

RESPUESTA DE LA PALMA AFRICANA HÍBRIDO INIAP-TENERA CULTIVADA *IN VITRO* SEGÚN EL TIPO DE EXPLANTE Y NIVELES DE ÁCIDO NAFTALENACÉTICO

Ariadne Vegas¹, Digner Ortega², Walter Gualoto², Ernesto Paredes², Eduardo Rebolledo¹, Leonardo Quintero² y Jorge Ortega²

RESUMEN

La pudrición del cogollo (PC) ha afectado y devastado más de 22 mil hectáreas de palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) en la provincia de Esmeraldas, Ecuador. Sin embargo, se ha observado cierta tolerancia del híbrido INIAP-Tenera a la PC, en plantaciones ubicadas en zonas de alta incidencia. El objetivo de esta investigación fue lograr el establecimiento *in vitro* del híbrido comercial mediante su propagación clonal, apoyado en el hecho que la productividad de clones élite es superior a la de plantas producidas de semillas. Los explantes utilizados fueron primordios foliares, inflorescencias masculinas y embriones cigóticos a los cuales se les aplicaron las técnicas de desinfección y desinfestación tradicionales en cultivo *in vitro*. Luego se cortaron en secciones de 5 a 12 mm que fueron colocadas en medios de cultivo MS suplementados con 0, 50, 100 y 200 mg·L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA), sacarosa (30 g·L⁻¹) y carbón activado (3,0 g·L⁻¹), y mantenidos en oscuridad a 28±2 °C. A los 45 días después de la siembra, el nivel de contaminación estuvo entre aproximadamente 0 y 29 %, principalmente debido a la presencia de bacterias. Hubo diferentes grados de oxidación dependiendo del tipo de explante y la concentración de ANA. La calogénesis fue superior con los primordios foliares (42,02 %) y las dosis de 100 mg·L⁻¹ de ANA (47,64 %), mientras que la rizogénesis ocurrió principalmente en los embriones cigóticos (14,01 %). Se describe el establecimiento exitoso de explantes del híbrido y la inducción de respuestas morfogénicas, en las que los mejores explantes fueron los primordios foliares y embriones cigóticos, con importantes porcentajes de calogénesis, particularmente cuando se adicionó al medio 100 mg·L⁻¹ de ANA.

Palabras clave adicionales: Callogenesis, *Elaeis guineensis*, iniciación, PC, rizogénesis

ABSTRACT

Response of African palm hybrid INIAP-Tenera grown in vitro as affected by explant type and naphthaleneacetic acid levels
Bud rot (BR) has affected and devastated more than 22 thousand hectares of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Esmeraldas province, Ecuador. It has been noted certain tolerance of the hybrid INIAP-Tenera in areas of high incidence of BR. The objective of this study was to achieve the establishment of *in vitro* clonal propagation of the commercial hybrid, supported by the fact that productivity of elite clones can be higher than that of plants grown from seeds. Leaf primordia, male inflorescences and zygotic embryos were used as explants and they were submitted to the usual techniques for disinfection and disinfestation of explants. Tissues were cut into sections 5 to 12 mm and plated on MS culture media supplemented with 0, 50, 100 and 200 mg·L⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA), sucrose (30 g·L⁻¹) and activated carbon (3.0 g·L⁻¹), and maintained in dark conditions at 28±2 °C. Forty five days after tissues were cultured, the internal contamination level was between 0 and 29 %, mainly due to the presence of bacteria. There were different degrees of oxidation (none, medium, and medium-high), depending on the explant type and ANA concentration. The percentage of callogenesis was superior when using leaf primordia (42.02 %), and 100 mg·L⁻¹ ANA (47.64 %), while rhizogenesis occurred only in explants of zygotic embryos (14.01 %). The successful establishment of the hybrid explants and the induction of morphogenetic responses are described. They show, that the best explants were leaf primordia and zygotic embryos with important percentages of callogenesis when 100 mg·L⁻¹ of ANA were added to the culture medium.

Additional key words: Callogenesis, bud rot, *Elaeis guineensis*, initiation, rhizogenesis

Recibido: Septiembre 29, 2015

Aceptado: Abril 2, 2016

¹ Pontificia Universidad Católica del Ecuador, sede Esmeraldas (PUCESE). e-mail: ariadne.vegas@pucese.edu.ec; eduardo.rebolledo@pucese.edu.ec

² INIAP. Estación Experimental Santo Domingo. Programa de Palma Africana. Santo Domingo de los Tsáchilas. Ecuador. e-mail: digner.ortega@iniap.gob.ec; walter.gualoto@iniap.gob.ec; ernesto.paredes@iniap.gob.ec; leonardo.quintero@iniap.gob.ec; jorge.ortega@iniap.gob.ec

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la palma africana en Ecuador se inició en la zona de La Concordia en la década de los años 50. Las plantaciones se fundaron con material de *Elaeis guineensis* Dura Deli. Posteriormente, en la Estación Experimental Santo Domingo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), a través del Programa de Palma Africana, se mejoró el material y se obtuvo la segregación de plantas Pisíferas locales que sirvieron para la obtención del híbrido INIAP-Tenera, abasteciéndose con palmas madres (Duras) y padres (Pisíferas) locales. El INIAP posee más de 40 años ofreciendo el híbrido mejorado INIAP-Tenera destacado por su alto rendimiento (INIAP, 2003).

Una de las limitantes para el desarrollo del cultivo es la presencia de la enfermedad conocida como pudrición de cogollo (PC), anomalía que se reporta desde los años setenta causando la muerte de las plantas. En la actualidad la PC está afectando cerca de 10 mil hectáreas de palma y una cifra aun mayor ya ha sido devastada en la provincia de Esmeraldas, Ecuador. Técnicos del INIAP han observado tolerancia del híbrido INIAP-Tenera en las zonas de alta incidencia. De la misma manera se conoce que algunos materiales del híbrido interespecífico OxG manifiestan una considerable tolerancia al PC; sin embargo, requieren de la introgresión de los genes presentes en *E. guineensis* para mejorar los componentes del racimo y del fruto, y de polinización asistida para aumentar los rendimientos (INIAP, 2015).

El método convencional de propagar materiales genéticos de palma africana comerciales es a través de la polinización cruzada entre la palma Dura, que produce frutos con cuesco o endocarpio grueso, y la Pisífera, con frutos sin cuesco; ambos con conocido potencial genético. De esta manera se produce el híbrido Tenera, con un endocarpio fino, mayor grosor de mesocarpio y cantidad de aceite. Aun cuando se lleva a cabo una selección rigurosa, persiste el problema de la segregación de las progenies derivadas de semillas. El coeficiente de variabilidad en los rendimientos de aceite en las plantaciones de palma africana es del 20 al 30 %, ya que consisten en poblaciones de híbridos

intervarietales (Jones, 1974).

Esta especie monocotiledónea, leñosa, y alógama dispone de tallo único, con un solo ápice de crecimiento con ausencia de brotes o ramas laterales, lo cual representa un problema para la propagación vegetativa convencional como injertos o acodos (Kanchanapoom et al., 2010). Por esta razón, la micropropagación constituye una alternativa para la clonación de híbridos y parentales con excepcionales características, tales como alta producción de racimos, estípites cortos o de crecimiento lento, frutos de mayor tamaño, con alta tasa de extracción de aceite, aceite con altos contenidos de ácidos grasos monoinsaturados y resistentes o tolerantes a la pudrición del cogollo (Rocha, 2007). Se ha demostrado que la productividad de los clones élites de palma aceitera son del 40 a 50 % superior que las plantas producidas a partir de semillas (Rohani et al., 2003).

En esta especie, la embriogénesis somática es la vía de regeneración más usada y ha permitido la producción de plantas en forma masiva en algunos países, como Costa Rica y Malasia, donde se producen plántulas, como fuente de material de alta calidad para las plantaciones experimentales y comerciales (Ting et al., 2013). Esto ha permitido incrementar la productividad de manera considerable en un corto período de tiempo (Rocha, 2007). El proceso de embriogénesis ocurre de forma indirecta, a través de la inducción de callos embriogénicos que se diferencian formando los embriones somáticos (Carvalho, 2009).

Existen investigaciones sobre la inducción de callogenesis e embriogénesis en la palma africana, a partir de diferentes tejidos del híbrido Tenera, en diversos medios de cultivo (Murashige y Skoog, 1962; Nitsh, 1972; Eeuwens, 1978), y suplementados con diferentes reguladores de crecimiento en concentraciones que varían de 100 a 177 mg·L⁻¹, utilizando carbón activado (2,5 a 3 g·L⁻¹) en condiciones de oscuridad (Balzon et al., 2013; Ting et al., 2013; Jayanthi et al., 2015). Los callos embriogénicos se pueden producir entre 5 a 18 meses luego de ser transferidos a medio fresco.

El presente estudio tuvo como objetivo lograr el establecimiento *in vitro* del híbrido INIAP-Tenera iniciando con diferentes tejidos de la planta, e inducir respuestas morfogenéticas a partir de ellos mediante la modificación de las condiciones del medio de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la colecta y posterior desinfección y siembra de los siguientes tipos de explante a partir de plantas del híbrido INIAP-Tenera en vivero y campo:

- Primordios foliares. Se podaron las hojas de cuatro plantas de vivero de 1,5 a 2 años. En cada planta se realizaron cortes longitudinales y otro transversal por debajo de la parte media de la estipe, hasta extraer la parte central, de unos 4 a 6 cm de grosor y 9 cm de longitud, que contenía el meristemo apical y los primordios foliares u hojas negativas que aún no han emergido (Ting et al., 2013).

La parte central de la estipe extraída de las plantas se lavó con agua común, por 5 min y con jabón líquido comercial, por otros 5 min. Se llevó a la campana de flujo laminar, donde se sometió a la siguiente desinfección: solución de Povidine con yodo al 0,05 % por 30 min, alcohol isopropílico al 70 % por 2 min, inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 2,5 % i.a. por 30 min. Enjuague con agua destilada estéril (ADE) por 5 min por 3 veces. Se eliminaron las capas externas, y los primordios foliares, específicamente las bases y los raquis, desde la hoja -4 hasta -8, se seccionaron transversalmente en segmentos de 5 mm y se colocaron horizontalmente en tubos de ensayo contentivos de los medios de cultivo (Carvalho, 2009, Ting et al., 2013).

- Inflorescencias. Se tomaron dos inflorescencias masculinas cerradas, con tamaño de espata externa de 8,5 y 15 cm de largo, en las bases de las hojas +8 y +11 respectivamente, de plantas de vivero de 1,5 a 2,0 años (Abul-Soad, 2011; Aguirre, 2012; Carvalho, 2009; Jayanthi, et al. 2015).

Se lavaron las inflorescencias cerradas con la espata externa en agua común y jabón líquido comercial por 5 min, con la ayuda de una esponja. Luego se sumergieron en alcohol isopropílico al 70 % por 1 min y solución de Povidine con yodo al 0,05%, por 2 horas. En una cámara de flujo laminar se sumergieron en hipoclorito de sodio al 2,5 % i.a. por 15 min, y se enjuagaron con ADE, 3 veces, por 5 min. Se eliminaron las espatas externas e internas y se disectaron las espiguillas o raquillas que contenían los botones florales. Se colocaron en el medio de cultivo en segmentos, de 1,0 a 1,2 cm, de manera horizontal en tubos de

ensayo contentivos de los medios de cultivo (Abul-Soad, 2011; Carvalho, 2009).

- Embriones cigóticos. Se tomaron semillas de un racimo, entre 79 a 84 días después de la antesis aproximadamente, las cuales se seleccionaron por poseer el color del endocarpio o cuesco marrón claro, poseían endospermo sólido y embriones cigóticos formados (Hormaza et al., 2011; Pádua et al., 2013). En el laboratorio, a unas 32 semillas se les eliminó el mesocarpio y posteriormente el endocarpio, con la ayuda de un abrenueces, antes de la desinfección en la campana de flujo laminar.

Las nueces de los frutos sin endocarpio se esterilizaron superficialmente en alcohol isopropílico al 70 % por 3 minutos, luego se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio 2,5% i.a, por 20 min, y se lavaron tres veces en ADE. Con la ayuda del bisturí se extrajeron los embriones cigóticos y se colocaron horizontalmente en tubos de ensayo en los medios de cultivo (Balzon et al., 2013)

Todos los tipos de explante fueron colocados en condiciones de oscuridad a temperatura promedio de 28 °C.

Se utilizaron medios de cultivo MS base con 30 g·L⁻¹ de sacarosa y 3,0 g·L⁻¹ carbón activado sin regulador de crecimiento (tratamiento testigo), o suplementados con ANA en las concentraciones de 50, 100 y 200 mg·L⁻¹. Se realizaron reciclajes a los 30 días, subcultivando los explantes a los mismos medios de cultivos frescos, hasta lograr la inducción de callos.

Los experimentos se realizaron bajo un diseño completo al azar, con arreglo factorial 4 x 3, que constó de 12 tratamientos (cuatro medios de cultivo y tres tipos de explante), usando de 9 a 14 unidades experimentales, de acuerdo a la disponibilidad de los explantes en el momento de la siembra.

A los 45 días, se cuantificó el porcentaje de contaminación: bacteriana y/o fúngica; y el grado de oxidación de los explantes, según la siguiente escala de oxidación: Nulo: sin oxidación; Inicio: con foco pequeño de color marrón; Medio: con foco mayor al anterior pero <50 % de color marrón; Intenso: >50 % de color marrón. Asimismo, se evaluaron los porcentajes de callogénesis y rizogénesis en los diferentes tejidos.

Los porcentajes obtenidos para las diferentes variables fueron convertidos mediante

transformación angular, así como $y = x + 1$ para eliminar los eventuales excesos de ceros. Se realizó análisis de varianza y separación de medias según la prueba LSD para los tipos de explantes y medios de cultivo. Igualmente, se realizaron análisis de correlación de Pearson y análisis de componentes principales para las variables de contaminación, callogénesis y rizogénesis, utilizando el programa estadístico InfoStat/L (Univ. Córdoba, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza de la contaminación mostró diferencias para el tipo de explante ($P \leq 0,00$), en la inducción de callogénesis para los tipos de explante ($P \leq 0,02$) y medios de cultivo ($P \leq 0,05$) y en la rizogénesis para el tipo de explante ($P \leq 0,05$), sin interacción entre los factores estudiados (Cuadro 1).

Se observó que a los 30 días después de la siembra de los explantes la contaminación interna promedio bacteriana y fúngica fue baja (4,5 %), y la oxidación estuvo entre nula y media. Sólo se observó oxidación intensa en algunas espiguillas de inflorescencias en el medio de

cultivo MS suplementado con 50 a 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA.

A los 45 días, la contaminación interna promedio con bacterias se incrementó, dependiendo del tipo de explante usado. No existió contaminación cuando se utilizaron embriones cigóticos, pero sí en los primordios foliares, con 18,43 %, y las espiguillas de inflorescencias con 23,78 % (Cuadro 2). No se observó contaminación fúngica. Según Rocha (2007), en los laboratorios comerciales de Malasia, la contaminación se mantiene menor al 10 %, cuando se utilizan explantes de primordios foliares. La oxidación permaneció nula, en la siembra de embriones, pero fue media en los primordios foliares y medio-intensa en los tratamientos con las espiguillas de inflorescencias. Asimismo, la oxidación mostró una tendencia a aumentar a medida que aumentaron los niveles de ANA, desde 0 hasta 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Similares resultados con relación a la mayor oxidación y producción de compuestos fenólicos en los primordios foliares y espiguillas de inflorescencias que en los embriones cigóticos han sido reportados previamente (Texeira et al., 1994).

Cuadro 1. Componentes del análisis de varianza para la respuesta citogenética del híbrido de palma aceitera INIAP-Tenera micropropagada mediante tres tipos de explante y cuatro medio de cultivo

Variable	F.V.	Gl	CM	F	P
Contaminación	Tipo de explante	2	714,28	26,99	0,00
	Medio de cultivo	3	11,480	0,43	0,73
Callogénesis	Tipo de explante	2	738,53	7,84	0,02
	Medio de cultivo	3	478,20	5,07	0,05
Rizogénesis	Tipo de explante	2	68,327	4,99	0,05
	Medio de cultivo	3	11,420	0,83	0,53

Se observó la presencia de callos primarios de aspecto friable, translúcido y nodular compacto, de color amarillo o amarillo-marrón, en la superficie cortada de los primordios foliares (Figura 1). Estos explantes presentaron, en promedio, el mayor valor de callogénesis (42,25 %), seguidos por los embriones cigóticos (35,00 %) y las espiguillas de inflorescencias (13,75 %). En este último caso, hubo formación de callo fino primario que sólo se observó en los bordes cortados.

Con relación a los niveles de ANA, el mayor valor de callogénesis (52,00 %) se obtuvo al utilizar el medio suplementado con 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ del regulador (Cuadro 1), indicando que las dosis extremas (0 ó 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) afectaron negativamente el proceso. Hubo presencia de callos friables y nodulares en los medios de cultivo suplementados con ANA, a 50 y 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 1a,b). Se observó que en el medio testigo, aunque hubo bajo porcentaje promedio de callogénesis (14,67 %), existió elongación de los

Vegas et al. Micropropagación en palma africana vs. tipo de explante y niveles de ANA

explantes y brotación de las yemas florales cuando se utilizaron las espiguillas (Figura 1c).

Cuadro 2. Respuestas morfogénicas de tres tipos de explantes del híbrido INIAP-Tenera en medios de cultivo MS suplementados con ANA, a los 45 días

Tipo de explante	Contaminación (%)	Grado de oxidación	Calogénesis (%)	Rizogénesis (%)
Primordios foliares	18,43 a	Nulo-medio	42,25 a	0 b
Inflorescencias (espiguillas)	23,78 a	Medio-intenso	13,75 b	0 b
Embriones cigóticos	0 b	Nulo	35,00 ab	5,80 a
Medio de cultivo (ANA mg·L ⁻¹)				
200	23,38 a	Medio-intenso	22,00 b	0 a
100	12,17 a	Medio	52,00 a	3,03 a
50	11,87 a	Medio	28,33 ab	2,77 a
0	16,67 a	Nulo	14,67 b	0 a

Medias seguidas con la misma letra en cada columna y tratamiento no presentan diferencias significativas según la prueba SD ($P \leq 0,05$)

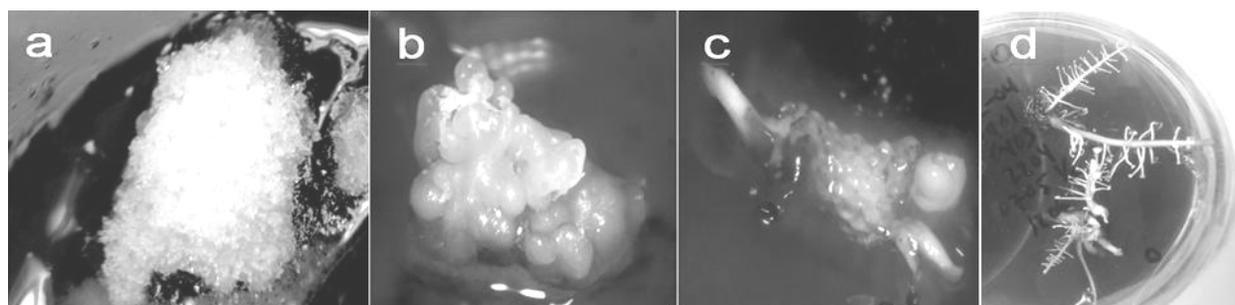


Figura 1. Respuestas morfogénicas de los explantes del híbrido INIAP-Tenera: a) Callo friable traslucido formado en primordio foliar; b) Callo nodular amarillento-marrón inducido en embrión cigótico; c) Brotación de yemas florales en la espiguilla o raquilla; d) Formación de raíces adventicias a partir de embriones cigóticos

Según Thuzar et al. (2012), en el desarrollo de callos nodulares compactos primarios de la palma aceitera, de color amarillento, amarillento-marrón o marrón claro, se observan las zonas compuestas de pequeñas células meristemáticas que se dividen intensamente y después de 5 a 6 meses producen callos embriogénicos blanquecinos, compuestos de células agregadas globulares, lo que indica la existencia de embriogénesis somática secundaria. En nuestro trabajo se logró la inducción de callos nodulares compactos primarios, de color amarillento y marrón claro, a partir de primordios foliares y embriones cigóticos, en medios suplementados con ANA (50 y 100 mg·L⁻¹), similares a los descritos por los autores mencionados (Figura 1).

Los resultados corroboran lo indicado por otros autores (Madon et al., 2012; Thuzar et al., 2012; Balzon et al., 2013) en cuanto a que la

inducción de callo primario en explantes de este híbrido de palma africana ocurre a partir de 4 a 6 semanas después de la incubación y es afectada por la concentración de la auxina y el tipo de explante.

El hecho que los porcentajes de calogénesis fueron superiores en los primordios foliares seguidos por los embriones cigóticos, coincide con la afirmación de Rocha (2007) quien destacó la importancia del uso de estos tejidos como fuentes de explantes en la micropropagación de palmas élite seleccionadas por el fitomejorador y aclaró que la extracción de los primordios no resultaría en la destrucción de la planta, si al extraerlos no se lesiona el meristemo. Sin embargo, los embriones cigóticos son preferidos como fuente de explantes por su alta disponibilidad y facilidad de transporte, el grado de uniformidad fisiológica, la conservación por

largos periodos de tiempo en condiciones *in vitro*, y la posibilidad de clonar cruces dirigidos, facilitando el estudio de su establecimiento y conservación del cultivo *in vitro*, así como la inducción de la calogénesis y embriogénesis (Engelmann 1990; Thuzar et al., 2012; Balzon et al., 2013).

El porcentaje de rizogénesis encontrado en este estudio fue reducido y ocurrió solamente en los explantes de embriones cigóticos (Figura 1d). Se observó que el mayor valor individual (9,09 %) se obtuvo en este tipo de explante con la dosis de 100 mg·L⁻¹ de ANA. Asimismo, es de destacar que en los primordios foliares hubo formación de raíces pero sólo a los 75 días después de la siembra de los explantes.

El análisis de componentes principales (Figura

2) demostró que el 91,8 % de la varianza de las variables evaluadas fue suficiente al incluir dos componentes principales (64,7 % para CP1 y 27,1 % para CP2). Se destaca que los explantes provenientes de inflorescencias masculinas presentaron una mayor contaminación, mientras que los embriones cigóticos fueron más propensos a la calogénesis y la rizogénesis, al igual que los primordios foliares implantados en el medio MS suplementado con 100 mg·L⁻¹ de ANA. Por su parte, las variables calogénesis y rizogénesis estuvieron muy relacionadas entre sí.

Lo anterior se corrobora en la matriz de correlación entre las variables morfogénicas, donde se evidenció una correlación positiva de 0,74, altamente significativa, entre los porcentajes de calogénesis y rizogénesis (Cuadro 4).

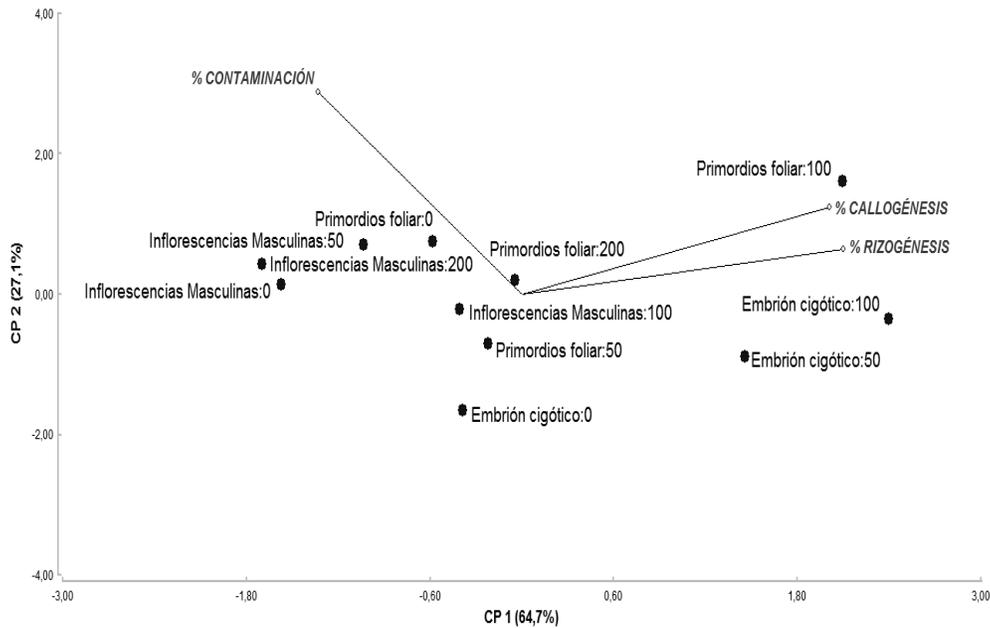


Figura 2. Análisis de componentes de las variables analizadas: porcentajes de contaminación, calogénesis y rizogénesis; en relación a los explantes y los medios de cultivo utilizados

Cuadro 3. Coeficientes de correlación de Pearson entre variables morfogénicas en palma africana híbrido INIAP-Tenera (en paréntesis la probabilidad)

	Contaminación	Calogénesis	Rizogénesis
Contaminación	1,00	-0,25 (0,47)	-0,36 (0,27)
Calogénesis	-	1,00	0,74 (0,01)
Rizogénesis	-	-	1,00

CONCLUSIONES

Se logró el establecimiento de tres explantes del híbrido INIAP-Tenera, con bajos niveles de contaminación y oxidación, lo cual permitió obtener respuestas morfogénicas diferenciales: formación de callos primarios y raíces, y brotación de yemas florales.

La contaminación no fue afectada por la dosis de ANA pero sí por el tipo de explante (menor contaminación en los embriones cigóticos). El mejor medio de cultivo para la calogénesis con los primordios foliares y embriones fue el MS suplementado con $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA, mientras que la rizogénesis ocurrió sólo en los explantes de embriones cigóticos, independientemente de la dosis de ANA.

LITERATURA CITADA

1. Abul-Soad, A. 2011. Micropropagation of date palm using inflorescence explants. *In*: S. Jain, J. Khayri y D. Johson (eds.). Date Palm Biotechnology. Springer. Dordrecht, Netherlands. pp. 91-117.
2. Aguirre, C. 2012. Inducción de callos embriogénicos en explantes INIAP de palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) y Palma americana (*E. oleifera* H.B.K) con resistencia y/o tolerancia a la pudrición del cogollo. Trabajo de grado. Escuela Politécnica del Ejército. Sto. Domingo. Ecuador. 63 p.
3. Balzon, T., L. Zanderluce y J. Scherwinski-Pereira. 2013. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 49: 41-50.
4. Carvalho, M. 2009. Embriogenese somática a partir de folhas imaturas e flores desenvolvidas in vitro del dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). Tesis Doctoral. Universidad Federal de Vicosa. Minas Gerais. Brasil. 73 p.
5. Eeuwens, C. 1978. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. *Physiol. Plant* 36: 23-28.
6. Engelmann, F. 1990. Intéret de la cryoconservation des organes végétaux: cas des embryons somatiques de palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Int. J. Refrig.* 13: 26-30.
7. Hormaza, P., D. Forero, R. Ruiz y E. Romero. 2011. Fenología de la palma de aceite africana (*Elaeis guineensis* Jaq.) y del híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*). Centro de Investigación de Palma de Aceite, Cenipalma. Bogotá. 110 p.
8. INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias). 2003. Manual del cultivo de palma aceitera para la zona noroccidental del Ecuador. Quito 125 p.
9. INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias). 2015. Manual del cultivo de palma aceitera. 107 p.
10. Jayanthi, M., B. Susanthi, N. Murali y P. Kumar. 2015. *In vitro* somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura an tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). SpringerPlus 4: 256.
11. Jones, L. 1974. Propagation of clonal palms by tissue culture. *Oil Palm News* 17: 1-8.
12. Kanchanapoom, K., A. Phongdara y K. Kanchanapoom. 2010. The effect of chitosan on the organogenesis of oil palm embryo-derived callus. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj-Napoca.* 38(1): 213-217.
13. Madon, M. 2012. Ploidy induction through secondary somatic embryo (SSE) of oil palm by colchicine treatment. *Journal Agricultural Technology* 8: 337-352.
14. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.
15. Nitsch, J. y C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
16. Pádua, M., L. Paiva, C. Labory, E. Alves y V. Stein. 2013. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. *An. Acad. Bras. Cienc.* 85(4): 1545-1556.

17. Rocha, P. 2007. Cultivo de tejidos: una herramienta valiosa para el desarrollo de la palma de aceite en Colombia. *Palmas* 28(1): 53-63.
18. Rohani, O., I. Zamburi y A. Tarmizi. 2003. Oil palm cloning: MPOB protocol. Malaysian Palm Oil Board. Ministry of primary Industries. Malaysia. MPOB Technology 26: 1-26.
19. Teixeira, J., M. Sondahl y E. Kirby. 1994. Somatic embryogenesis from immature inflorescens of oil palm. *Plant Cell Report* 13: 247-250.
20. Ting N., J. Jansen, J. Nagappan, Z. Ishak, C. Chin, G. Tan, et al. 2013. Identification of QTLs associated with callogenesis and embryogenesis in oil palm using genetic linkage maps improved with SSR markers. *PlosOne* 8(1): 1-16.
21. 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.