

# Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae)

## Factors affecting *in vitro* somatic embryogenesis of palms (Arecaceae)

María Viñas\*, Víctor M. Jiménez\*\*

### Resumen

La embriogénesis somática (ES) es una vía de desarrollo *in vitro* que presenta una serie de ventajas sobre otras técnicas utilizadas para la regeneración de palmas. Esta técnica tiene gran potencial para superar las limitaciones observadas al tratar de propagar clonalmente estas plantas utilizando yemas basales. A pesar de la conocida recalcitrancia que presentan las palmas al cultivo *in vitro*, si se utilizan los reguladores de crecimiento apropiados, el tipo y el estado de desarrollo del explante adecuados, así como genotipos con buena respuesta, es muy probable que se obtengan buenos resultados. Esto ha sido demostrado parcialmente en *Phoenix dactylifera* (palma dátíl), *Elaeis guineensis* (palma aceitera), *Bactris gasipaes* (pejibaye) y *Cocos nucifera* (coco). También se ha logrado generar protocolos eficientes en otras palmas menos estudiadas, como *Geonoma gamiova* (una palma ornamental), *Euterpe edulis* (palmito dulce) y *Areca catechu* (palma de betel). La inducción de ES se ha conseguido principalmente con el uso de auxinas. De ellas, la que se ha utilizado con más frecuencia es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), aunque en algunos casos (como en pejibaye y palma aceitera) se ha usado picloram y dicamba, también con buenos resultados. Los explantes más utilizados han sido inflorescencias, ápices y segmentos basales de hojas, todos con un estado de desarrollo incipiente. También se ha visto que el tamaño del explante y el medio de cultivo juegan un papel importante en la respuesta. En este trabajo se presenta una recopilación de los trabajos más importantes sobre ES en esta familia de plantas y del efecto de varios factores sobre su establecimiento y desarrollo.

**Palabras clave:** Explante, genotipo, medio de cultivo, regeneración, reguladores de crecimiento

### Abstract

Somatic embryogenesis (SE) is an *in vitro* developmental pathway that exhibits a number of advantages over other techniques for regeneration of palms. This technique has great potential to overcome the limitations observed when trying to propagate these plants clonally using basal buds. Despite the known recalcitrance of palms for *in vitro* culture, good results can be obtained by using the appropriate growth regulators, explant type and developmental stage, as well as responsive genotypes. This has been partially observed in *Phoenix dactylifera* (date palm), *Elaeis guineensis* (African oil palm), *Bactris gasipaes* (peach palm) and *Cocos nucifera* (coconut). Efficient protocols have been also generated in less-studied palms, such as *Geonoma gamiova* (an ornamental palm), *Euterpe edulis* (Assai palm) and *Areca catechu* (areca palm). Induction of SE has been achieved mainly through the use of auxins. Of these, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) has been used most frequently, although in some cases (such as in peach palm and African oil palm) picloram and dicamba have been employed also with good results. The most commonly used explants are young inflorescences, apical buds and leaf-basal segments. Explant size and culture medium also play an important role in obtaining good results. This review presents a compilation of the most important publications on SE in this plant family and the effect of various factors on induction and development of this pathway.

**Key words:** Culture medium, explant, genotype, plant growth regulators, regeneration

**Recibido:** abril 13 de 2011

**Aprobado:** noviembre 24 de 2011

\* M.Sc., CIGRAS, Universidad de Costa Rica e-mail: maria.vinas@ucr.ac.cr

\*\* Ph.D., CIGRAS, Universidad de Costa Rica e-mail: victor.jimenez@ucr.ac.cr

## Introducción

La embriogénesis somática (ES) es un proceso que implica la formación de embriones a partir de células somáticas vegetales (Von Arnold *et al.*, 2002). Estos embriones poseen, al igual que los embriones cigóticos, una estructura bipolar con ápices de tallo y de raíz (Lelu *et al.*, 1993). Algunos autores indican que los embriones somáticos tienen un origen unicelular (Carman, 1990; Terzi and Lo Schiavo, 1990), mientras que otros proponen orígenes tanto unicelular como multicelular (Perera *et al.*, 2007, Gahan and George, 2008).

Para que ocurra la reprogramación en una célula somática y esta comience a diferenciar un embrión, su patrón de expresión génica debe cambiar (Dodeman *et al.*, 1997; Low *et al.*, 2008). Es probable que esta regulación génica se deba a factores epigenéticos como la metilación del ADN (Von Arnold, 2008) y compactaciones o descompactaciones en la disposición de la cromatina (Fehér *et al.*, 2003). Según Von Arnold *et al.* (2002), los reguladores de crecimiento, principalmente las auxinas, juegan un papel muy importante en la transducción de señales para desencadenar un patrón de expresión génica determinado. De todas las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), utilizado en la mayoría de los casos para la inducción de ES, es el que promueve la hipermetilación del ADN con mayor facilidad (Terzi and Lo Shiavo, 1990; Causevic *et al.*, 2005).

Los embriones somáticos *in vitro* pueden provenir de células que pasaron por un proceso de desdiferenciación, como en callos o suspensiones celulares, en lo que se conoce como ES indirecta o, sin pasar por ese proceso de desdiferenciación, en lo que se denomina ES directa (Von Arnold, 2008).

Las palmas, con cerca de 3500 especies, constituyen un grupo particular de plantas tropicales y subtropicales, con crecimiento exclusivamente primario (Tomlinson, 2006). Su importancia económica las sitúa únicamente detrás de las gramíneas entre todos los grupos de plantas. Se utilizan como fuente de alimento, abrigo, tejidos y combustible, principalmente en los trópicos (Glimn-Lacy and Kaufman, 2006). En palmas, la mayoría de los estudios mencionan la ocurrencia de ES indirecta, que permite la producción de una progenie más numerosa, tal y como se ha observado en palma dátil (*Phoenix dactylifera*), palma aceitera (*Elaeis guineensis*), palma de betel (*Areca catechu*) y coco (*Cocos nucifera*) (Rajesh *et al.*, 2003; Konan *et al.*, 2006; Pérez-Núñez *et al.*, 2006; Te-chato and Hilae, 2007; Wang *et al.*, 2010). Según Gueye *et al.* (2009), la formación de callo es un prerequisite indispensable en palma dátil para la inducción de ES. Sin embargo, debido a este paso previo, muchas veces las plantas

resultantes presentan cierto grado de variación somaclonal. Según Jaligot *et al.*, (2000) y Lucia *et al.*, (2011), esa variación es ocasionada por factores epigenéticos en palma aceitera y se manifiesta principalmente como deformaciones durante el desarrollo floral. En esta especie, sin embargo, Sanputawong and Te-chato (2011) no observaron variación somaclonal en las plantas propagadas mediante ES indirecta, utilizando marcadores moleculares SSR (Repeticiones de Secuencia Simple).

Al igual que en muchas otras especies, en palmas el proceso de regeneración de plantas mediante ES se divide en varias etapas. En cada una existen variaciones en cuanto a las condiciones de cultivo, los reguladores de crecimiento, los medios de cultivo utilizados, entre otras (Von Arnold *et al.*, 2002). Las cuatro etapas generales de la ES indirecta (la más común en palmas, como se mencionó anteriormente) son:

- Callo proembriogénico (CP): donde se establece el estímulo celular para que inicie la ES y se forme la masa de células proembriogénicas. La etapa de CP implica una división asimétrica de las células en respuesta a reguladores de crecimiento, usualmente auxinas. Además, se caracteriza por una acidificación del citoplasma y de la pared celular en las células con capacidad embriogénica.
- Desarrollo proembriogénico (DP): se fomenta el crecimiento de la masa proembriogénica formada anteriormente.
- Maduración de proembriones (MP): se estimula la conversión de proembriones a embriones. Durante esta etapa los embriones somáticos comienzan a acumular productos de reserva. En muchos casos la maduración del embrión requiere la deshidratación previa.
- Desarrollo de embriones (DE): se estimula el crecimiento de los embriones, que pasan por las etapas características de su desarrollo (globular, escutelar y coleoptilar) hasta que se convierten en pequeñas plantas completas (germinación de embriones).

La capacidad para producir embriones somáticos está genéticamente predeterminada (Von Arnold *et al.*, 2002), por lo que la respuesta ante tratamientos varía según la especie con la cual se esté trabajando. En palmas la inducción de embriones es difícil mientras que en otras especies, como *Daucus carota*, la ES ocurre fácilmente cuando los tejidos se colocan en el medio de cultivo adecuado (Von Arnold, 2008).

La multiplicación de palmas por medio de ES puede ser importante, ya que muchas de estas monocotile-

dóneas perennes producen muy pocos hijos basales y estos son difíciles de enraizar (Eke et al., 2005; Asemota et al., 2007; Othmani et al., 2009). Asemota et al. (2007) afirman que incluso algunos genotipos de palma dátíl nunca producen hijos basales.

La recalcitrancia que presentan las palmas al cultivo *in vitro* es ampliamente conocida. Aun así, muchos autores mencionan haber desarrollado protocolos eficientes para la inducción de ES *in vitro* en palmas, como en el caso de palma dátíl (Eke et al., 2005; Al-Khayri, 2005; Asemota et al., 2007), palma aceitera (Rajesh et al., 2003; Konan et al., 2006; Konan et al., 2007), *Bactris gasipaes-pejibaye* (De Almeida and Vieira, 2006; Steinmacher, 2007abc) y coco (Verdeil et al., 1994; Chan et al., 1998). Otras palmas menos estudiadas son: *Geonoma gamiova* (una palma ornamental) (Dias et al., 1994), *Euterpe edulis* (palmito dulce) (Guerra and Handro, 1988; Guerra and Handro, 1998) y palma de betel (Wang et al., 2003; Karun et al., 2004; Wang et al., 2006).

Los aspectos que más influyen sobre la ES en palmas, así como en otras especies vegetales, en orden de importancia, son: los reguladores de crecimiento, el tipo de explante, el genotipo, el estado de desarrollo del explante, el medio de cultivo y el tamaño del explante (Badawy et al., 2005; Asemota et al., 2007; Steinmacher et al., 2007a; Gueye et al., 2009; Perera et al., 2009). A continuación se presentará un resumen de los principales estudios en palmas realizados hasta el momento para determinar la influencia que ejercen cada uno de estos factores sobre la ES.

## Factores que influyen sobre la ES en palmas

### Reguladores de crecimiento

En todas las familias de plantas, incluyendo la *Arecaceae*, el aspecto más importante para combatir la recalcitrancia durante el cultivo *in vitro* es la selección adecuada de los reguladores de crecimiento que se incorporan en el medio de cultivo (Benson, 2000). Al respecto, es muy importante tener en cuenta que los explantes se encuentran bajo el control de reguladores de crecimiento tanto endógenos como exógenos y que el balance de estos es el que determina el resultado final (Jiménez, 2005). Por ejemplo, Jiménez et al. (2005) mostraron la participación de las hormonas endógenas en la respuesta embriogénica en zanahoria, mientras que, en palma dátíl, Othmani et al. (2009) determinaron que la aplicación exógena de reguladores de crecimiento es indispensable para la producción de callo embriogénico. Esa interacción entre reguladores

de crecimiento exógenos y hormonas endógenas ha sido estudiada previamente en varias especies (Jiménez, 2005).

Tanto en palmas como en otras familias de plantas, las auxinas son los reguladores de crecimiento más ampliamente utilizados para inducir callo con potencial embriogénico. De las auxinas disponibles, la más utilizada es el 2,4-D (Fehér et al., 2003; Phillips, 2004). A continuación se detallarán los reguladores de crecimiento más utilizados en palmas durante cada una de las etapas de la ES descritas anteriormente:

**Etapas CP:** en palmas, la auxina utilizada con más frecuencia para esta etapa es el 2,4-D (Verdeil et al., 1994; Ledo et al., 2002; Eke et al., 2005; Saldanha et al., 2006; Gueye et al., 2009), aunque picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) y/o dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico) se han utilizado también en pejibaye (Steinmacher et al., 2007abc; Maciel et al., 2010; Steinmacher et al., 2011), *Areca catechu* (Karun et al., 2004; Wang et al., 2010) y palma aceitera (Kramut and Te-chato, 2010; Scherwinski-Pereira et al., 2010; Thuzar et al., 2011; Sanputawong and Te-chato, 2011) con buenos resultados. Recientemente se ha observado la expresión diferencial de transcritos en suspensiones celulares de palma aceitera de acuerdo con el tipo y concentración de auxina utilizada en esta etapa (Roowi et al., 2010). Aunque en la mayoría de los casos se han utilizado concentraciones altas de 2,4-D durante esta etapa ( $>100 \mu\text{M}$ ), Thi-Lan et al. (1999) observaron que concentraciones mayores a  $90,5 \mu\text{M}$  de este regulador de crecimiento inhibieron por completo la inducción de callo embriogénico en *Phoenix canariensis* "Canary Island". En palma aceitera el uso de bajas concentraciones de 2,4-D ( $5 \mu\text{M}$ ), junto con Picloram ( $1 \mu\text{M}$ ), produjo la mejor respuesta en cuanto a inducción de callo embriogénico utilizando hojas inmaduras como explante (Yusnita, 2011).

Algunos autores han utilizado, además de auxina, citoquininas como la BAP (6-bencilaminopurina) ( $22,2 \mu\text{M}$ ) (Zouine and El Hadrami, 2007) y la 2ip ( $\text{N}^6$ -(2-isopenteniladenina)) en bajas concentraciones ( $15 \mu\text{M}$ ) (Veramendi and Navarro, 1997; Al-Khayri, 2001; Badawy et al., 2005; Eke et al., 2005; Eshraghi et al., 2005) o bien tidiázurón ( $9 - 90 \mu\text{M}$ ), también con buenos resultados (Perera et al., 2009; Sidky and Zaid, 2011). El uso solo de esta última citoquinina en altas concentraciones provocó la inducción de embriogénesis directa sin previa producción de callo en palma aceitera (Sidky and Zaid, 2011). Es importante tener en cuenta que el uso de citoquininas en altas concentraciones podría aumentar la acumulación de compuestos fenólicos y por tanto, afectar negativamente la inducción y

el crecimiento de los embriones somáticos en palmas (Abohatem *et al.*, 2011)

Azpeitia *et al.* (2003), con la utilización de explantes de plúmula de coco, mostraron que el uso del brasinosteroides brassinolide antes de la etapa CP (3 a 7 días), ayuda a aumentar la respuesta ante el 2,4-D, actuando de forma sinérgica con otras auxinas, como se ha observado en diversas plantas (Nakamura *et al.*, 2003).

**Etapas DP:** en esta etapa generalmente se elimina por completo del medio de cultivo la auxina utilizada durante la etapa CP, o bien se reduce su concentración (Thomas and Rao, 1985; Valverde *et al.*, 1989; Verdeil *et al.*, 1994; Fki *et al.*, 2003; Othmani *et al.*, 2009; Perera *et al.*, 2009). Al respecto, es importante destacar que subcultivos sucesivos en medio de cultivo con altas concentraciones de auxinas durante la etapa DP pueden provocar que, posteriormente durante la etapa DE, se inhiba el desarrollo de los embriones. Esto fue observado por Aberlenc-Bertossi *et al.* (1999) y Guerra y Handro (1998) en palma aceitera y *Euterpe edulis*, respectivamente. Por otro lado, en *Areca catechu*, subcultivos sucesivos en medio suplementado con dicamba llevaron a la formación de embriones somáticos anormales (Wang *et al.*, 2010).

Al-Khayri (2001) utilizó altas concentraciones de 2ip (148  $\mu\text{M}$ ) y bajas concentraciones de ANA (ácido naltalenacético) (54  $\mu\text{M}$ ) en palma datil, mientras que Pérez-Núñez *et al.* (2006) redujeron la concentración de 2,4-D de 600  $\mu\text{M}$  a 6  $\mu\text{M}$  y adicionaron 300  $\mu\text{M}$  de BAP en coco. Con este último procedimiento, los autores generaron altas cantidades de embriones (9,8 millones de embriones/100 plúmulas). En *Phoenix canariensis* la mejor combinación de reguladores de crecimiento para esta etapa fue 2,26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 0,83  $\mu\text{M}$  de kinetina (6-furfurilaminopurina) y 2  $\mu\text{M}$  de ABA (ácido abscísico) (Thi-Lan *et al.*, 1999).

**Etapas MP:** A diferencia lo que se realiza comúnmente con otras especies, en las cuales durante esta etapa se eliminan completamente los reguladores de crecimiento del medio de cultivo (Dudits *et al.*, 1991; Komamine *et al.*, 1992; Von Arnold *et al.*, 2002), en palmas, luego de su formación, los proembriones se subcultivan directamente en un medio de cultivo con los reguladores de crecimiento utilizados para la etapa DE (Eshraghi *et al.*, 2005; Steinmacher *et al.*, 2007c; Othmani *et al.*, 2009). Sin embargo, en contraste con lo anterior, Konan *et al.* (2010) lograron conservar embriones somáticos de palma aceitera por al menos 20 años en medio desprovisto de reguladores de crecimiento. También obtuvieron porcentajes de regeneración de alrededor de 30% en varios genotipos.

**Etapas DE:** en el caso de las palmas, como se mencionó anteriormente, la maduración del embrión, es decir, su conversión hacia plantas completas, requiere, en la mayoría de los casos, del uso de reguladores de crecimiento. No existe ningún regulador de crecimiento utilizado con mayor frecuencia, aunque el ABA (1 mg/L) ha mostrado ser efectivo en coco (Fernando and Gamage, 2000; Perera *et al.*, 2007), palma datil (Zouine *et al.*, 2005; Othmani *et al.*, 2009; Sghaier *et al.*, 2009) y *Phoenix canariensis* (Huong *et al.*, 1999; Thi-Lan *et al.*, 1999). Sghaier-Hammami *et al.* (2010) mostraron que la adición de ABA en el medio de cultivo incrementa significativamente el contenido de proteína dentro de los tejidos, principalmente proteínas abundantes durante la embriogénesis tardía (LEA) implicadas en la protección del embrión a la desecación. Thi Lan *et al.* (1999) mostraron, además, que el medio de cultivo adicionado solamente con BAP, kinetina o 2ip inhibió por completo el desarrollo de los embriones, mientras que Yusnita (2011) utilizó BAP durante esta etapa en palma aceitera logrando un buen desarrollo de los embriones

Perera *et al.* (2009) utilizaron BAP (5  $\mu\text{M}$ ), en conjunto con 2ip (5  $\mu\text{M}$ ), en el medio de cultivo durante esta etapa y lograron aproximadamente un 85% de conversión de embriones de coco. Estos autores mostraron, además, que la inclusión de ácido giberélico ( $\text{AG}_3$ ) (0,45  $\mu\text{M}$ ) al medio de cultivo fomentó considerablemente la maduración de embriones de esta planta, mientras que la adición de ABA no favoreció la maduración. El efecto positivo del  $\text{AG}_3$  en la formación y germinación de embriones somáticos también fue observado por Montero-Córtes *et al.* (2010) en esta misma especie.

Además, otros autores han utilizado auxinas en esta etapa con buenos resultados (Al-Khayri, 2003; Othmani *et al.*, 2009). Al-Khayri (2003) utilizó ácido indol-3-butírico (AIB) (0,98-1,97  $\mu\text{M}$ ) y obtuvo entre un 80 y un 90% de germinación de embriones somáticos de palma datil, comparado con la misma concentración de ANA, con la cual se lograron apenas entre un 40 y 60% en la germinación de los embriones.

Una excepción a lo anterior es el caso de palma aceitera, en la cual Scherwinski-Pereira *et al.* (2010) lograron la conversión a plantas completas eliminando en su totalidad los reguladores de crecimiento del medio de cultivo.

### **Tipo de explante**

Existen algunos tejidos que responden mejor a los tratamientos para inducción de ES que otros. Para lograr la regeneración de embriones somáticos en plantas

monocotiledóneas es muy importante la selección de explantes que contengan regiones meristemáticas (Benson, 2000). Es por ello que en palmas comúnmente se utiliza tejido somático inmaduro, como es el caso de inflorescencias, ápices y secciones basales de hojas. En algunos casos también se ha reportado el uso de raíces, como por ejemplo las provenientes de plantas de *Areca catechu* en cultivo *in vitro* (Wang *et al.*, 2006). Estos autores encontraron mayor formación de callo embriogénico en raíces que en hojas y tallos.

Se ha observado que la respuesta embriogénica puede variar, aun en una misma especie de palma, según el tipo de tejido utilizado. Por ejemplo, en algunas especies la mejor respuesta se logra con inflorescencias mientras que en otras, se logra con el uso de hojas. Thuc *et al.* (2011) encontraron, en palma aceitera, un posible marcador molecular (el transcripto Eg707) que permite identificar estadios tempranos de ES en los explantes, ya que se expresa mayoritariamente en tejido con potencial embriogénico. Esto permitiría descartar explantes sin esperar hasta que ocurra una respuesta visible, ahorrando de esta forma tiempo y recursos.

Los embriones cigóticos responden muy bien a varios tratamientos para inducir ES, tal y como lo mostraron Huang *et al.* (1999) y Thi-Lan *et al.* (1999) en *Phoenix canariensis* y Teixeira *et al.* (1993) en palma aceitera. Al comparar la respuesta entre embriones cigóticos y ápices, los primeros presentaron significativamente mayor potencial para la formación de callo embriogénico. Sin embargo, en muchos casos la aplicación de la metodología desarrollada para un explante, en este caso embriones cigóticos, no lleva a los mismos resultados en otros tejidos (Chan *et al.*, 1998).

Chan *et al.* (1998) y Azpeitia *et al.* (2003) utilizaron plúmulas provenientes de embriones en frutos de coco y obtuvieron buenos rendimientos (>50%) en la formación de embriones. Los cambios morfológicos e histológicos que ocurren durante este proceso fueron descritos y caracterizados posteriormente (Sáenz *et al.*, 2006). En palma aceitera, Thomas and Rao (1985) utilizaron solamente la sección basal de la hoja para la inducción de ES, logrando que un 50% de los explantes produjeran callo embriogénico.

En pejíbaye y coco se ha reportado el uso de inflorescencias, ya que en estas dos especies la ES a partir de ápices y hojas no es sencilla (Valverde *et al.*, 1989; Verdeil *et al.*, 1994; Steinmacher *et al.*, 2007a). En coco, además se han utilizado ovarios no fertilizados para la inducción de ES con buenos resultados (Perera *et al.*, 2007; Perera *et al.*, 2009). En este último caso, el callo embriogénico se formó a partir del carpelo del ovario,

por lo que las plantas obtenidas fueron diploides. El uso de plántulas de *Hyophorbe lagenicaulis*, palma en peligro de extinción, con tres semanas de edad, seccionadas de forma longitudinal y cultivadas en medio MS (Murashige and Skoog, 1962), con 3 mg/l 2,4-D indujo la formación de embriones somáticos de forma directa; sin embargo, no fue posible aclimatarlos en el suelo (Sarasan *et al.*, 2002).

Badawy *et al.* (2005) utilizaron ápices, yemas axilares y hojas de palma dátíl, aplicaron los mismos tratamientos en todos los tipos de explante, y encontraron que el explante que mejor respondió ante los tratamientos fue el ápice, seguido de la yema axilar. En esta especie no es común el uso de inflorescencias como explante para la inducción de ES. También en palma dátíl, Veramendi and Navarro (1997) utilizaron diferentes explantes para la inducción de callo embriogénico (tejido subapical, ápices y yemas de la planta, además de ápices, bases y fragmentos de las hojas) y observaron que los ápices y las yemas de la planta así como las bases de las hojas produjeron la mayor cantidad de callo, donde los dos primeros tuvieron rendimientos de entre 96 y 100% en la formación de callo.

Teixeira *et al.* (1994) utilizaron inflorescencias inmaduras de palma aceitera y lograron la inducción de callo embriogénico luego de 81 semanas de cultivo. Sin embargo, la mayoría de los explantes se oxidaron. Es probable que por ello los tejidos más utilizados en esta especie sean las hojas jóvenes provenientes de plantas adultas (Schwendiman *et al.*, 1988; De Touchet *et al.*, 1991; Lucia *et al.*, 2011; Thuc *et al.*, 2011). Guerra y Handro (1998) utilizaron embriones, inflorescencias y hojas para la producción de embriones somáticos en *Euterpe edulis*; sin embargo, solamente con los dos primeros lograron producción de plantas completas. También se han utilizado anteras de coco para inducir callo embriogénico, embriones somáticos y, posteriormente, regeneración de plantas, aunque con una frecuencia de únicamente 7% (Perera *et al.*, 2008).

El cuadro 1 resume la composición de reguladores de crecimiento en algunos de los casos más exitosos reportados hasta el momento en palmas durante cada etapa, excepto la MP, en la cual, como se detalló anteriormente, no hay variaciones en el medio de cultivo ya que los explantes son subcultivados directamente a medio de cultivo suplementado con los reguladores de crecimiento característicos de la etapa DE. Además, se indica el tipo de explante utilizado, ya que, como se mencionó anteriormente, es el segundo factor más importante para la inducción de ES en palmas.

**Cuadro 1.** Tipo de explante y reguladores de crecimiento utilizados en las diferentes etapas durante la ES en varias especies de palma

Especie	Explante*	ETAPA DE LA ES**						Referencia
		CP		DP		DE		
		Nombre	Concentración (μM)	Nombre	Concentración (μM)	Nombre	Concentración (μM)	
<i>Bactris gasipaes</i>	I	Picloram	300	Picloram	300	2,4-D	40	Steinmacher <i>et al.</i> (2007a)
						2-ip	10	
<i>Cocos nucifera</i>	I	2,4-D	200-300	2,4-D	150-200	BAP	10	Verdeil <i>et al.</i> (1994)
	P	2,4-D	100	2,4-D	1	2,4-D	1	Chan <i>et al.</i> (1998)
				BAP	50	BAP	50	
	P	2,4-D	550	2,4-D	6	2,4-D	6	Azpeitia <i>et al.</i> (2003)
		HBr*	0,01-0,1	BAP	300	BAP	300	
	P	2,4-D	600	2,4-D	600	2,4-D	6	Pérez-Núñez <i>et al.</i> (2006)
						BAP	300	
	O	2,4-D	100	ABA	5	NO		Perera <i>et al.</i> (2007)
	O	2,4-D	100	2,4-D	66	BAP	5	Perera <i>et al.</i> (2009)
		TDZ	9			2ip	5	
<i>Elaeis guineensis</i>	H	2,4-D	362-905	2,4-D	113,1-905	2,4-D	362-452,5	de Touchet <i>et al.</i> (1991)
		BAP	4,4	BAP	4,4	BAP	4,4	
	I	2,4-D	475	2,4-D	500	ANA	15	Teixeira <i>et al.</i> (1994)
						ABA	2	
	EC	2,4-D	113,12	2,4-D	0,045	2,4-D	0,045	Rajesh <i>et al.</i> (2003)
		2ip	14,76	Putrescina	1000	Putrescina	1000	
<i>Phoenix dactylifera</i>	A	2,4-D	453	ANA	54	No		Al-Khayri (2001)
		2ip	15	2ip	7			
	I	2,4-D	45,2	2,4-D	4,5			Fki <i>et al.</i> (2003)
	H	2,4-D	2,3	2,4-D	4,5			
	A	2,4-D	452,5	ANA	53,7			Al-Khayri (2005, 2007)
		2ip	14,8	2ip	29,5			
	A, PF, YA	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	
	A	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	
	H	2,4-D	45,2	2,4-D	0,45	ABA	3,8	Othmani <i>et al.</i> (2009)

\* PF = Primordio foliar; H= hojas; YA= yema axilar; A= ápice; EC= embrión cigótico; O= óvulos; I= inflorescencias; P= plúmula.  
HBr = 22(S),23(S)-homobrassinolide

\*\* CP = callo proembriogénico, DP= desarrollo proembriogénico, DE= desarrollo de embriones

## Genotipo

En la familia Arecaceae se ha observado la influencia del genotipo sobre la respuesta embriogénica en las especies más estudiadas: pejobaye, coco, palma dátíl y palma aceitera. En pejobaye, por ejemplo, inflorescencias de varios genotipos presentaron respuestas significativamente diferentes a los mismos tratamientos durante la inducción de ES (Steinmacher *et al.*, 2007a). En palma dátíl el número de embriones somáticos formados fue significativamente diferente en dos cultivares expuestos a los mismos tratamientos de concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento (Zouine and El Hadrami, 2007). En coco, Verdeil *et al.* (1994) encontraron respuesta diferencial al 2,4-D durante la etapa CP en los tres genotipos utilizados.

En palma dátíl la etapa CP depende en gran medida del genotipo (Gueye *et al.* 2009). Esta sería la principal limitante para la propagación de genotipos importantes de esta especie. Eshraghi *et al.*, (2005) demostraron que dos cultivares iraníes de palma dátíl respondieron de diferente manera en todas las etapas. En ese caso solamente uno de los cultivares (Khanizi) logró alcanzar la etapa MP. Sumado a esto, Al-Khayri and Al-Bahrany (2004) reportaron diferencias en la respuesta ante diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  durante la etapa DP en diferentes genotipos de palma dátíl. El  $\text{AgNO}_3$  se ha utilizado para favorecer la ES en especies como maíz (Songstad *et al.*, 1991) gracias a su acción como inhibidor de la actividad del etileno (Kumar *et al.*, 1998). Se ha reportado que el etileno también puede inhibir la respuesta morfogénica *in vitro* en *Passiflora edulis* (Kumar *et al.*, 2009) y zanahoria (Tisserat and Murashige, 1977). Por otro lado, Zouine and El Hadrami (2004) mostraron que dos genotipos de palma dátíl respondieron de forma significativamente diferente ante distintas dosis de sacarosa durante la etapa DP. Mientras que Aslam *et al.* (2011) y Al-Khayri (2011a) mostraron que la respuesta durante todas las etapas de la ES fue diferente entre los genotipos de palma dátíl evaluados.

En palma aceitera también se ha reportado influencia del genotipo en la maduración de los embriones durante la etapa MP con el uso de BAP. En este caso, solamente algunos clones respondieron positivamente al tratamiento con diferentes concentraciones de esta citoquinina (Aberlenc-Bertossi *et al.*, 1999).

El efecto tan determinante del genotipo en la respuesta embriogénica ha impedido definir un protocolo particular que se pueda aplicar en forma general para una misma especie de palmas. Lo anterior probablemente está relacionado con la alta diversidad genética presente en los miembros de esta familia de plantas, que

se ve acentuada por el hecho de que la propagación por semilla, producto muchas veces de un proceso de polinización abierta, predomina sobre la propagación vegetativa (Elshibli and Korpelainen, 2008). Solo se conocen protocolos para la embriogénesis somática de variedades específicas en el caso de palma dátíl (Fki *et al.*, 2003; Eke *et al.*, 2005; Eshraghi *et al.*, 2005).

## Estado de desarrollo del explante

La capacidad que posee una célula o grupo de células para convertirse en embriogénica también depende de su estado fisiológico y de diferenciación (Gueye *et al.*, 2009). Los tejidos maduros, por ejemplo, presentan un mayor grado de metilación del ADN, lo que provoca una baja capacidad de desdiferenciación (Terzi and Lo Schiavo, 1990).

En el caso de palma dátíl, Gueye *et al.* (2009) realizaron un estudio histológico de diferentes secciones de hoja y determinaron que en el segmento basal existe una zona de división celular, seguida de una zona de elongación celular (segmento intermedio), para terminar en una zona de maduración (segmento distal). De esa forma los autores encontraron que únicamente los segmentos intermedios de las hojas, donde se ubica la zona de elongación celular, fueron los que respondieron ante el tratamiento con 2,4-D para lograr la inducción de callo embriogénico.

En el caso de las inflorescencias, los resultados obtenidos al utilizar diferentes estados de desarrollo varían de acuerdo con la especie. En el caso de coco, Verdeil *et al.* (1994) mostraron que las inflorescencias con mayor respuesta embriogénica fueron aquellas con un mayor desarrollo (tamaño de espata = 45 cm); mientras que en pejobaye fueron las inflorescencias con menor desarrollo (tamaño de espata = 5-8 cm) (Steinmacher *et al.*, 2007a), lo cual refuerza lo dicho anteriormente sobre el papel del genotipo en la respuesta embriogénica.

Perera *et al.* (2007) utilizaron ovarios sin fertilizar de coco en diferentes estados de desarrollo para inducir ES. Estos fueron numerados desde 0 a -6, donde 0 correspondió al estado de desarrollo maduro (inflorescencia que abrió primero) y -6 al estado de desarrollo más inmaduro (inflorescencia que abrió aproximadamente seis meses después). Sin embargo, no encontraron resultados consistentes en cuanto a la influencia del estado de desarrollo del ovario sobre la inducción de callo embriogénico en los diferentes tratamientos utilizados. Los ovarios con estado de desarrollo más avanzado respondieron mejor cuando las concentraciones de auxina fueron mayores (100-200  $\mu\text{M}$  de 2,4-D), mientras que los estados con menor desarrollo

respondieron mejor ante concentraciones menores de auxina (50  $\mu$ M de 2,4-D).

Samosir *et al.* (1998) encontraron que la mayor cantidad de embriones cigóticos de coco que produjeron callo embriogénico fueron los inmaduros (> 40%) con 10 meses de edad, mientras que solamente un 10% de los embriones maduros con 12 meses de edad produjeron callo embriogénico.

### **Medios de cultivo**

#### **Tipos de medios de cultivo**

En la mayoría de los casos se ha utilizado medio de cultivo sólido durante todas las etapas descritas anteriormente; sin embargo, el uso de suspensiones celulares durante la etapa DE ha fomentado la obtención de embriones somáticos, tanto en palma aceitera (De Touchet *et al.*, 1991, Aberlenc-Bertossi *et al.*, 1999) como en palma dátíl (Bhaskaran and Smith, 1992; Veramendi and Navarro, 1996; Fki *et al.*, 2003; Zouine *et al.*, 2005; Badawy *et al.*, 2009). El cultivo de células de palma aceitera en biorreactor también ha sido reportado con anterioridad; sin embargo, sin indicar si estas eran embriogénicas (Gorret *et al.*, 2004). Recientemente, Steinmacher *et al.* (2011) observaron mayor formación de embriones somáticos de pejíbaye y mayor crecimiento de las plántulas formadas al utilizar un sistema de inmersión temporal que cuando se utilizó medio sólido. Sin embargo, la sobrevivencia al momento de realizar la aclimatación fue mayor en las plantas cultivadas en medio sólido. Khawnium y Te-chato (2011) mostraron que es posible la criopreservación por medio de vitrificación de tejido embriogénico friable proveniente de hojas jóvenes de palma aceitera, logrando más de 65% de formación de embriones somáticos.

Para una misma especie, la literatura reporta generalmente el uso de un mismo medio de cultivo basal para todo el proceso, en algunos casos con ciertas variaciones. Paranjothy y Othman (1982) afirman que en palma aceitera el uso de un medio de cultivo con una formulación estándar de nutrientes como el MS es suficiente para la inducción de callo. Además, en esta misma especie, Da Silva Guedes *et al.* (2011) observaron una mayor formación de callo embriogénico en los explantes cultivados en medio de cultivo MS que en los cultivados en medio de cultivo Y3 (Eeuwens 1976). También Thuzar *et al.* (2011) mostraron que, en comparación con el MS, una mayor cantidad de los explantes de esta misma especie, cultivados en el medio N6 (Chu *et al.*, 1975), produjeron callo embriogénico.

En el caso de palma dátíl, el medio de cultivo más utilizado incluye las sales y vitaminas de MS (Al-Khayri, 2001; Fki *et al.*, 2003; Eke *et al.*, 2005; Othmani *et al.*, 2009; Eshraghi *et al.*, 2005). Sin embargo, en algunos casos se ha utilizado el MS adicionado con las vitaminas de Morel y Wetmore (1951) (Sané *et al.*, 2006). Recientemente, en esta especie Al-Khayri (2011b) indicó que es importante realizar variaciones en el medio de cultivo según la etapa de ES, ya que se observó que un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de callo embriogénico no necesariamente coincide con el medio de cultivo óptimo para la regeneración de los embriones.

En el caso de coco (Gupta *et al.*, 1984; Verdeil *et al.*, 1994, Adkins *et al.*, 1998) y *Acrocomia aculeata* (Freireira *et al.*, 2009), se ha utilizado preferencialmente el medio de cultivo Y3. En pejíbaye se ha preferido el MS adicionado con las vitaminas de Morel y Wetmore (1951) (Steinmacher *et al.*, 2007ab). El medio de cultivo CRI 72 (Karunaratne y Periyapperuma, 1989) fue utilizado con éxito en embriones inmaduros y ovarios de coco (Karunaratne y Periyapperuma, 1989; Perera *et al.*, 2009).

Sin embargo, también existen informes de que cambiar el medio de cultivo a lo largo del desarrollo del proceso embriogénico puede ser beneficioso. Así, Verdeil *et al.* (1994) utilizaron inflorescencias de coco cultivadas en el medio de cultivo Y3 adicionado con las vitaminas de Morel y Wetmore (1951) durante la etapa CP. Posteriormente, para las siguientes tres etapas (DP, MP y DE), utilizaron las sales y vitaminas del medio de cultivo MS pero con las concentraciones aumentadas al doble. Para una aproximación más precisa, Dussert *et al.* (1995) analizaron la absorción de nutrientes específicos durante el inicio de la ES en coco, y encontraron que nitrato, calcio, magnesio y sacarosa fueron los requeridos en mayor cantidad.

Debido a que la maduración del embrión (etapa MP) requiere la deshidratación previa, en algunas ocasiones es posible utilizar medios de cultivo con mayor concentración de solutos, utilizando diversos agentes osmóticos, como azúcares y polietilenglicol (Von Arnold *et al.*, 2002).

#### **Uso de antioxidantes**

En palmas, la oxidación de los tejidos en cultivo *in vitro* es un problema recurrente (Sugimura and Salvaña, 1989; Teixeira *et al.*, 1994; Al-Khayri, 2005; Steinmacher *et al.*, 2007c; Sáenz *et al.*, 2010). Este podría ser uno de los motivos más determinantes para la reduci-

da regeneración vegetativa *in vitro* de esta familia de plantas.

El carbón activado es utilizado comúnmente para disminuir los problemas de oxidación durante el proceso de ES en palmas. Sin embargo, este compuesto puede adsorber ciertos componentes importantes del medio de cultivo, como los reguladores de crecimiento y otros compuestos orgánicos, lo que podría afectar la respuesta morfogénica (Pan and van Staden, 1998). La adsorción de reguladores de crecimiento por parte del carbón activado fue demostrada por Ebert and Taylor (1990). Estos autores encontraron que el 2,4-D es adsorbido por el carbón activado en forma dependiente de la consistencia del medio de cultivo. Cuando se agregó una concentración intermedia de 2,4-D (100  $\mu$ M) y 2,5 g/l de carbón activado, un día después de preparado el medio de cultivo, la cantidad de 2,4-D disponible en el medio de cultivo líquido fue de 3,6%, mientras que en medio de cultivo semisólido, la cantidad disponible de 2,4-D fue de 5-6%.

Huong *et al.* (1999) y Thi-Lan *et al.* (1999) reportaron que la adición de carbón activado durante la etapa CP inhibió completamente la formación de callo embriogénico en *Phoenix canariensis*. Por el contrario, Sáenz *et al.* (2010) afirman que el carbón activado también actúa positivamente sobre la ES en coco por razones que aún se desconocen y Samosir *et al.* (1998) encontraron que la presencia de carbón activado en el medio de cultivo es necesaria para promover la ES en coco.

Según Sáenz *et al.* (2010), la capacidad de adsorción del carbón activado depende también de la marca comercial. Ellos observaron que la formación de callo embriogénico en coco varió significativamente dependiendo de la marca de carbón activado que se utilizó.

En la mayoría de los trabajos publicados en palmas, el carbón activado es eliminado durante las etapas finales de la ES (Verdeil *et al.*, 1994; Fki *et al.*, 2003; Steinmacher *et al.*, 2007c). En otros casos se utiliza durante todas las etapas de la ES (Eshraghi *et al.*, 2005; Steinmacher *et al.*, 2007a) y en pocos casos, no se usa del todo (Badawy *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). Sugimura y Salvaña (1989) y Samosir *et al.* (1998) reportaron que, en los casos en los cuales no se agregó carbón activado al medio de cultivo, se observó oxidación en todos los explantes de inflorescencias de coco.

El uso de PVP (polivinilpirrolidona) no es comúnmente reportado en la literatura sobre ES en palmas. Da Silva Guedes *et al.* (2011) observaron que este compuesto no influyó sobre la respuesta embriogénica en inflores-

cencias de palma aceitera, lo cual sí sucedió cuando se utilizó carbón activado.

### Otros aditivos

Algunos autores mencionan los beneficios del uso de otros componentes en el medio de cultivo durante las diferentes etapas de la ES en palma, tales como vitaminas, aminoácidos, diferentes concentraciones y tipos de fuentes de carbono, entre otros. La adición de biotina y tiamina durante la etapa DP ayudó a aumentar significativamente el peso de los callos embriogénicos y el tamaño y número de embriones obtenidos en palma dátíl (Al-Khayri, 2001). También en esta especie, la adición de glutamina (0,67 mM) favoreció significativamente el número de embriones somáticos producidos (Zouine and El Hadrami, 2007), mientras que el uso de  $\text{AgNO}_3$ , junto con 2ip, ha resultado favorable para el crecimiento de los callos embriogénicos, pero también para la elongación de los embriones durante la etapa DE (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2001).

En coco, Adkins *et al.* (1998) mostraron que la adición de poliaminas (espermidina-0,5  $\mu$ M y putrescina-7,5  $\mu$ M) en el medio de cultivo redujo la producción de etileno y, con ello, lograron un aumento significativo en la producción de embriones somáticos. Mientras que en palma dátíl, Al-Khayri (2010) mostró que la adición de 10-15% de agua de coco al medio de cultivo durante todas las etapas, hasta la germinación de los embriones, influyó positivamente en el crecimiento del callo embriogénico y en el número de embriones somáticos obtenidos. La caseína hidrolizada también favoreció el crecimiento de los callos embriogénicos y la producción de embriones somáticos en palma dátíl (Al-Khayri, 2011a).

Badawy *et al.* (2009), por su parte, evaluaron el uso de diferentes concentraciones de varias vitaminas para aumentar el grado de globalización de los embriones somáticos durante la etapa DE en palma dátíl. Ellos mostraron que este parámetro se favorece cuando se agrega tiamina-HCl, piridoxina y ácido nicotínico al medio de cultivo, mientras que la adición de biotina no mostró ser efectiva. De ellas, la vitamina que más influyó positivamente sobre el número de embriones somáticos obtenidos fue la tiamina (7,4  $\mu$ M).

Veramendi and Navarro (1996) y Badawy *et al.* (2005) encontraron que la concentración óptima de sacarosa para la formación de embriones somáticos en palma dátíl fue de 30 g/l. Cuando se redujo la concentración a 15-20 g/l o se aumentó a 40-60 g/l, el número de embriones obtenidos se redujo considerablemente. De la misma forma y también en palma dátíl, Zoudine and El

Hadrami (2004) mostraron que existe un aumento significativo de la masa proembrionaria durante la etapa DP cuando se utiliza una concentración de sacarosa de 30 g/l, comparado con concentraciones de 15 y 60 g/l. También en esa especie y similar a los resultados anteriores, Asemota *et al.* (2007) mostraron que una concentración de sacarosa de 30 g/l era suficiente para una inducción adecuada de callo embriogénico. Además de la sacarosa como fuente de carbono, Kramut y Te-chato (2010) utilizaron 0,2 M de sorbitol durante la etapa DE en palma aceitera. Ellos observaron un aumento significativo en la cantidad de embriones somáticos obtenidos. Mientras que Te-chato and Hilae (2007), en esa misma especie, reportaron que la mejor fuente de carbono para la inducción de ES secundaria fue el sorbitol (0,2 M), comparado con las mismas concentraciones de manitol, sacarosa, fructuosa y glucosa.

El tipo de gelificante agregado al medio de cultivo también puede influir en las etapas finales de la ES, como lo mostraron Wong *et al.* (1997) en palma aceitera. Según estos autores, el Gelrite favoreció el desarrollo de los embriones (etapa DE) ya que con este gelificante se obtuvo mayor cantidad de embriones que con el uso de agar.

### Tamaño del explante

El tamaño del explante es otro de los factores que puede afectar la respuesta embriogénica en palmas. En general, los tamaños más pequeños responden mejor ante los diferentes tratamientos, probablemente porque existe una mayor cantidad de células expuestas al medio de cultivo, lo cual provoca un mayor estrés que fomenta el metabolismo celular (Fehér *et al.* 2003). Gueye *et al.* (2009) afirman que, en hojas de palmas, el callo emerge a partir de las células perivasculares. El seccionamiento de los explantes hasta alcanzar tamaños pequeños, permitiría que una mayor cantidad de células perivasculares se encuentren en contacto con los componentes del medio de cultivo y, por tanto, respondan con mayor facilidad.

Existen pocos estudios en palmas en los que se ha evaluado el efecto del tamaño del explante sobre su respuesta. En estos se han utilizado hojas como fuente de material vegetal. En palma aceitera, Othmani *et al.* (2009) mostraron que la mayor cantidad de callo embriogénico se obtuvo con los explantes más pequeños (5-10 mm) de hoja. Mientras que en pejíbaye (Steinmacher *et al.*, 2007c) y palma aceitera (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010) se ha utilizado exitosamente la técnica conocida como TCL (capas delgadas de células, por sus siglas en inglés), la cual consiste en utilizar explantes

tes muy pequeños (0,7-1,0 mm) obtenidos a partir de diferentes partes de la planta (Silva, 2003).

### Conclusiones

La ES *in vitro* representa una alternativa para la propagación clonal de palmas con gran potencial para superar los problemas de propagación vegetativa que presenta esta familia de plantas. Aunque son muchos los factores que influyen sobre la ES en este grupo vegetal, su manejo adecuado ha permitido la obtención de buenos resultados en varias especies, como en el caso de palma dátíl, coco y palma aceitera. Al respecto, es muy importante tener en cuenta que los tres factores que más han influido sobre la respuesta embriogénica en palmas son: los reguladores de crecimiento, el tipo de explante y el genotipo. Una vez evaluado y definido el efecto de estos tres factores para una determinada especie y variedad, el correcto manejo de factores adicionales (estado de desarrollo, tamaño del explante y medio de cultivo) permite aumentar la eficiencia del proceso.

### Referencias bibliográficas

- Aberlenc-Bertossi, F., Noirot, M. and Duval, Y. 1999. BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 53-57.
- Abohatem, M., Zouine, J. and 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.
- Adkins, S. W., Samosir, Y. M., Ernawati, A., Godwin I.D., and Drew, R.A. 1998. Control of ethylene and use of polyamines can optimize the conditions for somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.) and papaya (*Carica papaya* L.). *Acta Horticulturae* 461: 459-466.
- Al-Khayri, J. M. 2001. Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 37: 453-456.
- Al-Khayri, J. M. 2003. *In vitro* germination of somatic embryos in date palm: effect of auxin concentration and strength of MS salts. *Current Science* 84: 680-683.
- Al-Khayri, J. M. 2005. Date palm *Phoenix dactylifera* L. In: Jain, S. M.; Gupta, P. K. (eds.). *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants*. The Netherlands: Springer. pp. 309-319.
- Al-Khayri, J. M. 2007. Date palm *Phoenix dactylifera* L. micropropagation. In: Jain, S. M.; Häggman, H. (eds.). *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. The Netherlands: Springer. pp. 509-526.

- Al-Khayri, J. M. 2010. Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) improved by coconut water. *Biotechnology* 9: 477-484.
- Al-Khayri J. M. 2011a. Influence of yeast extract and casein hydrolysate on callus multiplication and somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae* 130: 531-535.
- Al-Khayri J. M. 2011b. Basal salt requirements differ according to culture stage and cultivar in date palm somatic embryogenesis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 7: 32-42.
- Al-Khayri J. M. and Al-Bahrany, A. M. 2001. Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae* 89: 291-298.
- Al-Khayri J. M. and Al-Bahrany, A. M. 2004. Genotype-dependent *in vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. *Scientia Horticulturae* 99: 153-162.
- Asemota, O., Eke, C. R. and 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: 2353-2357.
- Aslam, J., Khan, S. A., Cheruth, A. J., Mujib, A., Sharma, M. P. and Srivastava, P. S. 2011. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 369-380.
- Azpeitia, A., Chan, J. L., Saenz, L. and Oropeza, C. 2003. Effect of 22(S), 23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78: 591-596.
- 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.
- Badawy, E. M., Habib, A. M., El-Banna, A. A. and Yousry, G. M. 2009. Effect of some factors on somatic embryos formation from callus suspensions cultures in *Phoenix dactylifera* L. cv. Sakkoty. 4<sup>th</sup> Conference on Recent Technologies in Agriculture. Giza, Egipto. p. 593-599.
- Benson, E. E. 2000. *In vitro* plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 36: 141-148.
- Bhaskaran, S. and Smith, R. H. 1992. Somatic embryogenesis from shoot tip and immature inflorescence of *Phoenix dactylifera* cv. Barhee. *Plant Cell Reports* 12: 22-25.
- Carman, J. G. 1990. Embryogenic cells in plant tissue cultures occurrence and behaviour. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 26: 746-753.
- Causevic, A., Delaunay, A., Ounnar, S., Righezza, M., Delmotte, F., Brignolas, F., Hagège, D. and Maury, S. 2005. DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 681-691.
- Chan, J. L., Saénz, L., Talavera, C., Hornung, R., Robert, M. and Oropeza, C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 17: 515-521.
- Chu, C-C., Wang, C-C. and Sun C-S. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice thought comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18: 659-668.
- Da Silva Guedes, R., Da Silva, T. L., Gomes Luis, Z. and Scherwinski-Pereira, J. E. 2011. Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. *African Journal of Biotechnology* 10: 10774-10780.
- De Almeida, M. and Vieira, C. 2006. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration from pejibaye adult plant leaf primordia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 1449-1452.
- De Touchet, B., Duval, Y. and Pannetier, C. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Reports* 10: 529-532.
- Dias, A. C., Guerra, M. P., Cordoba, A. S. and Kemper, E. L. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in the tissue culture of *Geonoma gamiova* (Arecaceae). *Acta Horticulturae* 360: 167-171.
- Dodeman, V. L., Ducreux, G. and Kreis, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48: 1493-1509.
- Dudits, D., Bogre, L. and Gyorgyey, J. 1991. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells. *Journal of Cell Science* 99: 475-484.
- Dussert, S., Verdeil, J.-L. and Buffard-Morel, J. 1995. Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. *Plant Science* 111: 229-236.
- Ebert, A. and 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.
- Euwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 36: 23-28.
- 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.
- Elshibli, S. and Korpelainen, H. 2008. Microsatellite markers reveal high genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm from Sudan. *Genetica* 134: 251-260.
- Eshraghi, P., Zarghami, R. and Mirabdulbaghi, M. 2005. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. *African Journal of Biotechnology* 4: 1309-1312.
- Fehér, A., Pasternak, T. P. and Dudits, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201-228.
- Fernando, S. C. and Gamage, C. K. A. 2000. Absciscic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Science* 151: 193-198.

- Ferreira, E., Yoshimitsu, S., Contin, M., Quirino, A. and Carvalho, M. 2009. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae* 119: 447-454.
- 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.
- Gahan, P. B. and George, E. F. 2008. Adventitious regeneration. In: George, E. F., Hall, M. A. and DeKlerk, G.-J. (eds). *Plant propagation by tissue culture*. Capítulo 10. 3 ed. The Netherlands: Springer. pp. 355-392.
- Glimn-Lacy, J. and Kaufman, P. B. (Eds.). 2006. Plant family (Arecaceae). In: *Botany Illustrated – Introduction to plants, major groups, flowering plant families*. 2 ed. Part 3. New York: Springer. pp. 125-126.
- Gorret, N., bin Rosli, S. K., Oppenheim, S. F., Willis, L. B., Lessard, P. A., Rha, C. and Sinskey, A. J. 2004. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. *Journal of Biotechnology* 108: 253-263.
- Guerra, M. P. and Handro, W. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). *Plant Cell Reports* 7: 550-552.
- Guerra, M. P. and Handro, W. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. *Journal of Plant Research* 111: 65-71.
- Gueye, B., Morcillo, F., Collin, M., Gargani, D., Overvoorde, P., Aberlenc-Bertossi, F., Tranbarger, T. J., Sane, D., Tregear, J. W., Borgel, A. and Verdeil, J.-L. 2009. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 35-45.
- Gupta, P. K., Kendurkar, S. V., Kulkarni, V. M., Shirgurkar, M. V. and Mascarenhas, A. F. 1984. Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro*. *Plant Cell Reports* 3: 222-225.
- Huong, L. T. L., Baiocco, M., Huy, B. P., Mezzetti, B., Santilocchi, R. and Rosati, P. 1999. Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 1-7.
- Jaligot, E., Rival, A., Beulé, T., Dussert, S. and Verdeil, J.-L. 2000. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports* 19: 684-690.
- Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47: 91-110.
- Jiménez, V. M., Guevara, E., Herrera, J. and Bangerth, F. 2005. Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 23: 567-572.
- Karun, A., Siril, E. A., Radha, E. and Parthasarathy, V. A. 2004. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). *Current Science* 86: 1623-1628.
- Karunaratne, S. and Periyapperuma, K. 1989. Culture of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.): callus proliferation and somatic embryogenesis. *Plant Science* 62: 247-253.
- Khawnum, T. and Te-chato, S. 2011. Simple vitrification protocol for cryopreservation of oil palm using embryogenic culture. *Journal of Agricultural Technology* 7: 519-529.
- Komamine, A., Kawahara, R., Matsumoto, M., Sunabori, S., Toya, T., Fujiwara, A., Tsukahara, M., Smith, J., Ito, M., Fukuda, H., Nomura, K. and Fujimura, T. 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 28: 11-14.
- Konan, E. E., Durand-Gasselin, T., Kouadio, J. Y., Flori, A. and Rival, A. 2006. A modeling approach of the *in vitro* conversion of oil palm (*Elaeis guineensis*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84: 99-112.
- Konan, E. E., Kouadio, J. Y., Flori, A., Durand-Gasselin T. and Rival, A. 2007. Evidence for an interaction effect during *in vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryo-derived plantlets. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 43: 456-466.
- Konan, E. K., Durand-Gasselin, T., Kouadio, J.Y., Flori, A., Rival, A., Duval, Y. and Pannetier, C. 2010. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. *Plant Cell Reports* 29: 1-13.
- Kramut, P. and Te-chato, S. 2010. Effect of culture media, plant growth regulators and carbon sources on establishment of somatic embryo in suspension culture of oil palm. *Journal of Agricultural Technology* 6: 159-170.
- Kumar, P. P., Lakshmanan, P. and Thorpe, T. A. 1998. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 34: 94-103.
- Kumar, V., Parvatam, G. and Aswathanarayana, G. 2009. AgNO<sub>3</sub>-a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology* 12: 1-15.
- Ledo, A. D. S., Lameira, O. A., Benbadis, A. K., De Menezes, I. C., De Oliveira, M. D. S. P. and Filho, S. M. 2002. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal* 24: 601-603.
- Lelu, M. A., Klimaszewska, K. K., Jones, C., Ward, C., Von Aderkas, P. and Charest, P. J. 1993. *A laboratory guide to somatic embryogenesis in spruce and larch*. Petawawa National Forestry Institute. Canada. Publications Distribution Centre. 57 p.
- Low, E.-T. L., Alias, H., Boon, S.-H., Shariff, E. M., Tan, C.-Y. A., Ooi, L. C., Cheah, S.-C., Raha, A.-R., Wan, K.-L. and Singh, R. 2008. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. *BMC Plant Biology* 8: 1-19.
- Lucia, G., Rufinni Castiglione, M., Turrini, A., Nuti Ronchi, V. and Geri, C. 2011. Cytogenetic and histological approach for early detection of “mantled” somaclonal variants of oil palm regenerated by somatic embryogenesis: first results on the characterization of regeneration system. *Caryologia* 64: 223-234.

- Maciel, S. A., Fermino Junior, P. C. P., da Silva, R. A. and Scherwinski-Pereira, J. E. 2010. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. *Acta Scientiarum Agronomy* 32: 263-267.
- Montero-Córtés, M., Sáenz, L., Córdova, I., Quiroz, A., Verdeil, J.-L. and Oropeza, C. 2010. GA<sub>3</sub> stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Cell Reports* 29: 1049-1059.
- Morel, G. and Wetmore, R. M. 1951. Fern callus tissue culture. *American Journal of Botany* 38: 141-143.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nakamura, A., Higuchi, K., Goda, H., Fujiwara, M. T., Sawa, S., Koshihara, T., Shimada, Y. and Yoshida, S. 2003. Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in *Arabidopsis*, implying a crosstalk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiology* 133: 1843-1853.
- Othmani, A., Bayoudh, 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. and Van Staden, J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. *Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
- Paranjothy, K. and Othman, R. 1982. *In vitro* propagation of oil palm. In: Fujiwara, A. (ed). *Plant Tissue Culture*. Tokyo: Maruzen. pp. 747-748.
- Perera, P. I. P., Hoche, V., Verdeil, J.-L., Doubeau, S., Yakandawala, D. M. D. and Weerakoon L. K. 2007. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 26: 21-28.
- Perera, P. I. P., Hoche, V., Verdeil, J.-L., Bandupriya, H. D. D., Yakandawala, D. M. D. and Weerakoon, L. K. 2008. Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 293-302.
- Perera, P. I. P., Vidhanaarachchi, V. R. M., Gunathilake, T. R., Yakandawala, D. M. D., Hoche, V., Verdeil, J. L. and Weerakoon, L. K. 2009. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 73-81.
- Pérez-Núñez, M. T., Chan, J. L., Sáenz, L., González, T., Verdeil, J.-L. and Oropeza, C. 2006. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 42: 37-43.
- Phillips, G. C. 2004. *In vitro* morphogenesis in plants: Recent advances. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 40: 342-345.
- Rajesh, M. K., Radha, E., Karun, A. and Parthasarathy, V. A. 2003. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm- the effect of exogenous polyamines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 41-47.
- Roowi, S. H., Ho, C.-L., Alwee, S. S. R. S., Abdullah, M. O. and Napis, S. 2010. Isolation and characterization of differentially expressed transcripts from the suspension cells of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to different concentration of auxins. *Molecular Biotechnology* 46: 1-19.
- Sáenz, L., Azpeitia, A., Chuc-Armendariz, B., Chan, J. L., Verdeil, J.-L., Hoche, V. and Oropeza, C. 2006. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 42: 19-25.
- Sáenz, L., Herrera-Herrera, G., Uicab-Ballote, F., Chan, J. L. and Oropeza, C. 2010. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 301-308.
- Saldanha, C. W., Martins-Corder, M. P., Steinmacher, D. A. and Guerra, M. P. 2006. *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae). *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 6: 228-235.
- Samosir, Y. M. S., Godwin, I. D. and Adkins, S. W. 1998. An improved protocol for somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Acta Horticulturae* 461: 467-474.
- Sané, D., Aberlenc-Bertossi, F., Gassama-Dia, Y. K., Sagna, M., Trouslot, M. F., Duval, Y. and Borgel, A. 2006. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Annals of Botany* 98: 301-308.
- Sanputawong, S. and Te-chato, S. 2011. Analysis of somaclonal variation of callus, somatic embryo and plant regeneration of *in vitro* oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Agricultural Technology* 7: 531-545.
- Sarasan, V., Ramsay, M. M. and Roberts, A. V. 2002. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in 'Bottle Palm' [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E. Moore], a critically endangered Mauritian palm. *Plant Cell Reports* 20: 1107-1111.
- Scherwinski-Pereira, J. E., Da Guedes, R. S., Fermino, P. C. P., Silva, T. L. and Costa, F. H. S. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 46: 378-385.
- Schwendiman, J., Pannetier, C. and Michaux-Ferrière, N. 1988. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany* 62: 43-52.
- Sghaier, B., Kriaa, W., Bahloul, M., Novo, J. V. J. and Drira, N. 2009. Affect of ABA, arginine and sucrose on protein content of date palm somatic embryos. *Scientia Horticulturae* 120: 379-385.
- Sghaier-Hammami, B., Jorrín-Novo, J.-V., Gargouri-Bouaid, R. and Drira, N. 2010. Absciscic acid and sucrose increase the protein content in date palm somatic embryos, causing changes in 2-DE profile. *Phytochemistry* 71: 1223-1236.
- Sidky, R. A. and Zaid, Z. E. 2011. Direct production of somatic embryos and plant regeneration using TDZ and CPPU of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Academic Research* 3: 792-796.

- Silva, J. A. T. 2003. Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 2: 683-691.
- Songstad, D. D., Armstrong, C. L. and Petersen, W. L. 1991. AgNO<sub>3</sub> increases type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives. *Plant Cell Reports* 9: 699-702.
- Steinmacher, D. A., Clement C. R. and Guerra, M. P. 2007a. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 89: 15-22.
- Steinmacher, D. A., Cangahuala-Inocente, G. C., Clement, C. R. and Guerra, M. P. 2007b. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 43: 124-132.
- Steinmacher, D. A., Krohn, N. G., Dantas, A. C. M., Stefenon, V. M., Clement, C. R. and Guerra, M. P. 2007c. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. *Annals of Botany* 100: 699-709.
- Steinmacher, D. A., Guerra, M. P., Saare-Surminski, K. and Lieberei, R. 2011. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany* doi:10.1093/aob/mcr033.
- 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.
- Te-chato, S. and Hilae, A. 2007. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera). *Journal of Agricultural Technology* 3: 345-357.
- Teixeira, J. B., Söndahl, M. R. and Kirby, E. G. 1993. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34: 227-233.
- Teixeira, J. B., Söndahl, M. R. and Kirby E. G. 1994. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Reports* 13: 247-250.
- Terzi, M. and Lo Schiavo, F. 1990. Somatic embryogenesis. In: Bhojwani, S.S. (ed). *Plant tissue culture: applications and limitations*. The Netherlands: Elsevier. pp. 54-66.
- Thi-Lan, L., Baiocco, M., Phan, B., Mezzetti, B., Santilocchi, R. and Rosati, P. 1999. Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 1-7.
- Thomas, V. and Rao, P. S. 1985. *In vitro* propagation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq var. Tenera) through somatic embryogenesis in leaf-derived callus. *Current Science* 54: 184-185.
- Thuc, L. V., Sarpan, N., Ky, H., Ooi, S-E., Napis, S., Ho, C-L., Ong-Abdullah, M., Chin, C-F. and Namasivayam, P. 2011. A novel transcript of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), Eg707, is specifically upregulated in tissues related totipotency. *Molecular Biotechnology* 48: 156-164.
- Thuzar, M., Vanavichit, A., Tragoonrungs, S. and Jantasuriyarat, C. 2011. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 123-128.
- Tisserat, B. and Murashige, T. 1977. Effects of ethephon, ethylene, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on asexual embryogenesis *in vitro*. *Plant Physiology* 60: 437-439.
- Tomlinson, P. B. 2006. The uniqueness of palms. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151: 5-14.
- Valverde, R., Arias, O. and Thorpe, T. A. 1989. Picloram-induced somatic embryogenesis in pebibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10: 149-156.
- Veramendi, J. and Navarro, L. 1996. Influence of physical conditions of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 159-164.
- Veramendi, J. and Navarro, L. 1997. Influence of explants sources of adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) on embryogenic callus formation. *Journal of Horticultural Science* 72: 665-671.
- Verdeil J-L., Huet, C., Grosdemange, F. and Buffard-Morel, J. 1994. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 13: 218-221.
- Von Arnold, S. 2008. Somatic embryogenesis. In: George, E. F., Hall, M.A. and de Klerk, G-J (eds). *Plant propagation by tissue culture*. Capítulo 9. 3 ed. The Netherlands: Springer. pp. 335-354.
- 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.
- Wang, H-C., Chen, J-T., Wu, S-P., Lin, M-C. and Chang, W-C. 2003. Plant regeneration through somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived callus of *Areca catechu* L. (Arecaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 39: 34-36.
- Wang, H. C., Chen, J. T. and Chang, W. C. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. *Biologia Plantarum* 50: 279-282.
- Wang, H. C., Chen, J. T. and Chang, W. C. 2010. Morphogenetic routes of long-term embryogenic callus culture of *Areca catechu*. *Biologia Plantarum* 54: 1-5.
- Wong, G. T., Tan, C. C. and Soh, A. C. 1997. Large scale propagation of oil palm clones - experiences to date. *Acta Horticulturae* 447: 649-658.
- Yusnita, D, H. 2011. *In vitro* callus induction and embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from leaf explants. *Hayati Journal of Biosciences* 18: 61-65.
- Zouine, J. and El Hadrami, I. 2004. Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L.: effect of exogenous supply of sucrose on proteins, sugar, phenolics and peroxidases activities during the embryogenic cell suspension cultures. *Biotechnology* 3: 114-118.
- Zouine, J. and El Hadrami, I. 2007. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae* 112: 221-226.
- Zouine, J., El Bellaj, M., Meddich, A., Verdeil, J-L. and El Hadrami, I. 2005. Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in *Phoenix dactylifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82: 83-92.



# MIXING

## XXIII

June 17 - 22, 2012

Iberostar Paraiso Beach  
Mayan Riviera, Mexico



North American  
Mixing Forum

[www.mixing.net](http://www.mixing.net)



June 17-22, 2012  
Iberostar Paraiso Beach  
Mayan Riviera, Mexico

[www.mixing.net](http://www.mixing.net)



Every two years since 1967 the mixing community meets to share and discuss the latest research and technology developments in mixing. Participants come from academia, industry, equipment manufacturers, private and government research institutions based in North America and all over the world. Mixing XXIII will take place in the Riviera Maya, Mexico, for the first time. The conference this year includes an additional night enabling not only our scientific inquisitiveness to be cultivated, but also to nurture our souls by learning about the Mexican ancient culture that was able to have great achievements both in astronomy and mathematics. - Interestingly, the Mayan Culture also provided the world of its time with a highly sophisticated device for efficient mixing!

Come and join us in this most exciting conference. In June 2012 it will be held in the beautiful State of Quintana Roo, Mexico, in the heart of the Riviera Maya!

**Enrique Galindo**  
Chair of Mixing XXIII  
[galindo@ibt.unam.mx](mailto:galindo@ibt.unam.mx)



North American  
Mixing Forum



## The call for papers for Mixing XXIII is now open

In keeping with the tradition of the conference, the acceptance of both oral and poster presentation is based - solely on submitted abstracts (300 – 600 words). Full papers are not required. **The deadline for the submission of abstracts is March 15th, 2012.** There will be no published proceedings for the conference, which allows for the presentation and discussion of the most recent mixing research in a collegial environment.

Sessions will cover mixing related subjects from fundamentals to the application of mixing in a wide range of industrial processes. Topics include, but are not limited to:

- Mixing Fundamentals
- Mixing on small scales
- Static and Other in-Line Mixers
- Mixing of Multi-phase Systems
- Mixing of solids
- New modeling and simulation approaches to mixing
- Mixing and chemical reaction
- CFD Modeling of mixers and mixing processes
- Mixing aspects of biotechnological processes
- Industrial Mixing Processes

### Short course on Mixing: June 17th

A special session of Mixing XXIII will be devoted to celebrate the 21st anniversary of NAMF, discussing the 21 most influential contributions to mixing.

Please e-mail your abstract submission to [marcela.garcia@agronegociosinternacionales.com.mx](mailto:marcela.garcia@agronegociosinternacionales.com.mx). You will receive an e-mail confirmation within the next 24 hours. If not, please contact Marcela García at the same e-mail address.

**For further information visit: [www.mixing.net](http://www.mixing.net) • [www.23mixing.net](http://www.23mixing.net)**

The Iberostar Paraíso Beach lies between Playa del Carmen and the lesser-known city of Puerto Morelos, which is some 15 minutes from Cancun International Airport. The contrast between these two cities is immediately noticeable: Puerto Morelos is a far more relaxed, laid-back destination, popular with artists and craftsmen, fishermen and divers. In contrast, the glamorous Playa del Carmen is far more lively and vibrant, and is packed with tourists who flock to the beaches during the day and in the evening enjoy a drink at one of the many bars. The hotel address is:

Carretera Chetumal - Puerto Juarez, km.309

Playa Paraíso, Quintana Roo –Mexico

Phone +(52-984) 8772800

Fax: +(52-984) 8772810

Web site: <http://www.iberostar.com/EN/Riviera-Maya-hotels/Iberostar-Paraiso-Beach.html>

For further information visit: [www.mixing.net](http://www.mixing.net) • [www.23mixing.net](http://www.23mixing.net)



## Mayan Riviera Conference site characteristics



### Hotel: Iberostar Paraíso Beach

The Iberostar Paraíso Beach is a family hotel built in traditional Mexican colonial style, with arches and columns throughout. The furniture in this All Inclusive hotel includes authentic works of art that wouldn't look out of place in an exhibition of fine art. Upon arrival at the hotel the superb wooden carvings in the reception area will immediately strike you. This is the perfect spot to escape from the crowds. The hotel is so large that a small train runs every 15 minutes transporting guests around the facilities to the restaurants, lobby, rooms and even the shopping mall and modern spa that form part of the Paraíso complex.

### Dinner in XCARET is included in the program

As night falls on Xcaret, a fiesta awakens with the most famous musical performance in Mexico: Xcaret Mexico Espectacular. More than 300 artists on stage will amaze you with a vibrant musical journey through the history of Mexico, which brings to life colorful traditions and the heritage of the country

Xcaret Mexico Espectacular will take you to presence an unforgettable display of Mexican traditional hand-made dresses, dances and musical performances that will stay in your heart forever. This is the most amazing representation of Mexico's national identity and cultural heritage. Dinners are served while guests enjoy Xcaret Mexico Espectacular.



### Knowing The Heart Of Maya's Civilization

Also included is a day-trip to Chichen Itza. It was the most important regional capital of the Mayan culture from 750 to 1200 B.C. Their structures are well conserved, as well as the Yucatan ancient Mayas tales. Their vestiges show the incredible Mayan civilization and architecture, enriched with other cultural currents of Mesoamerica. The temple of Kukulcán, also called "El Castillo", is a magnificent construction of 23 meters of height in pyramidal form. It has four faces, in which during the equinox a shade of a serpent can be seen descending by the stairs of the building. You will also visit the Ball Game (the greatest of Mesoamerica), the Observatory, the Temple of the Soldiers with its figure of the Chac-Mool and the sacred cenote.