 3 °C y oscuridad total, durante las cuatro primeras semanas, posteriormente se modificó a un fotoperíodo luz - oscuridad de 16/8 horas, manteniendo la misma temperatura de incubación.

Las respuestas que se evaluaron en estos experimentos fueron germinación (esta se reconoció desde el momento en que emergió el epicótilo del embrión), formación de callo y oxidación (como el oscurecimiento del tejido).

V.3.2 Cultivo *in vitro* de inflorescencias inmaduras

De las inflorescencias, se eliminaron las brácteas y se disecaron las raquillas con flores sumergidas en una solución de L-cisteína (100 mg/l) estéril (Romero, 1990) y permanecieron en esta solución hasta el momento de la siembra.

Se sembraron raquillas con flores, de aproximadamente 4 cm de longitud cada una, en un factorial de 6 tratamientos con diferentes reguladores de crecimiento (Tabla V.2), utilizando 24 inóculos por tratamiento.

Se realizó otro experimento en el que se probaron 1.5 mg/l de Picloram. Se sembraron cuatro inóculos por frasco "gerber", (raquillas de 4 cm de longitud, aproximadamente) en un total de cuatro frascos.

Tabla V.2 Tratamientos que se probaron en el cultivo *in vitro* de inflorescencias inmaduras

Citocinina (1.5 mg/l)	Auxinas (0.2 mg/l)					
	2,4-D	ANA	AIA	Picloram	AIB	control
BAP	1	2	3	4	5	6

2,4-D Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético. ANA Ácido Naftalenacético. AIA Ácido Indolacético. AIB Ácido indolbutírico. BAP Bencil aminopurina

Los cultivos de todos los experimentos fueron mantenidos en total oscuridad, durante cuatro semanas con la finalidad de reducir el riesgo de oxidación de los inóculos, transcurrido este tiempo, se cambió a un fotoperíodo de 16 horas luz y ocho de oscuridad. La temperatura de incubación en ambos casos fue de 25 ± 3 °C.

V.4. Pretratamientos auxínicos y térmicos

En este experimento tanto embriones como inflorescencias fueron sometidos a pretratamientos auxínicos y térmicos, con la finalidad de reactivar la división celular, y modificar cualquier metabolismo o desarrollo especializado, adquirido por las células de los inóculos, buscando obtener células competentes o que células competentes se encuentren presentes en los inóculos y requieran tan solo de un estímulo exógeno para proliferar, para que finalmente puedan tomar diferentes rutas morfogénicas.

V.4.1 En embriones

Para el choque auxínico en embriones se probaron cinco diferentes tratamientos, en los que la concentración del 2-IP se mantuvo constante (2 mg/l), mientras que para el 2,4-D se utilizaron las siguientes concentraciones: tratamiento I, 5 mg/l; tratamiento II, 10 mg/l; tratamiento III, 20 mg/l; tratamiento IV, 50 mg/l; y tratamiento V, 100 mg/l; además de 2 g/l de carbón activado. Este experimento se realizó con embriones de 34 y 41 semanas de edad, y se sembraron por cada uno de los tratamientos ocho embriones.

Los controles para este experimento fueron los mismos que para los factoriales de 18 tratamientos con embriones de 34 y 41 semanas de edad (apartado V.3.1).

Las condiciones de incubación para este experimento fueron: inicialmente se mantuvieron en oscuridad, durante las cuatro primeras semanas, posteriormente se cambió a un fotoperíodo de luz - oscuridad de 16/8 horas, con una temperatura de incubación de 25 ± 3 °C, en ambos casos.

El choque térmico se les aplicó a embriones que se sembraron en tratamientos II, III y IV, después de la siembra, y se probaron cuatro embriones por tratamiento. Los tipos de choques térmicos fueron los siguientes:

- Pretratamiento con frío (5 °C durante 48 horas)
- Pretratamiento con calor (35 °C durante 48 horas)
- Pretratamiento mixto (5 °C durante 24 horas y 30 °C durante 24 horas)

Los controles que se consideraron en este experimento (choque térmico), fueron los tratamientos II, III y IV del experimento del choque auxínico.

Otro experimento en la inducción de choque térmico fue el que se realizó con embriones de 26 semanas de edad, con un tratamiento con calor, fueron incubados a 32 °C durante 72 horas, después de la siembra. Los reguladores del crecimiento que se probaron fueron, 0.2 mg/l de cinetina y 3 mg/l de 2,4-D. Se sembró un total de diez embriones para este experimento.

Como control del experimento anterior se sembraron ocho embriones de 26 semanas de edad, en un medio suplementado con los mismos reguladores (cinetina y 2,4-D) y las mismas concentraciones, pero no fueron sometidos a los pretratamientos térmicos.

Las condiciones de incubación y de fotoperíodo, posterior a los pretratamientos térmicos, fueron las mismas que para la del apartado V.3.1.

V.4.2 En inflorescencias

Para el experimento de choque auxínico con inflorescencias inmaduras se trabajó con el mismo factorial de 2-ip + 2,4-D del apartado V.4.1. El experimento se realizó con secciones de raquillas inmaduras de 4 cm de longitud, aproximadamente, cuatro inóculos por frasco y dos frascos por tratamiento.

En el experimento de choque térmico se probaron los mismos pretratamientos de frío, calor y mixto, cada uno de éstos, con los tratamientos II, III y IV del factorial de 2-ip + 2,4-D como en el apartado V.4.1. Se sembraron cuatro inóculos por frasco, (secciones de raquillas inmaduras de 4 cm de longitud, aproximadamente) y dos frascos por tratamiento.

Las condiciones de incubación y de fotoperiodo, posterior a los pretratamientos térmicos, fueron las mismas que la del apartado V.3.1.

V.5. Pruebas de germinación

V.5.1 Rescate de Embriones. (Cultivo *In vitro* de embriones maduros)

La siembra de los embriones para el experimento de germinación se realizó en cuatro tratamientos diferentes. Los reguladores del crecimiento que se probaron fueron, AG₃ (Ácido giberélico), 0.02 mg/l, 2,4-D, 1mg/l, ANA (Ácido naftalenacético), 1 mg/l y un complejo natural (agua de coco al 10%).

En este experimento se sembraron 28, 32, 32 y 30 embriones maduros respectivamente.

En este experimento la condición de oscuridad se mantuvo hasta que el embrión desarrolló la plúmula y la radícula, posteriormente se cambiaron a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. La temperatura de incubación en ambos casos fue de 25 ± 3 ° C.

V.5.2 Cultivo *in vitro* de semillas maduras

Las pruebas que se realizaron en este experimento fueron para definir el sustrato más conveniente para la germinación, ya que posteriormente se efectuaron pruebas de germinación con semillas de diferentes edades, (semillas de 34, 41 y 51 semanas de edad aproximada) utilizando el sustrato más exitoso para la germinación

Para este experimento se llevaron a cabo tres pruebas, la primera consistió en la siembra de semillas maduras en medio MS (1962) al 50%, suplementado con AG_3 0.05 mg/l, la segunda en medio MS (1962) al 50% y la tercera sobre algodón húmedo esteril. Los tratamientos se realizaron con 30, 30 y 160 semillas maduras respectivamente

La germinación en este experimento se reconoció en el momento en el que el embrión es expulsado de la semilla por el haustorio o cotiledón

La temperatura de incubación, para los cultivos de las pruebas de germinación en MS al 50%, y en MS al 50% suplementado con AG_3 (0.05 mg/l), fue de 25 ± 3 °C, y para los cultivos de la prueba de germinación sobre algodón húmedo esteril fue de 30 ± 3 °C. Los cultivos de estas tres pruebas se mantuvieron en total oscuridad, hasta que el embrión desarrolló la plúmula y la radícula, solo hasta ese momento los cultivos fueron expuestos a un fotoperíodo de luz - oscuridad de 16/8 horas. Para los cultivos sobre algodón húmedo esteril además se cambió la temperatura de incubación a 25 ± 3 °C

Para el experimento con semillas de diferentes edades, por cada edad fueron utilizadas 100 semillas por prueba. Lo anterior, entre otras cosas, con el fin de contar con un número necesario de plantulas asepticas para el experimento exploratorio de la respuesta morfogenética, utilizando como inóculo ápices de brote de estas plantas.

V.6 Cultivo *In vitro* de ápices de brote

Para este experimento no fue necesario ninguna desinfección del inóculo, pues las plantas que se obtuvieron del experimento descrito en el punto V.5.2. que se encontraban bajo condiciones de asepsia. Los ápices de brote se disecaron sumergidos en agua destilada esteril y se mantuvieron así hasta antes de la siembra.

La siembra de los ápices de brote fue en un factorial de 8 tratamientos con reguladores de crecimiento (Tabla V.3). Se trabajó con un inóculo por recipiente, y se sembraron dos recipientes por tratamiento.

Los cultivos de este experimento se mantuvieron en total oscuridad durante las cuatro primeras semanas de siembra, posteriormente fueron expuestos a un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 25 ± 3 °C.

Tabla V.3 Tratamientos que se probaron en el cultivo *in vitro* de ápices de brote

Auxinas 0.2 mg/l)	Citocininas (1.5 mg/l)	
	BAP	2-ip
AIB	1	2
2,4-D	3	4
ANA	5	6
0	7	8

BAP: Bencil aminopurina, 2-ip: N6-isopenteniladenina, AIB: Acido Indobutirico, 2,4-D: Acido 2,4-Diclorofenoxiacético, ANA: Acido Naftalenacético

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Fenología

Del seguimiento fenológico realizado en campo (Rancho Zacoapan, Huatusco, Veracruz) a plantas de *Chamaedorea elegans* Mart., cuya finalidad fue conocer los diferentes estadios de desarrollo y tiempos aproximados de maduración de sus inflorescencias e infrutescencias, se observó que las palmas presentaron floración durante casi todo el año, con una interrupción de tres meses, entre abril y junio.

La floración en estas palmas se inició en el mes de julio y terminó en marzo del siguiente año, periodo en el que se detectó una disminución gradual en los porcentajes de floración. Los valores más altos se presentaron entre los meses de julio y noviembre, estos meses fueron los únicos en los que se llevó a cabo la fecundación de las flores (esto se hace evidente cuando el ovario se hincha pocos días después de la polinización), mismas que, posteriormente, desarrollaron frutos (Cuadro VI 1).

En cuanto a los porcentajes de floración que se observaron (Cuadro VI 1), aparentemente, éstos están relacionados con las condiciones ambientales que prevalecen en la zona, ya que las plantas responden sensiblemente al medio que las rodea, lo que nos hace pensar que las palmas, como muchas otras plantas, sincronizan su floración con las condiciones climáticas idóneas, con el fin de asegurar que su reproducción tendrá éxito.

Algunas plantas inician su floración cuando han madurado fisiológicamente para hacerlo, en tanto que otras tienen mecanismos que determinan cuándo llega la estación de floración. La estación se determina por dos requerimientos básicos: la duración del día (fotoperíodo) y las bajas temperaturas (termoperíodo). La programación genética para la floración está presente en las células del ápice, así como de toda la planta, y esta no se expresa sino hasta el momento conveniente (Bidwell, 1993).

De acuerdo con lo anterior, seguramente, los factores que influyen en la palma para establecer el momento adecuado para la floración son la combinación del fotoperíodo con cierta madurez fisiológica de la planta. En cuanto al termoperíodo, parece menos probable que pueda tener algún efecto sobre la floración de la palma, ya que solamente las plantas

de climas templados, que soportan una temporada invernal definida, pueden presentar este requerimiento (Bidwell, 1993).

En cuanto a la fecundación, presumiblemente, el hecho de que sólo se lleve a cabo en los primeros meses de floración está relacionado con el ciclo de vida del insecto polinizador, el cual debe de estar estrechamente vinculado con la época de mayor floración de la palma, y esta, a su vez, con las condiciones ambientales de la zona. Esto habla de una probable relación simbiótica entre la palma y su polinizador.

Al respecto, Henderson (1986) señala que existe una gran diversidad en cuanto a los tipos de polinización por insectos en las palmas, entre los que destacan la polinización cantarófila, realizada por coleópteros, la polinización melitófila, realizada por abejas, y la polinización mofila, realizada por dípteros. De estas, la polinización cantarófila parece ser la más antigua, dada la estrecha relación existente entre ciertos coleópteros y algunas palmas.

En especies del género *Chamaedorea* existen algunos registros de polinización por insectos. Al respecto, Croat, en 1978, observó que cierto tipo de abejas (*Trigona tataira*) colectaban polen de las inflorescencias de *Ch. wendoliana* (Oersted) Hems. Por su parte, Anderson y Henderson encontraron que las inflorescencias estaminadas de *Ch. aff. costancana* Oerst. despiden un olor dulce durante el día, los últimos diez días de la antesis, y las inflorescencias pistiladas lo hacen durante los últimos siete días. También observaron que las inflorescencias fueron visitadas por abejas (Trigonidae y Halictidae), escarabajos (Chrysomelidae) y moscas (Drosophilae). Estos insectos colectaron polen de las flores estaminadas y, aparentemente, fueron atraídos por las flores pistiladas por el olor y color similares a los de las flores estaminadas (Citados por Henderson, 1986).

La polinización anemófila para *Chamaedorea elegans* Mart parece muy improbable, debido, principalmente, a las características que presenta su polen (éste es pegajoso de tipo húmedo) (*Pors comun* Barba, 1997) y a lo bien delimitado de su período de polinización. Adicionalmente, Fisher y Moore, en 1977, mencionan que algunas especies del género *Chamaedorea* que presentan flores con este tipo de polen, aparentemente, son polinizadas por insectos (Henderson, 1986).

Una vez efectuada la fecundación de las flores, se continuó con la observación del desarrollo de los frutos en campo.

La formación de frutos en palmas es un proceso muy lento, debido a que el ovulo de la flor tiene que crecer desde un tamaño de medio milímetro, en el momento de la fecundación, hasta su tamaño final (7 - 9 mm), teniendo que pasar por el desarrollo del endospermo (lo cual implica el almacenamiento de grandes cantidades de reservas) así como por el desarrollo y maduración del embrión (Barba y Romero 1993)

En *Chamaedorea elegans* el periodo de formación del fruto, desde la polinización hasta la maduración de la semilla, dura aproximadamente un año. De esta manera, en una misma palma se encontraron inflorescencias maduras e infrutescencias en las últimas etapas de maduración.

Los frutos maduros de *Chamaedorea elegans* Mart son de color negro brillante que contrasta con el color naranja del raquis y las raquillas, esto parece ser una clara adaptación de la especie para asegurar la dispersión de sus semillas por animales.

Para el mes de noviembre, la mayoría de los frutos y, en consecuencia, las semillas de *Chamaedorea elegans* Mart, alcanzaron la madurez (Cuadro VI.1). Entre los meses de noviembre y febrero son frecuentes los nortes en el Golfo de México, lo que implica el incremento de la precipitación pluvial en la zona de estudio dándose, así, condiciones ambientales favorables para la germinación de las semillas de la palma. De esta manera, la palma asegura a su descendencia

Cuadro VI.1 Fenología de *Chamaedorea elegans* Mart. en la zona de estudio (Rancho Zacoapan, Hualusco Veracruz) Porcentajes de los diferentes estadios de inflorescencias e infrutescencias, durante el año de muestreo

ESTADIO	NOVI.	DIC.	ENERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGO.	OCT.
A	8%		7%	9%				6%	12%	
B	3%		2%					18%	89%	
C	1%	1%	2%	2%					8%	11%
D	4%			2%						4%
E	3%	3%				12%			1%	15%
F	41%								8%	2%
G		51%	36%							42%
H		9%	36%	5%						2%
I			16%	26%						
J			2%	26%						
K				23%	18%					
L				4%	41%	57%	33%			
M					29%	37%	63%			
N						7%	4%			
O								76%		
P									6%	
Q	42%	36%		2%					5%	25%
TOTAL	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

A Inflorescencia envainada

B Inflorescencia abierta con flores verdes de 1 mm de diámetro

C Inflorescencia abierta con flores verdes de 1.1 - 2 mm de diámetro

D Inflorescencia abierta con flores verdes de 2.1 - 3 mm de diámetro

E Inflorescencia abierta con flores amarillo-verdosas o amarillas

F Inflorescencia abierta con flores amarillas y receptividad polínica

G Infrutescencia con frutos verdes 1 - 2 mm de diámetro

H Infrutescencia con frutos verdes 2.1 - 3 mm de diámetro

I Infrutescencia con frutos verdes 3.1 - 4 mm de diámetro

J Infrutescencia con frutos verdes 4.1 - 5 mm de diámetro

K Infrutescencia con frutos verdes 5.1 - 6 mm de diámetro

L Infrutescencia con frutos verdes 6.1 - 7 mm de diámetro


M Infrutescencia con frutos verdes 7.1 - 8 mm de diámetro

N Infrutescencia con frutos verdes 8.1 - 9 mm de diámetro


O Infrutescencia con frutos verdes y raquis naranja

P Infrutescencia con frutos verdes y negros con raquis naranja

Q Infrutescencia con frutos negros y raquis naranja

 Porcentajes de los diferentes estadios de las inflorescencias en los meses del año que se colectó material biológico

 Porcentajes de las inflorescencias en las que se observó receptividad polínica

 Porcentajes de los diferentes estadios de las infrutescencias en los meses del año que se colectó material biológico

VI.2 Desinfección

En el cultivo *in vitro* de palmas, como en muchas especies vegetales, la contaminación por microorganismos es un problema importante. No obstante, para *Chamaedorea elegans* Mart. esto no representó un problema, considerando que, de manera natural, tanto los embriones, al encontrarse en el interior de las semillas, como las inflorescencias, cuando se encuentran dentro de las vainas, están libres de microorganismos que los contaminen.

Por lo tanto, partiendo de la premisa anterior, fueron tejidos superficiales los que se sometieron a tratamientos agresivos de Desinfección y los resultados que se obtuvieron fueron: la obtención de cultivos libres de contaminación por microorganismos, además, también se salvó parcialmente el problema del oscurecimiento del inóculo, ya que éste no fue dañado por efecto del tratamiento de Desinfección, considerando que los tejidos de esta palma son especialmente susceptibles a la oxidación por lesiones.

Durante la siembra de los inóculos, éstos fueron sumergidos en una solución de L-cisteína o en agua destilada estéril, fría, y así se mantuvieron hasta el momento de la siembra, lo anterior con la finalidad de controlar la oxidación en los inóculos, provocada por el aumento de la temperatura ambiental, así como por lesiones en el tejido.

VI.3 Cultivo *in vitro* de embriones

En este experimento se buscó obtener alguna respuesta morfogénica o formación de callo, sin embargo con las concentraciones de auxinas y citocininas que se probaron, la respuesta general que se obtuvo, en los diferentes tratamientos fue la germinación, a excepción de los que contenían Picloram donde se obtuvo callo. La germinación en embriones de *Chamaedorea elegans* Mart. está fuertemente determinada, es decir el programa genético para la germinación, en esta especie, no es fácil de romper ya que las concentraciones de auxinas (1.5 mg/l) y citocininas (0.2 mg/l) que se probaron no fueron suficientes para desviar a los embriones de la ruta de germinación y provocar otras respuestas morfogénicas.

Por lo tanto las respuestas que se evaluaron en estas pruebas fueron: germinación (la cual se reconoció en el momento en el que emergió el epicótilo del embrión), formación de callo y oxidación (como el oscurecimiento del tejido).

VI.3.1 Germinación

De la germinación de los embriones se obtuvieron plántulas fenotípicamente diferentes, por lo que se clasificaron de acuerdo con las características fenotípicas que éstas presentaron. Para fines de este trabajo se asignaron las claves que se enlistan a continuación

Plántula A	Desarrollo de la primera hoja verdadera y de la raíz primaria
Plántula B	Desarrollo de la primera hoja verdadera Sin desarrollo de la raíz ó desarrollo incipiente
Plántula C	Desarrollo incipiente del epicótilo Desarrollo de la raíz primaria
Plántula D	Desarrollo incipiente del epicótilo y de la raíz primaria
Plántula E	Sin desarrollo del epicótilo ó desarrollo incipiente Desarrollo de raíces
Plántula F	Desarrollo de la primera hoja verdadera Formación de callo en el hipocótilo
Plántula G	Desarrollo incipiente del epicótilo Formación de callo en el hipocótilo
Plántula H	Desarrollo de la primera hoja verdadera Formación de callo en el hipocótilo y desarrollo de raíces
Plántula I	Desarrollo incipiente del epicótilo Formación de callo en el hipocótilo y desarrollo de raíces.

La plántula A, fue la que tomo como patrón de referencia, ya que las plántulas con estas características, fueron las que se obtuvieron generalmente en el control (tratamiento 18), medio de cultivo sin reguladores del crecimiento

Con embriones de 21 semanas, la germinación se inició entre las semanas 8 y 12, con los siguientes porcentajes AIA + K, 50%; ANA BAP, 100%; AIA + BAP, 50%; AIB + BAP, 50% y ANA, 50% (Cuadro VI 2).

La germinación con embriones de 21 semanas, de los diferentes tratamientos que se probaron, ésta se vio favorecida por la citocinina BAP y las auxinas ANA y AIA, en tanto que la mejor combinación de auxina/citocinina fue ANA + BAP (Figura VI.1). Las concentraciones de auxinas y citocininas que se probaron en el factorial fueron altas como

para permitir una germinación normal. La germinación de los embriones estuvo precedida por la formación de callo en el hipocótilo, lo que provocó que la germinación se iniciara más tarde.

Con embriones de 21 semanas no se obtuvo germinación en el control.

Cuadro VI.2 Porcentajes de germinación, a la 12a semana, de embriones de diferentes edades en el factorial de 18 tratamientos

Edad del embrión		2,4-D	ANA	AIA	Picloram	AIB	0
21 semanas	K	0	0	50	0	0	0
26 semanas		17	67	33	0	0	0
30 semanas		83	55	67	0	67	33
34 semanas		33	0	25	0	17	17
41 semanas		43	67	0	0	75	33
51 semanas		17	33	17	0	33	50
21 semanas	BAP	0	100	50	0	50	0
26 semanas		17	0	0	0	0	0
30 semanas		42	83	42	0	45	25
34 semanas		17	0	0	0	0	0
41 semanas		60	33	25	0	0	0
51 semanas		17	83	17	0	67	17
21 semanas	0	0	50	0	0	0	0
26 semanas		17	25	0	0	25	50
30 semanas		58	100	83	0	25	58
34 semanas		33	0	0	0	0	0
41 semanas		60	33	0	0	75	25
51 semanas		0	57	33	0	33	33

Porcentajes de germinación \geq 50%

Las plántulas que se desarrollaron en estos tratamientos presentaron diferentes características y se reportan en el cuadro VI.3.

Cuadro VI.3 Características de las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 21 semanas

AIA + K plántula C	ANA + BAP plántula E plántula A	AIA + BAP plántula D	AIB + BAP plántula B	ANA plántula C
-----------------------	---------------------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------

En el caso de los embriones de 26 semanas, la germinación se presentó entre las semanas 4 y 12, con los siguientes porcentajes de germinación: 2,4-D + K, 17%; ANA + K, 67%; AIA + K, 33%; 2,4-D + BAP, 17%; 2,4-D, 17%; ANA, 25%; AIB, 25%; y el control,

50% (Cuadro VI.2). El tiempo de germinación se redujo en algunos tratamientos a 4 semanas, seguramente por la edad y madurez de los embriones. Los mejores porcentajes de germinación se obtuvieron con la combinación ANA + K, así como con el control. Así mismo, la citocinina que favoreció la germinación fue la K.

Por otra parte, el porcentaje de germinación obtenido con el control (50%), indica que la mayoría de los reguladores del crecimiento probados, más que favorecer, inhibieron la germinación.

Las plántulas procedentes de los embriones que germinaron, desarrollaron diferentes características que se muestran en el cuadro VI.4

Cuadro VI.4 Características de las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 26 semanas

2,4-D + K	ANA + K	AIA + K	2,4-D + BAP	2,4-D	ANA	AIB	Control
plántula G	plántula H plántula G	plántula C plántula I	plántula G	plántula B	plántula E	plántula B	plántula A

Las plántulas más vigorosas se obtuvieron con ANA + K, ya que desarrollaron tanto la primera hoja verdadera como raíces. La cinetina fue determinante en el desarrollo del epicótilo, ya que en el tratamiento con ANA sin K, la plántula no desarrolló el epicótilo, aunque sí gran cantidad de raíces. En los tratamientos que contenían 2,4-D, se inhibió el desarrollo de las plántulas. En todos los tratamientos el epicótilo tuvo un desarrollo incipiente y el hipocótilo formó callo. La germinación con el control fue normal: se desarrolló la primera hoja verdadera y una raíz primaria vigorosa, misma que formó raíces secundarias (Figura VI.2)

Con embriones de 30 semanas, la germinación se obtuvo en casi todos los tratamientos, a excepción de los que contenían Picloram. En la mayoría de los tratamientos, los embriones comenzaron a germinar a la cuarta semana, obteniéndose porcentajes de germinación por arriba del 50% con los siguientes tratamientos: 2,4-D + K, 84%; ANA + K, 55%; AIA + K, 67%; AIB + K, 67%; ANA + BAP, 83%; 2,4-D, 58%; ANA, 100%; AIA, 83%; y el control, 58% (Cuadro VI.2).

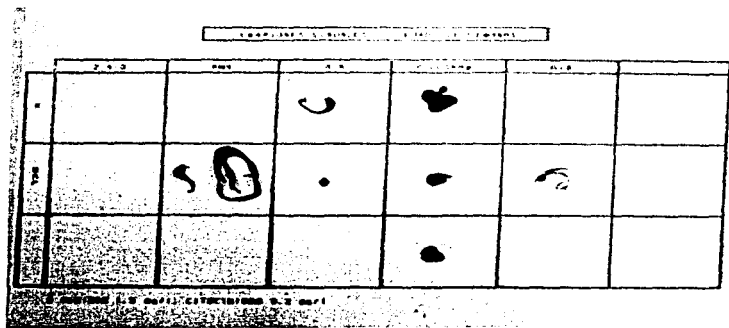


Figura VI.1 Respuesta de embriones de 21 semanas en el factorial de 18 tratamientos y tipos de plántulas obtenidas.

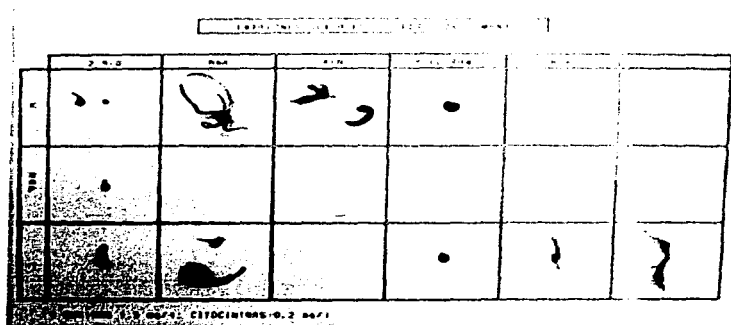


Figura VI.2 Respuesta de embriones de 26 semanas en el factorial de 18 tratamientos y tipos de plántulas obtenidas.

La citocinina que favoreció la germinación fue la cinetina, repitiéndose en cuatro tratamientos. Por su parte, la auxina más exitosa fue ANA. La mejor relación auxina/citocinina, según el porcentaje obtenido, fue 2,4-D + K. No obstante, cabe destacar que con el control se obtuvo un 58% de germinación, lo cual sugiere que la edad del embrión fue el factor principal que determinó los porcentajes de germinación.

Las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 30 semanas presentaron diferentes características, que se muestran en el Cuadro VI.5

Cuadro VI.5 Características de las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 30 semanas

	2,4-D	ANA	AIA	AIB	control
K	plántulas A plántulas C	plántulas I plántulas H plántulas E	plántulas A	plántulas B plántula E	plántulas A plántulas B
BAP	plántulas F	plántulas H plántulas F	plántulas A plántula H	plántulas A plántula B	plántulas A plántulas B
control	plántulas A plántulas C	plántulas H plántulas A	plántulas A plántulas D	plántulas C	plántulas A plántulas B

En cuanto a la formación de raíces, las auxinas que favorecieron su desarrollo fueron ANA y AIA. El ácido naftalenacético es una auxina sintética, a diferencia del ácido indolacético, que es una auxina natural, sin embargo, actuaron de forma similar, debido, probablemente, a que tanto ANA como AIA cuentan con un par de carbonos en la cadena lateral, lo que posiblemente les permitió reaccionar de forma parecida. De esta manera, si se considera que AIA es una auxina natural y, por lo tanto, el inoculo es capaz de incorporarla más fácilmente a su metabolismo, lo mismo pudo suceder con ANA, evitando así su acumulación en el tejido y permitiendo la germinación.

El 2,4-D y el AIB, si bien no inhibieron la germinación, en la mayoría de las plántulas obtenidas indujeron el desarrollo de la raíz primaria y de una incipiente hoja verdadera. Presumiblemente, por ser estas dos auxinas sintéticas y extremadamente activas, no fueron metabolizadas con facilidad por los embriones, por lo que eventualmente alcanzaron niveles tóxicos e inhibieron el desarrollo de las plántulas.

Los porcentajes de germinación que se obtuvieron en los tratamientos que contenían únicamente citocininas, fueron los siguientes: K, 33% y BAP, 25%. Nuevamente, a diferencia de BAP, la cinetina favoreció la germinación, además de un mayor desarrollo de la primera hoja verdadera (Figura VI.3).

Los porcentajes de germinación que se lograron con embriones de 34 semanas estuvieron por debajo del 50%, además, sólo en seis de los 18 tratamientos se obtuvo germinación, y ésta se inició a partir de la octava semana (Cuadro VI.2)

Los embriones de 34 semanas se sembraron en frascos viales de 20 ml, los cuales, por su tamaño principalmente, no resultaron ser muy efectivos, ya que durante el proceso de siembra de los inóculos, la boca del frasco se calienta a la flama varias veces, esto aumenta considerablemente la temperatura del recipiente, y, por lo tanto, del microambiente, lo que se reflejó en los altos porcentajes de oxidación obtenidos.

Las plántulas con diferentes características, que se obtuvieron con embriones de 34 semanas se muestran en el cuadro VI.6

Cuadro VI.6 Características de las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 34 semanas

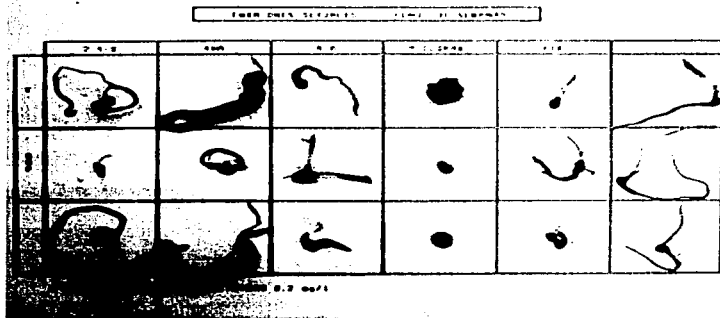
AIA + K	AIB + K	K
plántula G	plántula B	plántula G

La auxina y la citocinina que favorecieron la germinación fueron el 2,4-D y la K, respectivamente. Así mismo, los porcentajes más altos de germinación se obtuvieron con la combinación auxina/citocinina de 2,4-D + K. Sin embargo los embriones que iniciaron su germinación bajo el efecto del 2,4-D se oxidaron antes de desarrollar la plántula. De manera similar, en los tratamientos restantes, una vez que se desarrollaron las plántulas, éstas se oxidaron.

Con embriones de 34 semanas, en el control no se obtuvo germinación.

En el experimento con embriones de 41 semanas, la germinación se presentó en 11 de los 18 tratamientos, y se inició entre la cuarta y la octava semana. Los porcentajes más

A



B

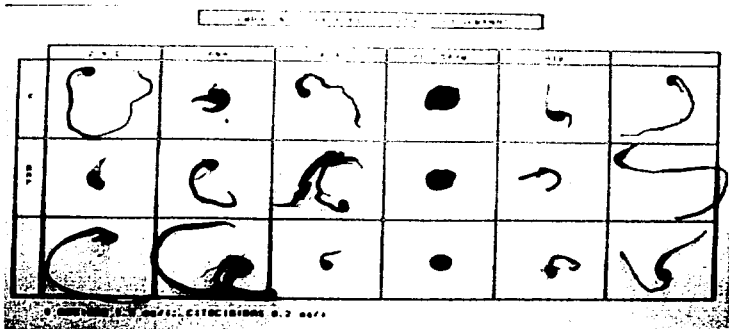


Figura VI.3 A y B, respuesta de embriones de 30 semanas en el factorial de 18 tratamientos y tipos de plántulas obtenidas.

altos (arriba del 50%) se obtuvieron con los siguientes tratamientos: ANA + K, 67%; AIB + K, 75%; 2,4-D + BAP, 50%; 2,4-D, 50%, y AIB, 50% (Cuadro VI.2).

Con embriones de 41 semanas se observó una disminución de los porcentajes de germinación en los diferentes tratamientos. Esto se hizo evidente en el control, cuyo porcentaje de germinación fue del 25% (Cuadro VI.2).

La cinetina fue la citocinina con la que se obtuvieron los porcentajes más altos de germinación; por su parte, la auxina que dio mejores resultados fue AIB; en tanto que la mejor relación auxina/citocinina fue AIB + K.

En el cuadro VI.7 se presentan los diferentes tipos de plántulas, resultantes de la germinación de embriones de 41 semanas

Cuadro VI.7 Características de las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 41 semanas

ANA + K	IBA + K	2,4-D + BAP	ANA + BAP	2,4-D	AIB	Control
plántulas H plántula G	plántula B	plántulas B	plántulas H	plántula A plántula D	plántula A plántula H	plántula A

Las plántulas que se obtuvieron en los tratamientos con AIA + K, K, AIA + BAP, y ANA, se oxidaron.

El 2,4-D no favoreció el desarrollo de raíces; en la mayoría de los casos inhibió completamente la formación de éstas, mientras que en el resto de las plántulas tan sólo permitió el desarrollo de una raíz primaria. Las auxinas ANA y AIB, aún cuando inhibieron la formación de raíces en algunas plántulas, en la mayoría de ellas favorecieron el desarrollo de raíces fuertes y abundantes (Figura VI.4).

Las plántulas que se obtuvieron en el control de este experimento, fueron plántulas vigorosas, y en el único tratamiento en el que se generaron plántulas más vigorosas, fue con el que contenía 1.5 mg/l de AIB (Figura VI.4).

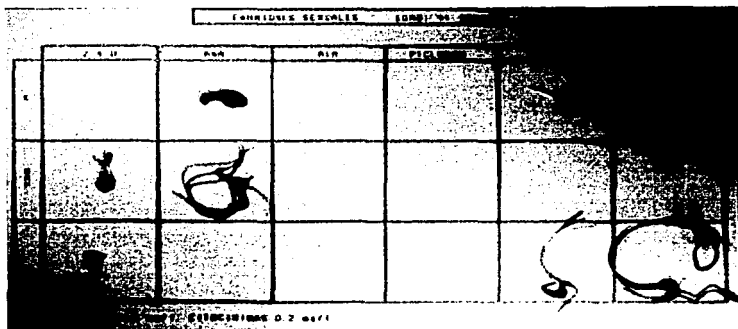
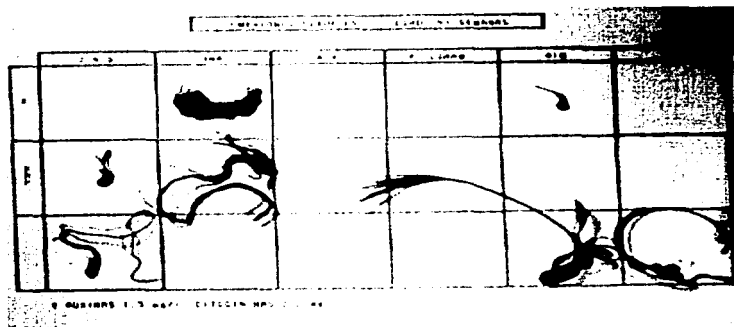
A**B**

Figura VI.4 A y B, respuesta de embriones de 41 semanas en el factorial de 18 tratamientos y tipos de plántulas obtenidas.

Con embriones de 51 semanas, la germinación se presentó en casi todos los tratamientos (14 de 18). Los embriones de esta edad comenzaron a germinar entre la cuarta y octava semanas.

Los porcentajes de germinación por arriba del 50% se obtuvieron con los siguientes tratamientos: K, 50%; ANA + BAP, 83%; AIB + BAP, 66%, y ANA, 50% (Cuadro VI.2)

Aún cuando la germinación se presentó en la mayoría de los tratamientos, los porcentajes en general fueron bajos, incluso con el control se obtuvo un 33% de germinación. Aparentemente, debido a la edad de los embriones, el porcentaje de germinación comenzó a decrecer, sin embargo, en los casos en que sí hubo respuesta, ésta fue más vigorosa, es decir, los embriones que germinaron desarrollaron plántulas fuertes (Figura VI.5).

Las diferentes plántulas, fenotípicamente, que se desarrollaron de los embriones de 51 semanas, se muestran en el cuadro VI.8.

Cuadro VI.8 Características de las plántulas que se desarrollaron a partir de embriones de 51 semanas

	2,4-D	ANA	AIA	AIB	Control
K	plántula I	plántula H plántula I	plántula F	plántula H	plántula C
BAP	plántulas D	plántulas I	-	plántulas A	-
Control	-	plántulas H plántula I	plántulas C	plántulas C	plántula A

En este caso, la citocinina que favoreció la germinación fue BAP, ya que los porcentajes más altos de germinación se obtuvieron en dos de los tratamientos que contenían esta citocinina. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió en todos los tratamientos con K, en los que las plántulas que se desarrollaron sobrevivieron *in vitro*, las obtenidas con BAP se oxidaron.

Por su parte, la auxina que favoreció la germinación fue ANA, y la mejor relación auxina/citocinina fue ANA + BAP.

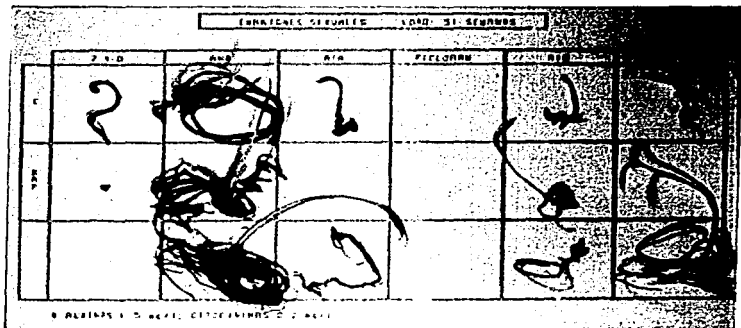


Figura VI.5 Respuesta de embriones de 51 semanas en el factorial de 18 tratamientos y tipos de plántulas obtenidas.

En el control de este experimento, las plántulas que se obtuvieron fueron normales y vigorosas, las cuales desarrollaron raíz primaria y la primera hoja verdadera (Figura VI.5).

VI.3.2 Formación de callo

La inducción de callo en monocotiledóneas es difícil, por lo que las auxinas con gran actividad, como el Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), resultan especialmente útiles.

El Picloram es una auxina sintética muy activa, aún en bajas concentraciones. En este experimento se probó una concentración de 1.5 mg/l, que fue suficiente para desviar al embrión de la ruta de germinación y formar callo. La formación de callo en embriones de todas las edades se vio favorecida por esta auxina. Los porcentajes más altos de formación de callo (por arriba del 50%) se obtuvieron con esta auxina (Cuadro VI.9).

Las auxinas restantes 2,4-D, ANA, AIA, y AIB, que también fueron probadas, desarrollaron callo, pero en porcentajes menores al 50%, a excepción del AIA, que alcanzó un 75% con embriones de 41 semanas (Cuadro VI.9).

Los porcentajes obtenidos de formación de callo en embriones de diferentes edades (Cuadro VI.9) revelan que, de las dos citocininas que se probaron (K y BAP), los tratamientos que contenían cinetina fueron los más exitosos.

Uno de los embriones de 41 semanas formó callo en el control, en ausencia de reguladores del crecimiento, mismo que no sobrevivió, sin embargo, esto demuestra que, si bien las auxinas tienen un papel determinante en la formación de callo, también lo tiene el genotipo de cada embrión. Esto es, los inoculos provenientes de diferentes individuos, aún cuando son de la misma especie, no todos cuentan con la misma plasticidad para desarrollar una respuesta morfogenética. La respuesta morfogenética es dependiente del genotipo (Villegas, 1991; Fernández, 1983).

Cuadro VI.9 Porcentajes de formación de callo, a la 12a semana, de embriones de diferentes edades en el factorial de 18 tratamientos

Edad del embrión		2,4-D	ANA	AIA	Picloram	AIB	0
21 semanas	K	0	0	0	50	0	0
26 semanas		0	17	0	17	0	17
30 semanas		0	18	0	65	0	0
34 semanas		0	0	0	17	0	0
41 semanas		17	0	0	67	25	0
51 semanas	17	17	0	100	0	0	
21 semanas	BAP	0	0	0	50	0	0
26 semanas		0	0	0	0	0	0
30 semanas		0	0	0	42	0	0
34 semanas		0	0	0	0	0	0
41 semanas		0	0	0	33	0	0
51 semanas	33	0	17	33	0	0	
21 semanas	0	0	0	0	50	0	0
26 semanas		17	25	0	50	0	0
30 semanas		0	0	0	8	0	0
34 semanas		0	0	0	0	0	0
41 semanas		0	0	75	80	25	25
51 semanas	0	0	0	33	17	0	

Porcentajes de formación de callo \geq 50%

Los callos que se obtuvieron con embriones de diferentes edades desarrollaron las siguientes características.

Cuadro VI.10 Características de los diferentes callos obtenidos a partir de embriones de distintas edades en los tratamientos con Picloram

TRATAMIENTO	EDAD DEL EMBRIÓN (en semanas)				
	21	30	34	41	51
Picloram + K	Ca+ granular friable	Ca+ granular (desarrollo raiz)	Cc+ granular friable	Cba+ granular friable	Ca+ granular friable
Picloram + BAP	Cbt+ granular friable	Ca+ granular friable	-	Ca+ granular friable	Ca+ granular friable
Picloram	Ca+ granular friable	C+ granular friable	-	Ca+ granular friable Cc+ granular friable	Ca+ granular friable

Significado de las claves. C+ = callo que sobrevive. Ca = callo de color amarillo. Cba = callo de color blanco-amarillo. Cbt = callo blanco transparente. Cc = callo color crema

Del Cuadro anterior, los callos que más proliferaron fueron los que se formaron con embriones de 30, 41 y 51 semanas de edad, bajo el efecto del Picloram (Figuras VI.6, VI.7, VI.8, VI.9, VI.10 y VI.11).

Reynolds y Murashige (1979) reportan embriogénesis somática indirecta en *Phoenix dactylifera*, a partir de secciones de óvulos, de 2 a 3 meses después de la polinización, en *Howeia fosteriana* y *Chamaedorea costancana*, a partir de embriones obtenidos de semillas maduras, en un medio de cultivo MS (1962), suplementado con 100 mg/l de 2,4-D, 1 mg/l de N6-isopenteniladenina (2-iP), y 3 g/l de carbón activado. Inicialmente desarrollaron un callo de color crema y apariencia granular, que resulto ser un callo embriogénico.

Un callo muy similar, en apariencia, al reportado por Reynolds y Murashige fue el que se obtuvo con 1.5 mg/l de Picloram y embriones de 30, 41 y 51 semanas de edad. Sin embargo, a diferencia de aquel, este callo no resulto ser embriogénico aparentemente.

En este experimento se llevo hasta el momento de la búsqueda de células competentes, con la dediferenciación del tejido, que involucró la reactivación de la división celular en las células de los embriones y la modificación del desarrollo especializado de las células. Sin embargo, cabe recordar que no todas las células dediferenciadas son competentes.

Por lo tanto con células tan comprometidas, como las de *Chamaedorea elegans* Mart., con un desarrollo especializado, el reto es obtener células competentes en algunas de ellas.

En los demás tratamientos, que no contenían Picloram, en que los embriones también formaron callo, estos no sobrevivieron más allá de la octava semana, pues se oxidaron.

VI.3.3 Oxidación

En general, los porcentajes de oxidación en este experimento fueron altos (Cuadro VI.11), no obstante, esto no fue un impedimento para establecer el cultivo *in vitro* de los embriones.



Figura VI.6 Formación de callo granular con desarrollo de raíz a partir de embriones de 30 semanas de edad. Tratamiento 4 (1.5 mg/l de picloram + 0.2 mg/l de eteftrial), del factorial de 18 tratamientos.



Figura VI.7 Formación de callo granular a partir de embriones de 41 semanas de edad. Tratamiento 4 (1.5 mg/l de picloram + 0.2 mg/l de eteftrial), del factorial de 18 tratamientos.



Figura VI.8. Formación de callo granular a partir de embriones de 41 semanas de edad. Tratamiento 10 (1.5 mg/l de Picloram) + 0.2 mg/l de herbicida auxinoprimario, del factorial de 18 tratamientos.

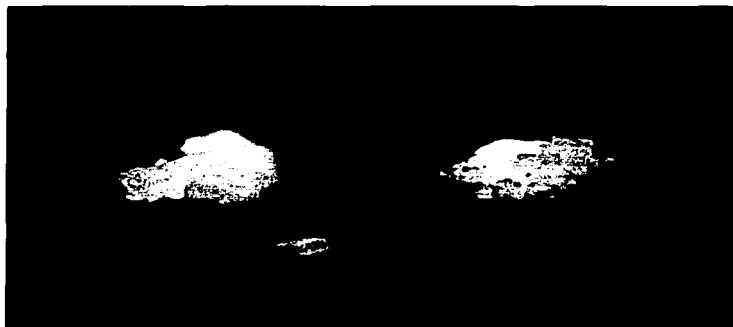


Figura VI.9. Formación de callo granular a partir de embriones de 41 semanas de edad. Tratamiento 16 (1.5 mg/l de Picloram), del factorial de 18 tratamientos.



Figura VI.10 Formación de callo granular a partir de embriones de 51 semanas de edad. Tratamiento 4 (1.5 mg/l de picloram) + (0.2 mg/l de carbetama), del factorial de 18 tratamientos.

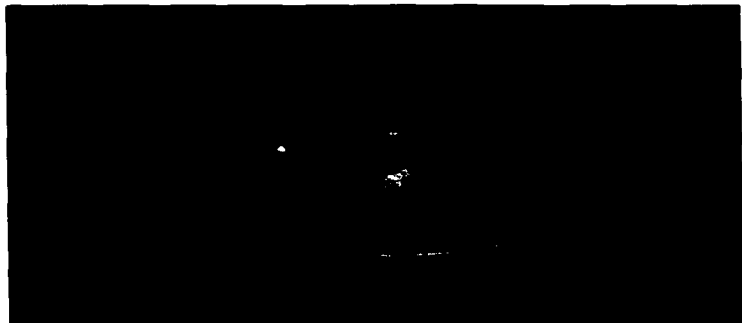


Figura VI.11 Formación de callo granular a partir de embriones de 51 semanas de edad. Tratamiento 16 (1.5 mg/l de picloram), del factorial de 18 tratamientos.

Cuadro VI.11 Porcentajes de oxidación, a la 12ª semana, de embriones de diferentes edades en el factorial de 18 tratamientos

Edad del embrión		2,4-D	ANA	AIA	Picloram	AIB	0
21 semanas	K	50	0	0	50	100	100
26 semanas		17	17	67	83	67	83
30 semanas		0	18	17	7	8	17
34 semanas		67	50	0	17	67	33
41 semanas		33	33	17	17	0	50
51 semanas		33	17	50	0	33	33
21 semanas	BAP	0	0	50	50	50	100
26 semanas		17	50	0	0	0	100
30 semanas		0	8	25	8	0	25
34 semanas		50	100	100	83	83	0
41 semanas		17	33	0	67	75	40
51 semanas		50	0	50	66	0	33
21 semanas	0	100	50	100	50	0	100
26 semanas		33	50	100	50	50	50
30 semanas		0	0	8	17	8	0
34 semanas		67	50	67	17	67	67
41 semanas		0	33	0	0	0	0
51 semanas		50	50	50	33	17	50

La oxidación se identificó como el oscurecimiento del tejido y los porcentajes de oxidación se calcularon con base en los embriones oxidados que no generaron ninguna respuesta o tan sólo una respuesta incipiente

Porcentajes de oxidación \geq 50%

Para evitar la oxidación se tomaron medidas preventivas tales como evitar el contacto de los embriones, recién disecados de las semillas, con el aire caliente, manteniendolos sumergidos en una solución fría de L-cisteína o agua destilada estéril mientras se sembraban, así mismo, se evitó lesionar a los embriones y los cultivos se mantuvieron en oscuridad las primeras semanas. Las dos últimas medidas tuvieron la finalidad de evitar estimular a la enzima fenilalanina amoniliasa (PAL), la cual es activada por lesiones en los tejidos, así como por la luz, y es la responsable de la formación de compuestos fenólicos en los tejidos vegetales.

Adicionalmente, se diseñó otro experimento con la finalidad de encontrar un sustrato adecuado para el control de la oxidación. En este experimento se utilizaron embriones de 41 semanas y se probaron dos sustratos diferentes. Los resultados obtenidos de ambas pruebas se muestran en el cuadro VI.12.

Cuadro VI.12 Porcentajes de formación de callo y oxidación, a la 12ª semana, obtenidos en carbón activado y papel filtro

RESPUESTA	carbón activado	papel filtro
formación de callo	75%	100%
oxidación	25%	0%

En los casos en que se utilizó papel filtro la oxidación fue nula, no así con carbón activado (Cuadro VI 12). El trabajar con papel filtro tiene una ventaja adicional sobre el carbón activado, ya que éste, a diferencia del carbón activado, no atrapa a los reguladores del crecimiento, ni a los nutrientes, disminuyendo la disponibilidad de éstos en el medio de cultivo. Por lo tanto, se tiene un control más eficiente sobre la concentración real del regulador del crecimiento que se encuentra en el medio de cultivo. Sin embargo, la mejor manera de controlar la oxidación es no lesionando el inoculo

VI.4 Cultivo *In vitro* de inflorescencias inmaduras

El objetivo principal de este experimento fue la obtención de organogénesis, para tal fin se probó una combinación citocinina/auxina de 1.5 mg/l / 0.2 mg/l. Por lo general, la organogénesis en monocotiledóneas es promovida en un medio sin auxinas o con bajas concentraciones de ellas, en complementación con altos niveles de citocininas (George y Sherrington, 1984).

Los inóculos que se utilizaron fueron secciones de inflorescencias inmaduras (envainadas), raquillas (estructuras de la inflorescencia en las que se encuentran las flores), que se sembraron en seis diferentes tratamientos. Las respuestas que se evaluaron fueron formación de callo, crecimiento de las flores, crecimiento de las raquillas y oxidación.

La respuesta más sobresaliente en este experimento fue el crecimiento de las flores, esta respuesta obtuvo los porcentajes más altos (ambos del 50%), en los diferentes tratamientos.

En cuanto a la obtención de callo se refiere, éste se desarrolló a partir de las raquillas de la inflorescencia.

Por otra parte, los porcentajes de oxidación fueron altos, en general, debido a que las inflorescencias tuvieron que ser seccionadas para la siembra, lesionando, con esto, el tejido.

Cuadro VI.13 Resultados del experimento con inflorescencias inmaduras en diferentes tratamientos, a las 12 semanas de cultivo

RESPUESTA	A	B	C	D	E	F
formación de callo	5%	20%	0%	9%	0%	6%
crecimiento de las flores	85%	0%	54%	0%	55%	0%
crecimiento de las raquillas	0%	17%	0%	0%	0%	0%
oxidación	17%	63%	33%	65%	45%	50%
sin respuesta aparente	13%	0%	13%	26%	0%	44%

A(2,4-D + BAP), B(ANA + BAP), C(AIA + BAP), D(Picloram + BAP), E(AIB + BAP) y F(BAP). La concentración de las auxinas fue de 0.2 mg/l (2,4-D, ANA, AIA, Picloram, AIB), y de la citocinina de 1.5 mg/l (BAP).

Un segundo experimento con inflorescencias inmaduras fue el que se realizó con medio MS al 100%, suplementado con 1.5 mg/l de Picloram.

De la evaluación de resultados, la formación de callo fue la respuesta que presentó el porcentaje más alto (86%) (Cuadro VI.14). El Picloram fue capaz de desdiferenciar el tejido de las inflorescencias inmaduras, reactivando la división celular y modificando el desarrollo especializado de las células. Además de que en algún momento se obtuvieron células competentes, ya que posterior a la formación de callo se generaron raíces. En este caso el estímulo que recibió el inóculo hizo que las células competentes tomaran esa ruta morfogénica (Figura VI.12).

Cuadro VI.14 Resultados del experimento con inflorescencias inmaduras en medio MS (1962), suplementado con 1.5 mg/l de Picloram. Después de 12 semanas de cultivo

RESPUESTA	Picloram 1.5 mg/l
formación de callo	86%
crecimiento de las flores	14%
oxidación	0%

En cuanto al problema de oxidación, inicialmente, los inóculos presentaron oscurecimiento en la zona de corte, sin embargo, se sobrepusieron favorablemente.

A



B



Figura VI.12 A y B, formación de callo con raíces a partir de inflorescencias inmaduras, en medio de cultivo MS (1962), suplementado con 1.5 mg/l de picloram

VI.5. Respuesta a los pretratamientos auxínicos y térmicos

Si partimos del principio de que todas las células vegetales son totipotentes, es decir, que cuentan con el mismo potencial de desarrollo que el cigoto, aún cuando durante su diferenciación se lleva a cabo la expresión selectiva del material genético, es posible, mediante el estímulo adecuado, activar la expresión de otros genes y dirigir a las células hacia una ruta morfogénica específica

Los estímulos pueden ser químicos (aplicación de reguladores del crecimiento y otras sustancias) o físicos (cambios drásticos en las condiciones ambientales).

Con base en lo anterior, en este experimento se buscó, por medio de choques auxínicos y térmicos, desviar a las células de los inoculos (embriones de 34 y 41 semanas de edad, e inflorescencias inmaduras) de su desarrollo especializado hacia otra ruta morfogénica.

Este tipo de pretratamientos ha dado muy buen resultado en la obtención de callo y de haploides, a partir de anteras y/o ovulos, en muchas especies. Por ejemplo *Datura stramonium*, tabaco, centeno (Blakeslee, 1922; Povolochkee, 1937; Muentzing, 1937, y Noerdenskiold, 1939, respectivamente Citados por Bajaj, 1983), cebada, *Saccharum spontaneum* L., arroz (Huang y Sunderland, 1982; Fitch y Moore, 1983; Lin y Tsay, 1984, respectivamente Citados por Rose et al, 1986) y *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Rose et al, 1986), entre otras

VI.5.1 Choque auxínico y térmico en embriones

Con embriones de 26 semanas, los cuales se sembraron en un medio de cultivo MS al 100%, suplementado con 3 mg/l de 2,4-D y 0.2 mg/l de cinetina, y se incubaron a 32 °C durante 72 horas, se obtuvieron los siguientes resultados a la 12a semana.

Como se puede observar en el cuadro VI. 15, tanto en el pretratamiento térmico como en el control se obtuvo germinación, aunque el porcentaje más alto se presentó en el primero de éstos. Así mismo, la formación de callo solo se presentó con el choque térmico.

Por su parte, la oxidación en el control fue sensiblemente mayor que en el pretratamiento.

Cuadro VI.15 Resultados del experimento con pretratamiento térmico en embrones de 26 semanas

RESPUESTA	Pretratamiento Térmico	Control
germinación	40%	12%
formación de callo	30%	0%
oxidación	30%	88%

Pretratamiento térmico 32 °C por 72 horas, posterior a la siembra

Al comparar los resultados del pretratamiento con los del control, resulta evidente que el choque térmico sí tuvo un efecto favorable sobre la respuesta de los embrones, tanto para la germinación como para la formación de callo

Con embriones de 34 semanas, tanto en los pretratamientos auxínicos como en los térmicos, la germinación se vio inhibida por completo (Cuadros VI.16 y VI.17). Lo anterior se debió, seguramente, a las concentraciones que se probaron de 2,4-D, pues los embrones de esta misma edad que se sembraron en el factorial de 18 tratamientos (Apartado VI.3), bajo el efecto del 2,4-D, sí germinaron. Cabe señalar que en dicho factorial la concentración del 2,4-D fue de 1.5 mg/l, en tanto que en los pretratamientos la menor concentración de esta auxina fue de 5 mg/l.

En cuanto a la formación de callo, ésta se obtuvo en los tratamientos expuestos a choque térmico, particularmente en el pretratamiento con calor, sin embargo los porcentajes fueron menores al 30% (Cuadro VI.17). Aparentemente, el choque térmico sí tuvo influencia sobre la formación de callo, aún cuando, muy probablemente, también el genotipo de los embrones tuvo un papel importante, ya que no todos los embrones, independientemente de que sean de la misma especie, tienen la misma plasticidad para generar una respuesta, o bien, no tienen la misma susceptibilidad a los reguladores del crecimiento.

Cuadro VI.16 Resultados en porcentaje, a la 12a semana, del choque auxínico en embriones de 34 semanas

RESPUESTA	2,4-D + 2-ip				
	tratamiento I	tratamiento II	tratamiento III	tratamiento IV	tratamiento V
germinación	0	0	0	0	0
formación de callo	0	0	0	0	0
oxidación	25	50	25	50	0
sin respuesta aparente	75	50	75	50	100

La concentración de la citocinina 2-ip fue de 2 mg/l en todos los tratamientos, mientras que para el 2,4-D la concentración varió como sigue: tratamiento I, 5 mg/l; tratamiento II, 10 mg/l; tratamiento III, 20 mg/l; tratamiento IV, 50 mg/l; y tratamiento V, 100 mg/l.

Cuadro VI.17 Resultados en porcentaje, a la 12a semana, de los pretratamientos térmicos en embriones de 34 semanas

RESPUESTA	PRETRATAMIENTOS								
	frío			calor			mixto		
	II	III	IV	II	III	IV	II	III	IV
germinación	0	0	0	0	0	0	0	0	0
formación de callo	0	25	0	25	0	25	0	25	0
oxidación	50	75	50	25	100	100	25	25	100
sin respuesta aparente	50	0	50	50	0	0	75	50	0

Tratamiento II: 2,4-D (10 mg/l) + 2-ip (2 mg/l); tratamiento III: 2,4-D (20 mg/l) + 2-ip (2 mg/l); y tratamiento IV: 2,4-D (50 mg/l) + 2-ip (2 mg/l).

Con embriones de 41 semanas, la germinación se presentó únicamente en el tratamiento I (5 mg/l de 2,4-D) (Cuadro VI.18). Lo anterior se debió, seguramente, a que la concentración de la auxina no fue suficiente para inhibir la germinación, ya que el carbón activado adsorbe cierta cantidad del 2,4-D contenido en el medio, disminuyendo así la disponibilidad de la auxina para el inoculo.

Por su parte, tanto la edad de los embriones como su genotipo deben haber jugado un papel importante en la germinación, ya que los embriones de esta misma edad que germinaron bajo el efecto del 2,4-D, en el factorial de 18 tratamientos (Apartado VI.3), desarrollaron plántulas de las más vigorosas (Figuras VI.4 y VI.5).

La conclusión obligada, entonces, es que, a mayor madurez de los embriones, mayor será la dificultad para cambiar su ruta metabólica y mayor será, también, la concentración de auxina necesaria para tal fin.

En cuanto a la formación de callo, esta se presentó en el tratamiento II (10 mg/l de 2,4-D), sin exposición a choque térmico, y en el tratamiento III (20 mg/l de 2,4-D), con exposición a choque térmico mixto (Cuadros VI.18 y VI.19). Aparentemente, los diferentes pretratamientos térmicos no fueron determinantes en la formación de callo, no así el choque auxínico (Cuadros VI.18 y VI.19).

Cuadro VI.18 Resultados en porcentaje, a la 12ª semana, del choque auxínico en embriones de 41 semanas

RESPUESTA	2,4-D + 2-ip				
	tratamiento I	tratamiento II	tratamiento III	tratamiento IV	tratamiento V
germinación	25	0	0	0	0
formación de callo	0	25	0	0	0
oxidación	50	50	50	100	100
sin respuesta aparente	25	25	50	0	0

La concentración de la citocinina 2-ip fue de 2 mg/l en todos los tratamientos, mientras que para el 2,4-D la concentración varió como sigue: tratamiento I, 5 mg/l; tratamiento II, 10 mg/l; tratamiento III, 20 mg/l; tratamiento IV, 50 mg/l y tratamiento V, 100 mg/l.

En resumen, los pretratamientos auxínicos que indujeron la formación de callo, tanto en embriones de 34 como de 41 semanas, fueron el II (10 mg/l de 2,4-D) y el III (20 mg/l de 2,4-D). Concentraciones mayores a los 20 mg/l de 2,4-D inhibieron toda respuesta, seguramente porque se provocó la intoxicación de los embriones.

Cuadro VI.19 Resultados en porcentaje, a la 12a semana, de los pretratamientos térmicos en embriones de 41 semanas

RESPUESTA	PRETRATAMIENTOS								
	frio			calor			mixto		
	II	III	IV	II	III	IV	II	III	IV
germinación	0	0	0	0	0	0	0	0	0
formación de callo	0	0	0	0	0	0	0	25	0
oxidación	75	100	50	50	25	25	100	50	75
sin respuesta aparente	25	0	50	50	75	75	0	25	25

Tratamiento II 2,4-D (10 mg/l) + 2-ip (2 mg/l), tratamiento III 2,4-D (20 mg/l) + 2-ip (2 mg/l), y tratamiento IV 2,4-D (50 mg/l) + 2-ip (2 mg/l)

VI.5.2 Choque auxínico y térmico en inflorescencias

Con inflorescencias inmaduras se probaron los mismos choques auxinicos (Apartado IVI 4.1) y pretratamientos térmicos (frio, calor y mixto, en los tratamientos II, III y IV) que se aplicaron a los embriones

En cuanto a la prueba con choque auxinico, solamente en el tratamiento I se produjo respuesta, siendo esta la formación de callo en el 100% de los inóculos (Cuadro VI.20). Por su parte, el choque con frio, de los pretratamientos térmicos, fue el único en el que se obtuvieron respuestas, éstas consistieron en la formación de callo y en el crecimiento de las flores, ambas se registraron en los tratamientos II y IV (Cuadro VI.21) Es importante mencionar que el callo que se formó en todos los tratamientos se originó de las flores

De acuerdo con estos resultados, el pretratamiento con frio tuvo un efecto favorable sobre la formación de callo, así como sobre el crecimiento de las flores. Vale la pena recordar que en muchas especies, incluso tropicales (*Pers comun* Sanchez, 1990), el frio es un factor muy importante para la floración, ya que, no solo funciona como sincronizador de esta, sino que también la induce y estimula el desarrollo de los brotes florales (Bidwell, 1993), por lo que no resulta extraño que las inflorescencias de *Chamaedorea elegans*, a pesar de ser una especie tropical, sean susceptibles a este estímulo.

Cuadro VI.20 Resultados en porcentaje, a la 12ª semana, del choque auxínico en inflorescencias inmaduras

RESPUESTA	2,4-D + 2-ip				
	tratamiento I	tratamiento II	tratamiento III	tratamiento IV	tratamiento V
formación de callo	100	0	0	0	0
crecimiento de las flores	0	0	0	0	0
oxidación	0	0	0	0	100
sin respuesta aparente	0	100	100	100	0

La concentración de la citocinina 2-ip fue de 2 mg/l en todos los tratamientos, mientras que para el 2,4-D la concentración varió como sigue: tratamiento I, 5 mg/l; tratamiento II, 10 mg/l; tratamiento III, 20 mg/l; tratamiento IV, 50 mg/l; y tratamiento V, 100 mg/l. El callo que se formó se originó de las flores.

Cuadro VI.21 Resultados en porcentaje, a la 12ª semana, de los pretratamientos térmicos en inflorescencias inmaduras

RESPUESTA	PRETRATAMIENTOS								
	frio			calor			mixto		
	II	III	IV	II	III	IV	II	III	IV
formación de callo	50	0	50	0	0	0	0	0	0
crecimiento de las flores	38	0	50	0	0	0	0	0	0
oxidación	12	100	0	0	0	50	0	100	100
sin respuesta aparente	0	0	0	100	100	50	100	0	0

Tratamiento II: 2,4-D (10 mg/l) + 2-ip (2 mg/l); tratamiento III: 2,4-D (20 mg/l) + 2-ip (2 mg/l); y tratamiento IV: 2,4-D (50 mg/l) + 2-ip (2 mg/l). El callo que se formó se originó de las flores.

VI.6. Pruebas de germinación

VI.6.1. Rescate de embriones (Cultivo *in vitro* de embriones maduros)

En condiciones naturales, la germinación de semillas del género *Chamaedorea*, aún cuando varía según la especie, es un proceso muy lento, que oscila entre dos y siete meses. Sin embargo, para la mayoría de las camedoras, el periodo de germinación de las semillas es de 90 días, en promedio (Barba y Romero, 1993).

Con el rescate de embriones de *Chamaedorea elegans* (cultivo *in vitro* de embriones sexuales) se buscó optimizar la germinación de esta palma, reduciendo el tiempo e incrementando el porcentaje de germinación

En este experimento se evaluaron las siguientes respuestas germinación, esta se reconoció desde el momento en que emergió el epicotilo del embrión, formación de callo, y oxidación. Así como la sobrevivencia *in vitro* de las plántulas, a partir de la onceava semana posterior a la germinación

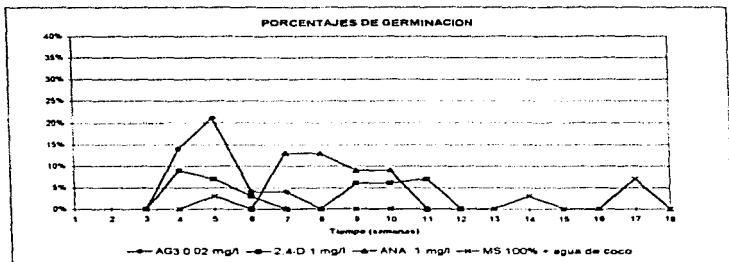
a) Germinación

De los cuatro diferentes tratamientos probados, a la semana 16 los porcentajes de germinación fueron los siguientes, con ácido giberélico (AG₃), 43%, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 38%, ácido naftalenacético (ANA), 44%, y MS al 100% suplementado con Agua de coco, 13% (Ver Cuadro VI 22.) Adicionalmente, también fue considerado el tiempo en el que se inició la germinación en cada tratamiento, así como las características de las plántulas relacionadas con la sobrevivencia de estas (el desarrollo de un sistema de raíces vigoroso y la formación de la primera hoja verdadera)

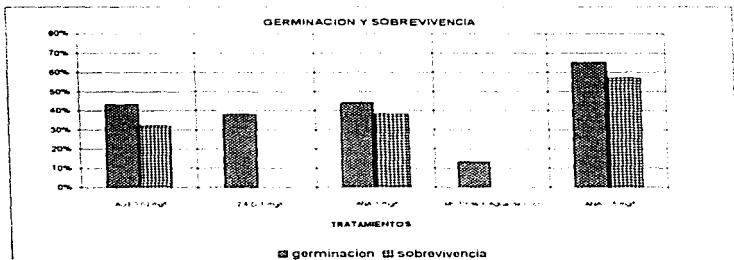
Los mejores tiempos de germinación se obtuvieron con AG₃ y 2,4-D (Gráfica VI 1), los cuales fueron de cuatro y cinco semanas, respectivamente. Aun cuando la función de las giberelinas en la germinación sea la activación de la síntesis de enzimas hidrolíticas (amilasas principalmente) en el endospermo de la semilla, siendo el embrión quien suministra la giberelina necesaria para iniciar este proceso, el AG₃ favoreció la germinación de los embriones sexuales cultivados *in vitro*

En cuanto a las características de las plántulas obtenidas con AG₃, estas no formaron raíces fuertes ni abundantes, sin embargo, la mayoría desarrollaron la plumula y la primera hoja verdadera (eófila) (Figura VI.13). Un paso posterior a la germinación con AG₃ sería transplantar las plántulas a un medio de cultivo suplementado con auxinas para estimular el desarrollo de raíces.

Gráfica VI.1 Porcentajes de germinación vs tiempo, de embriones maduros en cuatro diferentes tratamientos



Gráfica VI.2 Porcentajes de germinación de embriones maduros y sobrevivencia *in vitro* de las plántulas obtenidas. La sobrevivencia se evaluó a la semana 11, a partir de que dio inicio la germinación



Acido giberélico (AG3) 0.02 mg/l, Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) 1 mg/l, Acido naftalenacético (ANA) 1 mg/l, MS 100% + Agua de coco, ANA 0.5 mg/l

Cuadro VI.22 Porcentajes de las respuestas obtenidas, a la 18a semana, del experimento Rescate de Embriones

RESPUESTA	AG ₃	2,4-D	ANA	M5 al 100% + agua de coco	ANA *
germinación	43	38	44	13	85
formación de callo	14	19	22	0	22
oxidación	25	31	19	37	13
sin respuesta aparente	18	12	15	50	0
Total	100	100	100	100	100

AG₃: Ácido giberélico (0.02 mg/l); 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (1 mg/l); ANA: Ácido naftalenacético (1 mg/l) y ANA * (0.5 mg/l)

La germinación con 2,4-D presentó dos vías de desarrollo. En la primera, inicialmente se formó callo a partir de la zona del hipocótilo (polo radical del embrión), seguido del desarrollo incipiente de la plúmula, sin formar nunca raíces; en la segunda, las plántulas formaron una raíz primaria incipiente y tuvieron un desarrollo mínimo de la plúmula.

El 2,4-D es una auxina sintética que, debido a su estructura molecular, que le permite ser fuertemente activa, es en extremo potente. Además, una vez en el metabolismo del inóculo, su molécula es más estable que la de las auxinas naturales. Quizá, esto se deba a que, por ser un compuesto sintético, existen pocos sistemas enzimáticos que la ataquen con éxito. Esto permitiría que la auxina se acumulara con mayor facilidad, provocando, eventualmente, la intoxicación del inóculo.

Lo anterior explicaría el hecho de que el 2,4-D fue capaz de romper la ruta fuertemente comprometida de germinación del embrión, formando callo. No obstante, la concentración de la auxina no fue suficiente para cambiar por completo esta ruta, ya que el callo no proliferó y finalmente se impuso la germinación. Sin embargo, la concentración de la auxina sí fue suficiente para inhibir el crecimiento de las plántulas y el desarrollo de raíces (Figura VI.14).

El mayor porcentaje de germinación, así como las plántulas más vigorosas, se obtuvieron con ANA (Figura VI.15). En este tratamiento, las plántulas desarrollaron una raíz primaria vigorosa; sin embargo, la germinación se presentó hasta la séptima semana (Gráfica VI.1). Inicialmente, todos los embriones que germinaron formaron callo en el hipocótilo, entre la

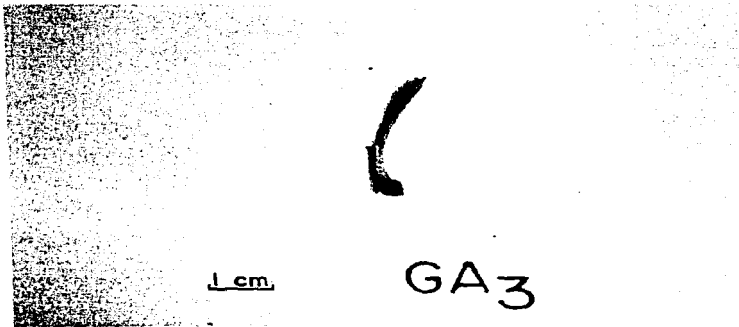


Figura VI.13 Plántula obtenida de la germinación de un embrión maduro en medio de cultivo MS (1962) suplementado con 0.02 mg/l de ácido giberélico.

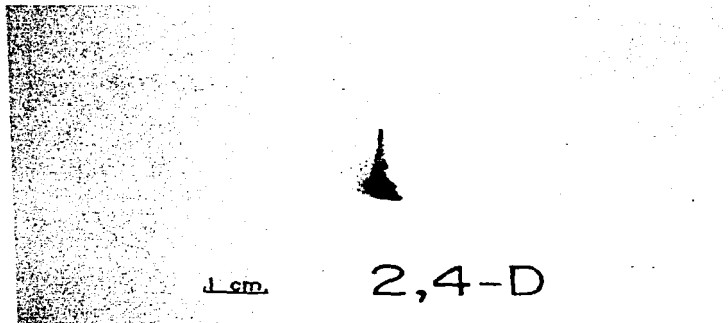


Figura VI.14 Plántula obtenida de la germinación de un embrión maduro en medio de cultivo MS (1962) suplementado con 1 mg/l de ácido 2,4.diclorofenoxiacético.

cuarta y quinta semana, pero fue hasta la séptima semana que comenzaron a desarrollar el epicótilo y la raíz primaria, abriéndose paso la germinación.

A diferencia del 2,4-D, ANA no inhibió el desarrollo de la plántula. Aún cuando ANA es una auxina sintética es menos activa que el 2,4-D; por lo que, si bien en un principio indujo la formación de callo en el embrión, cuando este germinó lo hizo con gran vigor, ya que esta auxina propicio el desarrollo de raíces.

Lo anterior sugiere que el embrión de esta palma está fuertemente comprometido con la ruta de germinación, y no es posible romper con este compromiso utilizando bajas concentraciones de reguladores del crecimiento

El tratamiento con MS al 100%, suplementado con agua de coco, resultó infructuoso. El porcentaje de germinación obtenido fue el menor y los embriones que germinaron no desarrollaron plántulas

La composición del agua de coco es muy compleja y poco conocida, se sabe que es rica en nitrógeno orgánico y azúcares, así como en una variedad de sustancias del crecimiento y otros complejos con mayor o menor grado de actividad fisiológica. De alguna manera, la combinación de todos estos compuestos afectaron negativamente a los embriones de *Chamaedorea elegans* Mart., contrariamente a lo reportado en la literatura para otras especies vegetales. Al parecer, el agua de coco actuó como un inhibidor de la germinación y del desarrollo de la plántula, además de favorecer la oxidación

Con base en los resultados obtenidos en la prueba con ANA (el tratamiento con el mayor porcentaje de germinación, 44%, y las plántulas más vigorosas), se diseñó un experimento adicional en el que se ensayó una concentración menor a la utilizada en el primer experimento (0.5 mg/l). El objetivo fue reducir el tiempo de germinación (siete semanas), así como aumentar el porcentaje de la misma.

Los resultados fueron congruentes con lo esperado. Al disminuir la concentración de ANA se redujo notablemente el efecto inhibitorio sobre la germinación, pues ésta se inició a la cuarta semana y se incrementó el porcentaje de germinación al 65 % (Cuadro VI.22); además, las plántulas obtenidas fueron vigorosas. Sin embargo, no se logró eliminar la

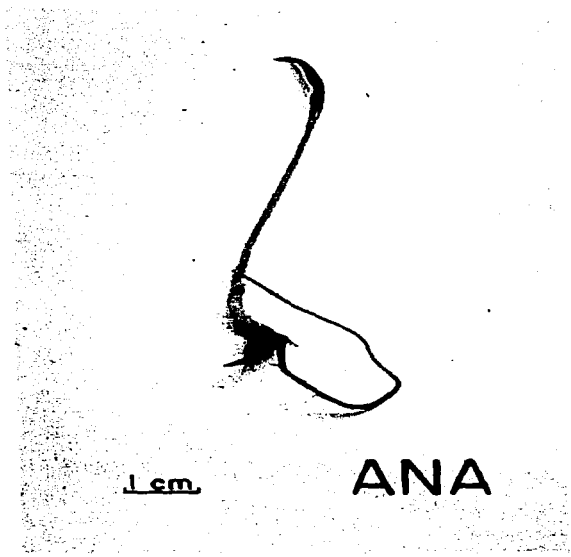


Figura VI.15 Plántula obtenida de la germinación de un embrión maduro en medio de cultivo MS (1962) suplementado con 1 mg/l de ácido naftalenacético

formación de callo del hipocótilo, en la mayoría de los embriones que germinaron, antes de desarrollar la raíz primaria.

En este experimento, el control fue el mismo que para el factorial de 18 tratamientos, con embriones de 51 semanas, se tomó este control como referencia porque los embriones de esa edad fueron los más maduros que se probaron, en ese experimento. El porcentaje de germinación para el control de este experimento fue del 33% (Cuadro VI. 2), un porcentaje menor al que se obtuvo con 0.5 mg/l de ANA (65%)

b) Formación de callo

En este experimento también se obtuvo formación de callo en los diferentes tratamientos. Los porcentajes que se obtuvieron fueron los siguientes con AG₃, 14%, 2,4-D, 18% y ANA 21% (Cuadro VI 22) El callo que se formó con AG₃ no sobrevivió más de una semana, no así los callos formados con 2,4-D y ANA, sin embargo no proliferaron y, finalmente, se oxidaron.

c) Oxidación

En el cultivo *in vitro* de esta especie la oxidación se presenta de manera constante. Sin embargo, en este trabajo no fue relevante, ya que los inóculos en general, se sobrepusieron a esta satisfactoriamente, obteniéndose porcentajes de oxidación relativamente bajos. AG₃, 25%; 2,4-D, 31%; ANA, 19%, y MS (1962) al 100%, suplementado con agua de coco, 37% (Cuadro VI 22)

d) Supervivencia *in vitro*

Los porcentajes de supervivencia de los embriones que germinaron fueron los siguientes: AG₃, 32%, 2,4-D, 0%, ANA (1 mg/l), 38%; MS al 100%, suplementado con agua de coco, 0%; y ANA (0.5 mg/l), 57% (Gráfica VI.2). Estos resultados estuvieron estrechamente relacionados con el vigor de las plántulas logradas en los diferentes tratamientos que se probaron.

El porcentaje de sobrevivencia que se obtuvo con AG₃ se debió, probablemente, a que la giberelina, aún cuando no inhibió el desarrollo de la plántula, no favoreció el desarrollo de la raíz. Por su parte, el 2,4-D, en la concentración probada, permitió que germinaran los embriones, pero inhibió el desarrollo de la plántula, por lo que estas no lograron sobrevivir. Los resultados más satisfactorios se obtuvieron con ANA; en las dos pruebas se alcanzaron los porcentajes más altos, pues como ya se mencionó, generaron las plántulas más vigorosas. Finalmente, el complejo natural (agua de coco), al favorecer la oxidación de los inóculos, no permitió que éstos sobrevivieran.

VI.6.2. Cultivo *in vitro* de semillas maduras

En este experimento se buscó el mejor sustrato *in vitro* para germinar semillas maduras. La respuesta que se evaluó fue la germinación (ésta se reconoció en el momento que el embrión emergió de la semilla), además de la sobrevivencia *in vitro* (ésta se evaluó a la semana 18, una vez iniciada la germinación) de los embriones que germinaron.

a) Germinación

Durante el desarrollo de este experimento fue posible identificar claramente la morfología del embrión y las etapas del proceso de germinación de las semillas de *Chamaedorea elegans* Mart.

El embrión es de forma cónica y su polo radical está orientado hacia el exterior de la semilla (cicatriz del micrópilo), en tanto que el polo apical apunta hacia el interior del endospermo.

Las camedoras presentan germinación tipo *Elaeis*, la cual considera un embrión recto, con orientación oblicua, radícula persistente, extensión del cotiledón no alargada, adyacente, y la vaina del cotiledón ligulada (Tomlinson, 1990).

La germinación se hizo evidente en el momento en que el embrión fue expulsado de la semilla por el haustorio o cotiledón, que se mantiene embebido en el endospermo; posteriormente, el epicótilo se elongó y emergió la plántula. La ligula o coleóptilo, que funciona como una vaina protectora del meristemo apical, se desarrolló en ángulo recto al

eje cotiledonar, las hojas de la plúmula, de reciente formación, sobresalieron a través del ápice de la ligula y continuaron creciendo. Al mismo tiempo, la radícula creció en dirección opuesta a la plúmula, para producir la raíz primaria que se desarrolló persistente y vigorosa, y de la cual se desarrollaron raíces secundarias. La primera hoja verdadera (edífil) de las plántulas se presentó en forma pinada.

De acuerdo con Barba y Romero (1993), el proceso de germinación se inicia antes de que emerja el embrión de la semilla. Una vez que se desencadena la germinación, el embrión comienza a tener una pequeña diferenciación; en esta etapa, el embrión a través del cotiledón o haustorio procede a nutrirse del endospermo de la semilla, el cotiledón se ensancha y continúa digiriendo hasta que absorbe prácticamente todo el endospermo y ocupa su lugar, es entonces cuando el embrión es expulsado de la semilla.

Como resultado de las tres pruebas que se realizaron en este experimento se obtuvieron, a la semana 20, los siguientes porcentajes de germinación: Algodón húmedo estéril, 44%, MS al 50%, 13%, y MS al 50%, suplementado con ácido giberélico (0.05 mg/l), 7%.

El porcentaje más alto de germinación se obtuvo con algodón húmedo estéril. En esta prueba las semillas se mantuvieron a una temperatura de $30 \pm 3^\circ\text{C}$, a diferencia de las semillas de las otras dos pruebas, las cuales se incubaron a $25 \pm 3^\circ\text{C}$, aparentemente la temperatura favoreció la germinación. Además, el tipo de sustrato proporcionó más humedad al cultivo, propiciando así la imbibición de las semillas, etapa inicial y determinante en el proceso de la germinación.

En el medio MS al 50%, sin reguladores del crecimiento, el porcentaje de germinación fue mayor, en comparación con el que se obtuvo con el medio de cultivo MS al 50%, suplementado con AG_3 . Esto parece indicar que el ácido giberélico no tuvo ningún efecto en la germinación de las semillas, probablemente, dada la baja concentración de AG_3 utilizada, además de que la temperatura de incubación no fue la adecuada.

En cuanto al tiempo de germinación sobre algodón húmedo estéril, ésta se inició a la primera semana (con 1% de germinación) y alcanzó su máximo entre la cuarta y la octava semana de cultivo. Para los tratamientos restantes, la germinación se inició a la tercera

semana (Gráfica VI 3). Seguramente, esto fue ocasionado por la humedad del cultivo y la temperatura de incubación.

Se sabe que la germinación de algunas semillas es inhibida por la luz, esto puede ser un mecanismo de adaptación de las semillas con germinación lenta, que impide que éstas germinen en la superficie del suelo después de un breve chubasco, pues morirían antes de que sus raíces alcanzaran el suelo húmedo (Bidwell, 1993). Condiciones frecuentes en selvas tropicales

Por otra parte, la luz también es un factor importante que determina la aparición de la enzima fenilalanina-amoniaco-liasa (PAL), que cataliza la desaminación de la fenilalanina, abriéndola a un amplio rango de productos secundarios como los fenoles, los cuales son los causantes de la oxidación en los tejidos vegetales (Bidwell, 1993)

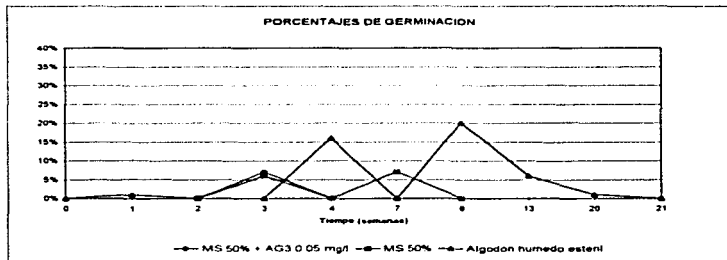
Lo anterior se aplica a las semillas de *Chamaedorea elegans* Mart ; por esta razón, los cultivos de este experimento se mantuvieron en oscuridad hasta los primeros indicios de la germinación, a fin de no inhibirla, así como de minimizar la oxidación del tejido

c) Supervivencia *in vitro*

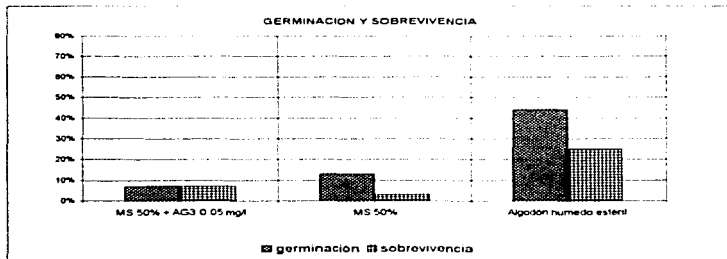
En las pruebas en las que se trabajó con medio de cultivo MS al 50%, los porcentajes de supervivencia *in vitro* fueron los siguientes MS al 50%, suplementado con AG₃ (0.05 mg/l), 7%, y MS al 50%, 3% (Gráfica VI 4). En estos experimentos, los impedimentos para la germinación y el desarrollo de las plántulas, que se observaron, fueron la resistencia que ofreció el medio de cultivo, por su consistencia, a los embriones cuando estos emergieron de las semillas, así como la difusión en el medio de sustancias oxidantes (compuestos fenólicos), provocando la oxidación del tejido

El porcentaje de supervivencia en Algodón húmedo estéril fue del 25%. En este caso, la supervivencia de las plántulas estuvo influenciada por el genotipo de cada planta, ya que sólo sobrevivieron las más vigorosas (Figuras VI.16 y 17). Además de la capacidad de adsorción del sustrato, que no permitió la intoxicación de las plántulas por compuestos fenólicos

Gráfica VI.3 Porcentajes de germinación vs tiempo, de semillas maduras en tres diferentes sustratos



Gráfica VI.4 Porcentajes de germinación de semillas maduras y sobrevivencia *in vitro* de las plántulas obtenidas. La sobrevivencia se evaluó a la semana 18, a partir de que dio inicio la germinación



Medio de Cultivo MS (Murashige Skoog, 1962) al 50% suplementado con 0.05 mg/l de Ácido giberélico (AG3); MS 50%; Algodon humedo esteril



Figura VI.16 Plántula obtenida de la germinación de una semilla madura sobre algodón húmedo estéril.



Figura VI.17 Plántulas obtenidas de la germinación de semillas maduras sobre algodón húmedo estéril.

VI.6.3. Cultivo *in vitro* de semillas de diferentes edades

En este experimento se sembraron semillas de diferentes edades sobre algodón húmedo estéril, ya que éste resultó ser el sustrato más conveniente para la germinación de semillas. La finalidad de este experimento fue la de encontrar a que edad de las semillas, se observaba el porcentaje más alto de germinación.

Las edades de las semillas con las que se trabajó, fueron 34, 41 y 51 semanas aproximadamente. La edad de estas se registró a partir de que las flores femeninas presentaron receptividad polínica (la evidencia de esta receptividad es la apertura de la corola con la exposición de un pistilo humedecido con una gota de néctar).

En este experimento se evaluaron el porcentaje de germinación (ésta se reconoció en el momento en que el embrión fue expulsado de la semilla por el cotiledón) y la sobrevivencia *in vitro* de las plántulas obtenidas, la cual se evaluó 18 semanas después de la germinación.

a) Germinación

A la semana 22, los porcentajes de germinación fueron los siguientes: semillas de 34 semanas 10%; semillas de 41 semanas 64%, y semillas de 51 semanas 76%

Las semillas de 34 semanas no habían madurado completamente, aún cuando los frutos ya habían alcanzado la misma talla que los frutos maduros, el endospermo ya se encontraba en estado sólido y el embrión era visible

En las semillas de esta edad que germinaron, el embrión no desarrolló el epicotilo y se oxidó. En el 35% de las semillas que no germinaron, el embrión se oxidó dentro de ellas, en tanto que en el 1% el embrión fue abortado, es decir, fue expulsado de la semilla sin que se desarrollara el cotiledón, lo que significó la muerte del embrión.

Para las semillas de 41 semanas, no se presentó oxidación de los embriones dentro de las semillas, no obstante, si se obtuvo el 2% de aborto de los embriones, esto último debido a

que tanto las semillas como sus embriones aún no habían alcanzado la madurez para germinar.

El mejor porcentaje de germinación se logró con semillas de 51 semanas, lo que hace suponer que ésta es la mejor edad para la germinación. Esto resulta lógico si se considera la aparente madurez de los frutos de esta edad, que son completamente negros y el ráquiz y las raquillas son de color naranja, lo cual puede ser indicador de un cierto estado de madurez de los embriones.

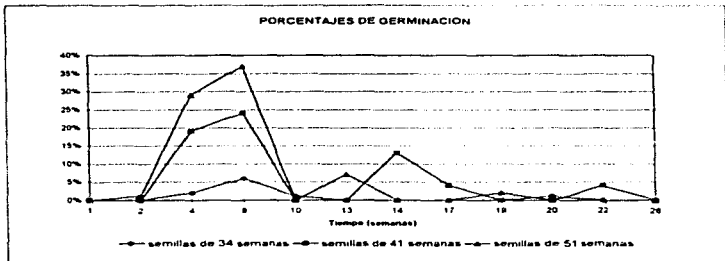
Las semillas ideales para la germinación son las que provienen de frutos maduros, ya que cuando los embriones han alcanzado su madurez en el interior de la semillas, estos adquieren la capacidad de producir las giberelinas y las citocininas necesarias para contrarrestar la acción de los inhibidores del crecimiento. En esta etapa, si las semillas cuentan con las condiciones ambientales favorables, como agua, oxígeno, temperatura y luz, germinarán.

La edad de las semillas también es un factor determinante en la germinación, pues son pocas las semillas que pueden sobrevivir durante largo tiempo.

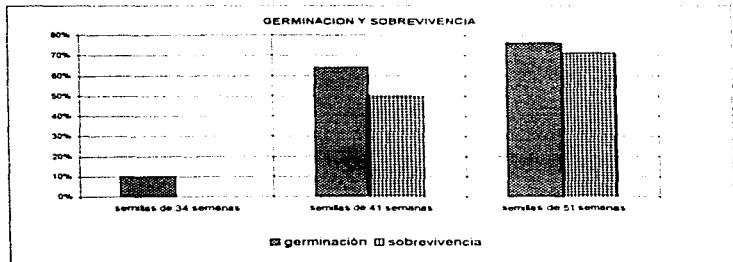
La viabilidad de las semillas de palma comedora oscila entre cuatro y seis semanas (Barba y Romero, 1993), aunque siempre hay excepciones. Las semillas que no germinaron, una vez concluido este experimento, se colocaron en macetas con plántulas de la misma especie, algunas de estas semillas, entre 10 y 12 meses después de haber sido colectadas, y sin haber sido mantenidas bajo ninguna condición especial de almacenamiento, germinaron. Aun cuando estas semillas estuvieron bajo las mismas condiciones propicias para la germinación que el resto de las semillas que sí germinaron, éstas entraron en un aparente estado de letargo (entendiéndose por letargo la incapacidad de germinar aún en condiciones ideales), que las imposibilitó para germinar de manera inmediata.

En cuanto a los tiempos de germinación, el patrón de comportamiento fue el mismo. La germinación para todas las semillas, independientemente de la edad, alcanzó su máximo porcentaje entre la cuarta y la octava semanas. Con las semillas de 51 semanas, la germinación se inició a la segunda semana (Gráfica VI.5).

Gráfica VI.5 Porcentajes de germinación vs tiempo, de semillas de diferentes edades en algodón húmedo estéril



Gráfica VI.6 Porcentajes de germinación de semillas de diferentes edades, en algodón húmedo estéril, y sobrevivencia *in vitro* de las plántulas obtenidas. La sobrevivencia se evaluó a la semana 18, a partir de que dio inicio la germinación



b) Supervivencia *in vitro*

Los porcentajes de supervivencia de los embriones que germinaron fueron los siguientes: para semillas de 34 semanas, 0%; semillas de 41 semanas, 50%; y semillas de 51 semanas, 71% (Gráfica VI.6). En las semillas de 34 semanas que germinaron, el embrión se oxidó antes de que se desarrollara el epicótilo, ya que estas no habían concluido su maduración.

La supervivencia de las plántulas provenientes de las semillas de 41 y 51 semanas de edad estuvo influenciada principalmente por el genotipo de cada planta, pues algunas de éstas no se desarrollaron vigorosamente (no formaron raíces fuertes o la primera hoja verdadera) por lo que, finalmente, no sobrevivieron. Por otra parte, en algunas de estas semillas, el embrión se oxidó antes de que se desarrollara el epicótilo.

VI.7. Cultivo *in vitro* de ápices de brote

En este experimento se trabajó con ápices de brote, de plántulas que se obtuvieron de la germinación de semillas, en condiciones asépticas. Estos inóculos fueron sembrados en un medio de cultivo MS (1962) al 100%, suplementado con 1.5 mg/l de citocinina y 0.2 mg/l de auxina.

En general, la respuesta que se obtuvo en los diferentes tratamientos fue el desarrollo normal del ápice (Figura VI.18). La concentración de las citocininas y de las auxinas, que se probaron en este experimento, no fueron suficientes para desviar al menstemo apical de su ruta morfogénica, ya que únicamente se obtuvo la regeneración de hoja, no así la de las raíces.

En este experimento todos los inóculos fueron sometidos a una lesión, al momento de aislar el ápice de brote, sin embargo el realizar el corte con el tejido sumergido en una solución de L-cisteína fría, contribuyó como preventivo de la oxidación. Los porcentajes de oxidación no fueron altos, ni fue un obstáculo para que el tejido respondiera positivamente (Cuadro VI.23).

A



B



Figure 1. (A) Larva of *Phlebotomus perniciosus* showing the characteristic curved shape and bright, curved structure. (B) Larva of *Phlebotomus perniciosus* showing the characteristic curved shape and bright, curved structure, with a distinct bright, curved structure extending from the right side.

Cuadro VI.23 Resultados en porcentaje, a la 4a semana, del experimento de ápices de brote

TRATAMIENTO	RESPUESTA	
	Desarrollo normal del ápice	Oxidación
1 (BAP + AIB)	50	50
2 (2-ip + AIB)	50	50
3 (BAP + 2,4-D)	50	50
4 (2-ip + 2,4-D)	100	0
5 (BAP + ANA)	100	0
6 (2-ip + ANA)	100	0
7 (BAP)	100	0
8 (2-ip)	50	50

Las citocininas BAP y 2-ip se probaron en la concentración de 1.5 mg/l, y las auxinas AIB, 2,4-D, y ANA de 0.2 mg/l

El esfuerzo realizado durante el desarrollo de este trabajo tiene su origen en el deseo de generar y aportar nueva información acerca de *Chamaedorea elegans* Mart., especie mexicana en peligro de extinción

Es lamentable que, en la actualidad, cuando apenas comenzamos a conocer más a fondo la flora y fauna silvestres de nuestro planeta, el ritmo acelerado con que se extinguen las especies no nos permite apreciar cuan valiosas pueden ser por sí mismas, y los posibles beneficios que pudieran aportar a la humanidad. Evitar la pérdida de la diversidad biológica del planeta es uno de los más grandes retos ambientales que tendremos que afrontar de cara al siglo XXI.

Hoy nos compete a todos reflexionar a fondo sobre la manera en que nos sostenemos a nosotros mismos, como género humano, y, al mismo tiempo, al ambiente. En suma, el reto es edificar un futuro sostenible.

VII. CONCLUSIONES

En la zona de estudio, la floración de *Chamaedorea elegans* Mart se presentó durante la mayor parte del año, esta se inicio en el mes de julio y finalizó en marzo del siguiente año, con un periodo intermedio de tres meses (abril a junio) en el que la floración se vio interrumpida

Aún cuando la palma florece casi todo el año, la fecundación de las flores sólo se llevó a cabo entre agosto y noviembre. Esto parece estar relacionado con el ciclo de vida de un posible insecto polinizador, el cual podría tener una relación simbiótica con la palma.

En *Chamaedorea elegans* Mart. el periodo de formación del fruto, desde la polinización hasta la maduración, tiene una duración aproximada de un año, razón por la cual sólo se observó una fructificación durante el año.

Las plantas en general para tener éxito en crecer y reproducirse requieren de una efectiva coordinación con el ambiente, y esto fue evidente en el ciclo de fructificación de *Chamaedorea elegans* Mart, el cual está dado de tal forma que cuando la mayoría de los frutos y, en consecuencia, las semillas alcanzaron su madurez, en la zona de estudio hay un aumento en la precipitación pluvial debido a la temporada de nortes, dándose así las condiciones favorables para la germinación.

De manera natural, tanto los embriones, al encontrarse en el interior de la semilla, como las inflorescencias inmaduras, cuando se encuentran dentro de las vainas, están libres de microorganismos que los contaminen. De esta manera, dirigiendo los tratamientos de desinfección a los tejidos superficiales, y no a los inóculos directamente, se logró obtener inóculos libres de contaminantes y sin daños provocados por el agente desinfectante.

La oxidación se controló con medidas preventivas, tales como mantener los inóculos sumergidos en una solución de L-cisteína o agua destilada estéril, frías, previo a la siembra, y evitar cualquier lesión a los inóculos.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

El papel filtro fue más efectivo que el carbón activado en el control de la oxidación. Además, a diferencia del carbón activado, el papel filtro no atrapa a los reguladores del crecimiento ni a los nutrientes, por lo que tampoco disminuye la disponibilidad de éstos en el medio de cultivo. Sin embargo, la mejor manera de controlar la oxidación es evitando lesionar el inóculo.

Las concentraciones de auxinas (1.5 mg/l) y de citocininas (0.2 mg/l) que se probaron, no fueron suficientes para modificar el desarrollo especializado de las células de los embriones y provocar otras respuestas morfológicas, a excepción del Picloram. Esto implica que la germinación de los embriones de *Chamaedorea elegans* Mart. está fuertemente determinada, es decir, el programa genético para la germinación no es fácil de romper.

Con embriones de 30 semanas se obtuvieron los porcentajes más altos de germinación; como ejemplo, tan solo con el testigo se alcanzó el 58% de germinación, además, esta se obtuvo en el mayor número de tratamientos del factorial (15 de 18). Con embriones de esta edad, en la mayoría de los tratamientos la germinación se inició a partir de la cuarta semana. Sin embargo, las plántulas que se obtuvieron, aunque vigorosas, no lo fueron tanto como las obtenidas con embriones de 41 y 51 semanas. Los embriones de mayor edad desarrollaron las plántulas más fuertes.

La germinación en embriones de diferentes edades se vio influenciada por los reguladores del crecimiento que se probaron, algunos la inhibieron, como el 2,4-D, en tanto que otros la favorecieron, como ANA, K y BAP. Sin embargo, el genotipo de cada embrión fue determinante en la germinación.

La formación de callo en embriones, de todas las edades, de *Chamaedorea elegans* Mart. se vio favorecida por el Picloram. Los porcentajes más altos (por arriba del 50%) se obtuvieron con esta auxina, además, de los callos que se obtuvieron, los que más proliferaron fueron los que se formaron a partir de embriones de 30, 41 y 51 semanas de edad bajo el efecto del Picloram.

Los inóculos provenientes de diferentes individuos, aún cuando sean de la misma especie, no cuentan con la misma plasticidad para desarrollar una respuesta morfogenética. Esto se hizo evidente en un embrión de 41 semanas que formó callo en un medio libre de reguladores del crecimiento (control). Si bien las auxinas son determinantes en la formación de callo también lo es el genotipo de cada embrión, ya que la respuesta morfogenética es dependiente del genotipo.

Al utilizar como inóculo inflorescencias inmaduras con una combinación citocinina/auxina de 1.5 mg/l / 0.2 mg/l respectivamente, se obtuvo el crecimiento de las flores y la formación de callo, el cual se desarrolló a partir del raquíz de la inflorescencia, sin lograr obtener la organogénesis. La concentración que se probó de las citocininas al parecer fue baja.

La respuesta obtenida con inflorescencias inmaduras y 1.5 mg/l de Pictoram, fue la formación de callo a partir de todas las estructuras de la inflorescencia, con la subsecuente generación de raíces. Con esta auxina fue posible la obtención de organogénesis, aún cuando la generación de raíces no era el tipo de respuesta deseada.

Los pretratamientos auxínicos con los que se formó callo, tanto con embriones de 34 como de 41 semanas, fueron los que contenían 10 mg/l y 20 mg/l de 2,4-D, respectivamente. Concentraciones mayores a los 20 mg/l de 2,4-D inhibieron toda respuesta, probablemente porque se provocó la intoxicación de los embriones.

Los pretratamientos térmicos que se probaron, particularmente con calor, con embriones de 34 semanas, sí tuvo influencia sobre la formación de callo, no así con embriones de 41 semanas, donde aparentemente los pretratamientos térmicos, no produjeron ningún estímulo determinante como para provocar un cambio en su desarrollo especializado. Sin embargo, el pretratamiento térmico, calor específicamente (32 °C durante 72 horas), que se probó con embriones de 26 semanas, favoreció la germinación y la formación de callo.

El pretratamiento auxínico que tuvo un mejor efecto en la formación de callo, en inflorescencias inmaduras, fue el de 5 mg/l de 2,4-D, en tanto que, de los pretratamientos térmicos que se probaron con inflorescencias inmaduras, los mejores resultados se obtuvieron con el pretratamiento de frío, con el que se obtuvo formación de callo en dos

tratamientos. El callo que se formó, tanto en el pretratamiento auxínico como el térmico, se originó de las flores.

En el rescate de embriones maduros se encontró que el mayor porcentaje y menor tiempo de germinación, así como las plántulas más vigorosas y, por lo tanto, el mayor porcentaje de sobrevivencia, se obtuvieron con 0.5 mg/l de ácido naftalenacético.

El sustrato en el que se obtuvo el menor tiempo de germinación de semillas, así como los porcentajes más altos de germinación, fue el algodón húmedo estéril. La edad de las semillas, en la que se alcanzó el porcentaje más alto de germinación, de las semillas que se probaron para la germinación sobre algodón húmedo estéril, fue de 51 semanas. Por lo tanto, las semillas ideales para germinar son las provenientes de frutos maduros.

En cuanto a los tiempos de germinación, el patrón de comportamiento fue el mismo para todas las semillas que se sembraron sobre algodón húmedo estéril, independientemente de su edad; la germinación alcanzó su máximo porcentaje entre la cuarta y la octava semana.

Se sabe que las semillas de *Chamaedorea elegans* Mart. no son del tipo de semillas que presenten un estadio de dormancia y mucho menos que entren en letargo, sin embargo, las semillas que estuvieron bajo condiciones propicias para la germinación y que no germinaron, después de 10 y 12 meses de haber sido colocadas en macetas con plántulas de la misma especie y sin haber sido mantenidas bajo ninguna condición especial de almacenamiento, germinaron. Estas semillas entraron en un aparente estado de letargo.

Al utilizar como inoculo ápices de brote con una combinación citocinina/auxina de 1.5 mg/l / 0.2 mg/l respectivamente, se obtuvo el desarrollo normal del ápice y la formación de hojas, sin lograr obtener la brotación múltiple. La concentración que se probó de las citocininas al parecer fue baja.

VIII. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con *Chamaedorea elegans* Mart. demostraron que la utilización de embriones cigóticos como inóculos es una opción con mucho potencial en la búsqueda de embriogénesis somática. Sin embargo las inflorescencias inmaduras se muestran como una alternativa en la búsqueda de organogénesis somática.

La implantación de un sistema de embriogénesis somática se ha convertido, en la actualidad, en un proceso estadístico. Partiendo de los resultados positivos obtenidos en un primer ensayo, es posible disminuir el número de tratamientos a probar y, a su vez, intensificar la siembra (aumentando el número de embriones cigóticos por tratamiento), así como manipular genomas diferentes dentro de la misma especie (poblaciones distintas), lo anterior aumenta sensiblemente las posibilidades de éxito en el establecimiento del sistema deseado.

Con base en lo anterior, es recomendable que se retomen los resultados favorables obtenidos en este trabajo y se utilicen solo los mejores tratamientos con una mayor cantidad de inóculos (embriones cigóticos), así como con una mayor variabilidad de fuentes de germoplasma, no solo entre individuos sino también entre poblaciones, pero sin perder nunca de vista la fuente, ya que no hay que olvidar que es una especie en peligro de extinción.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, A.R.I. 1986 El genero *Chamaedorea* Willd (Palmae) en el estado de Veracruz. Tesis profesional Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Veracruzana. Xalapa, Ver. 138 pp.
- Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. En: Handbook of Plant Cell Culture, Ed.: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Amirato, Y. Yamada Vol. 1: Techniques for Propagation and Breeding MacMillan Publishing Company New York
- Anas, M.O y Huete, V.F. 1983 Propagación Vegetativa *in vitro* de Pejibaye (*Bactris gasipaes* H B K.) Turnaliba, 33 (2) 103-108
- Bajaj, Y.P.S. 1983 In Vitro Production of Haploids. En: Handbook of Plant Cell Culture, Ed.: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Amirato, Y. Yamada Vol 1 Techniques for Propagation and Breeding MacMillan Publishing Company New York
- Blake, J. y Eeuwens, 1981 Culture of Coconut Palm Tissues with a view to Vegetative Propagation p 145-148
- Balboa, J. 1987 Ganancias Exorbitantes con la Deforestación en la Lacandona, La Jornada 18 de Junio Mexico p. 6
- Barba, A.A. y Luna, R.S. 1990 Rescate de Especies Vegetales en Vías de Extinción. El cultivo de Tejidos como una Alternativa En Cuadernos ENEP-Zaragoza, serie Biología, Vol 1 Conservación Ecológica p 39-42
- Barba, A.A. y Romero A.J. 1993 La palma Camedor, Historia natural y cultivo Facultad de Estudios Superiores Zaragoza-U N A M Mexico D.F. 145 pp
- Becerni, O.J. 1995 "Ontogenia de la Flor Pistilada de *Chamaedorea elegans* Mart. (PALMAE)." Tesis Profesional Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Mexico D.F. 77 pp
- Bidwell, R.G.S. 1993 Fisiología Vegetal AGT Editor, S.A. Primera edición, México, D.F. 784 pp
- Dra, N. and Benbadis, A. 1985 Vegetative Multiplication of Date-Palm (*Phoenix dactylifera* L.) by Reversion of *In Vitro* Cultured Female Flower Buds. J. Plant Physiol. 199: 227-235.
- Euwens, C.J. 1976 Mineral Requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum 36 23-28
- Fernández, O.A.A. 1993 Estudio Bioquímico Durante la Fase de Inducción del Proceso de Embriogénesis Somática en Alfalfa (*Medicago Sativa* L.). Tesis de Licenciatura, UNAM-FES-Zaragoza. Mexico D.F. 97 pp.

- Gautheret, R. J. 1982. Plant Tissue Culture: The History. Proc. 5 th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. p. 7-11.
- George, E.F. y Sherrington, P.D. 1984. Plant Growth Regulators. En: Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories, Great Britain. p. 285-323.
- Gonzalez, P.C. 1985. Los Recursos Naturales en Poder de las Transnacionales Macpaixochitl. Publicación de la Sociedad Botánica de México. No. 112.
- Henderson, A. 1986. A Review of Pollination Studies in the Palmae. The Botanical Review. 52(3): 221-259.
- Hodel, D.R. 1992. *Chamaedorea palms*. The species and their cultivation. The International Palm Society, USA. p. 36-40.
- Hu, C. y Wang, P. 1986. Embryo Culture: Technique and Applications. En: Evans, D.A., Sharp, W. R. y Ammirato, P.V., 1986. Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 4. Techniques and Applications. McMillan Co. p. 43-96.
- IUCN Botanic Gardens Conservation Secretariat. 1988. Rare and Threatened Palms of the New World. Questionnaire and Preliminary Report on their Occurrence in Botanic Gardens.
- Kumar, F., Raju, C.R., Chandramohan, M. e Iyer, R.D. 1985. Induction and Maintenance of Frable Callus from the Cellular Endosperm of *Cocos nucifera*. L. Hort. Science. 40. 203-307.
- Karunaratne, S., Periyapperuma, K. 1989. Culture of immature embryos of coconut, *Cocos nucifera* L. callus proliferation and somatic embryogenesis. Plant Science 62 (2) 247-253.
- Kovoor, A. 1981. Palm Tissue Culture: state of the art and its application to the coconut. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 69 pp.
- Ludden, P. y Carlson P.S. 1980. Use of plant Cell Cultures in Biochemistry. En: The Biochemistry of Plant. Vol. 1. Academic Press, Inc. 62-65.
- Moore, H. E. 1973. The major groups of palms and their distribution. Gentes Herbarum. 11(2): 27-141.
- Moore, H. E. y N. W. Uhl. 1982. Major trends of evolution in palms. The Botanical Review. 48(1). 1-89.
- Murashige, T., y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.
- Nwankwo, B. A. y Krikorian, A. D. 1986. Morphogenetic Potential of Embryo - and Seedling - Derived Callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc. Ann. Bot. 51: 65-76.

- Oyama, N.A.K. 1987. Demografía y Dinámica Poblacional de *Chamaedorea tepejilote* Liebm. Tesis de Maestría UNAM México D.F. 222 pp.
- Reynolds, J.F. 1979. Morphogenesis of palms *in vitro*. *In vitro* 15:210 (Abstr.).
- Reynolds, J.F. y Murashige, T. 1979. Asexual Embryogenesis in Callus Cultures of Palms. *In vitro* 15 (5): 383-387.
- Romero, A.J. 1990. Cultivo *in vitro* de tres Especies de Palma Camedor (*Chamaedorea* spp.). Tesis Profesional Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, UNAM, México D.F. 140 pp
- Rose, J.B., Dunwell, J.M. y Sunderland, N. 1986. Anther culture of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. I. Effect of panicle pretreatment, anther incubation temperature and 2,4-D concentration. *Plant Cell Tissue Culture* 6 (1): 15-22
- Saldivia, G.T. y Cherbonnier, CH. 1982. De la recolección silvestre al cultivo de la palma camedor. Perspectivas de su aprovechamiento. En: Alternativas para el Uso del Suelo en áreas forestales del trópico húmedo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, SFF, SARH México D.F. Tomo 5 (38): 47-73
- Tisserat, B. 1983. Tissue Culture of Date Palms -A New Method to Propagate and Ancient Crop- and A Short Discussion of the California Date Industry Principles. 27 (3): 105-117.
- Tisserat, B. 1984. Date Palm. En: Handbook of Plant Cell Culture. Ed.: D.A. Evans, W.R. Sharp and Y. Yamada. MacMillan Publishing Company, New York. Vol. 2: 505-545
- Toledo, V.M. 1988. La diversidad biológica de México. Ciencia y Desarrollo XIV (81): 17-30.
- Tomlinson, P.B. 1990. The Structural Biology of Palms. Oxford University Press, New York. USA. 477 pp
- Villegas, T. L. 1991. Embriogénesis somática en *Medicago sativa* L. y la fisiología de su desarrollo. Tesis Doctoral. E N C B - I P N. México, D.F.
- Vosters, J. 1975. Comercial use of *Chamaedorea elegans*. Principes, 19: 149-150.
- Vovides, A.P. 1981. Lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción. Biotica. 6 (2): 219-228.
- Wareing, P.F. and T. Al-Chalabi. 1985. Determination in plant cell. *Biologia Plantarum*, 27 (4-7): 241-248.

APENDICE I. Componentes nutricionales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

MACRONUTRIENTES

	Concentración (mg/l)
MgSO ₄	370.0
NH ₄ NO ₃	1650.0
KNO ₃	1900.0
KH ₂ PO ₄	170.0

MICRONUTRIENTES

H ₃ BO ₄	6.2
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.5
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
KI	0.88
CoCL ₂	0.25
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
MnSO ₄ H ₂ O	18.9

VITAMINAS

Glicina	2.0
Acido nicotnico	0.5
Piridoxina HCL (B ₆)	0.5
Tiamina HCL (B ₁)	1.0
Mio-inositol	100.0