

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Instituto de Ciencias Agrícolas



**EVALUACIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL
PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES DE
PALMA DATILERA (*Phoenix dactylifera*) var. Deglet Nour**

TESIS
QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOTECNÓLOGO AGROPECUARIO

PRESENTAN

**EDGARD ALLAN PAZOS INDA
SEBASTIÁN RODRÍGUEZ GARCÍA**

DIRECTOR
DR. DAGOBERTO DURÁN HERNÁNDEZ

Mexicali, Baja California.

Febrero de 2019.

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, bajo la supervisión del Dr. Dagoberto Durán Hernández.

AGRADECIMIENTOS

Por este medio, Sebastián Rodríguez García y Allan Pazos Inda, les agradecemos el apoyo incondicional a todos los que nos orientaron en cada una de las etapas del nuestro trabajo de investigación, al director de tesis Dr. Dagoberto Duran Hernández, que nos tuvo la paciencia, confianza y nos asesoró para terminar la tesis.

Estamos felices y agradecidos con todos los profesores que tuvimos en el transcurso de la carrera porque nos transmitieron un poquito de sus conocimientos y nos hicieron mejores personas, contribuyeron para que llegáramos a la meta.

A los integrantes del comité evaluador por formar parte de esta etapa, además de apoyar con la revisión de nuestra investigación y hacer las observaciones para mejorar nuestro trabajo.

Asimismo les damos las gracias a nuestros compañeros y amigos de clase que nos apoyaron y que además hicieron que estos años de estudio fueran interesantes, divertidos y vivimos muchos momentos que serán inolvidables por estos amigos, Gustavo Contreras Covarrubias, Paulo Leal Orozco, Juan Pedro Pérez Pérez, Josué Armenta Cuevas, Saúl Castro López y Jorge Mora Rodríguez.

A mi compañero Sebastián Rodríguez García por la tolerancia, responsabilidad, paciencia y la firmeza durante toda la realización de esta investigación, sin tu compromiso y apoyo, no lo hubiera logrado.

Le doy las gracias a Dios y mi eterna gratitud al Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA) y a la Universidad Autónoma De Baja California (UABC) por permitirnos formar parte de esta nueva carrera y darnos el apoyo incondicional para la realización de mi Ser. Somos orgullosamente, Cimarrones.

Un agradecimiento especial para el Dr. Roberto Soto Ortiz por haber creado, promovido y estructurado la Carrera de Ingeniero Biotecnólogo Agropecuario, a la Dra. Cristina Ruiz Alvarado, directora del ICA y al profesor Víctor Alberto Cárdenas Salazar, encargado del área de las palmas en el Instituto, por facilitarnos el material vegetal para llevar a cabo la investigación.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, por todo su apoyo, sacrificio, amor, consejos, esfuerzo, confianza en todo momento, ya que sin ellos no me hubiese sido posible cumplir con esta meta, por siempre estar conmigo en todo momento y ser lo mejor en mi vida.

A dios, por ser mi guía, permitir realizar lo que me propongo y nunca soltar de mi mano en buenos y malos momentos. A mi novia, por su apoyo, amor, consejos y paciencia en todo el proceso de mi preparación profesional y ser alguien fundamental en mi vida.

Al Dr. Dagoberto Durán Hernández por ser un gran profesor, amigo, consejero, y guiarnos en tan importante proceso.

A mis profesores, Ana Laura Lara, Olivia Tzintzun, Noemí Torrentera, Lourdes Cervantes, Claudia Yared M., Carlos Cecéña Durán, Daniel Gonzales M., Jesús A. Román C., Onésimo Grimaldo J., por su forma de transmitir su conocimiento y su gran apoyo.

A Dios por llenarme con su amor y su inquebrantable voluntad hasta el último momento en esta etapa de mi vida.

A mis padres y hermana, por estar siempre a mí lado apoyándome físico, emocional, mental y espiritualmente en todos los momentos de mi carrera. A mis abuelas, tíos, tías, primos y primas por los grandes consejos que siempre me brindaron.

Al Dr. Dagoberto Durán Hernández, Dr. Daniel González Mendoza y a la Dra. Olivia Tzintzun Camacho por brindarnos a mi compañero de tesis Sebastián Rodríguez García y a mí todo su apoyo, consejos y guía; por ser grandes profesores y amigos.

A mis profesores, Ana Laura Lara, Noemí Torrentera, Lourdes Cervantes, Claudia Yared M., Carlos Ceceña Durán, Jesús A. Román C., Onésimo Grimaldo J., Lázaro Sandoval Álvarez, Adriana Trejo Morales, Dolores Rojas Barboza, Luis Antonio González Anguiano por su forma de transmitir su conocimiento y su gran apoyo.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	I
Dedicatoria.....	II
Índice general.....	III
Lista de tablas.....	V
Lista de figuras.....	V
Lista de símbolos.....	VII
Glosario.....	VIII
Resumen.....	IX
Abstract.....	X

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1	Clasificación taxonómica.....	3
2.2	Morfología.....	5
2.3	Historia de la palma datilera.....	7
2.4	Variedades de Palma datilera.....	7
2.5	Producción a nivel mundial.....	8
2.6	Producción a nivel nacional.....	9
2.7	Condiciones Edafológicas y Climatológicas para el cultivo.....	11
2.8	Propagación de <i>Phoenix dactylifera</i>	13
2.9	Propagación <i>in vitro</i> de <i>Phoenix dactylifera</i>	13
2.9.1	Embriogénesis somática.....	15
2.9.2	Organogénesis.....	17
2.9.3	Medio de cultivo y su función.....	18
2.9.4	Reguladores de crecimiento.....	20
3	JUSTIFICACIÓN.....	21
4	HIPÓTESIS.....	22
5	OBJETIVOS.....	23
5.1	Objetivo general.....	23
5.2	Objetivo específico.....	23
6	MATERIALES Y METODOS	
6.1	Obtención de material vegetal.....	23
6.2	Medio de cultivo.....	24
6.3	Desinfección de explantes.....	25

6.4	Siembra de explantes.....	26
6.5	Inducción de callo.....	27
6.6	Tratamientos.....	28
6.7	Análisis estadístico.....	28
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
7.1	Características de los callos y oxidación en el cultivo de palma datilera.....	29
7.2	Contaminación en el cultivo de palma datilera.....	33
7.3	Formación de callos de meristemo apical de palma datilera.....	35
8	CONCLUSIÓN	44
9	PERSPECTIVAS	45
10	BIBLIOGRAFÍA	46
11	ANEXOS	54

LISTA DE TABLAS

Número de Cuadro	Título	Página
1	Detalles de la producción datilera en México en el 2015. (SIAP, 2016).....	11
2	Explantes y reguladores de crecimiento utilizados en las diferentes etapas durante la embriogénesis somática (ES) de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	21
3	Porcentaje de pérdida por oxidación y contaminación en los tratamientos, con explantes de meristemo apical de palma datilera variedad Deglet Nour. Medias con diferente literal son estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).....	34
4	Formación de callos de segmentos de meristemo apical de hijuelos de palma datilera variedad Deglet Nour, como respuesta a los diferentes reguladores de crecimiento evaluados. Medias con diferente literal son estadísticamente diferentes	

($p < 0.05$).....

43

LISTA DE FIGURAS

Número de Figura	Título	Página
1	Clasificación taxonómica de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	4
2	Diagrama de <i>Phoenix dactylifera</i> (f) fuente: archivo USDA. a) Hoja; b) inflorescencia masculina, c) fruto; d) fruto sección longitudinal; e) semilla. (Galán y Castroviejo, 2008).	6
3	Limites extremos: 10° N y 39° N Áreas favorable: 24° N y 34° N (FAO, 2003).....	8
4	Producción mundial de dátil desde 1961 (FAO, 2003).....	9
5	Principales Países productores de dátil a nivel mundial. Fuente: FAO (2003).....	9
6	Producción datilera en México en las últimas dos décadas, expresada en toneladas (1995-2015), (SIAP, 2016).....	10
7	Esquema de los dos tipos de embriogénesis somática en el cafeto: embriogénesis somática directa o de baja frecuencia y embriogénesis somática indirecta o de alta frecuencia (Etienne <i>et al.</i> , 1999).....	17
8	Corte de hojas de hijuelo de <i>Phoenix dactylifera</i> L., de la variedad Deglet Nour.....	24
9	Siembra de explantes de meristemo apical de palma datilera variedad Deglet Nour en campana de flujo laminar.....	27
10	Tratamientos de explantes de meristemo apical de palma datilera variedad Deglet Nour.....	27

11	Formación de callos de explantes de meristemo apical de hijuelos de palma datilera variedad Deglet Nour, fotos tomadas a los 6 meses de la siembra. A) Imagen del tratamiento 6 y B) tratamiento 2.....	30
12	Formación de callo: C) Tratamiento 2, la flecha indica explante de color marrón. D) Tratamiento 5, explantes sin contaminación. Los explantes son de meristemo apical de hijuelos de palma datilera variedad Deglet Nour, fotos tomadas a los 6 meses de la siembra.....	32
13	Callos de explantes de meristemo apical de hijuelos de palma datilera variedad Deglet Nour, fotos del tratamiento 6 (E) y (F) flecha verde: explantes oxidados; Flecha azul: inducción de raíces y Flecha amarilla: callos embriogénicos, a los 6 meses de la siembra.....	38
14	Callos de explantes de meristemo apical de hijuelos de palma datilera variedad Deglet Nour, (G) tratamiento 2 y 5 (H): flecha amarilla: callos embriogénicos sin problemas de oxidación. Flecha azul: Callos con raíces, después de 6 meses de la siembra.....	40
15	Imágenes de callos embriogénicos de cuatro tratamientos en el segundo medio de cultivo: I y H, tratamiento 2; K, tratamiento 5; L, tratamiento 1; M tratamiento 3; N tratamiento 6, después de 4 meses de la siembra.....	43

LISTA DE SÍMBOLOS O NOMENCLATURA

MS	Murashige &Skoog
RCV	Reguladores de Crecimiento Vegetal
ANA	Ácido 1-Naftalenacético
BAP	6-Bencilaminopurina
2-4,D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Kin	Kinetina
AG ₃	Ácido Giberélico
AA	Ácido Ascórbico
CA	Carbón Activado
AC	Ácido Cítrico
PVP	Polivinilpirrodilona
ADE	Agua Destilada Estéril
g·L ⁻¹	Gramo sobre litro
mg·L ⁻¹	Miligramo sobre litro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
°F	Grados Fahrenheit
Lb	Libra
UV	Ultra violeta
pH	Potencial de hidrógeno
FAO	Food and Agriculture Organization
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SEFOA	Secretaría de Fomento Agropecuario

GLOSARIO

Callo	Masa desorganizada de células vegetales.
Embriogénesis somática	embriones somáticos tanto a partir de células de explantes (embriogénesis directa) como a partir de callo (embriogénesis indirecta)Proceso de formación de embriones.
Explante	Fragmento de una planta que se escinde y se prepara de forma aséptica para su cultivo in vitro en un medio nutritivo.
Embrión somático	Embrión neoforado (diferenciado de <i>novo</i>) a partir de tejidos somáticos. Desde el punto de vista ontogénico, el embrión somático sigue todas las fases del embrión zigótico, aunque sin fecundación.
Meristemo apical	Meristemo situado en el ápice del tallo (meristemo apical del tallo) o de la raíz (meristemo apical de la raíz), responsable del crecimiento primario de las plantas.
Monocotiledóneas	Clase de angiospermas que se caracterizan por poseer un embrión con un solo cotiledón, así como raíces secundarias y adventicias, que no poseen crecimiento secundario en grosor, y hojas casi siempre sésiles y de nerviación paralela.
Morfogénesis	Desarrollo (génesis) de la forma. Para muchos autores es sinónimo de desarrollo.

RESUMEN

El cultivo de la palma datilera es de gran importancia económica y ecológica en las zonas áridas y existe demanda de plantas de palma datilera en el Valle de Mexicali, B.C., México. Se propuso en este estudio cultivar *in vitro* la palma datilera variedad Deglet Nour vía embriogénesis somática. Se extrajo el meristemo apical del hijuelo, previa desinfección se cortó en segmentos de 5 mm de diámetro y se sembró en medio de cultivo MS completo, complementado con 8 g/L de agar; 30 g/L de sacarosa; 100 mg/L de Myoinositol; 3 g/L de carbón activado; se realizaron 6 tratamientos, un tratamiento con (10 mg L⁻¹) de ácido 1-Naftalenacético (ANA) y 5 tratamientos combinando tres RCV con (1 y 0.5 mg L⁻¹) de (ANA), ácido giberélico (AG₃), 6-Bencilaminopurina (BAP), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2-4, D) y Kinetina (Kin), cada tratamiento con 5 réplicas y 4 explantes como unidad experimental. Empleando fotoperiodos de 16 horas luz y ocho de oscuridad durante seis meses. Transcurrido este tiempo se contaron los explantes que formaron callos y los que se perdieron por oxidación o contaminación por microorganismos patógenos. Al medio para multiplicación no se le agregó carbón activado y se complementó con 0.5 mg l⁻¹ (ANA y BAP).

Los datos de los tratamientos fueron sometidos a análisis de varianza y mediante la prueba de Tukey (p<0.05), se hizo la comparación de medias. El tratamiento 6, 2 y 5 compuestos con MS + 0.5 mg/L (2-4,D, Kin y AG₃); MS + 1 mg/L (ANA, BAP y AG₃); MS + 0.5 mg/L (ANA, Kin y AG₃) se obtuvo 51, 42 y 36% de formación de callo embriogénico, mientras que en el subcultivo, solo el 30% de los callos sembrados no se contaminó y están desarrollándose los embriones. Este estudio demostró que los segmentos de meristemo apical de *P. dactylifera* variedad Deglet Nour y los RCV utilizados en bajas concentraciones tuvieron un efecto positivo en la formación de callo embriogénico en todos los tratamientos, sin embargo, la pérdida de los explantes por oxidación y contaminación, afectó el cultivo. Por lo que se tiene que buscar alternativas eficaces para evitar la contaminación y oxidación en los subcultivos.

Palabras claves: explantes, meristemo apical, embriogénesis somática, reguladores de crecimiento vegetal

ABSTRACT.

Date palm cultivation is of economic and ecological importance in arid zones and there is demand for these plants in the Mexicali Valley, BC, Mexico. It was proposed in this study to cultivate *in vitro* the date palm variety Deglet Noor through somatic embryogenesis. The apical meristem was extracted, after disinfection, cut into 5 mm diameter segments and seeded in complete MS culture medium, supplemented with 8 g/L of agar; 30 g/L sucrose; 100 mg/L of Mioinositol; 3 g/L activated charcoal; 6 treatments were performed, one treatment with (10 mg/L) of 1-Naphthaleneacetic acid (ANA) and 5 treatments combining with three RCV; 1 and 0.5 mg/L of (ANA), giberellic acid (AG3), 6-Benzylaminopurine (BAP), 2,4-diclorofenoxiacetic acid (2-4, D) and Kinetin (Kin), each treatment with 5 replicates and 4 explants as an experimental unit. Employing photoperiods of 16 light hours and eight of dark for six months. After this time, explants that formed calluses and those that were lost by oxidation or contamination by pathogenic microorganisms were counted. Activated charcoal was not added to the medium for multiplication and was supplemented with 0.5 mg/L (ANA and BAP).

The data obtained from the treatments were subjected to an analysis of variance and, using the Tukey test ($p < 0.05$), the comparison of means was made. Treatment 6, 2 and 5 compounds with MS + 0.5 mg/L (2-4, D, Kin and AG3); MS + 1 mg/L (ANA, BAP and AG3); MS + 0.5 mg/L (ANA, Kin and AG3) obtained 51, 42 and 36% of embryogenic callus formation, while in the subculture, only 30% of the planted calluses were not contaminated and the embryos are developing. This study showed that the segments of apical meristem of *P. dactylifera* Deglet Noor variety and the RCV used in low concentrations had a positive effect on the formation of embryogenic callus in all treatments, however, the loss of explants by oxidation and contamination, affect the cultivation. So you have to look for effective alternatives to avoid contamination and oxidation in subcultures.

Key words: explants, apical meristem, somatic embryogenesis, plant growth regulators

1. INTRODUCCIÓN

La palma datilera es cultivada en regiones áridas donde conforman la vegetación característica de los oasis (Bendadis, 1992), actualmente se cultiva en diferentes partes del mundo donde las condiciones son favorables (Zaid, 2002). El cultivo es de gran importancia en casi todas las regiones desérticas, son una fuente importante de alimento y de ingresos de las comunidades rurales, además, contribuyen a la economía nacional (FAO, 2004).

Existe poca información documentada acerca del origen geográfico de la palma datilera, Rivera *et al.* (1997), sugieren que podría corresponder a un grupo de micoespecies, dispersas y aisladas entre sí en los *uadis*, ramblas y riberas fluviales entre la región que comprende el noreste de África y la península Arábiga donde fue domesticada y mezclada a lo largo de milenios. En ese sentido, Chao y Krueger (2007) comentan que el dátil sirvió de alimento en las regiones desérticas y contribuyó a que existieran los largos viajes de las caravanas por el desierto.

En la actualidad, la palma datilera se cultiva tanto en el Viejo Mundo como en el Nuevo Mundo con fines comerciales en grandes cantidades (Zaid y De Wet, 2002). En el continente americano, la producción exitosa de dátiles maduros sólo es posible en las regiones áridas de Perú, Chile, Baja California (México) y el suroeste de EE.UU, entre otras ciudades (Rivera *et al.*, 2013). El fruto es fuente de carbohidratos, fibra, aminoácidos y de las vitaminas A, B1, y B2, y minerales como hierro, potasio, calcio, cloro, cobre, magnesio, azufre, fósforo. Además, las palmeras han sido eficaces para el control de la

desertificación y la recuperación de tierras en la Península Arábiga (Chao y Krueger, 2007).

Por lo antes expuesto, el cultivo de palmas datileras tiene un gran potencial en el valle de Mexicali, B.C. y sus alrededores donde se concentra una gran actividad agrícola, entre los cultivos que se destacan son el trigo (*Triticum spp.*), el algodón (*Gossypium herbaceum*), la alfalfa (*Medicago sativa*), cártamo (*Carthamustinctorius*) y sorgo (*Sorghumvulgare P.*), (Morales *et al.*, 2016).

Algunos de los problemas que se presentan en los suelos agrícolas son el incremento de sales, afectando los cultivos tradicionales de la zona, por lo que se buscan alternativas de otros cultivos. En este sentido, la palma datilera (*P. dactylifera*) puede desarrollarse en suelos salinos, con un clima cálido seco y sobrevive con poca agua (Morales *et al.*, 2016).

Uno de los mayores obstáculos que enfrentan los agricultores interesados en el cultivo de palma datilera en el Valle de Mexicali, es la falta de material vegetal para la producción masiva de dátil. Cabe destacar que la palma *P. dactylifera* L. se propaga de manera natural por medio de semillas e hijuelos (reproducción sexual y asexual), en el primer caso, existe un 50% de probabilidad de que estas sean machos o hembras, en el segundo caso, el hijuelo será del mismo sexo de la palma madre, sin embargo, es un proceso tardado (Zaid y de Wet, 2002). Por otro lado, existen técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* que presentan ventajas en comparación con las técnicas anteriores. Comprende un grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte de un vegetal) se cultiva asépticamente en un medio de composición conocida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Roca y

Mroginski, 1993).

La regeneración de plantas por medio de la organogénesis o de embriogénesis somática se ha utilizado como alternativa en los métodos de propagación (Roca y Mroginski, 1993). Sin embargo, la micropropagación vía organogénesis demanda muchos recursos y las tasas de multiplicación son limitas (Von Arnold *et al.*, 2002).

En cambio, la propagación vía embriogénesis somática (ES) es un proceso por el cual las células somáticas vegetales se diferencian en embriones, obtenido un número variable de embriones. Los embriones somáticos siguen las mismas etapas de desarrollo que los embriones cigóticos, se parecen en la morfología y fisiológicamente, pero no son producto de la fecundación (Von Arnold *et al.*, 2002) En los dos casos exhiben polaridad apical-basal y radial, poseen un brote primario, meristemo de raíz y contienen los órganos embrionarios típicos de radícula, hipocótilo y cotiledones (Mordhorst *et al.*, 2002). La importancia de los embriones somáticos es su aplicación en propagación vegetativa a gran escala (Von Arnold *et al.*, 2002).

Algunos de los beneficios que trae el cultivo de la palma datilera a las comunidades locales y al ambiente, son una fuente de trabajo. Asimismo, las plantaciones de palma proveen sombra y protección contra el viento, creando microambientes que se pueden aprovechar para el cultivo de vegetales que se cultivan en la región.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Clasificación taxonómica

El nombre científico de la palma datilera es *Phoenix dactylifera* L., proviene del fenicio "fénix" y del griego "daktulos", que significan palmera y dedo respectivamente (por la forma de los dátiles). Existe otra teoría sobre el origen de su nombre científico, hace referencia a la legendaria ave de Egipto, "Phoenix", al igual que el fénix la palma datilera volverá a crecer después del fuego (Van Zyl, 1983).

Clasificación taxonómicamente de la palma datilera (Figura 1)

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Orden: Arecales
Familia: Arecaceae
Género: *Phoenix*
Especie: *Phoenix dactylifera* L.



Figura 1. Clasificación taxonómica de *Phoenix dactylifera* L. (USDA, NRCS. 2018)
Fotógrafo: Gustavo Romero Acosta tomada de (http://eol.org/data_objects/28668971)

En la revisión de Barrow (1998), al género *Phoenix* le atribuyen 13 especies, sin embargo, la especie más conocida es *Phoenix dactylifera* L., de las que se conocen al menos 600 variedades cultivadas (Morton, 1987).

Probablemente el progenitor de *Phoenix dactylifera* debe haber hibridizado naturalmente con otras especies silvestres, como se muestra en los siguientes casos, en África las palmas cultivadas *P. reclinata* en el Este con *P. atlantica* en el Noreste; En India y Pakistán, *P. dactylifera* es infértil con *P. silvestris*; en España y Norte de África *P. dactylifera* hibridiza con *P. canariensis* (Oudejens 1979; citado en Benbadis 1992). Por su largo ciclo de vida, la genética de la palma datilera es poco conocida. La especie es diploide

($2n = 36$) y no posee cromosomas heteromórficos que representen cromosomas sexuales (Benbadis 1992).

2.2 Morfología

Las palmas datileras son una monocotiledónea, heterocigota, dioica estricta, lo que significa que hay palmas masculina y femeninas (Eke *et al.*, 2005) llegan a medir 25 m a 30 m de altura, las hojas son pinnadas de 6 m de longitud con folíolos de 30 a 40 cm de longitud de color verde-azulado miden hasta 2 m de largo, (Hoyos y Braun, 2001). En su parte inferior hay espinas duras de hasta unos veinte centímetros, en algunas variedades (Zaid y Wet, 2002), las hojas se renuevan cada 3 a 7 años (Del Cañizo, 1991), debido a que pierden la funcionalidad después de 4 años para realizar la fotosíntesis (Nixon y Wedding, 1956). Las Inflorescencias se producen en la axila de una hoja de un año de edad (Orwa *et al.*, 2009) y miden hasta 2 m de largo (Hoyos y Braun, 2001), la inflorescencia en sus primeras etapas está encerrada en la espata que las protege del calor y se abre cuando las flores maduran para la polinización, la flores cuelgan en un pedúnculo o raquis estrecho, cada espiguilla lleva 8000 a 10000 flores en palmas femeninas y más en las masculinas (Zaid y De Wet, 2002; Chao y Krueger, 2007). Las inflorescencia masculinas son de color crema y femeninas amarillas, usualmente polinizadas por el viento y producen una gran cantidad de bayas monospermas oblongasovoides de 3 a 9 cm de longitud (**Figura 2 a**), con pulpa carnosa, dulce y la semilla es alargada con un surco longitudinal profundo (**Figura 2 b**).

La palma datilera comienza a producir dátiles entre los 4 a 6 años de edad y alcanza su máxima producción a los 15 a 20 años, produce de 40 a 100 kg de fruta al año y su

tamaño del fruto puede variar por el ambiente, además, el mal manejo o falta de productos agronómicos afectarían la producción (Chao y Krueger, 2007).

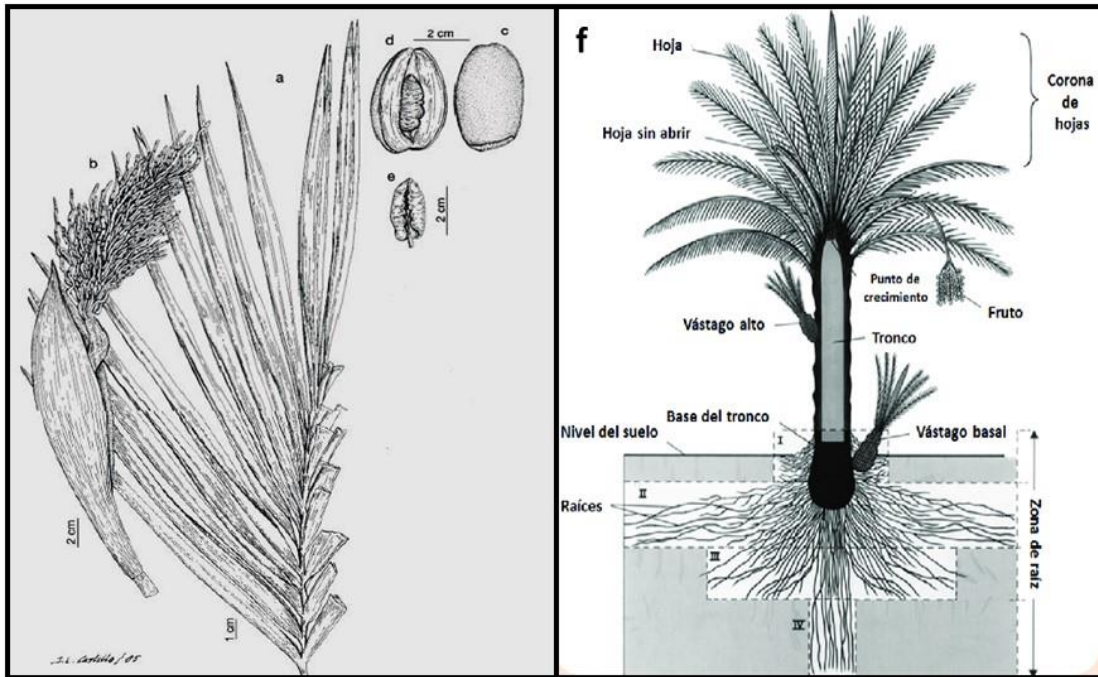


Figura 2. Diagrama de *Phoenix dactylifera* (f) fuente: archivo USDA. a) Hoja; b) inflorescencia masculina, c) fruto; d) fruto sección longitudinal; e) semilla. (Galán y Castroviejo, 2008).

En la **Figura 2 f** se muestra el diagrama de la palma datilera destacando un sistema radicular fasciculado y fibroso. Cabe destacar que, las características del suelo determinan la profundidad que alcanzaran las raíces, en suelos de textura limosa llegan hasta 2 m de profundidad y 2 m a ambos lados de la entre hilera, lo que permite a la palma utilizar la humedad del subsuelo, característica de las especies resistente al déficit hídrico y a las condiciones de sequía (Zaid y de Wet, 2002).

Por otro lado, el tallo o estípote de la palmera es vertical, cilíndrico y presenta el mismo grosor en todo su largo, en los primeros años se encuentra cubierto por la base de hojas

secas, con el tiempo caen dejando a la vista un tallo suave, la altura que alcanza depende de la variedad, una palmera adulta puede superar los 20 m (Del Cañizo, 1991). Por su parte, Tamaro (1981) indica que la planta cuando ha alcanzado 15 años de edad, emite brotes en la base, que se utilizan para la propagación.

2.3 Historia de la palma datilera

La palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) es una de las plantas cultivadas más antiguas (Riad, 2016). Se menciona que fue domesticada en Mesopotamia 3000 a.C. (Nixon y Carpener, 1978).

Debido a su alto valor nutricional, productividad y la larga vida útil de las palmas datileras (100 años), se le ha denominado el "árbol de la vida". La palma datilera es un cultivo multipropósito, se considera una herencia nacional en muchos países. Proporcionan alimentos, refugio y se usa toda la palma para elaborar diferentes productos (Alabdulhadi *et al.*, 2004).

2.4 Variedades de Palma datilera

Las variedades que predominan comercialmente, en Arabia Saudita son: Khudari, Nabbut-Al-Seif, Sullaj, Sukai, Maktumi, Sultana, Sagra, Nabtat Al, Shabibi, Barni, Rabiaa, Safari y Shalabi. En Iraq las principales variedades son: Yahidi, Hallawi, Sayer, Maktoom, Salva, Sukkari, Khustawai. Mientras que en Egipto son: Kabrabe y Khustawai, por su parte en Marruecos, la variedad Medjool es la de mayor importancia comercial y en Estados Unidos de América son: Deglet Nour, Zahidi, Khadrawy, Halawy, Medjool (Sidhu, 2006).

Cada variedad es única y se deriva de una semilla única, clonada y multiplicada vegetativamente (Jaradat y Zaid, 2004).

2.5 Producción a nivel mundial

La zona privilegiada para el cultivo de la palma datilera a nivel comercial, está comprendida dentro de un cinturón geográfico entre las coordenadas 24°N y 34°N (**Figura 3**) (Abdelouauhab y Arias-Jiménez, 1999), donde se ubican los países productores de dátil con la mayor producción, en el año 2013 fue de 7 189 789 toneladas de dátiles (**Figura 4**) (FAO, 2003)

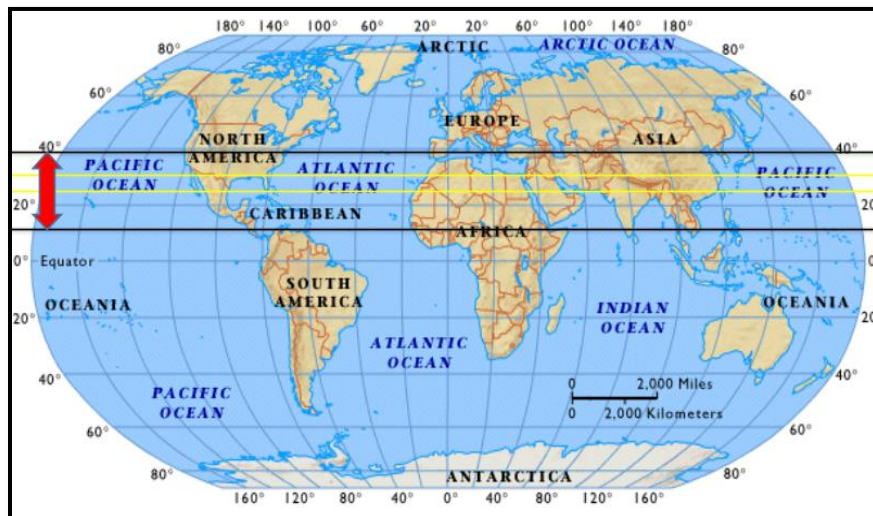


Figura 3: Límites extremos: 10° N y 39° N y Áreas favorable: 24° N y 34° N (FAO, 2003).

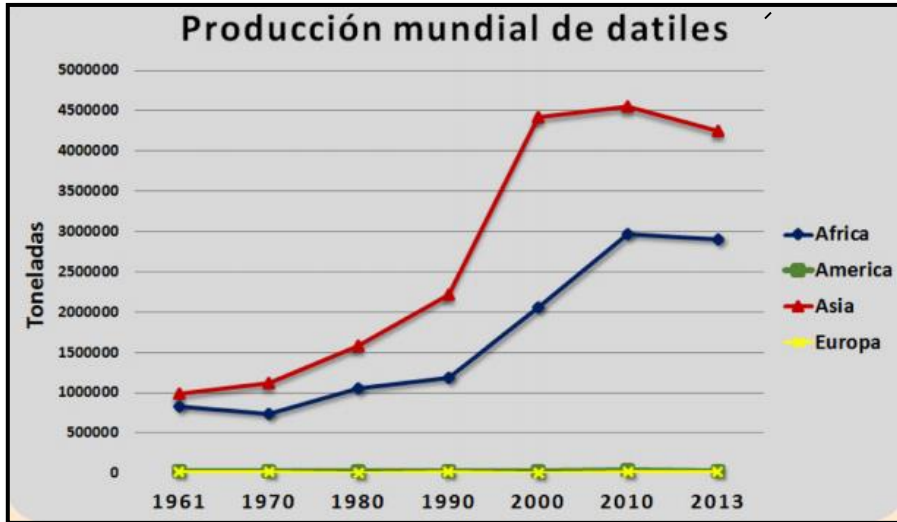


Figura 4: Producción mundial de dátil desde 1961 (FAO, 2003).

Los principales países productores de dátil en el mundo son: Egipto, Irán, Arabia Saudita, Argelia, Irak, Pakistán, Omán, Emiratos Árabes Unidos, Túnez y Libia, los cuales representan una producción mundial del 91.6% (**Figura 5**). Mientras que América y Europa fue del 0.4% y 0.2% respectivamente, en el mismo año (FAO, 2003).

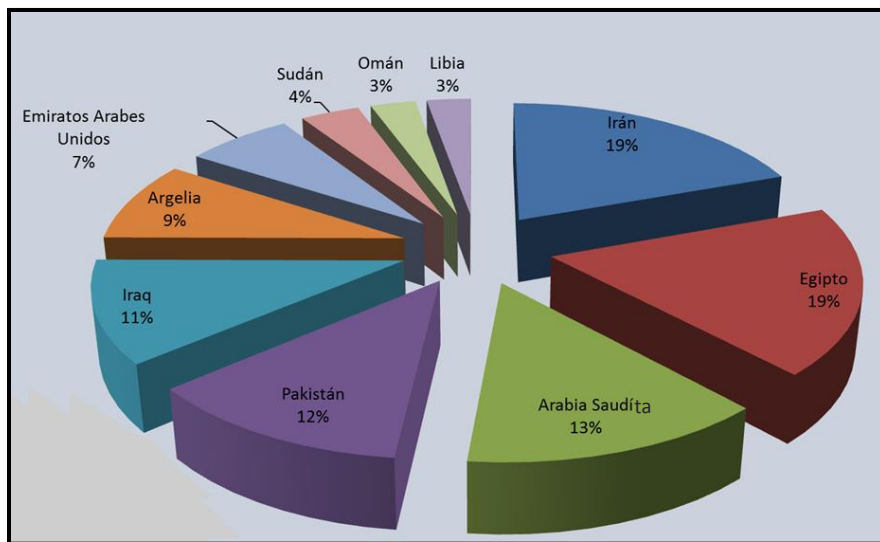


Figura 5: Principales países productores de dátil a nivel mundial. Fuente: FAO (2003).

2.6 Producción a nivel nacional

El cultivo de la palma datilera fue introducido en México durante el periodo Virreinal Español a finales del siglo XVI y mediados del XVII por los misioneros Jesuitas, en sus periodos de evangelización. Actualmente, existen 15 misiones en la Península de Baja California (De Grenade, 2013). De acuerdo con datos del SIAP, la palma datilera se cultiva principalmente en los Municipios de San Luis Río Colorado, Altar y Caborca en Sonora, Mexicali, Comundú, Mulegé, en Baja California y en La Paz, Baja California Sur y Viesca, Coahuila (**Figura 6**) (SIAP, 2016).

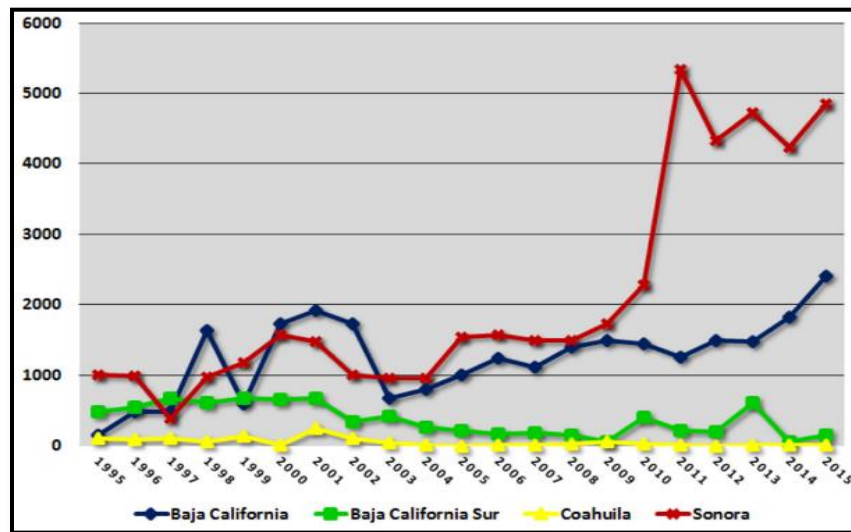


Figura 6: Producción datilera en México en las últimas dos décadas, expresada en toneladas (1995-2015), (SIAP, 2016).

En México, el dátil se ha convertido en un cultivo de alta prioridad, teniendo una producción en el 2015 de 7 427.10 toneladas (**Cuadro 1**), siendo el segundo mayor productor de América, después de Estados Unidos (FAO, 2016).

Los principales regiones en donde se cultiva el dátil en México son San Luis Río Colorado, Sonora y Mexicali, Baja California (**Cuadro 1**), contribuyendo con el 97% de la

producción datilera total en México (SIAP, 2016). Los agricultores tienen preferencia por la variedad Medjool porque el fruto es de mayor tamaño. Sin embargo, la variedad Deglet Nour también se cultiva, su fruto es de menor tamaño y se distingue por su tacto suave, color claro translúcido y el sabor a miel que lo distinguen de las otras palmas (Ben Mya *et al.*, 2016).

La industria datilera en México es muy pequeña en comparación con los grandes productores de este fruto, su producción se ha incrementado en un 300% durante los últimos 20 años (FAO, 2016). Las empresas mexicanas productoras de dátil, se han organizado para mejorar sus técnicas de cultivo, elevando los rendimientos e incrementado las superficies de siembra, logrando en el 2015 una producción de 1 940.25 hectáreas sembradas, con un valor de producción de 326, 239.35 millones de pesos (SIAP, 2016).

Cuadro 1: Detalles de la producción datilera en México en el 2015 (SIAP, 2016).

Estado	Municipio	Superficie sembrada	Superficie cosechada (Ha)	Producción (Toneladas)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor de Producción (Miles de pesos)
Baja California	Mexicali	668.25	303.00	2411.84	7.96	57,826.65	139,468.62
Baja California Sur	Comondú	112.00	121.00	128.26	1.06	40,000.00	5,130.40
Baja California Sur	La Paz	22.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Baja California Sur	Mulegé	204.50	14.50	29.00	2.00	35 627.59	1 033.20
Coahuila	Viesca	15.00	5.00	12.60	2.52	38 000.00	478.80
Sonora	Altar	2.00	2.00	10.40	5.20	39 500.00	410.80
Sonora	Caborca	7.00	7.00	35.00	5.00	40 500.00	1 417.50
Sonora	San Luis Río Colorado	900.00	600.00	4800.00	8.00	37 145.84	178 300.02
Totales		1940.25	1052.50	7427.10	7.06	43 925.54	326 239.35

2.7 Condiciones Edafológicas y Climatológicas para el cultivo.

La palma datilera (*P. dactylifera*) se cultiva principalmente en zonas áridas y semiáridas, donde los veranos son largos y calurosos, sin precipitaciones y la humedad relativa es baja, toleran temperaturas superiores a los 50 °C. Mientras que en invierno toleran temperaturas de 0 °C superficie (Zaid y de Wet, 2002). El umbral de crecimiento de la palmera datilera es a 7°C, alcanzando el máximo a los 32 ° C, cuando llega a 38-40 °C continua estable. Sin embargo, a temperaturas superiores comienza a disminuir su producción (Zaid y de Wet, 2002).

El cultivo de palma datilera se desarrolla en diferentes tipos de suelo, desde un suelo arenoso hasta uno de arcilla con capacidad de drenaje (Klein y Zaid, 2002). Los suelos salinos son comunes en las plantaciones de dátiles y se caracterizan por una alta concentración de sales solubles y sodio intercambiable, en comparación con otros frutales, la palmera datilera tiene tolerancia a las sales (Arar, 1975).

Aún cuando las palmeras soportan largos periodos de sequía a altas temperaturas, se requiere agua y fertilizantes para que las plantas estén sanas y den frutos de calidad. Al respecto, Abdul-Baki *et al.* (2002) informan que el riego por inundación es la forma más antigua y todavía se usa, actualmente, se riega con aspersores, microaspersores y por goteo, en las plantaciones recientes.

En cuanto a la fertilización Nixon y Carpenter, (1978) comentan que las palmeras son fertilizadas, aunque en muchos casos solo con nitrógeno. Probablemente depende del cultivar, las características físicas –químicas del suelo y otros factores. Tradicionalmente

los productores de dátil usan estiércol en los suelos y consideran que es superior a los fertilizantes inorgánicos (Chao y Krueger, 2007).

2.8 Propagación de *Phoenix dactylifera*

La palma datilera se propaga por medio de semillas (sexual) y asexual de manera vegetativa. La propagación con semillas, es útil para la reproducción del cultivo, sin embargo, es un método inadecuado para la propagación de la palma datilera ya que no es posible por esta vía obtener plantas idénticas. Debido a su diversidad, las semillas sólo pueden ser útiles para fines de mejoramiento genético, tales como calidad de la fruta, tolerancia a la lluvia o salinidad (Zaid y de Wet, 2002).

Mientras que la propagación por hijuelos, es otra forma de obtener plantas. Los hijuelos se desarrollan a partir de yemas axilares en el tronco de la planta madre, este se separa y producirá fruta de la misma calidad que la palma madre. Así se asegura la uniformidad de los productos.

A continuación se mencionan algunas desventajas de la propagación por hijuelos, la palma datilera da un número limitado de hijuelos que va de 20 hasta 30 como máximo, durante el ciclo de vida de la palma (Zaid y de Wet, 2002). Los hijuelos se extraen de la planta madre con la mayor proporción de rizomas posibles, cuando éstos han alcanzado un diámetro de 25 cm como mínimo (Soler, 1993). A pesar de que se produce un alto número de hijuelos por palma, sólo tres o cuatro son adecuados para plantar (Zaid y de Wet, 2002). En este sentido, Nixon y Carpenter (1978) sugieren que esto varía en función de la

variedad y el manejo que se realice. Por otro lado, Asemota *et al.* (2007) afirman que incluso algunos genotipos de palma de dátil nunca producen hijos basales.

Sin embargo, esta metodología permite mantener la pureza varietal, el sexo de la planta, y la producción de fruta de 2 a 3 años antes que las semillas. La propagación de hijuelos es una técnica laboriosa y no logra satisfacer las necesidades de la demanda vegetal; además, podría promover la dispersión de plagas y enfermedades (Zaid y de Wet, 2002).

2.9 Propagación *in vitro* de *Phoenix dactylifera*

La propagación convencional (asexual y sexual) produce cantidades insuficientes de plantas de palma datilera (Von Arnold *et al.*, 2002). La biotecnología ha proporcionado una alternativa para satisfacer la demanda de plantas en las últimas décadas, con las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se han clonado palmas de importancia económica (coco, palma aceitera y palmera datilera) (Al Kaabi *et al.*, 2001).

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende un grupo de técnicas mediante las cuales un explante (tejido vegetal), se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas, la aplicación de estas técnicas, ha permitido avances en estudios de fisiología, genética, bioquímica, obtención de plantas libres de patógenos, propagación de plantas y conservación e intercambio de germoplasma (Roca y Mroginski, 1993). El objetivo de la propagación de plantas vía cultivo de tejido, conocido como micropropagación, es propagar plantas genéticamente idénticas a la planta madre, que se escoge por su vigor (Neuman, 2006; George *et al.*,

2008). Con un sólo explante se puede multiplicar en miles de plantas en condiciones controladas, independientemente de la estación y el tiempo del año (Hussain *et al.*, 2012).

En la actualidad, la regeneración de plantas es a través del cultivo *in vitro* mediante la técnica de embriogénesis somática y organogénesis. (Roca y Mroginski, 1993). En los dos casos, puede ser directa o indirecta, va pender de los reguladores de crecimiento.

2.9.1 Embriogénesis somática

La técnica de embriogénesis somática (ES) es una de las posibles vías morfogénicas, es un proceso de regeneración que implica la formación de embriones a partir de células somáticas vegetales (Von Arnold *et al.*, 2002), sus etapas de desarrollo tiene similitud a las de los embriones cigóticos. Sin embargo, los embriones somáticos, no son producto de la fusión de gametos (Roca et al., 1993). El éxito de la técnica depende de la totipotencia de las células vegetales para regenerar plantas a partir de células en cultivos *in vitro* (Hussain *et al.*, 2012). A continuación se mencionan los dos tipos embriogénesis somática, (Evans et al., 1981; Ammirato, 1986).

Directa: se forma un embrión directamente de una célula o tejido sin formación previa de callo, las células a partir de las cuales se desarrolla el embrión se llaman células pre-embriónicas determinadas, un ejemplo, es el tejido de las especies de *Citrus*, que tienen una tendencia a la poliembriónia.

Indirecta: en este tipo de embriogénesis se forma un callo del que se pueden formar embriones posteriormente. Las células de las que surge el embrión se llaman células determinadas embriogénicamente y forman embriones cuando son inducidas a hacerlo. Con este tipo de embriogénesis, las células del explante deben pasar por un proceso en el cual se multiplican sin diferenciarse y posteriormente inducirlos a diferenciarse como células embriogénicas después de la división celular. Las auxinas y algunas veces las citoquininas, son de gran importancia en este proceso, un ejemplo de esta embriogénesis son los explantes de hojas de *Coffea arabica*.

El proceso de regeneración de diferentes especies de plantas, así como de las palmas, es mediante embriogénesis somática (ES) en las cuales existen variaciones: en los medios de cultivo, la elección de los reguladores de crecimiento y las condiciones en las que se establece el cultivo de tejidos (Von Arnold *et al.*, 2002). Se han observado detalles morfológicos que han revelado la existencia de cuatro fases: 0, 1, 2, y 3 las cuales pueden ser reconocidas desde los estados tempranos de la embriogénesis, descritos por Fujimura y Komanine (1980) en *Daucus carota* L. (zanahoria). En ese sentido, Newton *et al.* (1994) reporta las siguientes fases para la regeneración por embriogénesis somática: 1) Inducción tejido embrionario; 2) Proliferación del cultivo embrionario; 3) maduración del embrión somático y 4) Germinación del embrión somático. Mientras que para las monocotiledóneas reportan solo tres fases: 0, 1, y 2, pues no se diferencian las etapas de corazón y torpedo (etapa 3), sino que el embrión globular sufre un proceso de transición en el cual se alarga hasta llegar a formarse el embrión maduro, pasando por las etapas de escutelar y coleoptilar (Fujimura y Komanine, 1980). En este sentido, Ammirato (1983) comenta que después de las diferentes etapas mencionadas de la embriogénesis somática, se logra una

propagación a gran escala de las plantas seleccionadas. En la **Figura 7** se ejemplifican los dos tipos de embriogénesis somática.

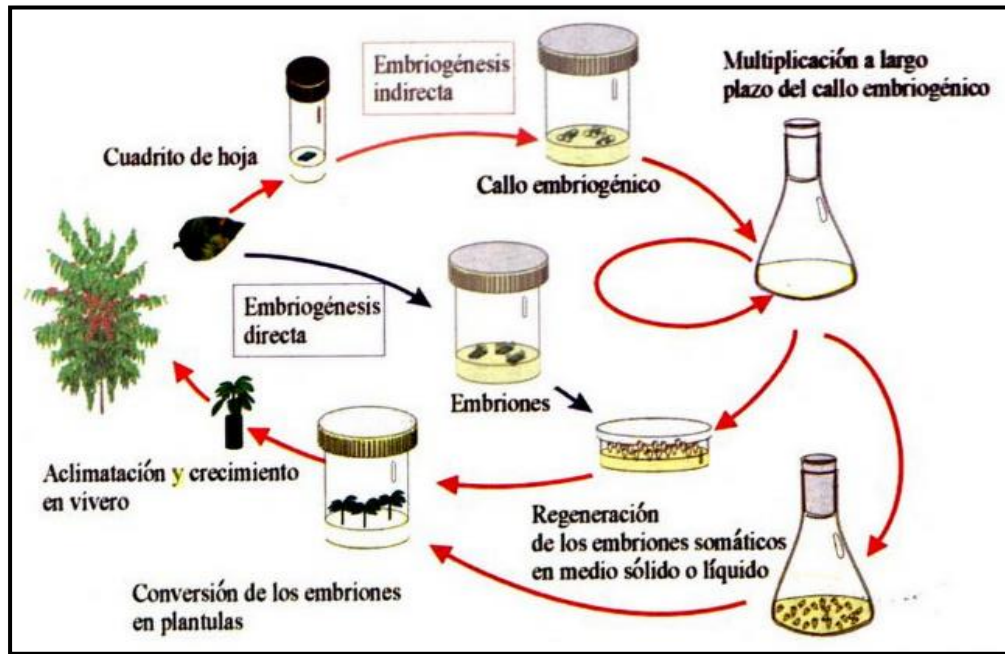


Figura 7. Esquema de los dos tipos de embriogénesis somática en el café: embriogénesis somática directa o de baja frecuencia y embriogénesis somática indirecta o de alta frecuencia (Etienne *et al.*, 1999).

2.9.2 Organogénesis

La técnica de organogénesis es la segunda vía de morfogénesis para la regeneración de plantas que ocurre de forma directa o indirecta a partir de explantes cultivados *in vitro*, que puede ocurrir de manera directa, en la que los explantes forman raíces, tejido u órganos y de forma indirecta, los explantes forman callos que posteriormente formarán brotes en un medio con baja relación de auxina/citoquinina (Tabares *et al.*, 2004; Huang *et*

al., 2002; Popielarska *et al.*, 2005). La técnica de la organogénesis consta de cuatro etapas: iniciación de brotes vegetativos; multiplicación de yemas; elongación y enraizamiento.

El éxito depende en gran medida del primer paso (iniciación). La mayoría de los problemas en las etapas siguientes (multiplicación, elongación, enraizamiento) pueden tener su origen en la fase de iniciación (Zaid y de Wet, 1999). Cada etapa de la organogénesis puede ser tratada con una variedad de reguladores de crecimiento como IAA, ANA y BAP, entre otros. (Mott y Amerson, 1981).

Una vez finalizado el proceso de producción masiva de plantas *in vitro* por medio de embriogénesis somática u organogénesis, se lleva a cabo un proceso de aclimatación de las plantas; sin embargo, al llevarlas a campo algunas plantas mueren. (Zaid y de Wet, 2002).

2.9.3 Medio de cultivo y su función

Los medios de cultivo acuosos o semisólidos contienen los nutrientes necesarios para que las células o tejidos vegetales y/o animales crezcan y se dividan (Calva-Calva y Pérez – Vargas, 2005). En la actualidad, la composición de los medios es conocida, como es el caso del medio de Murashige & Skoog MS (**Anexo 1**), y están constituidos básicamente por: nutrientes inorgánicos, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, vitaminas y reguladores del crecimiento que *in vivo* son sintetizados por una parte u órgano de la planta para luego ser transportados a otros órganos donde se metabolizan y/o acumulan (Seabrook, 1980; Yasuda *et al.*, 1972).

En ese sentido, Perea y Tirado, (2011) comentan que los medios de cultivo deben ser muy parecidos a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural y los micronutrientes adicionados al medio de cultivo son en forma de sales, los cuales son utilizados por las células como cofactores enzimáticos; las fuentes de nitrógeno más comunes son el nitrato y amonio, pero también se han utilizado urea, hidrolizado de caseína, extracto de levadura y aminoácidos, entre otros. La fuente de carbono más empleada es la sacarosa o glucosa y en menor grado la maltosa, galactosa, almidón y melaza (Murashige y Skoog 1962; Shenk y Hildebrandt, 1972).

Las fitohormonas se pueden dividir principalmente en auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides, poliaminas, ácido jasmónico y el ácido salicílico (Calva-Calva y Pérez –Vargas, 2005).

Las auxinas y giberelinas promueven el alargamiento celular pero inhiben la diferenciación, mientras que las citocininas estimulan la división mediante la cual se producen nuevas células y pueden también evitar el envejecimiento celular, mientras que el etileno estimula la maduración de los frutos, y el ácido abscísico inhibe la acción de las auxinas, giberelinas y citocininas operando como sistema de defensa natural contra efectos de estrés fisiológicos (Calva-Calva y Pérez –Vargas, 2005).

La formulación del medio de cultivo cambia de acuerdo con los objetivos de la investigación, no existe un medio universal para todos los propósitos, este se modifica.

Algunos factores químicos como la composición del medio, pH y factores físicos como la temperatura, fotoperiodo, humedad y contaminación, afectan el desarrollo de los cultivos

in vitro (Castillo, 2004), cuando estas variables son controladas, se logra el éxito de los cultivos.

2.9.4 Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento que se utilizan en el cultivo *in vitro*, son una parte fundamental, la elección y la cantidad que se incorporan al medio, tendrá que estar en equilibrio con los explantes que están bajo el influjo de reguladores de crecimiento endógenos como exógenos y el balance de estos es el que determina el resultado final (Viñas y Jiménez, 2011). Las fitohormonas más usadas en cultivos de células vegetales son las auxinas para inducir callo con potencial embriogénico. En el **Cuadro 2** se observa una recopilación de los tipos de explantes y los reguladores de crecimiento vegetal utilizados para la embriogénesis somática de *Phoenix dactylifera* L. (Viñas y Jiménez, 2011).

De las fitohormonas más utilizadas son el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para la inducción y mantenimiento de tejido calloso debido a que suprime severamente la organogénesis; mientras que las citocininas, la más activa es la 2-indolaminopurina (2iP). Sin embargo, las más utilizadas en cultivo de células vegetales son la 6-bencilaminopurina (BAP) (Aitchison *et al.*, 1977, Street, 1969 y 1977, Crozier *et al.*, 2000), la cual puede retrasar la senescencia foliar de varias especies (Gan y Amasino, 1996), reduciendo la degradación de pigmentos, de proteínas fotosintéticas y membranas cloroplásticas y manteniendo el equilibrio hídrico del tejido (Dangl *et al.*, 2000).

Cuadro 2. Explantes y reguladores de crecimiento utilizados en las diferentes etapas durante la embriogénesis somática (ES) en *Phoenix dactylifera* L.

Explante	Etapa de la embriogénesis somática						Referencia
	Callo Pro embriogénico		Desarrollo Pro embriogénico		Desarrollo de Embriones		
	Nombre	Concentración (µM)	Nombre	Concentración (µM)	Nombre	Concentración (µM)	
Ápice	2,4-D	453	ANA	54	Sin información disponible		Al-Khayri (2001)
	2ip	15	2ip	7			
Inflorescencias	2,4-D	45,2	2,4-D	4,5			Al-Khayri (2005, 2007)
Hojas	2,4-D	2,3	2,4-D	4,5			
Ápice	2,4-D	452,5	ANA	53,7			
	2ip	14,8	2ip	29,5			
Ápice, Primordio foliar, Yema axilar	2,4-D	452,5	ANA	0,54	ANA	0,54	Badawy <i>et al.</i> (2005)
	2ip	14,8	2ip	9,8	2ip	14,8	
Ápice	2,4-D	453	ANA	0,54	ANA	0,27-0,54	Eke <i>et al.</i> (2005)
	2ip	15	2ip	24,6	2ip	4,9	
Hojas	2,4-D	45,2	2,4-D	0,45	ABA	3,8	Othmani <i>et al.</i> (2009)

3. JUSTIFICACIÓN

Las palmas datileras se encuentran clasificadas dentro de la familia *Arecaceae* con una gran variedad de palmas y se distribuyen en zonas semiáridas o desérticas donde las temperaturas oscilan de 0 °C hasta 50 °C, llegan a vivir más de 100 años y sus frutos han sido una fuente de alimento para las personas y los animales de las zonas desérticas. Además, el consumo de esta fruta aporta carbohidratos, fibra y otros compuestos que lo hacen un fruto de gran importancia para su cultivo y su consumo.

En México la palma datilera se cultiva principalmente en el valle de Mexicali, B.C. y San Luis, Rio Colorado, Sonora. Su cultivo es de gran importancia económica y ecológica en estas zonas desérticas donde los suelos son salinos, la temperatura cambia drásticamente, y casi no llueve. En este sentido, la agricultura busca plantas que puedan cultivarse en estas condiciones para producir alimento para su población y se exporte para que los agricultores

obtengan mayores recursos económicos de sus cultivos. Otros de los benéficos que trae consigo el cultivo de palma en estas regiones es reforestar, proteger el suelo de la erosión, dar sombra y refugio a otros cultivos y a organismos de la vida silvestre, protegiendo así el ambiente.

En la actualidad, la palma datilera es uno de los cultivos más populares, se han sembrado 1,700 hectáreas y la demanda por este cultivo aumenta cada año. Sin embargo, el establecimiento del cultivo es caro y complicado, la propagación se lleva a cabo por medio de hijuelos, y cada uno cuesta \$1000 a 1600 pesos, los cuales presentan un alto porcentaje de mortalidad, además, no se cuenta con un control fitosanitario de los hijuelos.

Por lo tanto, se buscan alternativas para obtener palmas sanas y disminuir los costos de estas a través del cultivo *in vitro* con meristemos apicales de *P. dactylifera* L. mediante la micropropagación vía embriogénesis somática para obtener embriones con las características deseadas de la palma datilera madre, de donde se sacó el hijuelo.

4. HIPOTESIS

Con la formulación adecuada de los reguladores de crecimiento vegetal en el medio de cultivo se esperaría inducir la formación de callos embriogénicos con la capacidad de desarrollar raíces, brotes y finalmente convertirse en plántulas a partir de explantes del meristemo apical de hijuelos de la palma datilera.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Promover la inducción de callos a partir de explantes de meristemo apical de hijuelos de palma datilera *P. dactylifera* variedad Deglet Nour.

5.2 Objetivo específico.

- Evaluar la formación de callos en el medio MS con el uso de distintos reguladores de crecimiento vegetal en distintas concentraciones e identificar con cual medio se induce mayor porcentaje de callos de palma datilera *P. dactylifera* variedad Deglet Nour.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Obtención de material vegetal

Para la presente investigación se utilizó como material de estudio hijuelos de *Phoenix dactylifera* L., de la variedad Deglet Nour, cultivados en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicado en el ejido Nuevo León.

Como primera medida se seleccionó la palma datilera madre y se le extrajo el hijuelo con ayuda de una pala y un machete, evitando dañar a la palma.

Al hijuelo se le removieron todas las hojas con el peciolo y raíces con un machete (**Figura 8**), en seguida se trasladó al Laboratorio de Cultivo de tejidos vegetales para quitar el tejido externo del tronco hasta llegar al meristemo apical. Con un bisturí no. 10 se cortaron segmentos de aproximadamente 5 mm de diámetro y 3 mm de altura.



Figura 8: Corte de hojas del hijuelo de *Phoenix dactylifera* L., de la variedad Deglet Nour

6.2 Medio de cultivo

Debido a lo recalcitrante que es la palma *Phoenix dactylifera* L., de la variedad Deglet Nour y el bajo porcentaje de formación de callo embriogénico que se logra sin RCV, se contemplaron seis tratamientos con bajas concentraciones de estas, para su micropropagación vía embriogénesis somática secundaria.

El medio de cultivo base estuvo compuesto por 8 g/L de agar, 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de Myoinositol, 300 mg/L de Carbón Activado (CA), y la concentración de sales minerales de Murashige y Skoog (1962) al 100 %, disueltos en agua destilada estéril (ADE).

Los reguladores de crecimiento empleados fueron: ácido 1-Naftalenacético (ANA), 6-Bencilaminopurina (BAP), ácido giberélico (AG3), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2-4, D), Kinetina (Kin).

A los seis meses de la siembra de los explantes de meristemo apical de cada uno de los tratamientos, los callos sanos se pasaron al segundo medio de cultivo, se colocó un callo por frasco. El segundo medio de cultivo base, no contenía carbón activado y se formuló con los mismos compuestos que el primer medio base y se siguió el mismo procedimiento en su elaboración. Los RCV que se adicionaron fueron 0.5 mg l^{-1} (ANA y BAP).

En cada uno de los tratamientos el pH se ajustó a 5.7 con KOH y/o HCl 0.1 N, con un potenciómetro se verificó el ajuste, antes de adicionar el agar.

Una vez preparado el medio de cultivo se vertió 30 mL en cada unidad experimental (frasco de vidrio de 90 mL) y se taparon con tapas de polipropileno. Enseguida, los frascos de todos los tratamientos se sometieron a un periodo de esterilización en autoclave All American 75X, por 20 minutos a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y 15 libras de presión.

Posteriormente se colocaron los frascos en una mesa de laboratorio y se rotularon con el número de tratamiento que le correspondía y se dejaron 3 días a temperatura, con la finalidad de corroborar su esterilidad.

6.3 Desinfección de explantes

En un vaso de precipitado de un litro se adicionaron 50 mL de jabón líquido comercial y 450 mL de agua, los segmentos del meristemo apical se sumergieron y se dejaron agitar durante 10 minutos, posteriormente se llevó a la campana de flujo laminar para evitar contaminación. Cabe destacar que la campana fue limpiada con una solución de etanol al 70 % (v/v), y se encendió el ventilador para permitir el flujo del aire. Dentro de la campana de flujo laminar, se realizaron tres lavados de los meristemos de acuerdo con el siguiente procedimiento: los explantes se sumergieron en una solución de etanol al 70 % (v/v) durante 30 segundos. Después los explantes se dejaron en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex) al 10 % (v/v) durante 10 minutos y se realizaron tres enjuagues con ADE para eliminar el cloro.

6.4 Siembra de explantes

Cabe destacar que para la siembra de los explantes, se trabajó en condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar (Ulbrecht DCB-1200V), la cual fue previamente esterilizada con etanol al 70% (v/v) y con luz UV durante 15 minutos.

Los frascos se limpiaron previamente con etanol para evitar introducir algún patógeno a la cámara de flujo laminar. En seguida se sembraron cuatro segmentos de una talla de 5 mm de diámetro y 3 mm de altura, en cada frasco (**Figura 9**), distribuyéndolos de manera equidistante en el medio (**Figura 10**).

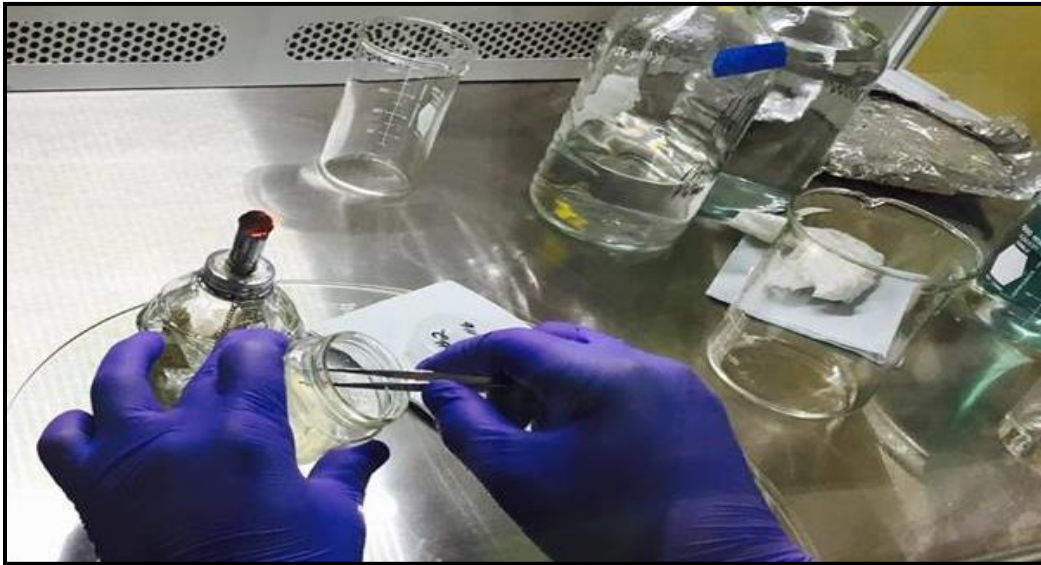


Figura 9: Siembra de explantes de meristemo apical de palma datilera variedad Deglet Nour en campana de flujo laminar.



Figura 10: Tratamientos de explantes de meristemo apical de palma datilera variedad Deglet Nour.

6.5 Inducción de callo

Los tratamientos se incubaron en una cámara de crecimiento y mantuvieron a una temperatura de 25 °C y se probaron dos fotoperiodos durante la incubación de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, durante 6 meses. Semanalmente se revisaron y observaron con una lupa los explantes de cada tratamiento, sin sacarlos de los frascos, hasta finalizar la

parte experimental. Se contaron los explantes que formaron callos y los que no lo formaron (sin importar si fue por oxidación o contaminación por microorganismos), en cada uno de los tratamientos para cuantificar el porcentaje de formación de callo y porcentaje de pérdida de los explantes.

6.6 Tratamientos

En esta investigación se trabajó con seis tratamientos con un medio de cultivo base y una combinación de reguladores de crecimiento de auxinas, citoquininas y giberelinas, además, un antioxidante. Para inducir la formación de callo a partir de los explantes de meristemo apical de hijuelos de palma datilera variedad Deglet Nour. Cada uno de los tratamientos con 5 réplicas. La unidad experimental fue cuatro explantes por frasco.

Tratamiento 1: 10 mg/L de ANA

Tratamiento 2: 1 mg/L de ANA, BAP y AG₃

Tratamiento 3: 1 mg/L de 2,4-D, Kin y AG₃

Tratamiento 4: 0.5 mg/L de ANA, BAP y AG₃

Tratamiento 5: 0.5 mg/L ANA, Kin y AG₃

Tratamiento 6: 0.5 mg/L 2,4-D, Kin y AG₃

6.7 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando el programa de Diseños Experimentales de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL), versión 2.1 (Olivares, 1990). Se realizó un análisis de varianza de los datos y se empleó un diseño de bloques completamente al azar. Mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$), se

realizó la comparación de medias. Los datos porcentuales de las pruebas se transformaron a una distribución normal empleando la ecuación $y = \arcsin(x)^{1/2}$, donde “y” = dato transformado y “x”= dato porcentual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Características de callos y oxidación en el cultivo de palma datilera

La embriogénesis somática es la vía más utilizada para la producción masiva de plantas con las características deseadas y así formar cultivares de plantas sanas (Calva-Calva y Pérez –Vargas, 2005). Mediante la embriogénesis indirecta, se induce la formación callos embriogénicos que se diferencian formando embriones somáticos, sin embargo, durante el cultivo de los explantes de palma datilera, se presentan altos niveles de oxidación y contaminación, que generan pérdidas considerables (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012).

En esta investigación se utilizaron seis tratamientos, para evaluar su efecto en los explantes de meristemo apical de hijuelos de palma datilera *P. dactylifera* variedad Deglet Nour. A partir de los 45 días de la siembra de los segmentos, se observó el incremento del tejido vegetal y en algunas partes del tejido se formaron pequeñas agrupaciones de unas estructuras como perlititas, sobresaliendo del tejido, a medida que transcurrió el tiempo se incrementaron dichas estructuras con una apariencia lisa y transparente dándole una apariencia irregular al tejido. Como se observa en la **Figura 11 A y B**, se presentaron diferentes tonalidades que van de color blanco, posteriormente, color crema, color verde claro, en algunas partes de la masa callosa. Con estas observaciones consideramos que los

explantos al inicio recibieron un estímulo por los reguladores de crecimiento que contenía el medio y los que contenía el tejido, lo cual promovió la división celular hasta llegar a formar una masa de callos embriogénicos de un color crema ya no con la apariencia vidriosa, como en la fase inicial. Además, las estructuras como perlititas se veían unas más grandes que otras, por lo que consideramos que la masa callosa estaba en diferentes fases de desarrollo.

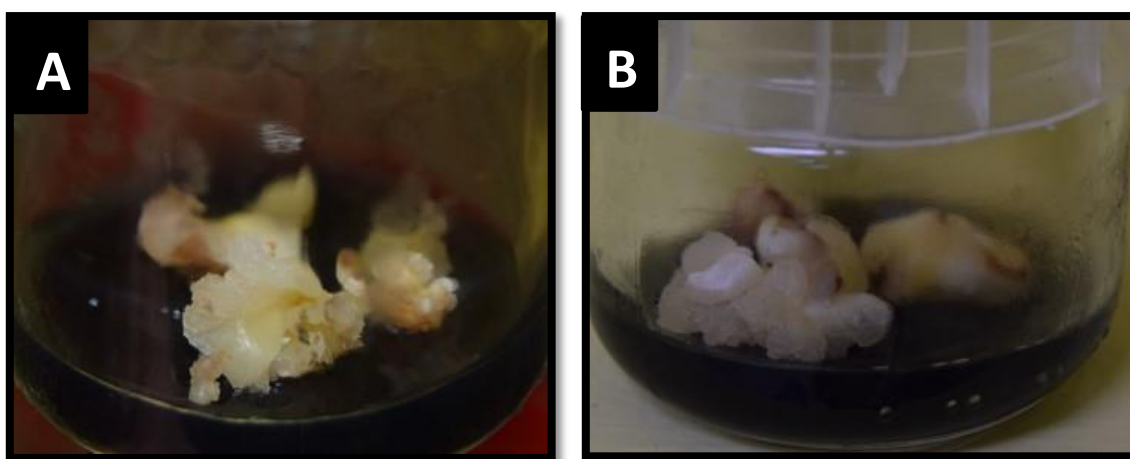


Figura 11: Formación de callos de explantes de meristemo apical de hijuelos de palma datilera variedad Deglet Nour, fotos tomadas a los 6 meses de la siembra. A) Imagen del tratamiento 6 y B) tratamiento 2.

Las características morfológicas descritas anteriormente en los explantes de los tratamientos, contrastan con los reportes de Creemers-Molenaar *et al.* (1988) y Aftab *et al.* (1996), en los cuales, mencionan que la identificación de estructuras embriogénicas y callos no embriogénicos, es complicada para personal sin experiencia. Sin embargo, a pesar de ello los estudios citológicos ofrecen una garantía total durante las determinaciones, en general en todas las especies, los callos suelen presentarse de color amarillo pálido, compacto y de apariencia nodular.

Asimismo, Zayed y Elbar (2015), reportan que en la primera etapa del proceso de diferenciación, los callos son blancos con apariencias granulares, en su mayoría son estructuras globulares cremosas brillantes. Estos reportes coinciden con nuestras observaciones en esta investigación, en donde las estructuras descritas se pueden observar en la **Figura 11 A y B**.

Además, se pudo observar que algunos explantes (en los diferentes tratamientos) no incrementaron el tamaño del tejido y fueron perdiendo el color, de esta forma a los dos meses presentaron un color café y fue oscureciéndose con el tiempo, al grado que se perdió con el color negro del medio por el carbón activado (**Figura 12 C**). Mientras que en la **Figura 12 D** se observan explantes sin oxidación a los 6 meses de su siembra.

En ese sentido, Abohatem, *et al.* (2011) y Mazri, (2015) informan que uno de los principales problemas que se presenta durante el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es la oxidación de los explantes, tanto en la técnica de embriogénesis somática, como en la organogénesis.

Con respecto a lo antes mencionado, Othmani *et al.* (2009) y Loufti y El Hadrami, (2005) informan que la coloración marrón de los explantes y de su medio adyacente es más frecuente en el cultivo de tejido de palma porque contienen altos niveles de compuestos fenólicos que son tóxicos para el tejido y finalmente causan su muerte.

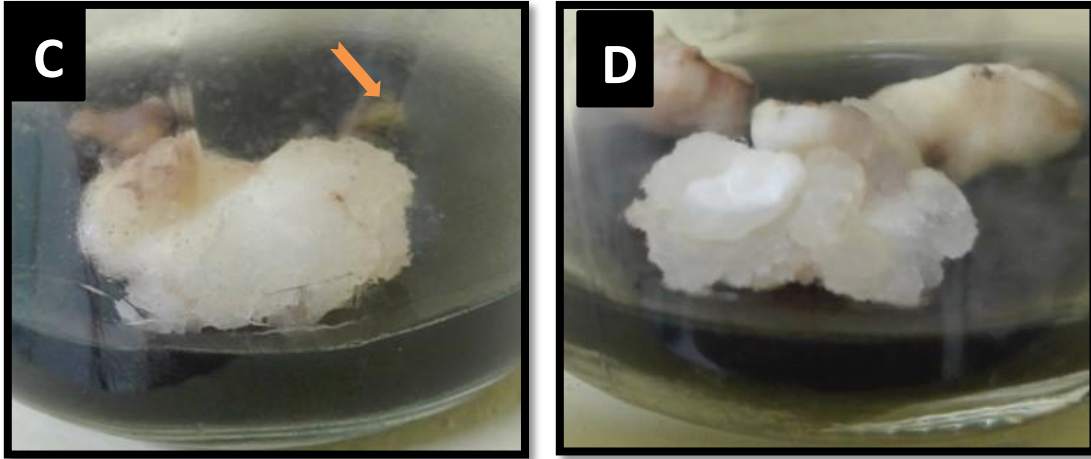


Figura 12: Formación de callo: C) Tratamiento 2, la flecha indica explante de color marrón. D) Tratamiento 5, explantes sin contaminación. Los explantes son de meristemo apical de hijuelos de palma datilera variedad Deglet Nour, fotos tomadas a los 6 meses de la siembra.

En el presente estudio se observó que los explantes que se oxidaron, no afectaron el desarrollo del callo de los otros explantes del tratamiento (frasco), por lo que consideramos que el carbón activado absorbió los compuestos liberados por dichos explantes. En ese sentido, Al-Khalifah y Shanavaskhan (2012) informan que el carbón activado es fundamental en la micropropagación de palmas datileras, ya que, reduce la fenolización de los explantes y elimina los fenoles excretados al medio de cultivo, producto de la oxidación de los explantes.

Sin embargo, el carbón activado también absorbe componentes del medio de cultivo, como reguladores de crecimiento y otros compuestos orgánicos, lo que podría afectar la respuesta morfogénica de los cultivos (Pan y van Staden, 1998). Al respecto, Ebert y Taylor (1990) informan que el regulador de crecimiento 2,4-D, es adsorbido por el carbón activado. Asimismo, Sáenz *et al.* (2010), observaron que la formación de callo embriogénico en palma de coco varió significativamente dependiendo de la marca de carbón activado.

No obstante, el carbón activado en el medio de cultivo es necesario para evitar pérdidas considerables en la inducción de callo de palma datilera (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012).

En ese sentido, Sugimura y Salvaña (1989), trabajaron con inflorescencias de coco e informaron que cuando no agregaron carbón activado a su medio de cultivo, se observó oxidación en todos los explantes.

7.2 Contaminación en el cultivo de palma datilera

La oxidación y la contaminación son recurrentes en las técnicas de cultivo *in vitro* a menudo compromete el desarrollo del cultivo de tejidos (Al-Khalifah y Shanavaskhan, 2012). En la presente investigación, se perdieron altos porcentajes de explantes de palma datilera (**Cuadro 3**). Después del mes, algunos tratamientos empezaron a presentar contaminación por microorganismos, es importante mencionar, que el método de desinfección que se utilizó para todos los tratamientos fue el mismo.

En el **Cuadro 3**, se observa que el tratamiento 4 suplementado con 0.5 mg l^{-1} (ANA, BAP y AG₃), fue el que presentó el porcentaje más alto de contaminación con 66%, seguido por los tratamientos 1 y 3 con 57%, mientras, que el tratamiento 6 fue el que presentó menor contaminación con 39%. Los tratamientos 4, 1 y 3 no presenta diferencias significativas entre sí; sin embargo, el tratamiento 6 presentó diferencias significativas respecto a todos los tratamientos. Con $P < 0.05$, de acuerdo con la prueba de Tukey.

De forma general, todos los tratamientos fueron afectados en un porcentaje por oxidación y contaminación por levaduras, bacterias y hongos.

Cuadro 3. Porcentaje de pérdida por oxidación y contaminación en los tratamientos, con explantes de meristemo apical de palma datilera variedad Deglet Nour. Medias con diferente literal son estadísticamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Tratamiento	Composición del medio de cultivo	% de contaminación
1	MS + 10 mg l ⁻¹ ANA	57% a
2	MS + 1 mg l ⁻¹ (ANA, BAP y AG ₃)	42% bc
3	MS + 1 mg l ⁻¹ (2-4,D, Kin y AG ₃)	57% a
4	MS + 0.5 mg l ⁻¹ (ANA, BAP y AG ₃)	66% a
5	MS + 0.5 mg l ⁻¹ (ANA, Kin y AG ₃)	54% ab
6	MS + 0.5 mg l ⁻¹ (2-4,D, Kin y AG ₃)	39% c

En ese sentido, la contaminación en los cultivos *in vitro* ha sido registrada por varios investigadores como Alvarado (1991) quien sugiere que los métodos de desinfección, no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociadas a los tejidos de las plantas *in vivo*, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y quedan protegidos de los agentes químicos. Al respecto, Abahmane (2011), informa que el tejido de palmas datilera a veces está contaminado con bacterias internas y se introducen *in vitro* con explantes aun si estaban bien desinfectados, mientras que Leary *et al.* (1986) mencionan que se han aislado e identificado estos contaminantes, los cuales pertenecen al género *Bacillus*. Por otro lado, Al-Khalifah y Shanavaskhan (2012), informan que cerca de treinta y un microorganismos de diez variedades diferentes de plantas que crecen en la micropropagación han sido

aislados, identificados y caracterizados, destacando *Corynebacterium* spp. *Pseudomonas* spp., y *Bacillus* sp.

7.3 Formación de callos de meristemo apical de palma datilera

Se han hecho varias investigaciones con diferentes tipos de explantes de palma datilera como embriones cigóticos, hojas, inflorescencias, raíces, ápice, para inducir callos embriogénicos. Sin embargo, la inducción de callo requiere condiciones fisicoquímicas muy específicas para la desdiferenciación de las células (Fki, *et al.*, 2011), es un proceso lento que requiere de 4 a 8 meses (Fki, 2005).

En el presente estudio todos los tratamientos presentaron un porcentaje de formación de células no diferenciadas (callos) hasta formarse callos embriogénicos de color blanco, durante los seis meses. Según Thuzar *et al.* (2012), se desarrollaron callos nodulares compactos de palma aceitera, después de 5 y 6 meses, los callos embriogénicos de apariencia blanquecinos, compuestos de células agregadas globulares, lo que indica la existencia de embriogénesis somática secundaria.

En el tratamiento 6 se obtuvo el 51%, en la formación de callos embriogénicos con los explantes de meristemo apical de hijuelos de palma datilera variedad Deglet Nour, el medio de cultivo fue suplementado con 0.5 mg l^{-1} de auxina (2-4, D, Kin y AG_3), seguido por los tratamientos 2 y 5 con 42% y 36% , suplementados con 1 mg l^{-1} (ANA, BAP y AG_3) y 0.5 mg l^{-1} (ANA, Kin y AG_3), respectivamente. Con $P < 0.05$, las letras diferentes presentan diferencias significativas, de acuerdo con la prueba de Tuky (**Cuadro 4**).

Cuadro 4: Formación de callos de segmentos de meristemo apical de hijuelos de palma datilera variedad Deglet Nour, como respuesta a los diferentes reguladores de crecimiento evaluados.

Tratamiento	Composición del medio de cultivo	% Formación de Callo
1	MS + 10 mg/L ANA	33 bc
2	MS + 1 mg l ⁻¹ (ANA, BAP y AG ₃)	42 ab
3	MS + 1 mg l ⁻¹ (2-4,D, Kin y AG ₃)	33 bc
4	MS + 0.5 mg l ⁻¹ (ANA, BAP y AG ₃)	24 c
5	MS + 0.5 mg l ⁻¹ (ANA, Kin y AG ₃)	36 bc
6	MS + 0.5 mg l ⁻¹ (2-4,D, Kin y AG ₃)	51 a

Medias con diferente literal son estadísticamente diferentes (p < 0.05).

Los resultados coinciden con lo señalado por El Hadrami y Baaziz (1995) y Tisserat (1979), quienes encontraron que la auxina (2,4- D) es el regulador de crecimiento vegetal más utilizado para la callogénesis en la palma datilera en concentraciones de 5 mg l⁻¹ y más, e incluso con concentraciones menores de 1 mg l⁻¹ resultaron eficientes (Fki *et al.*, 2003; Masmoudi *et al.*, 1999). Como es el caso del tratamiento 6 con una concentración de 0.5 mg/L de 2,4-D, produjo la mejor respuesta en la formación de callo embriogénico.

A continuación se presentan algunas investigaciones realizadas por Khalifah y Shanavaskhan (2012), comentan que para inducir el potencial embriogénico y formar callos en palma datilera, utilizaron un medio MS modificado con alta concentración de auxina de (2,4- D), además de 3 mg l⁻¹ 2iP y 1.5 g l⁻¹ de carbón activado.

Asimismo, Eke *et al.* (2005) realizaron investigaciones de embriogénesis somática en palma datilera con tejido del meristemo apical con medios MS que tenían 100 mg l^{-1} 2,4-D y 3 mg l^{-1} 2-iz, en el cual obtuvieron resultados positivos.

Mientras que Badawy *et al.* (2005) informaron que obtuvieron la mayor formación de callos en un medio con 100 mg l^{-1} 2, 4-D + 3 mg l^{-1} 2iP, a partir de explantes de meristemo apical.

Sin embargo, los tratamientos 2 y 5 no contenían la auxina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), la más utilizada en la embriogénesis somática en palmas (Viñas y Jiménez, 2011). Por otra parte, hay estudios que han demostrado que se puede producir callo embriogénico sin dicha auxina. Sin embargo, Marjan *et al.* (2017) utilizaron un medio MS suplementado con 2 mg L^{-1} de BAP y 3 mg L^{-1} de nitrato de plata + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ANA y mostró la mayor cantidad de callo embriogénico en peso fresco (1,38 g), usando segmentos de raíz de palma datilera de variedad Medjool.

En las investigaciones consultadas modifican el medio de cultivo según la fase de la embriogénesis somática, sin embargo, en la presente investigación no hicimos cambio de medios de cultivo, ya que se agregaron uno y tres reguladores de crecimiento en los tratamientos (auxinas, citoquininas y giberelinas), en bajas cantidades y se esperó seis meses para conocer el efecto que causó no haber hecho cambios de medios de cultivo, sin reguladores de crecimiento o disminuir la cantidad progresivamente, como lo sugieren los reportes de investigadores en estudios de ES en palma datilera.

En este contexto, en la presente investigación, el tratamiento 6 se ve claramente la embriogénesis indirecta, donde se observan las estructuras globulares agregadas de forma laxa de diferentes tamaño y de color crema, además, se desarrollaron raíces de apariencia lisa de color crema claro (**Figura 13 E y F**).

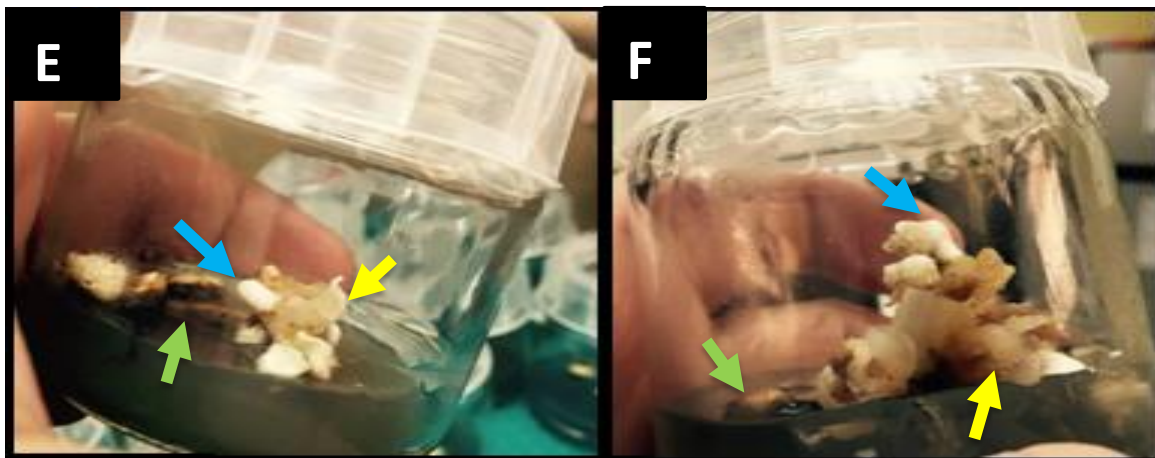


Figura 13: Callos de explantes de meristemo apical de hijuelos de palma datilera variedad Deglet Nour, fotos del tratamiento 6 (E) y (F) flecha verde: explantes oxidados; Flecha azul: inducción de raíces y Flecha amarilla: callos embriogénicos, a los 7 meses de la siembra.

Mientras, que los tratamientos 2 y 5 (**Figura 14 G y H**) formaron callos embriogénico, sin embargo, en el tratamiento 2, se observó que los callos permanecieron unidos de manera compacta con problemas de oxidación en partes de la masa callosa (**Figura 14 G**) y las raíces fueron de menor tamaño que el tratamiento 6.

Por el contrario, en el tratamiento 5 (**Figura 14 H**) los callos embriogénicos fueron de color crema y estaban agrupados de forma laxa y los glóbulos fueron de diferentes tamaños, los cuales no presentaron problemas de oxidación y se desarrollaron raíces de mayor tamaño que el tratamiento 2.

En los tratamientos (1, 3 y 4), se presentaron callos laxos y predominaron los callos compactos de apariencia translúcida, lisos y en algunos callos se observaron pigmentaciones de color verde, mientras que otros callos presentaron agregados globulares sin oxidación y otros con oxidación en la masa callosa, en los tres tratamientos, no desarrollaron raíces.

El tratamiento 3 presentó menor oxidación en comparación con los tratamientos 1 y 4. Como vemos, la oxidación mostró una mayor incidencia en los tratamientos con mayor concentración del regulador de crecimiento ANA y menor oxidación en los tratamientos con bajas concentraciones de (2,4-D). Al respecto Shiram *et al.* (2008) señalan que altas concentraciones de auxina o citoquininas estimulan la producción de callo y que su aspecto está relacionado al tipo de hormona utilizada durante su inducción.

Texeira *et al.* (1994) obtuvieron resultados similares con relación a la oxidación y producción de compuestos fenólicos en explantes de primordios foliares y espiguillas de inflorescencias de palma de aceite.

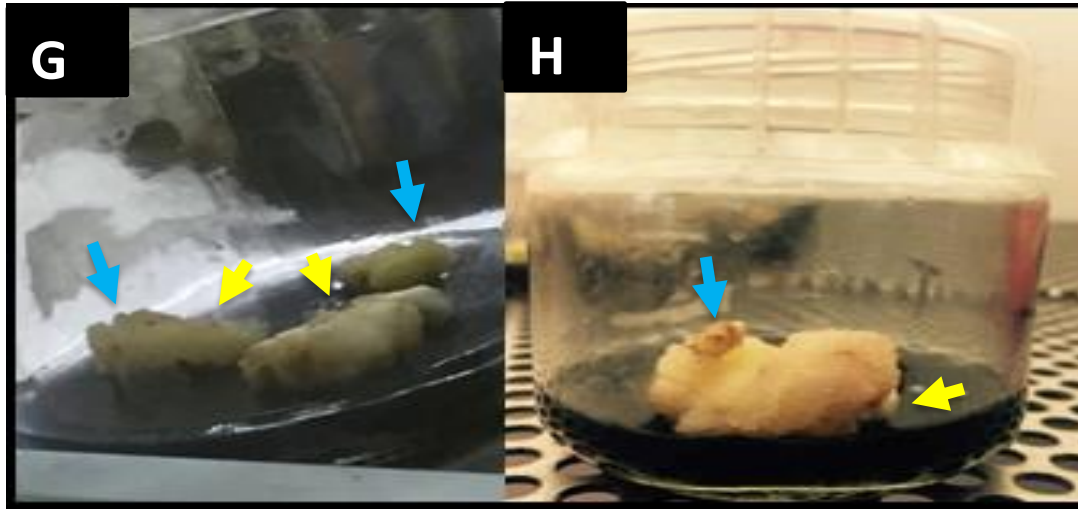


Figura 14: Callos de explantes de meristemo apical de hijuelos de palma datilera variedad Deglet Nour, (G) tratamiento 2 y 5 (H): flecha amarilla: callos embriogénicos sin problemas de oxidación. Flecha azul: Callos con índices de formación de raíces, después de 7 meses de la siembra.

Posteriormente, los callos embriogénicos se sembraron en el segundo medio de cultivo, en el cual, no se agregó CA, y se formuló con los mismos compuestos del primer medio base y los reguladores de crecimiento que se adicionaron fueron 0.5 mg l^{-1} (ANA, BAP).

Al momento de hacer la siembra de los callos embriogénicos laxos, se disgregaron al tomarlos con la piza, por lo cual, se aprovechó para dispersarlo homogéneamente sobre el medio de cultivo.

Posteriormente, se observó que el medio se tiñó de color crema (**Figura 15 L-N**), consideramos que libero fenoles que contenían los callos embriogénicos. Al-Khalifah y Shanavaskhan (2012) nos indican que los daños mecánicos a los tejidos estimulan la producción de compuestos fenólicos. Además, se observa el crecimiento de pequeñas raíces de color crema que han empezado a emerger de los callos. La formación de raíces

generalmente se opone a la formación de vástagos y viceversa, si ambos procesos se presenta simultáneamente *in vitro* se presentan problemas posteriormente (Smith, 2012).

De acuerdo con los resultados obtenidos, Ibrahim *et al.* (2013) informaron que con diferentes concentraciones de BAP y ANA obtuvieron la mayor producción de callos embriogénicos y embriones. Mientras que Kurup *et al.* (2014) lograron producir callo embriogénico tras la transferencia a un medio MS con 0.5 mg L^{-1} ANA y $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ BAP desarrollándose un mayor número de embriones somáticos con raíces, en un período de 10 semanas.

Igualmente, muchos informes han demostrado que la combinación de BAP con auxinas ANA tienen efectos positivos en la regeneración de palmas datileras.

A los dos meses de subcultivar los callos embriogénicos que eran de los tratamientos 2 y 5 mostraron un efecto positivo al pasarse al segundo medio de cultivo, los callos del tratamiento 2 que tenían problemas de oxidación en algunas partes del callo embriogénico, crecieron las raíces que tenían y empezaron a emerger otras de color crema claro, de apariencia compacta y esto provocó, que se empezara a disgregar algunas estructuras globulares, la masa de callos presentaron una forma irregular, laxa con agregados globulares de diferente tamaño y emergen pequeñas raíces, en los diferentes callos **(Figura 15 I y J)**.

En el tratamiento 5 se observó un aumento en el tamaño de las raíces y estructuras globulares presentando las mismas características que el tratamiento 2 **(Figura 15 K)**.

Al respecto a lo anterior, Yan *et al.* (2014) informó que ANA tiene un papel importante en la producción de raíces adventicias con la capacidad de inducción de brotes. Con los resultados obtenidos en esta investigación, ANA, BAP, AG₃ y 2,4-D, la combinación con 3 de estos reguladores de crecimiento vegetal, mostró que tienen un efecto positivo en la inducción de callos embriogénicos con desarrollo de raíz y seguramente más adelante se formaran brotes adventicios en los embriones.

Después de cuatro meses de la resiembra de los callos embriogénicos en el segundo medio de cultivo, el 70% se contaminó por bacterias y levaduras, sólo el 30% de los callos embriogénicos sobrevivió y algunos embriones germinaron. Estos reportes coinciden, con lo que informa Abahmane (2011), la contaminación se observa generalmente después de un mes de cultivo o incluso de tres a cinco subcultivos.

Por otro lado, algunos investigadores advierten que el método de micropropagación de palma datilera a través de la técnica de embriogénesis somática requiere mucho tiempo al usar meristemo como explante y una gran cantidad de (2,4-D), durante las etapas de formación de callos y causa la probabilidad de mutación, además sugieren que los subcultivos repetitivos, afecta el potencial de formación de callos y embriones de la palma datilera (Marjan *et al.*, 2017).

Actualmente, se propagan diferentes variedades de palma datilera debido a la aceptación en el mercado como Deglet Nour y Medjool, por la calidad de su fruto. Sin embargo, el costo de las plantas es alto, lo cual es un obstáculo para los agricultores. Por otro lado, la preferencia por una variedad de palma podría desplazar otras variedades, esto podría provocar la pérdida de germoplasma (Chao y Krueger, 2007).

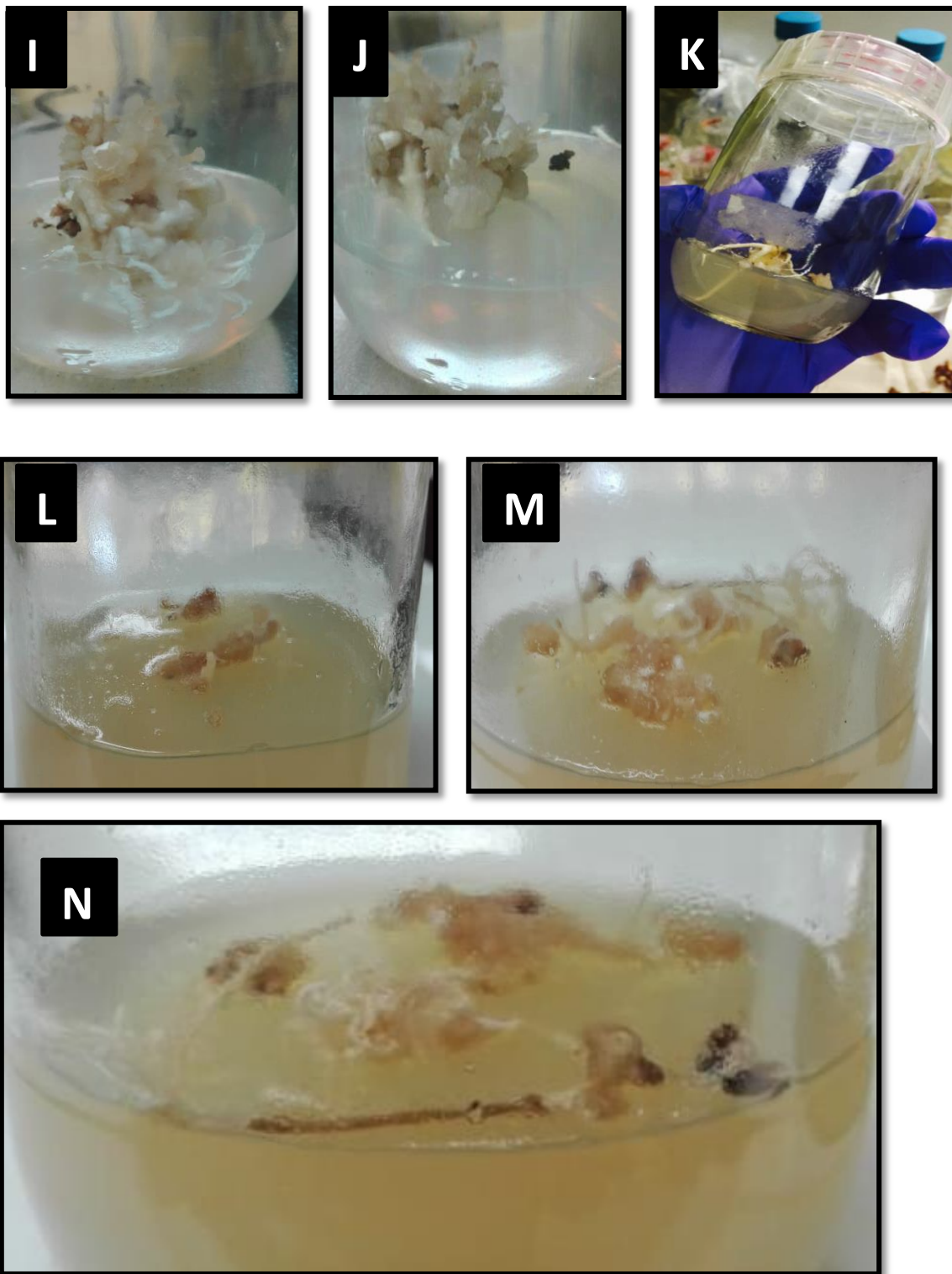


Figura 15: Imágenes de callos embriogénicos de cuatro tratamientos en el segundo medio de cultivo: I y H, tratamiento 2; K, tratamiento 5; L, tratamiento 1; M tratamiento 3; N tratamiento 6, después de 4 meses de la siembra. (El número de tratamiento que se pone fue del primer medio)

8. CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos en esta investigación indican que el medio de cultivo base compuesto por 8 g/L de agar; 30 g/L de sacarosa; 100 mg/L de Myoinositol; 300 mg/L de Carbón activado y la mitad de la concentración de sales minerales de MS suplementado con de 0.5 mg/L 2-4,D, Kin y AG₃; 1 mg/L de ANA, BAP y AG₃ y 0.5 mg/L de ANA, Kin y AG₃ de los tratamientos 6, 2 y 5, se obtuvo el mayor porcentaje de formación de callos embriogénicos con explantes de palma datilera variedad Deglet Nour dando un porcentaje de formación de 51 %, 42% y 36 % respectivamente. Al hacer el subcultivo a otro medio diferente después de unos meses se empezó a formar pequeñas raíces, lamentablemente al hacer este traspaso la mayoría de los callos formados se perdieron por problemas de oxidación o por contaminación de microorganismos y solo el 30% de los callos sobrevivió y continua el desarrollo de los embriones. Estos resultados son de gran utilidad para seguir con investigaciones futuras en la micropropagación de palma datilera debido a que actualmente es una de las plantas más solicitadas por los agricultores en Mexicali, Baja California, México.

9. PERSPECTIVAS

Una de las principales aplicaciones del cultivo de tejido *in vitro* va enfocado a la micropropagación masiva de plantas mediante la embriogénesis somática, con este método se podrían regenerar palmas datileras de la variedad Deglet Nour con las características de la planta madre y así establecer cultivares a menor costo para los agricultores interesados en sembrar esta palma.

Por lo que se sugiere seguir con investigaciones para lograr un protocolo eficiente para este cultivo, algunos investigadores recomiendan agregar antibióticos al medio de cultivo para disminuir la contaminación por microorganismos. Otro de los problemas recurrentes es la oxidación de los explantes. En esta investigación fueron los principales problemas que se tuvo.

Con los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere que a futuro se realicen pruebas con diferentes cantidades de carbón activado, antibióticos y bajas concentraciones de RCV en el medio de cultivo. Además, trabajar con diferentes tejidos de palma con la finalidad de no destruir el hijuelo.

La micropropagación de palma datilera tiene como finalidad proveer de material vegetal para contribuir y promover una agricultura sustentable, ya que de esta manera se estaría protegiendo al suelo y se formarían micro hábitats que se podrían utilizar para otros cultivos. Por ello la importancia de seguir realizando ensayos con plantas de valor económico en la agricultura, en las zonas áridas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Baki, A., Aslan, S., Linderman, R., Cobb, S., Davis, A. (2002) Soil, water, and nutritional management of date orchards in the Coachella Valley and Bard (California Date Commission, Indio, CA), 2nd ed.
- Abahmane, L. (2011). Date palm micropropagation via organogenesis. In Jain, S.M., Al-Khayri, J.M., Johnson, D.V. (Ed.). Date Palm Biotechnology. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. pp.70-84. DOI 10.1007/978-94-007-1318-5.
- Abdelouahhab, Z. & Arias-Jiménez, E. J. (1999). Date Palm Cultivation (First ed.). Roma, Italia: Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Abohatem, M., Zouine, J. y El Hadrami, I. (2011) Low concentrations of BAP and high rate of subcultures improve the establishment and multiplication of somatic embryos in date palm suspension cultures by limiting oxidative browning associated with high levels of total phenols and peroxidase activities. *Scientia Horticulturae*, 130:344-348.
- Aftab, F, Zafar Y, Malik K y Iqbal J (1996) Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplasts in sugarcane (*Saccharum* ssp. Hybrid cv. Col-54). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 71-78.
- Aitchison P. A., Macleod A. J., Yeoman M. M. (1977). Growth patterns in tissue (callus) cultures. En: Street H. E. (Ed.) *Plant tissue and cell culture*. Blackwell Sci. Publ., Oxford., England. pp. 267-306.
- Al Kaabi, H.H., Rhiss, A., Hassan, M.N. (2001). Efect of auxins and cytokinis on the in vitro production of date palm bud generative tissues and on the number of differentiated buds. *Proceedings second international conference on date palm Al Ain, UAE*, pp 47-48.
- Alabdulhadi, I., Ali-Dinar, H. and Ebert, G. (2004). Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) – ‘A Potential Food Security’ in the Kingdom of Saudi Arabia -- Research and Development. Sitio web: <http://www.tropentag.de/2004/proceedings/node145.html>
- AL-Khalifah, N.S. y Shanavaskhan A.E. (2012). Micropropagation of Date Palms. *Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB) and Association of Agricultural Research Institutions in the Near East and North Africa (AARINENA)* p.54
- Alvarado, Y.A. (1997). Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, (31), pp.87-88.
- Ammirato, .PV. (1983) In: Evans DA, Ammirato PV, Yamada Y (eds) *Handbook of Plant Cell Culture*, Macmillan, New-York vol 1,82-123 Assy-Bah B, Durand-Gasselii T, Pannetier C (1987) *Plant Gen Resources Newslet* 71:4-10.
- Ammirato, P.V., (1986). Morphogenesis and Clonal Propagation. In: *Plant Tissue Culture and its Agricultural Application*, Withers, L.A. and P.G. Alderson (Eds.). Butterworth, London, UK., pp: 21-47.

- Arar, A. (1975). Soils, irrigation and drainage of the date palm. 3rd FAO Tech. Conf. on Imp. Date Produc., Proc. and Marketg. Paper No. A3.
- Asemota, O., Eke, C.R. y Odewale, J.O. (2007). "Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) in Vitro Morphogenesis in Response to Growth Regulators, Sucrose and Nitrogen." *African Journal of Biotechnology* 6 (20) 2353-2357.
- Badawy, E. M., Habib, A. M. A., El-Bana, A. and Yosry, G. M. (2005). Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera*) plants by using tissue culture technique. *Arabian Journal of Biotechnology* 8: 343-354.
- Ben Mya, Omar. Ben Amar, Laroussi., Zarroud, Bilel. Y Hammami, Hadia. (2016). Deglet Nour Dates *Phoenix dactylifera* L.: An Alternative Source to Sugar in Algeria. *Springer Link Sugar Tech* 19:337-340. DOI 10.1007/s12355-016-0462-x
- Benbadis, A.K. (1992) Coconut and date palm. In: Hammerschlag, F.A. & Litz, R.E. (Eds), pp. 383-400, *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. CAB International, Wallingford.
- Calva-Calva, D. y Pérez -Vargas, J. (2005). CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES: FUENTE DE ALIMENTOS PARA EL FUTURO. *Revista Digital Universitaria Volumen 6 Número 11 • ISSN: 1067-6079*
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una tecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA Las Brujas. Unidad de Biotecnología.
- Chao, C.T., Krueger, R. R. (2007). The Date Palm (*Phoenix dactylifera*L.): Overview of Biology, Uses, and Cultivation *HortScience* August 2007 vol. 42 (5) 1077-1082
- Creemers-Molenaar, J, Loeffen J y Van der Valk P (1988) The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and donor plant environment on plant regeneration from immature inflorescence derived callus of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* L. *PlantSci.* 57: 165-172.
- Crozier A., Kamiya Y., Bishop G., Yokota T., (2000). Biosynthesis of hormones and elicitors molecules. En: Buchanan B., Grissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 850-929.
- Dangl, J, R.A Dietrich, and H. Thomas. (2000). Senescence and programmed cell death. In: Buchanan, B. B., W. Grissem, R. and L. Jones (eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists Press. Rockville, USA. pp: 1044–1100.
- Danthine, H. (1937). Le palmier-dattier et les arbres sacres dans l'iconographie de l'asiéoccidentale ancienne. Texte (277 pp) and Album (206 plates) Paris.
- De Grenade, R. (2013). Date palm as a keystone species in Baja California peninsula, Mexico oases. *Journal of Arid Environments*, 94, pp.59–67.

- Del Cañizo, J. (1991). Palmeras, 55 especies con sus características, clima, suelo, cuidados y viveros donde encontrarlas. Mundi Prensa. Madrid, España. 298 p.
- Ebert, A. & Taylor, H. F. (1990). Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 165-172.
- Eke, C. R., Akomeah, P. and Asemota, O. (2005). Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'Zebia' and 'Loko' landraces. *African Journal of Biotechnology* 4: 244-246.
- Eke, C.R., Akomeah, P., Asemota, O. (2005). "Somatic Embryogenesis in Date
- El Hadrami I, Baaziz M. (1995). Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in *Phoenix dactylifera* L. *Biol Plant* 37:179-203.
- Etienne, H., Barry-Etienne, D., Vásquez, N. y Berthouly, M. (1999). Aportaciones de la Biotecnología al Mejoramiento Genético del Café. En Benoit, B y Rapidel, B (Ed.). *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. Editorial Agroamerica. San José, Costa Rica pp. 467-469. ISBN 92-9039-391-2.
- Evans, D.A., W.R. Sharp and C.E. Flinck, (1981). Growth and Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis. In: *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*, Thrope, T.A. (Ed.). Academic Press, New York, USA., pp: 45-114.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2004). Producción mundial de dátiles en peligro por plagas y enfermedades. Disponible en <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2004/48147/index.html> Consultado 20 de abril de 2018.
- FAO. (2003). Word production of dates. Octubre 31, 16, de Food and Agriculture Organization. Sitio web: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>.
- FAO (Food and Agriculture Organization. Word production of dates). Recuperado el 31 de octubre de 2016, de <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>.
- Fki, L. Masmoudi, R., Kriaâ, W., Mahjoub, A., Sghaier, B., Mxid, R., MLiki, A., Rival, A. y Drira, N. (2011). Date palm micropropagation via somatic embryogenesis. In Jain, S.M., Al-Khayri, J.M., Johnson, D.V. (Ed.). *Date Palm Biotechnology*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. pp.50-60. DOI 10.1007/978-94-007-1318-5.
- Fki, L., Masmoudi, R., Drira, N. and Rival, A. (2003). An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Reports* 21: 517-524.
- Fki, L. (2005) Application des suspensions cellulaires embryogenes au clonage et à l'amélioration in vitro du Palmier dattier. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de Sfax-Tunisie

- Fujimura, T. and Komamine, A. (1980): Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in carrot cell suspension culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 99: 1-8.
- Galán, A. y Castroviejo, S. (2008). *Phoenix dactylifera* L. (Real Jardín Botánico). Castroviejo & al. (eds), *Flora ibérica* Vol. 18, Pag(s). 271,272,275,276,277,278.
- Gan, S., and R. M. Amasino. (1996). Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. *Bio Essays* 18: 557–565.
- George, E.F., M.A. Hall and G.J. de Klerk, (2008). Plant Tissue Culture Procedure-Background. In: *Plant Propagation by Tissue Culture*, George, E.F., M.A. Hall and G.J. de Klerk (Eds.), 3rd Edn., Springer, Netherlands, ISBN: 9781402050053, pp: 1-28.
- Hoyos, J. y Braun, A. (2001). *Palmas en Venezuela. Autóctonas y Exóticas*. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N° 47.
- Huang, T.; Shaolin, P.; Gaofeng, D.; Lanying, Z. y Gengguang, L. Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, (2002), vol. 69, p.141-146.
- Hussain, A., QarshI, I.A., Nazir, H. y Ullah, I. (2012). *Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities, Recent Advances in Plant in vitro Culture*, Dr. Annarita Leva (Ed.), ISBN: 978-953-51-0787-3, InTech, DOI: 10.5772/50568.
- Ibrahim, M.A., A.M. Waheed and H.A. Al-Taha, (2013). Plantlet regeneration from root segments of date palm tree (*Phoenix dactylifera* L. cv. Barhee) producing by in vitro culture. *Adv. Agric. Bot.*, 5: 45-50.
- INFOJARDÍN. (2010). <http://infojardin.com/palmeras/Phoenix-dactyliferapalmeradatilera-fenix-palma-comun> (Consultada: 25 Octubre 2010).
- Jaradat, A. & Zaid, A. (2004) Quality traits of date palm fruits in a center of origin and center of diversity. *J Food Agric Environ* 2: pp208-217.
- Klein, P. y A. Zaid. (2002). Date palm cultivation. Chapter VI: Land preparation, planting operation and fertilisation requirements. FAO Corporate document repository.
- Kurup, S.S., M.A.M. Aly, G. Lekshmi and N.H. Tawfik, (2014). Rapid in vitro regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Kheneizi using tender leaf explant. *Emir. J. Food Agric.*, 26: 539-544.
- Leary., J.V., Nelso, N., Tisserat, B., Allingham, E.A. (1986). Isolation of pathogenic *Bacillus circulans* from callus cultures and healthy offshoots of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Appl Envir Microbiol* 52:1173-1176.
- Loutfi, K., El Hadrami, I. (2005) *Phoenix dactylifera* date palm. In: LITZ, R. E. *Biotechnology of fruit and nut crops*, Wallingford: CAB International, p.144-156.
- Marjan Roshanfekrrad, Reza Zarghami, Hassan Hassani, Hedayat Zakizadeh y Ali Salari, (2017). Effect of AgNO₃ and BAP on Root as a Novel Explant in Date Palm (*Phoenix dactylifera* cv. Medjool) Somatic Embryogenesis. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 20: 20-27.

- Masmoudi R, Rival A, Nato A et al (1999) Carbon metabolism in in vitro cultures of date palm: the role of carboxylases (PEPC and RubisCO). *Plan Cell Tissue Org Cult* 57:139–143.
- Mazri, M. A. (2015) Role of cytokinins and physical state of the culture medium to improve in vitro shoot multiplication, rooting and acclimatization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Boufeggous. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 24(3):268-275.
- Morales M. Antonio, Payan O. Sergio, Natividad G. Jaime y Quevedo A. Isidro. (2016). Enraizado de hijuelos de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.). Centro de Investigación Regional Noroeste Campo Experimental Valle de Mexicali. INIFAP. Desplegable para productores No. 67
- Morton, J.F. (1987). Date: *Phoenix dactylifera*. Pp. 5-11 in Morton, J.F. ed. *Fruits of Warm Climates*. Creative Resources Systems Ltd. Versión actualizada a 2002 en el website de PurdueUniversity. Sitio web: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/date.html>. Consultado en marzo, 2003.
- Mott, R.L. and Amerson, H.V. (1981). Tissue Culture Plantlets Produced From *Pinus monticola* Embryonic Materials. *Forest Res.* 27: 299-304.
- Neumann, K. H. (2006). Some studies on somatic embryogenesis: a tool in plant biotechnology. In: Kumar and Roy (eds) *Plant biotechnology and its applications in tissue culture*. I.K. International, New Delhi, pp 1-14.
- Newton, R. J., K.A. Marek-Swize, M. E. Magallanes-Cedeno, N. Dong, S. Sen and S.M. Jain. (1994). Somatic embryogenesis in Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) in S. Jain., P. Gupta and R. Newton (eds.), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Khaver Netherlands pp 183-195.
- Nixon, R.W. y Carpenter, J.B. (1978). *Growing Dates in the United States*. U.S. Dept. of Agriculture, Agric. Information Bulletin No. 207: USDA. Technical Document p 63.
- Nixon, R.W. y R.T. Wedding. (1956). Age of date leaves in relation to efficiency of photosynthesis. *Amer. Soc. Hort. Sci. Proc.* N°67: 265-269.
- Olivares, S.E. (1990). Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.1 Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, (UANL). Marín, N.L. México.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Simons, A. (2009). “*Phoenix Dactylifera*.” *Agroforestry Database: A Tree Reference and Selection Guide Version 4.0*. World Agroforestry Centre, Kenya.
- Othmani, A., Bayouhd, C., Drira, N., Marrakchi and M., Trifi, M. (2009). Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97: 71-79

- Pan, M. J. y Van Staden, J. (1998). The use of charcoal in in vitro culture - A review. *PlantGrowthRegulation*. 26: 155-163.
- Perea, M. y Tirado, A. (2011). Cultivo de tejidos in vitro. Manual de prácticas de laboratorio. Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Popenoe, P. (1924). The date palm in antiquity. *ScienceMonthly*, pp. 313-325.
- Popielarska, M.; Slesak, H. y Goralski, G. Histological and SEM studies on organogenesis in endosperm-derived callus of kiwifruit. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, (2006), vol. 48, no. 2, p. 97–104.
- Riad, M (2006). ‘The date palm sector in Egypt’. *CIHEAM- Options Mediterraneennes*, 45-53.
- Rivera, D., Obón, C., Ríos, S., Selma, C., Méndez, F., Verde, A. y Cano, F. (1997) Las variedades tradicionales de frutales de la cuenca del río Segura. Catálogo etnobotánica (1): Frutos secos, Oleaginosos, Frutales de Hueso, Almendros y Frutales de Pepita. Universidad de Murcia. Murcia.
- Rivera, D., Johnson, D., Delgadillo, J., Carrillo, M.H., Obón, C., Krueger, R., Alcaraz, F., Ríos, S., Carreño, E. (2013). Historical Evidence of the Spanish Introduction of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L., *Arecaceae*) into the Americas. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60, no. 4: 1433–52.
- Roca, W.M. y mroginski, L.A. (1993). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Publicación CIAT N°.151. Colombia
- Sáenz, L., Herrera-Herrera, G., Uicab-Ballote, F., Chan, J. L. and Oropeza, C. (2010). Influence of form of activatedcharcoalonembryogeniccallusformation in coconut (*Cocos nucifera*). *PlantCell, Tissue and Organ Culture* 100: 301-308.
- Seabrook J. E. A. (1980). Laboratory culture. En: Staba, E. J. (Ed.) *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. C.R.C. Press, Inc, Boca Raton, Florida, U.S.A. pp 1-20.
- Shenk R. A., Hildebrandt (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Anuario estadístico de la producción agrícola. Recuperado el 31 de octubre de 2016, de http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap_gb/icultivo/index.jsp
- Shiram V, V Kumar, M Shitole. (2008). Indirect organogénesis and plant regeneration in *Helicteres isora* L., an important medicinal plant. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 44:186 DOI: 10.1007/s11627-008-9108-3.
- Sidhu, J. S. (2006): Date fruitsproduction and processing. In: *Handbook of Fruits and FruitProcessing*, Editedby Hui, Y. H. (2006). Pp 391- 419.

- Smith, R.(2012). Plant tissue culture: Techniques and experiments. Londres, UK. Academic Press Elsevier. 208 p.
- Soler, R. (1993). Fruticultura moderna. Imp. Albatros. Buenos Aires, Argentina. 294 p.
- Street H. E. (1969). The induction of cell division in plant cell suspension cultures. En: Colloq. Int. C.N.R.S. (Ed.) Les cultures de tissus de plants. Paris., France. pp. 177-93.
- Street H. E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. En: Street H. E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing., Oxford., England. pp. 61-102.
- Sugimura, Y. and Salvaña, M. J. 1989. Induction and growth of callus derived from rachilla explants of young inflorescences of coconut palm. Canadian Journal of Botany 67: 272-274.
- Tamaro, D. (1981). Tratado de Fruticultura. Barcelona, Editorial Gustavo Gili. p.939.
- Tavares, L. F.; Magalhaes, J. r.; Ariano, M. P. y José, A.R. (2004). Indirect organogenesis of rice explants from meristematic region of shoot tips. Bras. Agrociência, 10(2):203-207.
- Texeira, J., M. Sondahl y E. Kirby. (1994). Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. Plant Cell Report 13: 247-250.
- Thuzar M., A. Vanavichit, S. Tragoonrung y C. Jantasuriyarat. (2012). Recloning of regenerated plantlets from elite oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cv. Tenera. African Journal of Biotechnology 11(82): 14761-14770.
- Tisserat, B. (1979). Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. J Exp Bot 30:1275–1283
- USDA, NRCS. (2018). La base de datos de PLANTAS. Equipo Nacional de Datos de Planta, Greensboro, NC 27401-4901 USA. Disponible en <http://plants.usda.gov>, consultado: 21 de febrero de 2018.
- Viñas, M. y Jiménez, V. M. (2011). “Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae)”. Revista Colombiana de Biotecnología, vol. 13, no. 2, pp. 229-242, ISSN 0123-3475.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. and Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 233-249.
- Yasuda S., K. Satoh T., Ishii, Furuya T. (1972). Studies on the cultural conditions of plant cell suspension YASUDA S., K. SATOH T., ISHII, FURUYA T. (1972). Studies on the cultural conditions of plant cell suspension.
- Van Zyl, H.J. (1983). Date Cultivation in South Africa by the Fruit and Fruit Technology Research Institute. Department of Agriculture, Stellenbosch, RSA. Information Bulletin N°504: Compiled. 26.

- Zaid, A. (2002) Date Palm Cultivation. FAO Agricultural Services Bulletin No. 156, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Zaid, A. and De Wet, P.F. (1999) Chapter I Botanical and Systematic Description of Date Palm. FAO Plant Production and Protection Papers 1-28.
- Zaid, A. y De Wet, P.F. (2002). "chapter i: botanical and systematic description of the date palm." FAO Corporate Document Repository.
- Zayed, E.M.M., Elbar, O.H.A. (2015). Morphogenesis of immature female inflorescence of date palm in vitro. *Annals of Agricultural Sciences*. Vol 60:1.113- 120.

ANEXO 1 Composición del medio nutritivo Murashige & Skoog (MS) (1962).

Soluciones	Referencia (SIGMA)	Reactivo	mg/L
Macronutrientes	A3795	Nitrato de Amonio	1650
	P8291	Nitrato de Potasio	1900
	P8416	Fosfato de Potasio Monobásico	170
	C2536	Cloruro de Calcio Dihidrato	440
	M7774	Sulfato de Magnesio Heptahidrato	370
Micronutrientes	B9645	Ácido Bórico	6,2
	M7634	Sulfato de Manganeso Monohidrato	15,5
	Z1001	Sulfato de Manganeso Monohidrato	8,6
	C2911	Cloruro de Cobalto Hexahidrato	0,025
	M1651	Molibdato de Sodio Dihidrato	0,25
	C3036	Sulfato Cuprico Pentahidrato	0,025
Vitaminas	T3902	Tiamina-HCl	0,1
	P8666	Piridoxina-HCl	0,5
	N0765	Ácido Nicotínico	0,5
Yoduro de Potasio		KI	0,83
Glicina	G6143		2
EDTA	E6635	EDTA	37,3
	F8263	Sulfato de Hierro Heptahidrato	27,8
Mio - inositol	I3011		100