

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

**MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO
DE PLANTAS**



**“CARACTERIZACIÓN E INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS
SOMÁTICA DE ECOTIPOS REPRESENTATIVOS DE PALMA
DATILERA (*Phoenix dactylifera* L.) DE LA REGIÓN ICA, PERÚ”**

Presentada por:

ANDREA JOSEFA CARRIÓN ELGUERA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE EN
MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS**

Lima – Perú

2018

DEDICATORIA

*A mi familia, en especial a mis padres, por su
cariño, paciencia y consejos que me
incentivan a cumplir mis metas.*

*A mi hija Alejandra, que con una sonrisa
ilumina mis mañanas y me motiva a ser
mejor persona, mejor mamá.*

*A mi hermana Natalia, por apoyarme
siempre.*

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), por el financiamiento de este proyecto de acuerdo al contrato 227-FINCYT-IA-2013.

A mi patrocinadora la Ing. Mg. Sc. Lourdes Tapia, por haber confiado en mí y brindarme la oportunidad de seguir la maestría al incorporarme en el proyecto de Palma datilera.

A mi jurado de tesis por su asesoramiento, observaciones y apoyo constante en la redacción de este trabajo.

A mi familia y amigos por apoyarme en la realización de esta tesis, en mis viajes de caracterización y en la recolección de hijuelos y frutos.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Clasificación Taxonómica	3
2.2. Origen, historia y actualidad	3
2.3. Botánica	4
2.4. Caracterización morfológica.....	5
2.5. Descriptores	5
2.5.1. Coeficiente de correlación:.....	6
2.5.2. Coeficiente de distancia:.....	6
2.5.3. Componentes Principales:	7
2.5.4. Análisis de conglomerados:.....	7
2.6. Georreferenciación.....	8
2.7. La embriogénesis somática	9
2.7.1. Factores que influyen en la embriogénesis somática en Palmas	10
2.7.2. Las etapas de desarrollo de los Embriogénesis somática (Newton <i>et al.</i> , 1994; Von Arnold <i>et al.</i> , 2002)	11
2.7.3. Importancia de la Embriogénesis somática	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Ubicación del Área experimental.....	13
3.2. Prospección y selección de ecotipos	13
3.3. Caracterización morfológica.....	13
3.3.1. Descriptores morfológicos externos del fruto:	14
3.3.2. Descriptores morfológicos de la pulpa del fruto:	15
3.3.3. Elaboración de dendogramas.....	16
3.3.4. Clasificación de los frutos	16
3.4. Introducción <i>In vitro</i>	16
3.4.1. Material vegetal	16
3.4.2. Material de laboratorio	18
3.4.3. Aspectos técnicos comunes de los tratamientos	19
3.4.4. Tratamientos para la formación de callo embriogénico	22
3.4.5. Programa estadístico y Corrección de datos.....	25

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Georreferenciación de los Ecotipos de Palma datilera de la Región Ica	26
4.2. Caracterización morfológica.....	30
4.2.1. Análisis de componentes principales.....	48
4.3. Protocolo de formación de callo embriogénico	54
4.3.1. Desinfección	54
4.3.2. Inducción de callos	55
4.3.3. Proliferación de callo.....	58
4.3.4. Callo embriogénico	64
V. CONCLUSIONES	67
VI. RECOMENDACIONES	68
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Métodos multivariados de acuerdo con el tipo de variables e índices de similitud y distancias asociadas	8
Tabla 2: Composición de los medios de los tres tratamientos de Inducción de callo	23
Tabla 3: Composición de los medios de los tres tratamientos de Proliferación de callo ..	24
Tabla 4: Composición de los medios de los tres tratamientos de Callo embriogénico	25
Tabla 5: Datos de la geoprospección de Palma datilera en la Región Ica.....	29
Tabla 6: Caracteres georreferenciales y morfológicos de las plantas de Palmas datileras seleccionadas.	32
Tabla 7: Caracteres morfológicos del Fruto de las palmas datileras	34
Tabla 8: Caracteres morfológicos de la pulpa del Fruto de las palmas datileras	40
Tabla 9: Caracteres morfológicos relacionados al rendimiento de las palmas datileras ..	47
Tabla 10: Análisis de los valores y vectores propios de la matriz de correlación de las 16 Componentes principales.....	49
Tabla 11: Vectores propios de la matriz de correlación de las 16 Componentes principales	51
Tabla 12: Caracterización de ecotipos mediante el uso de Componentes Principales	52
Tabla 13: Ecotipos superiores de acuerdo a su calidad de fruto.....	54
Tabla 14: Análisis de varianza del porcentaje de explantes con callos a las seis semanas de siembra con transformación $\sqrt{(X+1)}$	55
Tabla 15: Análisis de varianza del crecimiento de callo en la etapa de Proliferación de callo con transformación $\sqrt{(X+1)}$	58
Tabla 16: Análisis de varianza del porcentaje de explantes muertos en la etapa de Proliferación de callo con transformación $\sqrt{(X+1)}$	59
Tabla 17: análisis de varianza del porcentaje callos que desarrollaron embriones en la etapa de Callo embriogénico con transformación $\sqrt{(X+1)}$	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Forma del fruto en estado Khalal.....	15
Figura 2: Extracción del hijuelo de 2 a 3 años de edad.....	16
Figura 3: Trabajo de extracción de hijuelo.....	17
Figura 4: Hijuelo listo para su transporte	17
Figura 5: Pelado del hijuelo	18
Figura 6: Columna de hojas	19
Figura 7: Columna de hojas remojando en lejía.....	20
Figura 8: Explante remojando en lejía al 50%	21
Figura 9: Meristemo de la palmera dátíl	21
Figura 10: Segmentos de la base de las hojas.	22
Figura 11: Explante del meristemo cortado en cuatro.....	22
Figura 12: Georreferenciación de palmeras datileras de la Provincia de Ica.....	26
Figura 13: Entrevista a los propietarios de las Palmeras datileras	27
Figura 14: Recorrido a pie para la georreferenciación de Palmas datileras ubicadas en zonas inaccesibles para el carro.....	27
Figura 15: Entrevista a los propietarios	28
Figura 16: Mapa de las colectas de los ecotipos de Palma Datilera.....	28
Figura 17: Frutos rojos en estado Khalal	31
Figura 18: Racimos de frutos en estado Khalal.....	31
Figura 19: Muestra de frutos caracterizada	31
Figura 20: Dendograma de ecotipos de la Región Ica tomando las variables de Altitud y Altura de planta, utilizando el método medición de distancia tipo Euclidiana y ligamiento por promedios (Minitab 17). Distancia de corte: 2.10.....	33
Figura 21: Dendograma de ecotipos de la Región Ica tomando las variables de Altitud y Altura de planta, utilizando el método medición de distancia tipo Euclidiana y ligamiento por promedios (Minitab 17). Distancia de corte: 1.50.....	33
Figura 22: Porcentaje de individuos caracterizados en Ica.	34
Figura 23: Dendograma de ecotipos de la Región Ica tomando las variables de Forma de fruto, Longitud de Fruto y Ancho de fruto, utilizando el método medición de distancia tipo Euclidiana y ligamiento por promedios (Minitab 17). Distancia de corte: 2.55	35

Figura 24: Proporción de ecotipos en la Región Ica, de acuerdo al carácter Forma de fruto.	35
Figura 25: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica, de acuerdo al carácter Forma de fruto.	36
Figura 26: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco, de acuerdo al carácter Forma de fruto.	36
Figura 27: Proporción de ecotipos en la Región de Ica, de acuerdo al carácter Longitud de fruto.	37
Figura 28: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica, de acuerdo al carácter Longitud de fruto.	37
Figura 29: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco de acuerdo al carácter Longitud de fruto.	38
Figura 30: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica, de acuerdo al carácter Ancho de fruto.	38
Figura 31: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica de acuerdo al carácter Ancho de fruto.	39
Figura 32: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco de acuerdo al carácter Ancho de fruto.	39
Figura 33: Dendograma de ecotipos de la Región Ica tomando las variables de Color de fruto, Consistencia, sabor y Textura de pulpa, utilizando el método medición de distancia tipo Euclidiana y ligamiento por promedios (Minitab 17). Distancia de corte: 1.50	41
Figura 34: Proporción de ecotipos en la Región Ica de acuerdo al carácter Consistencia de fruto	41
Figura 35: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica de acuerdo al carácter Consistencia de fruto.	42
Figura 36: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco de acuerdo al carácter Consistencia de fruto.	42
Figura 37: Proporción de ecotipos en la Región Ica de acuerdo al carácter de Gusto y Sabor de pulpa.	43
Figura 38: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica de acuerdo al carácter de Gusto y Sabor de pulpa.	43
Figura 39: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco de acuerdo al carácter de Gusto y Sabor de pulpa.	44

Figura 40: Proporción de ecotipos en la Región Ica de acuerdo al carácter de Textura de pulpa.	44
Figura 41: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica de acuerdo al carácter de Textura de pulpa.	45
Figura 42: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco de acuerdo al carácter de Textura de pulpa.	45
Figura 43: Proporción de ecotipos en la Región Ica de acuerdo al carácter de Color de fruto	46
Figura 44: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica de acuerdo al carácter de Color de fruto	46
Figura 45: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco de acuerdo al carácter de Color de fruto.....	47
Figura 46: Dendograma de ecotipos de la Región Ica tomando las caracteres relacionados al rendimiento, utilizando el método medición de distancia tipo Euclidiana y ligamiento por promedios (Minitab 17). Distancia de corte: 4000.0.....	48
Figura 47: Gráfica de sedimentación de los 16 componentes principales	49
Figura 48: Biplot del Análisis de los componentes principales	50
Figura 49: Dendograma de ecotipos de la Región Ica considerando los valores de los componentes principales seleccionados, utilizando el método medición de distancia tipo Euclidiana y ligamiento por promedios (Minitab 17). Distancia de corte: 2.87	53
Figura 50: Porcentaje de éxito en la desinfección.....	54
Figura 51: Influencia del genotipo-medio de cultivo en la Inducción de callo.....	56
Figura 52: Comparación en la respuesta de Inducción de callo en tres medios diferentes (Tukey $\alpha=0.05$).....	56
Figura 53: Callo formado en el medio de inducción I1.....	57
Figura 54: Callo formado en el medio de inducción I2.....	57
Figura 55: Callo formado en el medio de inducción I3.....	58
Figura 56: Curva de crecimiento de callo	60
Figura 57: Comparación en la respuesta de proliferación de callo en tres medios diferentes (Tukey $\alpha=0.05$).....	60
Figura 58: Callo formado en el medio de proliferación P1	61
Figura 59: Callo formado en el medio de proliferación P2.....	61
Figura 60: Callo formado en el medio de proliferación P3.....	62

Figura 61: Porcentaje de explantes muertos en los tres medios de proliferación de callo (Tukey $\alpha=0.05$).....	62
Figura 62: Callo fenolizado.....	63
Figura 63: Callo pasmado	63
Figura 64: Porcentaje de callos que formaron embriones (Tukey $\alpha=0.05$)	65
Figura 65: Callos en medio de proliferación P2 que se utilizaron para los tratamientos en los medios de CE.....	65
Figura 66: Callo embriogénico en fase globular	66
Figura 67: Embriones somáticos	66

RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron georreferenciar palmas datileras de la Región Ica (83 puntos) y caracterizar morfológicamente los frutos de 25 ecotipos usando 16 descriptores morfológicos tomados de IPGRI et al. (2005). Los ecotipos 2, 8 y 17 destacaron por la buena calidad de fruto, según las exigencias del mercado (Markhand et al., 2010). Posteriormente, se realizaron tres experimentos con tres tratamientos cada uno para la producción de callo embriogénico; en el primero se produjo la Inducción de callo, con los tratamientos I1, I2 e I3; el segundo hubo la Proliferación de callo con P1, P2 y P3 y el tercero, la Formación de callo embriogénico con C1, C2 y C3. En el primer experimento, el tratamiento I2 produjo la mayor cantidad de explante con callos (63%), con un medio compuesto por sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), 100 mg/L de 2,4-D y 3gr/L carbón activado, en temperatura de 26°C y plena oscuridad. En el segundo experimento, el tratamiento P2 produjo mayor crecimiento de callo (300%), con un medio compuesto por sales y vitaminas MS y 200 mg/L caseína hidrolizada, en temperatura de 26°C y plena oscuridad. En el tercer experimento, el tratamiento C3 produjo un mayor desarrollo de embriones somáticos (76% de callos diferenciados), con un medio compuesto por sales y vitaminas MS y 0.1 mg/L BAP, en condiciones de 26°C y fotoperiodo de 14/10. En conclusión, se propone un protocolo para la producción de callo embriogénico, el cual permitirá obtener material que puede servir para la conservación, intercambio de germoplasma y/o producción masiva de plantas clonadas. También, la investigación permitió identificar ecotipos sobresalientes por la calidad de fruto, los cuales servirían en un programa de mejoramiento genético en esta especie.

Palabras clave: *Phoenix dactylifera*, *Descriptores*, *PCA*, *Embriogénesis somática*.

ABSTRACT

The aims of this research work were to georeference the date palms from Ica (83 points) and morphologically characterize the fruits of 25 ecotypes using 16 morphological descriptors of IPGRI et al. (2005). The ecotypes 2, 8 and 17 stood out for the good quality of the fruit, according to the demands of the market (Markhand et al., 2010). Subsequently, three experiments are carried out with three treatments, an embryogenic callus production; in the first, callus induction has occurred, with treatments I1, I2 and I3; the second was the proliferation of calluses with P1, P2 and P3 and the third, the formation of embryogenic calluses with C1, C2 and C3. In the first experiment, the I2 treatment obtained the highest number of explants with callus (63%), with a medium composed of sales and vitamins MS (Murashige and Skoog, 1962), 100 mg/L of 2,4-D and 3gr/L Activated carbon, at a temperature of 26°C and in the dark. In the second experiment, treatment with P2 produced a greater growth of callus (300%), with a medium composed of sales and vitamins MS and 200 mg / L of hydrolyzed casein, at a temperature of 26°C and in the dark. In the third experiment, treatment with C3 obtained a greater development of somatic embryos (76% of differentiated calluses), with a medium composed of sales and vitamins MS and 0.1 mg/L BAP, under conditions of 26°C and photoperiod of 14/10. In conclusion, a protocol for the production of embryogenic callus is proposed to obtain material that can be used for conservation, exchange of germplasm and / or mass production of cloned plants. In addition, the research will identify outstanding ecotypes for the quality of the fruit, which will serve in a plant breeding program of this species.

Key words: *Phoenix dactylifera*, *Descriptors*, *PCA*, *Somatic embryogenesis*.

I. INTRODUCCIÓN

La Palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) ($2n=2x=36$) es una especie monocotiledónea, perenne, dioica perteneciente a la familia de las Aracaceae (Barrow, 1998). Es uno de los cultivos que tiene un alto valor nutritivo y se adapta a suelos áridos y salinos. El dátil constituye una parte importante en la dieta de las regiones orientales como: Irak, Israel, Egipto, India, Siria, ya que proporciona proteínas, azúcares, sales minerales, vitaminas.

Su importancia en el Perú radica en que con el paso del tiempo los dátiles que en un inicio fueron introducidos por los españoles en la Época Colonial (Rivera *et al.*, 2013), se adaptaron al ecosistema de la Costa peruana. Actualmente, en Ica se observa que estas palmeras no fueron mantenidas adecuadamente hasta llegar al estado de abandono, factor que permitió el desarrollo de ecotipos que crecen y producen frutos de mejor calidad que la Medjool, variedad más cotizada a nivel mundial que son consumidos principalmente por el poblador local, los cuales los conocen como “chochos”, y otro en menor porcentaje son vendidos al mercado local.

Para realizar la caracterización morfológica de las palmeras, se ha tomado como referencia otros trabajos de caracterización morfológica que los agrupó mediante el uso del Análisis de Componentes Principales, estos son: higos con 8 componentes principales que explicaban el 93.34% de la variabilidad total (Giraldo, *et al.*, 2010), berenjena con 4 componentes principales que explicaban el 71.38% de la variabilidad total (Cakir, *et al.*, 2017), papaya con 12 componentes principales que explicaban el 88.70% de la variabilidad total (de Oliveira, *et al.*, 2012), maracuyá con 7 componentes principales que explicaban el 93.34% de la variabilidad total (Matheri, *et al.*, 2016), coco con 2 componentes principales que explicaban el 87% de variabilidad total (Zizumbo *et al.*, 2005), palma datilera con 3 componentes principales que explicaban el 50.02% de variabilidad total (Ahmed *et al.*, 2011).

La propagación convencional de las Palmas datileras es por semillas o hijuelos los cuales no proporcionan el material vegetal necesario para la instalación de un campo de cultivo comercial (Al-Khayri, 2001). Por semillas se producen plantas con alta heterogeneidad con bajo porcentaje de plantas femeninas las cuales no se pueden distinguir hasta la etapa de floración. Además las progenies derivadas de semilla producen generalmente frutos de calidad inferior (Zaid y de Wet, 2002; Jain, 2011).

Los brotes o hijuelos, son producidos durante la etapa juvenil del ciclo de vida de la palma datilera, es en pequeño número y es el único método de propagación convencional de producir plantas homogéneas (Nixon y Carpenter, 1978; Soler, 1993; Jain, 2012). En algunos casos reportaron que estos hijuelos son difíciles de enraizar, con un 60 por ciento de sobrevivencia (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 micropropagación “*in vitro*” puede ser importante para solucionar esta limitante, para la multiplicación y conservación de ecotipos con características interesantes para el mejoramiento genético de esta especie. La técnica de embriogénesis somática, asegura la multiplicación a gran escala de plantas élite con características uniformes, utilizando espacios reducidos y permiten el intercambio de material sin ningún riesgo de incidencia de plagas o enfermedades (Al-Khayri, 2001).

Esta técnica ha sido aplicada en cultivos como la alfalfa (Brown, 1988), maíz (Jemenez y Bangerth, 2001), arroz (Tomes, 1985), cocotero (Verdeil *et al.*, 1994; Saenz *et al.*, 2010), palma aceitera (Aberlenc-Bertossi *et al.*, 1999; Constantin *et al.*, 2015), palma dátíl (Sané *et al.*, 2006; Sané *et al.*, 2011; Al-Khayri, 2010; Sani *et al.*, 2010; Kurup *et al.*, 2014; Baharan, *et al.*, 2015) con éxito.

Los objetivos de esta investigación es realizar la georreferenciación de ecotipos de palma datilera elite en Ica; caracterización morfológica de ecotipos representativos de palma datilera y establecer un protocolo para la formación de callo embriogénico.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Clasificación Taxonómica

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 (Glimm-Lacy and Kaufman, 2006).

La Palma datilera tiene la siguiente clasificación taxonómica:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Arecales
Familia:	Arecaceae
Subfamilia:	Coryphoideae
Tribu:	Phoeniceae
Género:	Phoenix
Especie:	<i>Phoenix dactylifera</i> (Linneo, 1734)

2.2. Origen, historia y actualidad

Se cree que su origen fue cerca al Golfo Árabe y han sido cultivadas en tiempos antiguos desde Mesopotamia hasta el Egipto prehistórico alrededor de los 4000 A.C. La Palma Datilera se registra en la historia antigua que se encontraba distribuida desde el Valle del Indo hasta Mesopotamia, el Valle del Nilo, Sur de Persia, Este del Mediterráneo y África (Pintaud *et al.*, 2011; Terral *et al.*, 2012). En la época Medieval, los Moros la introdujeron a

España, posteriormente los viajeros españoles introdujeron a América. Ahora, aparte de sus áreas naturales de distribución son extensamente cultivados en muchos países incluidos EE.UU. y Australia (Nasser & Shanavaskhan, 2012).

Al Perú fue introducido por los españoles durante la época de la Colonia logrando mejor producción en Ica, Saña y Camaná. En nuestros días están marginadas, desarrollándose en zonas donde no crece ningún otro cultivo (Reserva de Paracas), en bordes de campos de cultivos de exportación, arenales con nivel freático muy bajo o simplemente son eliminadas para sembrar otros cultivos que no son sustentables a las condiciones de la Costa Peruana. Algunos pobladores de Ica cuidan estas plantas que se han adaptado muy bien a las condiciones ambientales del lugar, con una precipitación menor a 8 mm al año (Whaley *et al.*, 2010), obteniendo plantas y frutos con características deseables en la agricultura moderna.

2.3. Botánica

El dátil es una especie monocotiledónea, dioica, alógama y perenne, perteneciente a la familia Aracaceae, que se reproduce normalmente por semillas botánicas, las cuales producen una población de palmeras diferentes a la madre y la mitad de ellas son machos, los cuales no se distinguen en la fase de crecimiento hasta la floración (Jain, 2011). Otro método de reproducción es mediante los hijuelos, estos originan plantas iguales a la madre, pero su producción en la planta es baja o nula, además el porcentaje de sobrevivencia es aproximadamente 60 % (Asemota *et al.*, 2007; Eke *et al.*, 2005).

El fruto es una baya de consistencia carnosa y azucarada alargada con semilla única que procede del único carpelo que se desarrolla tras la polinización. Su tamaño oscila entre los 3 y 4 cm, aunque se encuentran ejemplares de hasta 6 cm (Gracia y Ortiz, 1996). Los dátiles son ricos en algunos nutrientes y proveen una buena fuente de energía debido al alto contenido de carbohidratos. Adicionalmente contienen minerales, proteínas, grasas y vitaminas. El desarrollo del fruto pasa por 5 etapas (FAO, 2002; Nasser, 2012):

- “Hababouk”. Comprende desde la fertilización hasta 4 – 5 semanas, el fruto está totalmente cubierto por el cáliz y su tamaño es el de un frijol.

- “Khimri”. Llega hasta las 17 semanas después de la polinización, donde los frutos aún son verdes y tienen un 80% de humedad.
- “Khalal o Beser”. Comprende las semanas 18 y 23, donde los frutos alcanzan su tamaño máximo, hay un cambio de color, pero el contenido de humedad es muy alto (45-65%) y el sabor no está bien definido.
- “Rutab”. Va desde la semana 24 a la 27, donde los frutos están semimaduros, de color café claro y la humedad de los frutos es de 30-45%. Es posible cosechar algunas variedades en esta etapa.
- “Tamar”. Comprende la semana 28 y 29, donde hay un notorio cambio en el color, la firmeza y el sabor de los frutos, y la humedad es < al 30%.

2.4. Caracterización morfológica

Según Hernández (2013), la caracterización morfológica de recursos filogenéticos es la determinación de un conjunto de caracteres mediante el uso de descriptores definidos que permiten diferenciar taxonómicamente a las plantas. Algunos caracteres pueden ser altamente heredables, fácilmente observables y expresables en la misma forma en cualquier ambiente. Las características morfológicas se utilizan para estudiar la variabilidad genética, para identificar plantas y para conservar los recursos genéticos. Por lo tanto la caracterización es el primer paso en el mejoramiento de cultivos y programas de conservación.

2.5. Descriptores

Según Sevilla y Holle (2004), los descriptores describen o califican las características de las accesiones con un valor numérico, una escala, un código o un adjetivo calificativo. Se denomina “estado” del descriptor a cada una de las variables de un descriptor cualitativo. Todos los estados de un mismo carácter deben ser homólogos, es decir, si por ejemplo el descriptor es “forma de fruto”, todos los estados del descriptor deben expresar literalmente alguna de las variaciones en forma: Redonda, alargada, achatada, etc.

Estos descriptores para ser evaluados tendrán un valor numérico, lo cual permitirá evaluar el coeficiente de correlación, análisis de componentes principales y análisis de conglomerados utilizando índice de distancia euclidiana a partir de promedios, a continuación se detallará el por qué:

2.5.1. Coeficiente de correlación:

Cuantifica en términos relativos el grado de asociación íntima o variación conjunta entre dos descriptores cuantitativos. Su valor oscila entre -1 y +1. El signo del coeficiente indica el tipo de asociación – negativo (-) si la relación es inversa y positivo (+) si es directa – La magnitud está asociada con el grado de intimidad entre las variables, si el valor es próximo a 1 están estrechamente correlacionadas; por el contrario, un valor próximo a 0 debe ser interpretado con reserva ya que puede indicar independencia entre las variables o una relación no lineal. El coeficiente más empleado es el de Pearson que se recomienda para datos de tipo multiestados cuantitativos, aunque también es útil para datos mixtos.

2.5.2. Coeficiente de distancia:

Representa la similitud como la proximidad de las variables o acepciones con respecto a las demás. Son en realidad medidas de diferencias donde los valores elevados indican una menor similitud. Los resultados se obtienen en una matriz simétrica cuyos valores varían de 0 a ∞ (infinito), donde 0 es el indicativo de máxima similitud. Entre los coeficientes más utilizados tenemos a ‘Mean Character Difference’ (MCD) y las Distancias de Manhattan (MD), Taxonómica (TD), Euclidiana (DE).

Como síntesis de los conceptos sobre los índices o coeficiente de similitud o de distancias, Bramardi (2002) explica que la semejanza entre pares de unidades ha recibido diferentes denominaciones tales como similitud, proximidad, disimilitud y distancia o asociación por tanto, sugiere que todas las acepciones sean consideradas como un grupo de índices de distancia. Así, por ejemplo, cuando se hace referencia a similitud se toma un rango de 0 y 1, en el que 1 es similitud total y 0 es ausencia total de similitud. Por el contrario, cuando se refiere a distancia, aunque se toma el mismo rango 0 significa similitud total mientras que 1 es ausencia total de similitud. La elección de cual índice tomar depende de los datos y de los tipos de análisis que se planeen realizar posteriormente, como es el caso del análisis de Cluster que trabaja con índices de similitud, no obstante, estos se pueden transformar en índices de distancia y viceversa.

2.5.3. Componentes Principales:

El análisis de componentes principales (PCA de sus siglas en inglés) es una técnica de ordenación utilizada principalmente para mostrar modelos de datos multivariados. Su objetivo es mostrar las posiciones relativas de puntos de datos en menos dimensiones mientras conserva la máxima información que sea posible, y explorar las relaciones entre las variables dependientes. En general, es una técnica de generación de hipótesis que pretende describir modelos, en lugar de probar hipótesis estadísticas formales. Aunque el PCA fue desarrollado originalmente para analizar variables continuas, también se puede usar en datos ordinales de presencia-ausencia (Syms, 2008).

El PCA se lleva a cabo en la respuesta de variables dependientes en un conjunto de datos multivariante. En consecuencia, es una ordenación no restringida, en que las variables hipotéticas causales independientes no se incluyen explícitamente en el análisis. Por ejemplo, si la abundancia de varias especies de peces (la respuesta o las variables dependientes) se midiera en un rango de diferentes sitios con diferentes características, como la exposición a las olas (variables causales o independientes), esta información de exposición no se incluiría explícitamente en el análisis. Los patrones recuperados en el PCA son únicamente una función de las relaciones entre las variables dependientes. Por esta razón, el PCA también se puede clasificar como un análisis de gradiente indirecto, en el que los procesos causales hipotéticos, como la exposición, la humedad, etc., se deducen de los modelos de las variables dependientes. El PCA supone que las relaciones entre variables dependientes son lineales. Esto implica que el PCA se debe aplicar cuando la mayoría de las variables dependientes tienen valores distintos de cero en la mayoría de las muestras, y que los diagramas de dispersión bivariados de cada variable entre sí deben ser lineales o al menos monótonamente crecientes o decrecientes (Syms, 2008).

2.5.4. Análisis de conglomerados:

Es un método analítico que se puede aplicar para clasificar las accesiones de un germoplasma (o variables) en grupos relativamente homogéneos con base en alguna similitud existente entre ellas. Es importante aclarar que el análisis de conglomerados se aplica sobre una matriz de distancias y no sobre una de similitud. Existe dos métodos de conglomeración: los jerárquicos y no jerárquicos.

2.5.4.1. Agrupamiento jerárquico:

Se caracteriza por sucesivas fusiones para formar los grupos. Algunos de estos grupos tienen mayor rango y cada uno de ellos abarca varios de menor orden permitiendo seguir en detalle la formación de los conglomerados y conocer el nivel de similitud al que se agrupa cada conjunto de individuos. En este tipo de agrupamiento tenemos: Simple, completo, UPGMA, centroide y 'Ward', todas con el mismo criterio de maximizar la variación entre los grupos y minimizarla dentro de ellos.

2.5.4.2. Agrupamiento no-jerárquico:

Esta forma también es conocida como de partición. Se caracteriza por dividir el grupo de accesiones en un número preseleccionado de conglomerados que no tienen una estructura jerárquica. Este método tiene muchas variantes, siendo la más utilizada 'k-means' que se caracteriza por centrar de nuevo cada accesión cuando cambia de grupo.

Tabla 1: Métodos multivariados de acuerdo con el tipo de variables e índices de similitud y distancias asociadas

Tipo de método	Tipo de variable	Índice o distancia asociada	Método multivariado
Ordenación	Cuantitativas	Euclídea Mahalanobis	Componentes principales. Análisis canónico de poblaciones.
	Cualitativas	Similitud Datos de frecuencia organizados en tablas de contingencia. Distancia Chi-cuadrado	Análisis de coordenadas principales. Análisis factorial de correspondencias.
	Cuantitativas o cualitativas	Índice de disimilitud	Análisis de proximidades (MDS o escalas multidimensionales).
Clasificación	Cuantitativas o cualitativas	Según tipo de variables, asociar una matriz de distancia o similitud adecuada	Análisis Cluster.

Fuente: Adaptado de Bramardi, 2002.

2.6. Georreferenciación

La georreferenciación es el posicionamiento en el que se define la localización de un objeto espacial a una posición en la superficie de la Tierra, con un sistema de coordenadas y datum determinado.

2.7. La embriogénesis somática

La embriogénesis somática 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). Todo esto es posible gracias a una característica propia de las células vegetales, la totipotencialidad, esta característica confiere flexibilidad a sus programas ontogénicos. Consecuentemente, las células somáticas de las plantas son capaces de cambiar y de revertir sus estados de desarrollo bajo condiciones adecuadas de *in vitro*. En condiciones extremas, Fehér *et al.* (2003) observaron que estas células pueden morir (apoptosis) o desdiferenciarse y dividirse para experimentar patrones de morfogénesis tales como la embriogénesis, callogénesis u organogénesis. Como resultado de esa capacidad, ahora se puede asumir que los programas de desarrollo de plantas pueden darnos muchas vías alternativas (Fehér *et al.*, 2003; Costa and Shaw, 2007). Los primeros hallazgos de embriogénesis somática en laboratorio fueron observados en cultivos de raíces de zanahoria por Stewart *et al.* (1958) y Reinert (1958).

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 Embriogénesis somática, es el que promueve la hipermetilación del ADN con mayor facilidad (Terzi and Lo Shiavo, 1990; Causevic *et al.*, 2005), además su efecto durante la desdiferenciación celular está muy correlacionado con el incremento de AIA endógeno, lo cual promueve la inducción de Embriogénesis somática en zanahoria (Michalczuck *et al.*, 1992), alfalfa (Pasternak *et al.*, 2000), maíz (Jemenez and Bangerth, 2001).

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 embriogénesis somática indirecta, sin pasar por ese proceso de desdiferenciación, en lo que se denomina Embriogénesis somática directa (Von Arnold, 2008).

Según Gueye *et al.* (2009), la formación de callo es un pre requisito indispensable en palma dátil para la inducción de Embriogénesis somática. Sin embargo, debido a este paso previo, muchas veces las plantas resultantes presentan cierto grado de variabilidad somaclonal. Para evitar este suceso se tiene que optimizar el uso de reguladores de crecimiento para cada genotipo, manteniendo en mente los riesgos de las variaciones somaclonales (Sané *et al.*, 2011). Las variaciones somaclonales tales como la variegaciones y deformaciones de fruto fueron observadas en plantas producidas *in vitro* (Cohen *et al.*, 2004).

Los aspectos que más influyen sobre la embriogénesis somática 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.*, 2007; Gueye *et al.*, 2009; Perera *et al.*, 2009).

2.7.1. Factores que influyen en la embriogénesis somática en Palmas

Los reguladores de crecimiento como las auxinas pueden controlar diversos procesos y respuestas trópicas (Woodward and Bartel, 2005). En cultivo *in vitro*, las auxinas exógenas son las responsables en orientar las vías de desarrollo y favorecer la callogénesis o rizogénesis de acuerdo a sus concentraciones (Kanmegne and Omokolo, 2003; D’Onofrio and Morini, 2006; Jordan *et al.*, 2006). Sin embargo, existen algunos estudios comparativos detallados de los efectos de los cambios en la concentración de auxinas durante la callogénesis y rizogénesis. Aunque el 1-ácido naftalacetico (NAA) es raramente usado para el proceso de embriogénesis somática indirecta, esta hormona ha sido usada para estudiar el cambio entre diferentes vías organogénicas.

Las citoquininas más utilizadas son el benzilaminopurina (BAP), el 2iP (N6-(2-isopenteniladenina)) o bien el tidiazuron, todas en bajas concentraciones. Abohatem *et al.*, 2012 observaron que los medios de cultivo preparados con altas concentraciones de citoquinina

aumentan la acumulación de compuestos fenólicos y por tanto, afectan negativamente la inducción y el crecimiento de los embriones somáticos en palmas.

El carbón activado es utilizado comúnmente para disminuir los problemas de oxidación durante el procesos de embriogénesis somática en palmas (metabolitos fenólicos y etileno, además de 5-hidroximetil furural (es un inhibidor producto de la sacarosa durante la esterilización del medio en autoclave) (Weatherhead *et al.*, 1978)). Esta característica de la adsorción puede afectar en la cantidad disponible de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, llegando a ser tan alta como 99% de la cantidad inicial (Ebert and Taylor, 1990; Ebert *et al.*, 1993). Sáenz *et al.*, 2010 observaron que había una mejor respuesta de los explantes a la embriogénesis somática cuando las partículas de carbón activado eran muy finas (<38 μ m).

Badawy *et al.* (2005) utilizaron ápices, yemas axilares y hojas de palma dátil en un mismo tratamiento de inducción de embriogénesis somática y encontraron que el ápice y la yema axilar respondieron mejor. Veramendi and Navarro (1997) utilizaron tejido sub apical, ápices y yemas de las plantas, además de ápices, bases fragmentos de la hoja, y observaron que los ápices, yemas y bases de hojas produjeron mayor cantidad de callo (96-100%).

En las palmas la respuesta a la inducción de callo está muy influenciado por el genotipo, según Gabr and Tisserat (1985); Sané *et al.*, 2012; Sani *et al.*, 2011 en palma datilera y Verdeil *et al.*, 1994 en coco.

2.7.2. Las etapas de desarrollo de los Embriogénesis somática (Newton *et al.*, 1994; Von Arnold *et al.*, 2002)

Etapas 1: Inducción de tejido Proembriogénico.

En monocotiledóneas el patrón de desarrollo de los embriones tanto cigóticos como somáticos comprende los estadios globular, corazón, torpedo, escutelar y coleoptilar.

Etapas 2: Proliferación de la masa callosa.

Etapas 3: Formación de embriones somáticos.

Etapas 4: Maduración de los embriones somáticos

Etapas 5: Desección y Regeneración de plantas.

2.7.3. Importancia de la Embriogénesis somática

La importancia de la Embriogénesis somática radica en la multiplicación de genotipos a gran escala. Facilita el cultivo en medios líquidos y favorece la automatización del sistema de cultivo. Además es una técnica de regeneración celular, la cual, puede ser utilizada como base para el mejoramiento genético no convencional. Permite la conservación a largo plazo (crioconservación) de líneas celulares de interés genético y comercial, facilitando el intercambio internacional de germoplasma *in vitro* (Aguilar *et al.*, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del Área experimental

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las regiones de Ica y Lima, siendo las actividades de Georreferenciación, Caracterización morfológica de las plantas, Recolección de frutos e hijuelos de los Ecotipos de palma datilera realizados en las provincias regionales de Ica y Pisco de la Región de Ica y la caracterización de frutos y la fase *In vitro* de la tesis se llevó a cabo en la Región Lima. Los hijuelos y frutos recolectados fueron transportados vía terrestre hasta al Laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (238 msnm).

3.2. Prospección y selección de ecotipos

Los materiales que se utilizaron para la Georreferenciación de las palmeras dátiles fueron:

- 01 GPS Garmin
- 01 cinta métrica
- 01 eclímetro
- 01 cámara fotográfica
- Fichas de evaluación

Se georeferenció 83 ecotipos de palmeras datileras y se caracterizó 25 de ellas por 16 descriptores morfológicos de fruto mediante el uso de un equipo GPS. Se seleccionó un ecotipo de acuerdo a sus características de fruto y disponibilidad de explantes para introducción *in vitro* para la determinación del protocolo de embriogénesis somática.

3.3. Caracterización morfológica

Los materiales utilizados fueron:

- 01 cámara fotográfica
- 01 balanza de precisión
- 01 vernier
- Fichas de evaluación

Se utilizó 16 descriptores morfológicos para Palma datilera descritos por IPGRI *et al.* (2005) y se procedió a realizar las mediciones en el fruto, estos descriptores fueron: 5 caracteres cualitativos (forma de fruto, color de fruto, sabor, consistencia y textura de la pulpa) y 5 caracteres cuantitativos (longitud, ancho, peso de 20 frutos, peso de semillas y relación entre peso de frutos/semilla), además se consideró 4 caracteres de rendimiento (número de racimos, número de frutos por racimo, frutos totales y rendimiento), 1 carácter de ubicación (msnm) y 1 carácter de planta (altura).

3.3.1. Descriptores morfológicos externos del fruto:

Forma de fruto: (Figura 1)

1. Esférico
2. Sub esférico
3. Ovoide
4. Sub cilíndrico
5. Cilíndrico
6. Piriforme
7. Curvo

Longitud en Basar:

1. Muy corto (< 30mm)
2. Corto (30 - 40 mm)
3. Medio (41 - 50 mm)
4. Grande (51 - 60 mm)
5. Muy grande (> 60mm)

Ancho en Basar:

1. Estrecho (< 10mm)
2. Medio (10 - 20 mm)
3. Grande (21 - 30 mm)
4. Muy grande (> 30mm)

Peso (g): Peso promedio de 20 frutos de la parte central del racimo.

Color en Tamar:

1. Amarillo
2. Ámbar
3. Miel
4. Marrón oscuro
5. Negro
6. Verdoso
7. Rojo

Relación Peso de Fruto/Peso de Semilla: Peso de 20 frutos/peso de 20 semillas

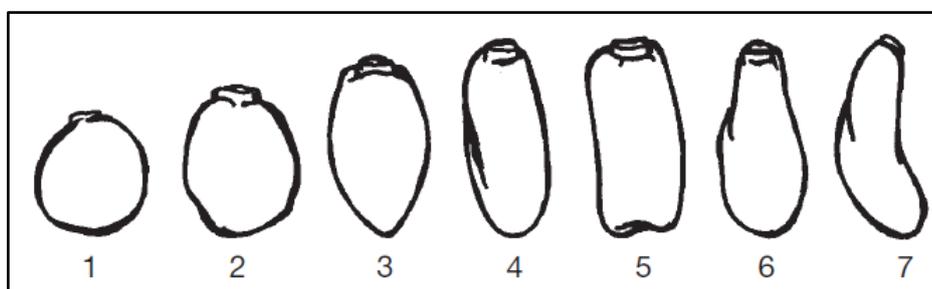


Figura 1: Forma del fruto en estado Khalal

3.3.2. Descriptores morfológicos de la pulpa del fruto:

Consistencia del dátil en Tamar:

1. Suave
2. Semi suave
3. Seco

Gusto y Sabor:

1. Insípido
2. Agrio
3. Amargo
4. Fermentado
5. Otro

Textura de la pulpa:

1. Fibrosa
2. Harinosa
3. Melosa

3.3.3. Elaboración de dendogramas

Se utilizó el análisis de conglomerados no jerárquico, utilizando las distancias euclidianas por promedios. Además se elaboró un análisis de componentes principales, con su correspondiente correlación de Pearson, para seleccionar las variables más discriminativas para la caracterización. Se utilizó el programa Minitab ver. 17 para el procesamiento de datos.

3.3.4. Clasificación de los frutos

Según Markhand *et al.* (2010) los frutos de la palma datilera se clasifican en pequeños si sus medidas son: longitud (L) <4.0 y diámetro (D) < 2.4cm), medianos si L= 4.0 – 5.0 y D= 2.5 – 2.9 cm y largos si L= >5.0 y D= >3.0 cm.

3.4. Introducción *In vitro*

3.4.1. Material vegetal

Se utilizaron los hijuelos de 2 a 3 años de edad (Figura 2), provenientes del ecotipo 16, ubicado en la latitud S13.9421, longitud W75.9238 y altitud 354.9 msnm, correspondiente al distrito de Villacurí, Región de Ica.



Figura 2: Extracción del hijuelo de 2 a 3 años de edad.

Primero se cortó las hojas del hijuelo de la planta madre para la extracción, después se cava alrededor del hijuelo para que haya espacio para maniobrar (Figura 3), se cortaron las raíces, se realizó una palanca, para que el hijuelo se separe de la planta madre sin daño en la base, de esta manera se evita la contaminación exógena.



Figura 3: Trabajo de extracción de hijuelo

Una vez extraído el hijuelo, se corta las bases de las hojas que dificulten el transporte debido a sus espinas (Figura 4).



Figura 4: Hijuelo listo para su transporte

3.4.2. Material de laboratorio

Los materiales utilizados para el establecimiento “*in vitro*” de Palma datilera fueron:

- Sierra
- Machete
- Cuchillos
- Guantes de protección
- Detergente
- Lejía
- Agua destilada
- Balanza de precisión
- Jarras de 2 litros
- Probetas
- Fungicida Benomyl (1 gr/L)

Los hijuelos fueron trasladados al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Área Cultivo de Tejidos.

Se cortaron las hojas externas del hijuelo, teniendo cuidado de no quebrar la base (Figura 5).



Figura 5: Pelado del hijuelo

Se sigue pelando hasta dejar una columna de hojas con su base, teniendo un tamaño final de 10 a 15 cm de longitud (Figura 6).



Figura 6: Columna de hojas

3.4.3. Aspectos técnicos comunes de los tratamientos

Tratamiento 1:

- Desinfección del material vegetal

La columna de hojas se colocó en una bandeja con abundante agua corriente debajo del grifo para eliminar residuos de suelo, después se lavan con detergente comercial y se enjuagó con abundante agua corriente.

En la cámara de flujo laminar, la columna de aproximadamente 8-10 cm de longitud se esterilizó superficialmente con alcohol 70% por 1 minuto, se enjuagó con agua destilada estéril, luego se sumergió durante 15 minutos en la solución de hipoclorito de sodio 1.6% (Clorox 30% v/v) con 0.1 ml de Tween 20/100 ml de solución. Posteriormente se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril a intervalos de 60 segundos. El tejido una vez desinfectado se sumergió en agua con cisteína (50 mg/L) hasta la preparación de los explantes para evitar su oxidación. El tejido que rodea el ápice fue removido hasta llegar al meristemo con cuatro primordios.

Tratamiento 2:

- Desinfección del material vegetal

Para iniciar con la desinfección del material vegetal, se cortó la parte del tallo del hijuelo de la Palma Datilera, dejando una columna de hojas. Se remojó en lejía Clorox y fungicida Benomyl (1 g/L) durante 30 minutos cada uno. Seguido de cada remojo se enjuagó 3 veces el material con agua destilada (Figura 7).



Figura 7: Columna de hojas remojando en lejía

Posteriormente, se desinfectó en la cámara del Flujo Laminar la columna de 5 a 8 centímetros, se utilizó lejía al 50% durante 20 minutos (Figura 8), luego se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Se cortaron los primordios hasta llegar al meristemo (Figura 9), luego se remojó en lejía al 25% durante dos minutos y luego se enjuagó tres veces con agua destilada estéril.



Figura 8: Explante remojando en lejía al 50%



Figura 9: Meristemo de la palmera dátíl

Los meristemas fueron sembrados en medio Murashige and Skoog (1962), a partir de ahora llamado MS, con antibiótico (ceftriaxona 60 mg/L) e incubados en oscuridad a 26°C por 7 días. Una vez cumplido ese plazo se utilizó para los tratamientos aquellos meristemas que no mostraron ningún signo de contaminación (hongos y/o bacterias) además se evaluó la eficiencia de los tratamientos de desinfección.

Preparación del explante: Se empleó como explantes las hojas más tiernas que rodean al ápice meristemático así como el propio ápice meristemático. De las hojas se empleó segmentos de 3 a 5 mm de longitud de la base (Figura 10) y el ápice meristemático se seccionó en cuatro partes (Figura 11) y se sembraron en los medios de inducción de los tratamientos estudiados



Figura 10: Segmentos de la base de las hojas.



Figura 11: Explante del meristemo cortado en cuatro

3.4.4. Tratamientos para la formación de callo embriogénico

Para la inducción de callos embriogénicos se utilizaron tres procedimientos para la formación de callo embriogénico, uno que pudiéramos denominar lento pues se transita por varios estadios (Al Khayri, 2010), otro rápido referido por Kurup *et al.* (2014) y otro establecido en el IBT.

3.4.4.1.Inducción de callo

El diseño experimental utilizado para evaluar el porcentaje de explantes con callogénesis fue el Diseño completamente al azar con tres tratamientos y 3 repeticiones. Cada repetición consistía en 9 explantes.

Los tratamientos utilizados en la fase de Inducción de callo se describen en la Tabla 2

Tabla 2: Composición de los medios de los tres tratamientos de Inducción de callo

TRAT.	MEDIO BASAL (L)	INICIO (L)
I1	Sales MS	2,4-D 100 mg
	NaH ₂ PO ₄ 170 mg	2 iP 3 mg
	Mioinositol 125 mg	Carbón Activo 1.5 gr
	Glutamina 200 mg	Oscuridad a 26°C por 3 meses, sub cultivo cada 3 semanas
	Tiamina 5 mg	
	Ac. Nicotínico 1 mg	
	Piridoxina 1 mg	
Sacarosa 30 gr		
I2	Sales MS	2,4-D 100 mg
	Vitaminas MS	
	NaH ₂ PO ₄ 200 mg	
	Mioinositol 100 mg	
	Sacarosa 30 gr	Oscuridad a 26° C por 6 semanas
	Carbón activado 3gr	
I3	Sales MS	2,4-D 2 mg
	Vitaminas MS	AIA 0.1 mg
	Mioinositol 100 mg	Ac. Ascórbico 50 mg
		Ac. Cítrico 50 mg
		Sulfato de Adenina 25 mg
		Oscuridad a 26° C por 2 meses, sub cultivo cada mes.

Se utilizó los explantes mostrados en la figura 10 y 11 y fueron sembrados uno por tubo.

3.4.4.2.Proliferación de callo

Para la evaluación del crecimiento del callo se trabajó bajo un diseño completamente al azar con tres tratamientos y tres repeticiones.

Para la evaluación de sobrevivencia de explantes se trabajó bajo un diseño completamente al azar con tres tratamientos y diez repeticiones.

Los tratamientos se describen en la Tabla 3.

Tabla 3: Composición de los medios de los tres tratamientos de Proliferación de callo

TRAT.	MEDIO BASAL (L)	PROLIFERACIÓN (L)
P1	Sales MS	ANA 10 mg
	NaH ₂ PO ₄ 170 mg	2 iP 30 mg
	Mioinositol 125 mg	Carbón Activo 1.5 gr
	Glutamina 200 mg	Fotoperiodo 14/10 por 3 semanas
	Tiamina 5 mg	
	Ac. Nicotínico 1 mg	
	Piridoxina 1 mg	
Sacarosa 30 gr		
P2	Sales MS	Caseína hidrolizada 200 mg
	Vitaminas MS	
	NaH ₂ PO ₄ 200 mg	
	Mioinositol 100 mg	Oscuridad a 26° C por 4 semanas, sub cultivo cada 2 semanas
	Sacarosa 30 gr	
	Carbón activado 3 gr	
P3	Sales MS	2,4-D 2.5 mg
	Vitaminas MS	AIA 0.1 mg
	Mioinositol 100 mg	Kinetina 0.25 mg
		Fotoperiodo 14/10 por 2 meses, sub cultivo cada mes.

3.4.4.3.Formación de callo embriogénico

Para la evaluación del desarrollo del callo se trabajó bajo un diseño completamente al azar con tres tratamientos y siete repeticiones.

Los tratamientos se describen en la Tabla 4.

Tabla 4: Composición de los medios de los tres tratamientos de Callo embriogénico

TRAT.	MEDIO BASAL (L)	CALLO EMBRIOGÉNICO (L)
C1	Sales MS	ANA 10 mg
	NaH ₂ PO ₄ 170 mg	2 iP 6 mg
	Mioinositol 125 mg	Carbón Activo 1.5 gr
	Glutamina 200 mg	Fotoperiodo 14/10 por 12 semanas, sub cultivo cada 3 semanas
	Tiamina 5 mg	
	Ac. Nicotínico 1 mg	
	Piridoxina 1 mg	
	Sacarosa 30 gr	
C2	Sales MS	ANA 0.5 mg
	Vitaminas MS	Caseína hidrolizada 200 mg
	NaH ₂ PO ₄ 200 mg	BAP 0.25 mg
	Mioinositol 100 mg	Fotoperiodo 14/10 por 7.5 meses, sub cultivo cada 6 semanas
	Sacarosa 30 gr	
	Carbón activado 3 gr	
C3	Sales MS	BAP 0.1 mg
	Vitaminas MS	Fotoperiodo 14/10 por 4 - 5 meses, sub cultivo cada mes.
	Mioinositol 100 mg	

3.4.5. Programa estadístico y Corrección de datos

Toda la información registrada fue ingresada a una base de datos elaborada en el programa Microsoft Office 2010. La base de datos fue procesada en el software estadístico SAS 9.4 con el fin de analizar la varianza (ANVA), comparar los promedios (Tukey, $\alpha=0.05$) y cuando el coeficiente de variabilidad resultara muy alto, se transformó los datos, sumando uno a cada variable respuesta y posteriormente sacándole la raíz cuadrada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Georreferenciación de los Ecotipos de Palma datilera de la Región Ica

Se georreferenció 83 ecotipos de palma datilera, se recorrió toda la zona de la Provincia de Ica y algunas zonas de la Provincia de Pisco del 8 al 10 de Marzo de 2014 (Puntos rojos) (Figura 12 y Figura 13) y toda la zona de la Provincia de Pisco del 4 al 6 de Abril del 2014 (Puntos verdes) (Figura 14 y Figura 15), se tomaron los datos de latitud ($^{\circ}$), longitud ($^{\circ}$), altura (msnm), altura de planta (m), dueño de la palmera (si la tenía), estado de la palmera, presencia de hijuelos, sexo de la planta y observaciones finales, todos estos datos se pueden apreciar en la Tabla 5, y la ubicación de los puntos en el mapa geográfico en la Figura 16. Los puntos resaltados en la Tabla 5 son los que se evaluaron para la caracterización morfológica.

Se eligió la Región Ica debido a que ahí se encuentra la mayor población de palmas datileras que provienen de palmeras sembradas a partir de semilla por los españoles en la época colonial, entre ellas tenemos el distrito de Cachiche (Ica - Ica) donde su palmera más representativa es la llamada de las “Siete Cabezas”, la Reserva de Paracas (Pisco - Ica), etc.



Figura 12: Georreferenciación de palmeras datileras de la Provincia de Ica



Figura 13: Entrevista a los propietarios de las Palmeras datileras



Figura 14: Recorrido a pie para la georreferenciación de Palmas datileras ubicadas en zonas inaccesibles para el carro



Figura 15: Entrevista a los propietarios

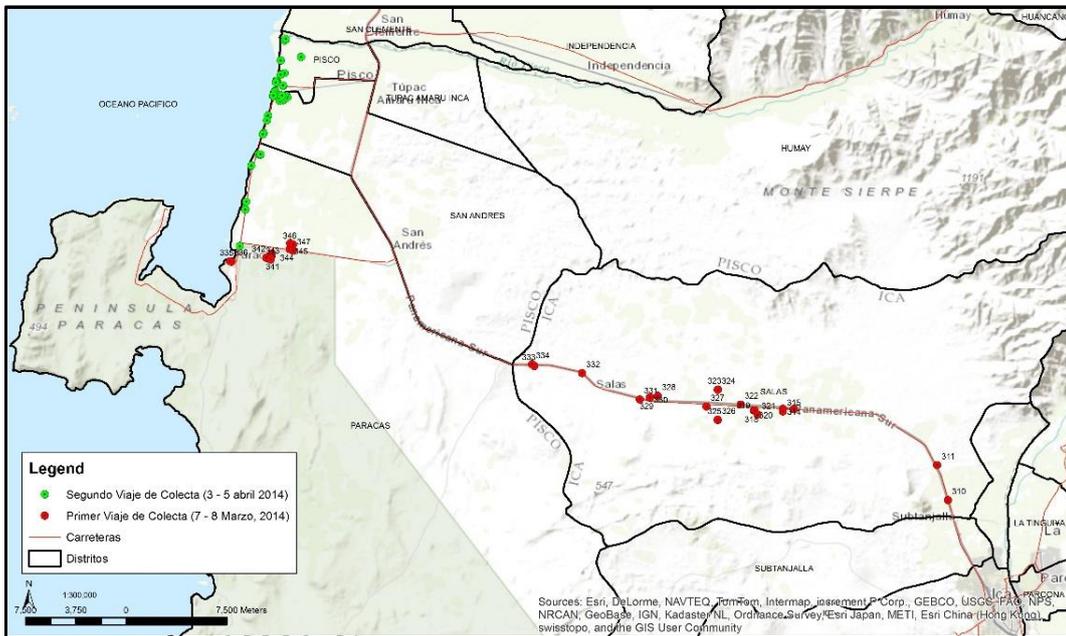


Figura 16: Mapa de las colectas de los ecotipos de Palma Datilera.

Tabla 5: Datos de la geoprospección de Palma datilera en la Región Ica

OTI	Latitud	Longitud	Altitud	Departamento	Provincia	Distrito	FechaColecta	LOCALIDAD	Propietario	AlturaArbol	HEMBRA (Si=1, NO=0)	CON HUIJUELOS (Si=1, NO=0)	PRESENCIA DE FLORES (Si=1, NO=0)	ESTADO DE PALMERA (BIEN=1, MAS O MENOS=2, MAL=3)	FENOTIPO (BIEN=***, MAS O MENOS=**, MAL= *)	OBSERVACIONES	FOTOS
1	-14.00	-75.77	433.9	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Años a 50 m E			N.D.	N.D.	1=3	N.D.		4 palmeras	1 al 3
2	-13.97	-75.78	439.7	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Centro poblado Nuestra Sra. de Guadalupe	Sra. Eida Contreras	4.2	1	1+	1	1	**	2 palmeras	4 al 9
3	-13.93	-75.87	394.6	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Granja Ica	Arnaldo Humari	3.2	1	1	1	1	**	2 palmeras	16 al 21
4	-13.93	-75.87	394.5	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Granja Ica	Arnaldo Humari	1.4	1	1	1	1	***	2 palmeras	28 al 33
5	-13.93	-75.88	386.4	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Carmen		6.5	1=3, 0=5	1	1=3, 0=5	1	***	8 palmeras, precoz y frutos grandes	38 al 47
6	-13.94	-75.88	386.9	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14				1=1, 0=3	0	0	3	***	Abandonados como cerco vivo	48 al 53
7	-13.94	-75.90	370.0	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Los Luisés	Gustavo Tipaqui	4.8	1	1	1	1	***	Existen dos palmeras mas en medio del cultivo	54 al 58
8	-13.94	-75.90	371.9	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Los Luisés	Gustavo Tipaqui	4.3	1	1	1	1	***	Existen dos palmeras mas en medio del cultivo	57 al 71
9	-13.94	-75.90	373.1	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Los Luisés	Gustavo Tipaqui	1.6	1	1	1	1	***	Existen dos palmeras mas en medio del cultivo	80 al 81
10	-13.94	-75.90	373.2	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Los Luisés	Gustavo Tipaqui	1.6	1	1	1	1	***	Existen dos palmeras mas en medio del cultivo	82 al 84
11	-13.94	-75.90	378.0	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Los Luisés	Gustavo Tipaqui	2.8	1	1	1	2	**	Existen dos palmeras mas en medio del cultivo	85 al 86
12	-13.93	-75.91	370.4	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Por Carretera		1.8	1	1	1	1	**	Por carretera	87 al 88
13	-13.92	-75.92	357.9	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Santa Ana	Jonas Yactayo	8.7	1	1	1	2	**	Fruto Amarillo	90 al 92
14	-13.92	-75.92	358.0	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Santa Ana	Jonas Yactayo	1.0	0	1	0	2	***		93 al 94
15	-13.94	-75.92	358.0	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Pampa Pisco		9.7	N.D.	1=4	0	3	N.D.	8 palmeras, en alto riesgo por sequia	95 al 107
16	-13.94	-75.92	354.9	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Rocio	Richard Navarrete	1.7	1=13	1	1	1	**	51 plantas enanas	108 al 128
17	-13.93	-75.93	353.0	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Rocio	Richard Navarrete	3.7	1	1+	1	1	**	1, 2 y 3	130 al 141
18	-13.93	-75.96	339.6	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo San Miguel		9.1	N.D.	0	0	3	N.D.		146 al 148
19	-13.93	-75.97	330.1	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Los Rosales	Juan	4.7	1 y 0	0 y 1	1	1 y 2	***		149 al 152
20	-13.93	-75.97	335.8	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Fundo Los Rosales	Juan	12.1	1=5	1+	1	2	***		153 al 158
21	-13.93	-75.99	332.1	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Villacuri	Fundo Shiman Produce	6.1	1=8, 0=20	1	1	2	***	28 palmeras	159 al 162
22	-13.91	-76.01	296.3	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Villacuri	Arenal	8.5	1	1	1	2	**	9 palmeras	163 al 165
23	-13.91	-76.05	252.6	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Villacuri	Arenal	6.1	1=15	1	1	2	**	11 palmeras	186 al 194
24	-13.90	-76.05	253.0	Ica	Ica	Salas	8-Mar-14	Villacuri	Arenal	5.4	1	1+	1	1	**		195 al 196
25	-13.94	-76.09	17.9	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	Cerca al mar		10.2	1=6	0	1	2	**	26 palmeras	200 al 201
26	-13.83	-76.26	19.2	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	PARACAS	Cerca al mar	8.7	1=4	1	1	2	**	6 palmeras	205 al 208
27	-13.83	-76.22	46.7	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	PARACAS	Reserva de Paracas	1.6	1=1	1	1	2	**	4 palmeras	211 al 230
28	-13.83	-76.22	46.7	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	PARACAS	Reserva de Paracas	1.6	1	1	1	2	**		231
29	-13.83	-76.22	46.1	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	PARACAS	Reserva de Paracas	6.6	1	0	1	2	**		232
30	-13.83	-76.22	46.4	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	PARACAS	Reserva de Paracas	5.6	1	1+	1	2	**	Colectar	234
31	-13.83	-76.22	47.3	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	PARACAS	Reserva de Paracas	5.9	1=4	1+	1	2	**	Colectar	235 al 236
32	-13.83	-76.23	46.8	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	PARACAS	Reserva de Paracas	10.2	1	1	1	2	**		241 al 243
33	-13.83	-76.21	45.4	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	PARACAS	Reserva de Paracas	9.2	1	1	1	2	**		244
34	-13.83	-76.21	50.0	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	LANCHAS	Bosque Huarangal	1.8	1=3	1	1	2	**		246 al 247
35	-13.82	-76.21	51.5	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	LANCHAS	Bosque Huarangal	8.6	1=4	1	1	2	**		248 al 255
36	-13.82	-76.21	55.3	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	LANCHAS	Bosque Huarangal	6.7	1=2	1 y 0	1	2	**	8 palmeras	256 al 261
37	-13.83	-76.22	20.7	Ica	Pisco	Paracas	8-Mar-14	LANCHAS	Bosque Huarangal	5.5	1=8	1 y 0	1	2	**	24 palmeras	262 al 270
38	-13.70	-76.20	20.7	Ica	Pisco	4-Apr-14	Cooperativa Santa Fe Fundo Rosario	Helber Peralta			0	0	1	**	1 palmera	271 al 282	
39	-13.69	-76.21	20.7	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Boca del Rio	Familia Flores	1	0	0	0	3	*	1 palmera	363 al 366
40	-13.69	-76.21	21.7	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Boca del Rio	Familia Flores	0	0	0	0	2	**	8 palmeras	367 al 375
41	-13.68	-76.21	22.1	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Boca del Rio	Familia Flores	0	0	0	0	2	**	5 palmeras	376 al 380
42	-13.70	-76.22	21.5	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Boca del Rio	Familia Flores	0	0	0	0	1	**	1 palmera	381 al 384
43	-13.71	-76.21	24.3	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14			0	0	0	0	2	**	2 palmeras	386 al 394
44	-13.71	-76.22	22.3	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Centro de Convenciones	Oasis	0	0	1	0	1	**	1 palmera	395 al 397
45	-13.71	-76.22	19.2	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Playa Montengamos	Humedales de Pisco		1	0	1	2	**	2 palmeras	432 al 436
46	-13.71	-76.22	21.4	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Playa Montengamos	Humedales de Pisco		4(0) 2(1)	4(1) 2(0)	1	1	**	3 palmeras	437 al 442
47	-13.71	-76.22	19.8	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Playa Montengamos	Humedales de Pisco		1	0	0	2	**	4 palmeras	444 al 445
48	-13.71	-76.22	17.8	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Centro Poblado Santísima Cruz de la Playa	Juan Martín Cuentas Casas	1	1	1	1	1	***	3 palmeras	446 al 472
49	-13.72	-76.22	19.6	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Los Jardines de San Andres	Humedales de Pisco		1	0	1	2	**	1 palmera	473 al 474
50	-13.72	-76.22	20.1	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Los Jardines de San Andres	Humedales de Pisco	10.2	4(1)	1	1	2	**	4 palmeras	475 al 478
51	-13.72	-76.22	19.4	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Los Jardines de San Andres	Humedales de Pisco		0	0	0	2	**	1 palmera	479
52	-13.72	-76.22	20.2	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14	Los Jardines de San Andres	Humedales de Pisco		1	0	1	2	*	1 palmera	480
53	-13.72	-76.22	16.2	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14	Los Jardines de San Andres	Humedales de Pisco		1	1+	1	1	**	1 palmera	481 al 482
54	-13.72	-76.22	12.5	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14	Los Jardines de San Andres	Humedales de Pisco		1	0	1	2	**	1 palmera	483 al 484
55	-13.72	-76.22	23.6	Ica	Pisco	Pisco	4-Apr-14	Instituto Pisco		1	0	1	1	**	1 palmera	485	
56	-13.72	-76.21	23.8	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		0+	0	0	2	*	3 palmeras	488
57	-13.72	-76.21	20.4	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		0	1+	0	2	*	2 palmeras	489 al 492
58	-13.72	-76.21	20.6	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		0	1+	0	1	*	2 palmeras	493 al 494
59	-13.72	-76.21	17.6	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		0	1	0	1	*	2 palmeras	495 al 497
60	-13.72	-76.21	21.5	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		0+	0	0	2	*	1 palmera	500
61	-13.72	-76.22	23.3	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		0	1+	0	2	*	1 palmera	501 al 502
62	-13.73	-76.22	22.2	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		0	0	0	2	**	1 palmera	503
63	-13.73	-76.22	22.4	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		0	1+	0	2	*	2 palmeras	504 al 508
64	-13.73	-76.22	20.3	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		0	1+	0	2	*	1 palmera	510 al 511
65	-13.72	-76.22	14.4	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		1	1+	1	2	**	1 palmera	512 al 513
66	-13.72	-76.22	24.4	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		0	1+	0	2	**	3 palmeras	514 al 516
67	-13.72	-76.22	24.2	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		0	1+	0	2	**	3 palmeras	517 al 521
68	-13.72	-76.22	25.5	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Humedales de Pisco		0	0	0	3	-	1 palmera	522 al 523
69	-13.74	-76.23	28.1	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14	Puerto Pesquero	Playa Pisco	1	0	0	0	2	*	2 palmeras	577
70	-13.74	-76.23	28.3	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14	Puerto Pesquero	Playa Pisco	0	0	(1) (10)	0	2	*	1 palmera	578
71	-13.74	-76.23	16.8	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Playa Pisco		0	0	0	1	**	0	580 al 581
72	-13.74	-76.23	16.2	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Playa Pisco		0	0	0	1	**	8 palmeras	580 al 581
73	-13.75	-76.23	16.7	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Terminal Pedro Peru		0	1+	0	1	*	2 palmeras	580 al 583
74	-13.75	-76.23	3.4	Ica	Pisco	San Andres	4-Apr-14		Playa Pisco		0	0	0	3	*	1 palmera	583
75																	

4.2. Caracterización morfológica

Se evaluaron los caracteres morfológicos de fruto, tomando como base los descriptores establecidos por el IPGRI, no se pudieron caracterizar todos los puntos georreferenciados mostrados en la Tabla 5, debido a la falta de disponibilidad de acceso a esos puntos por parte de los propietarios y/o por el difícil acceso a ellos.

Se escogió describir las palmeras mediante descriptores morfológicos de frutos, debido a que se quería discriminar las palmeras que poseían frutos con calidad superior a los existentes en el mercado actual p.e. var. Medjoul, además se encontró referencias anteriores que utilizaron descriptores morfológicos de frutos para discriminar individuos en una población en especie de la familia Arecaceae como en coco (Zizumbo *et al.*, 2005) y palma datilera (Ahmed *et al.*, 2011); en otras especies no relacionadas como los higos (Giraldo, 2010), la berenjena (Cakir *et al.*, 2017), la papaya (de Oliveira *et al.*, 2012) y la maracuyá (Matheri *et al.*, 2016).

En la Tabla 6 se muestra los datos obtenidos en la caracterización morfológica de las plantas de 25 palmeras seleccionadas, en la Tabla 7 se muestra los datos obtenidos en la caracterización externa del fruto y en la Tabla 8 se muestra los datos obtenidos de la evaluación de la pulpa del fruto y en la Tabla 9 se muestra los datos obtenidos a partir de los caracteres de rendimiento.

El punto resaltado en las tablas es el punto donde se recolectó los hijuelos para determinar el protocolo de Embriogénesis somática.

Los frutos fueron recolectados del 10 al 14 de Abril del 2015 en el estado que se encontrasen, que en la mayoría fueron en etapa Khalal a Rutab (Figura 17, Figura 18 y Figura 19).



Figura 17: Frutos rojos en estado Khalal



Figura 18: Racimos de frutos en estado Khalal



Figura 19: Muestra de frutos caracterizada

Tabla 6: Caracteres georreferenciales y morfológicos de las plantas de Palmas datileras seleccionadas.

ECOTIPO	LATITUD (°)	LONGITUD (°)	ALTITUD (msnm)	UBICACIÓN	ALTURA DE PLANTA (m)
2	-13.9728	-75.7766	439.69	Ica	4.2
7	-13.93566	-75.899573	370.03	Ica	4.8
8	-13.93572	-75.899198	371.87	Ica	4.3
9	-13.93573	-75.898995	373.06	Ica	1.6
10	-13.93574	-75.898933	373.18	Ica	1.6
11	-13.93856	-75.897047	378.01	Ica	2.8
12	-13.93179	-75.908451	370.44	Ica	1.8
13	-13.92157	-75.92368	357.92	Ica	8.7
16	-13.94209	-75.923761	354.93	Ica	3
17	-13.93316	-75.931382	353.04	Ica	3.7
22	-13.9105	-76.014766	296.31	Ica	8.5
23	-13.90564	-76.04676	252.57	Ica	6.1
24	-13.90444	-76.048399	252.99	Ica	5.4
26	-13.83494	-76.251018	19.21	Pisco	8.7
27	-13.82988	-76.222958	46.66	Pisco	1.6
28	-13.83124	-76.223121	46.66	Pisco	1.6
32	-13.83254	-76.226663	46.80	Pisco	10.2
33	-13.83372	-76.223565	45.39	Pisco	9.2
34	-13.82665	-76.210876	49.99	Pisco	10.5
35	-13.82281	-76.210652	51.46	Pisco	8.6
36	-13.82361	-76.208749	55.33	Pisco	6.7
37	-13.82775	-76.208779	56.19	Pisco	5.5
46	-13.71304	-76.219806	21.36	Pisco	5.6
65	-13.72438	-76.217209	14.36	Pisco	5
83	-13.55946	-75.55906	363.00	Ica	1.2

En la Figura 20 se puede observar que los ecotipos se han separado en dos grupos, el Grupo 1 corresponde a los ecotipos ubicados en la Provincia de Ica y el Grupo 2 corresponde a los ecotipos ubicados en la Provincia de Pisco.

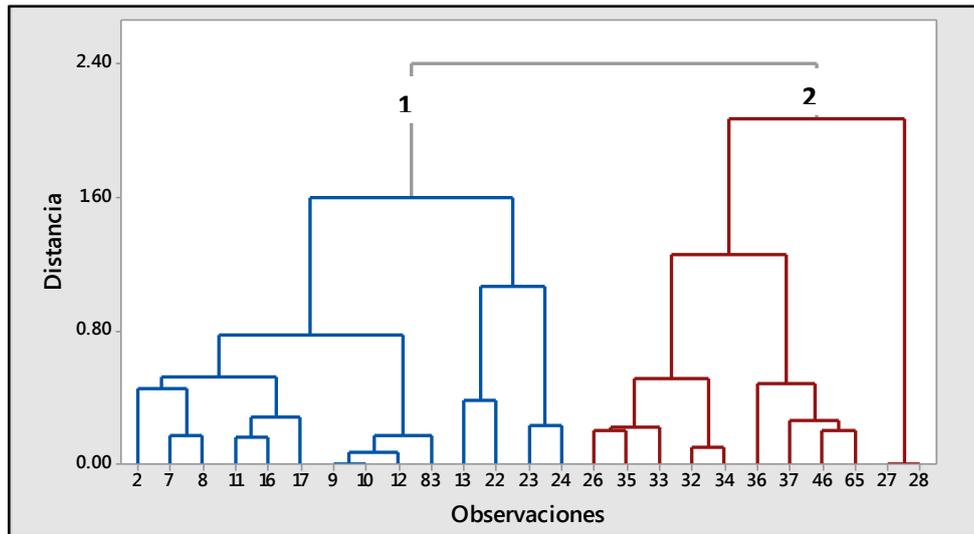


Figura 20: Dendrograma de ecotipos de la Región Ica tomando las variables de Altitud y Altura de planta, utilizando el método medición de distancia tipo Euclidiana y ligamiento por promedios (Minitab 17). Distancia de corte: 2.10

En la Figura 21 se muestra que al conglomerar el dendrograma en cuatro grupos, según el criterio altura de planta, se observa que el Grupo 1 corresponde a plantas de Ica y con una altura menor a 5 metros, el Grupo 2 corresponde a plantas de Ica y con una altura mayor a 5 metros, el Grupo 3 corresponde a plantas de Pisco con una altura mayor a 5 metros y el Grupo 4 corresponde a plantas de Pisco con una altura menor a 5 metros.

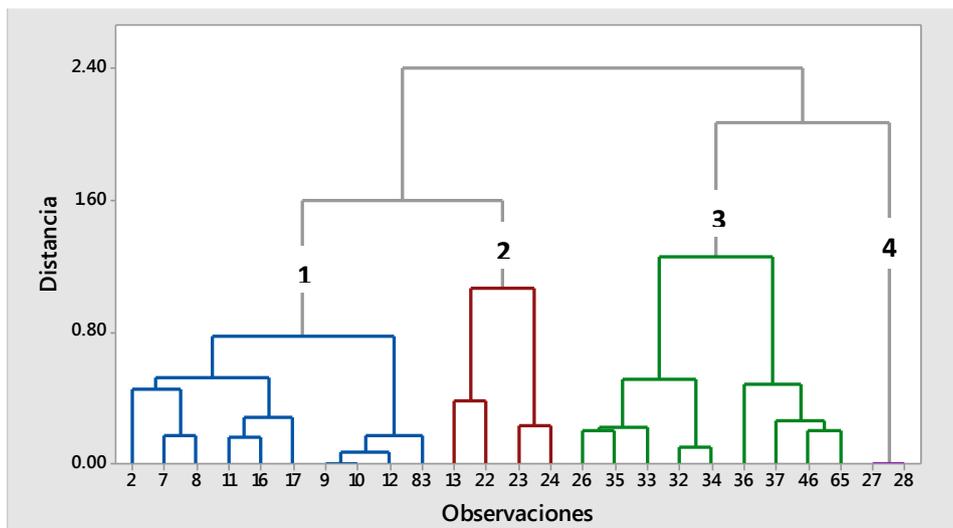


Figura 21: Dendrograma de ecotipos de la Región Ica tomando las variables de Altitud y Altura de planta, utilizando el método medición de distancia tipo Euclidiana y ligamiento por promedios (Minitab 17). Distancia de corte: 1.50

En la Figura 22 se puede observar que de la población caracterizada el 56 por ciento pertenece la provincia de Ica (14 individuos) y el 44 por ciento (11 individuos), a la provincia de Pisco

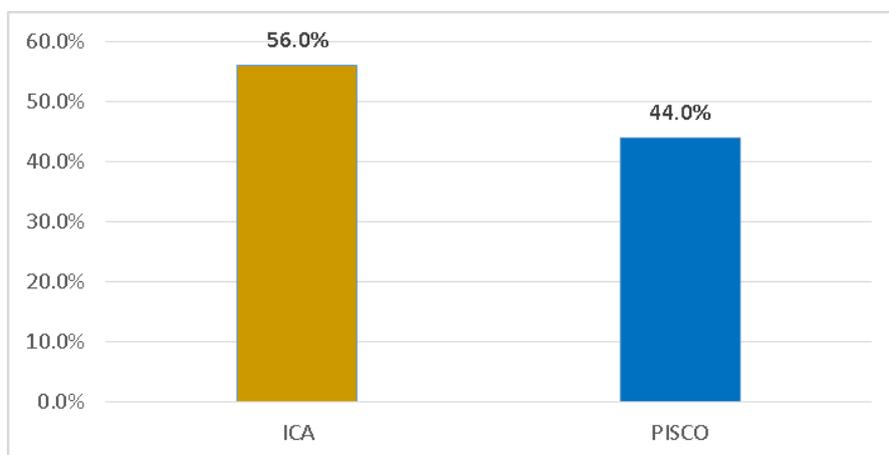


Figura 22: Porcentaje de individuos caracterizados en Ica.

Tabla 7: Caracteres morfológicos del Fruto de las palmas datileras

ECOTIPO	FORMA FRUTO	LONG. FRUTO	ANCHO FRUTO
2	Curvo	Muy grande	Grande
7	Ovoide	Corto	Grande
8	Sub cilíndrico	Medio	Grande
9	Ovoide	Corto	Medio
10	Sub cilíndrico	Medio	Medio
11	Sub cilíndrico	Corto	Medio
12	Ovoide	Corto	Medio
13	Curvo	Grande	Medio
16	Sub cilíndrico	Medio	Medio
17	Cilíndrico	Medio	Grande
22	Sub cilíndrico	Medio	Medio
23	Ovoide	Corto	Medio
24	Sub cilíndrico	Corto	Grande
26	Esférico	Muy corto	Grande
27	Ovoide	Corto	Medio
28	Ovoide	Muy corto	Medio
32	Ovoide	Muy corto	Medio
33	Sub esférico	Corto	Medio
34	Sub cilíndrico	Medio	Medio
35	Sub cilíndrico	Corto	Medio
36	Sub esférico	Corto	Grande
37	Sub esférico	Corto	Grande
46	Sub esférico	Corto	Grande
65	Cilíndrico	Medio	Grande
83	Ovoide	Corto	Grande

En la Figura 23 se muestra la conglomeración del dendograma en tres grupos, en el Grupo 1 corresponde a plantas con frutos de forma curva; el Grupo 2 corresponde a los frutos de ancho grande y el Grupo 3 corresponde a los frutos con ancho medio.

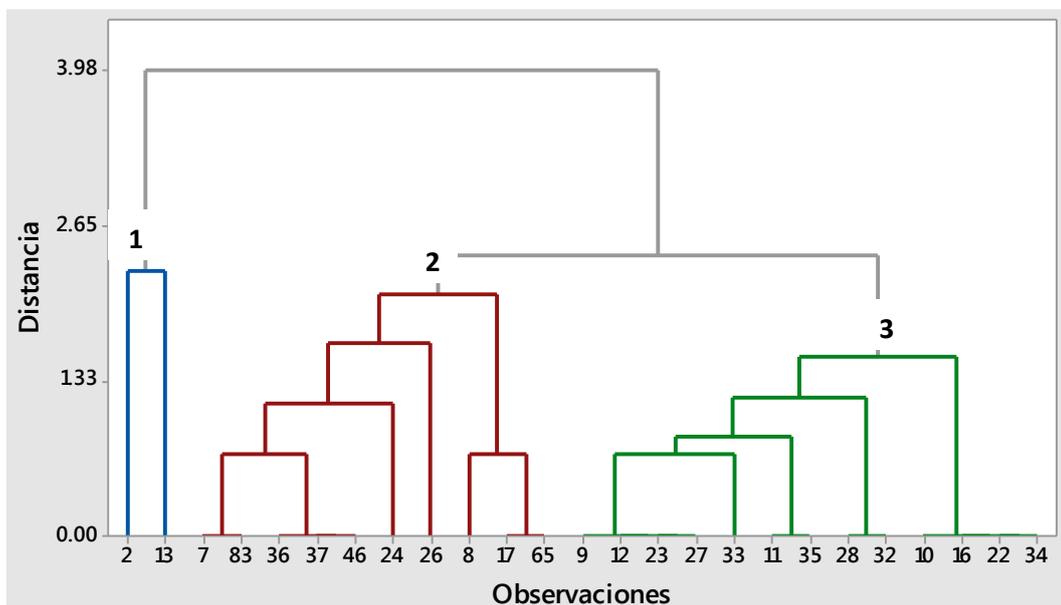


Figura 23: Dendrograma de ecotipos de la Región Ica tomando las variables de Forma de fruto, Longitud de Fruto y Ancho de fruto, utilizando el método medición de distancia tipo Euclidiana y ligamiento por promedios (Minitab 17). Distancia de corte: 2.55

En la Figura 24 se puede observar que en la Región de Ica se puede encontrar ecotipos con forma de fruto sub cilíndrico, ovoide, sub esférico, cilíndrico, curvo y esférico, encontrándolos en la población a una proporción de 0.32, 0.32, 0.16, 0.08, 0.8 y 0.04, respectivamente.

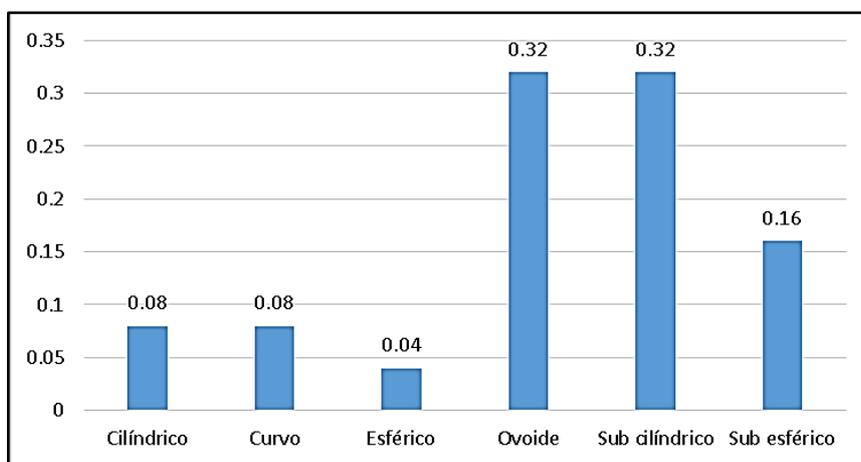


Figura 24: Proporción de ecotipos en la Región Ica, de acuerdo al carácter Forma de fruto.

En la Figura 25 se puede observar que en la provincia de Ica se puede encontrar ecotipos con forma de fruto sub cilíndrico, ovoide, curvo y cilíndrico, encontrándolos en la población a un porcentaje de 42.86%, 35.71%, 14.29% y 7.14%, respectivamente

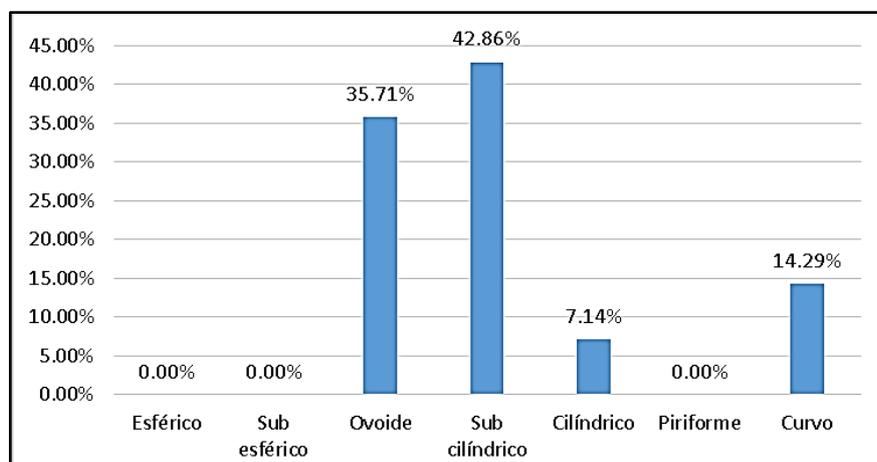


Figura 25: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica, de acuerdo al carácter Forma de fruto.

En la Figura 26 se puede observar que en la provincia de Pisco se puede encontrar ecotipos con forma de fruto sub esférico, ovoide, sub cilíndrico, esférico y cilíndrico, encontrándolos en la población a un porcentaje de 36.36%, 27.27%, 18.18%, 9.09% y 9.09%, respectivamente

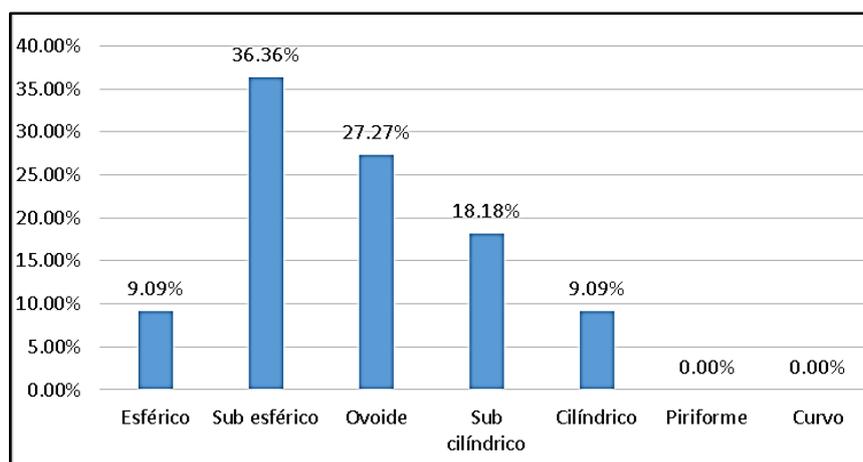


Figura 26: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco, de acuerdo al carácter Forma de fruto.

En la Figura 27 se puede observar que en la Región de Ica se puede encontrar ecotipos de longitud Corto, Medio, Muy corto, Grande, Muy grande, encontrándolos en la población a una proporción de 0.52, 0.28, 0.12, 0.4 y 0.4, respectivamente.

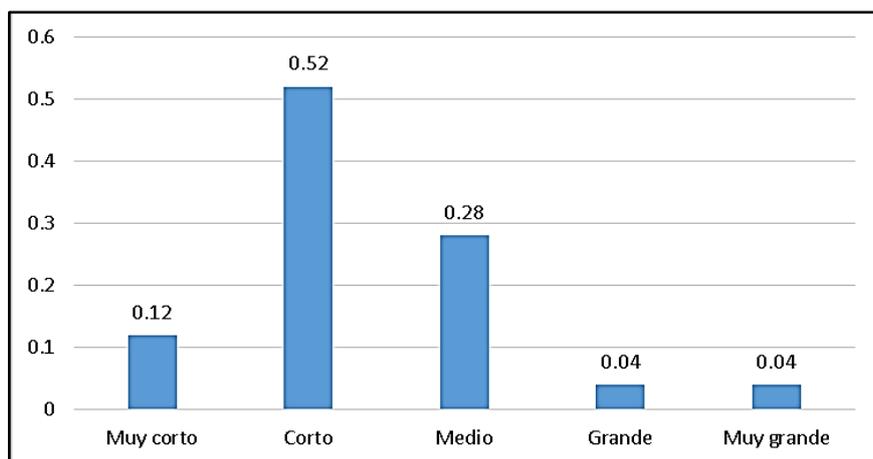


Figura 27: Proporción de ecotipos en la Región de Ica, de acuerdo al carácter Longitud de fruto.

En la Figura 28 se puede observar que en la provincia de Ica se puede encontrar ecotipos con longitud de fruto corto, medio grande y muy grande, encontrándolos en la población a un porcentaje de 50%, 35.71% 7.14% y 7.14%, respectivamente.

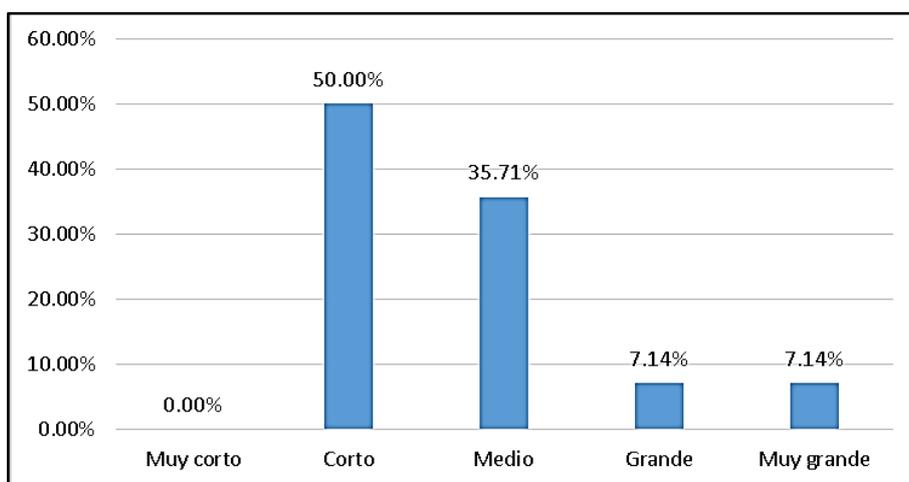


Figura 28: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica, de acuerdo al carácter Longitud de fruto.

En la Figura 29 se puede observar que en la provincia de Pisco se puede encontrar ecotipos con longitud de fruto Corto, Muy corto y Medio, encontrándolos en la población a un porcentaje de 54.55%, 27.27% y 18.18%, respectivamente.

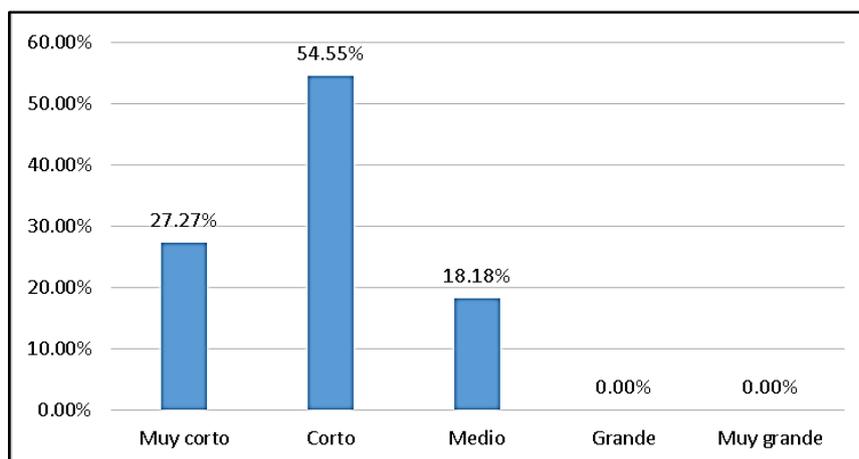


Figura 29: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco de acuerdo al carácter Longitud de fruto.

En la Figura 30 se puede observar que en la Región de Ica se puede encontrar ecotipos de fruto con ancho Medio y Grande, encontrándolos en la población a un porcentaje de 56% y 44%, respectivamente.

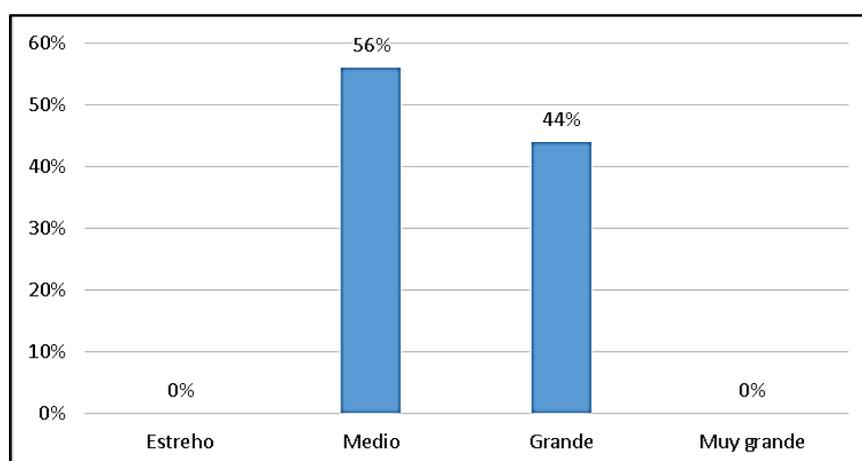


Figura 30: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica, de acuerdo al carácter Ancho de fruto.

En la Figura 31 se puede observar que en la provincia de Ica se puede encontrar ecotipos con ancho de fruto Medio y Grande, encontrándolos en la población a un porcentaje de 57.14% y 42.86%, respectivamente.

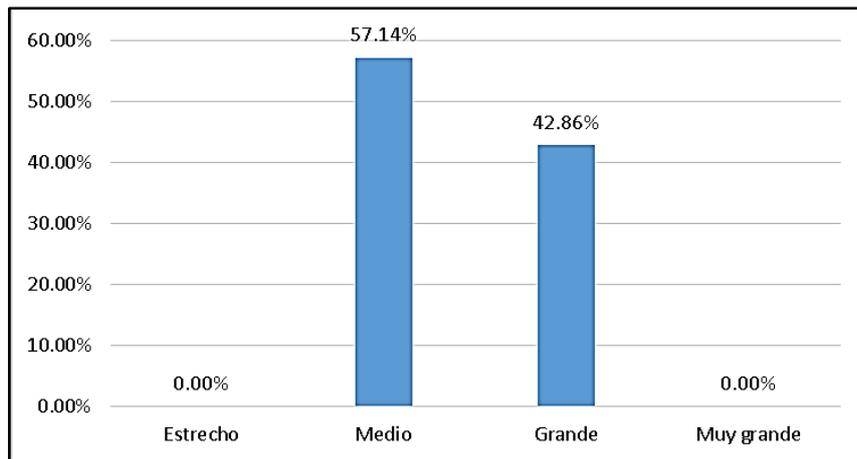


Figura 31: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica de acuerdo al carácter Ancho de fruto.

En la Figura 32 se puede observar que en la provincia de Pisco se puede encontrar ecotipos con ancho de fruto medio y grande, encontrándolos en la población a un porcentaje de 54.55% y 45.45%, respectivamente.

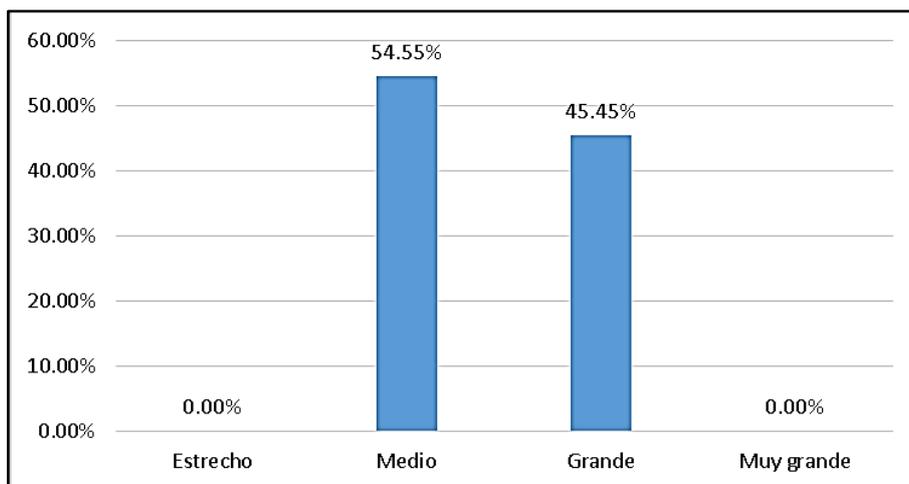


Figura 32: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco de acuerdo al carácter Ancho de fruto.

Tabla 8: Caracteres morfológicos de la pulpa del Fruto de las palmas datileras

ECOTIPO	CONSISTENCIA	SABOR	TEXTURA PULPA	COLOR
2	Semi suave	Otro	Harinosa	Ámbar
7	Suave	Otro	Melosa	Ámbar
8	Suave	Otro	Harinosa	Miel
9	Semi suave	Insípido	Harinosa	Amarillo
10	Semi suave	Otro	Harinosa	Miel
11	Seco	Insípido	Fibrosa	Amarillo
12	Suave	Otro	Harinosa	Amarillo
13	Semi suave	Agrio	Fibrosa	Amarillo
16	Suave	Otro	Harinosa	Miel
17	Suave	Otro	Harinosa	Amarillo
22	Semi suave	Otro	Harinosa	Ámbar
23	Suave	Otro	Melosa	Ámbar
24	Seco	Insípido	Fibrosa	Rojo
26	Suave	Agrio	Melosa	Ámbar
27	Semi suave	Fermentado	Fibrosa	Ámbar
28	Semi suave	Otro	Melosa	Ámbar
32	Seco	Agrio	Fibrosa	Verdoso
33	Seco	Otro	Fibrosa	Rojo
34	Semi suave	Agrio	Fibrosa	Ámbar
35	Seco	Insípido	Fibrosa	Ámbar
36	Seco	Fermentado	Fibrosa	Ámbar
37	Seco	Fermentado	Harinosa	Miel
46	Seco	Fermentado	Fibrosa	Miel
65	Semi suave	Otro	Fibrosa	Rojo
83	Semi suave	Otro	Harinosa	Marrón

En la Figura 33 se puede observar la agrupación de individuos de acuerdo a sus características en común, y esto son: Grupo 1: Frutos de pulpa harinosa y sabor otro (dulce), Grupo 2: Frutos ámbar de pulpa melosa y sabor otro (dulce), Grupo 3: Frutos ámbar de pulpa suave, melosa y agria, Grupo 4: Frutos amarillos de pulpa semi suave, harinosa e insípida, Grupo 5: Frutos de pulpa fibrosa, seca e insípida, Grupo 6: Frutos de pulpa semi suave y fibrosa, Grupo 7: Frutos con pulpa seca y sabor fermentado, Grupo 8: Frutos de pulpa seca y fibrosa, Grupo 9: Frutos rojos de pulpa fibrosa y sabor otro (dulce).

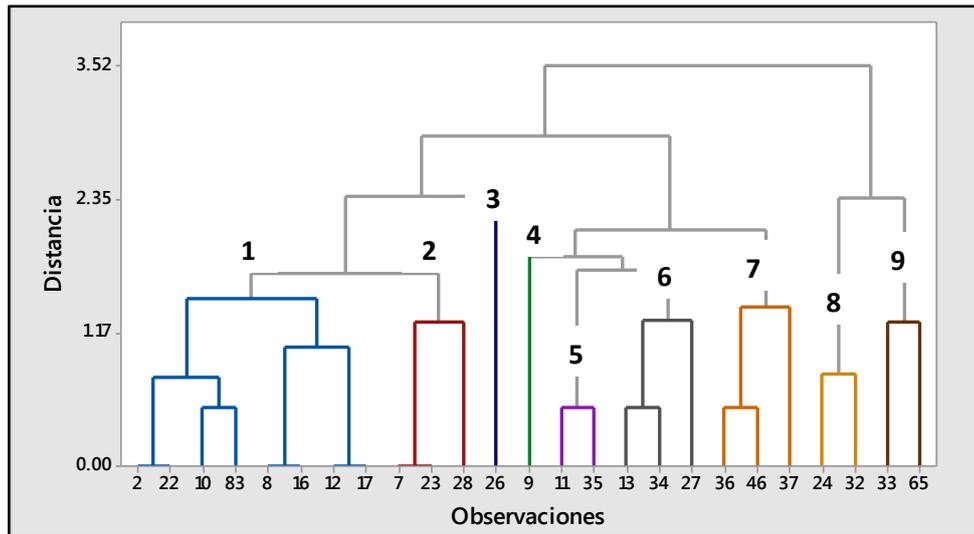


Figura 33: Dendrograma de ecotipos de la Región Ica tomando las variables de Color de fruto, Consistencia, sabor y Textura de pulpa, utilizando el método medición de distancia tipo Euclidiana y ligamiento por promedios (Minitab 17). Distancia de corte: 1.50

En la Figura 34 se puede observar que en la Región de Ica se puede encontrar ecotipos con frutos de Consistencia Semi suave, Seco y Suave, encontrándolos en la población a una proporción de 0.4, 0.32 y 0.28, respectivamente.

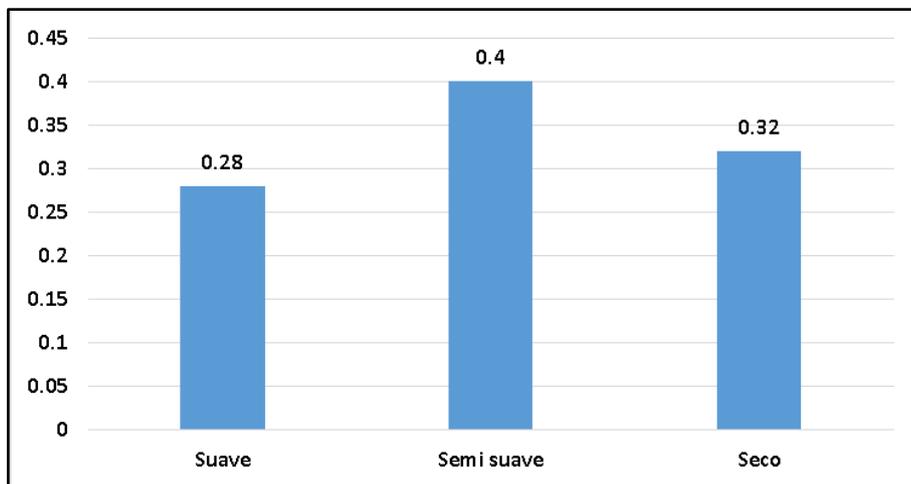


Figura 34: Proporción de ecotipos en la Región Ica de acuerdo al carácter Consistencia de fruto

En la Figura 35 se puede observar que en la provincia de Ica se puede encontrar ecotipos con frutos de Consistencia Suave, Semi suave y Seco, encontrándolos en la población a un porcentaje de 42.86%, 42.86% y 14.29%, respectivamente.

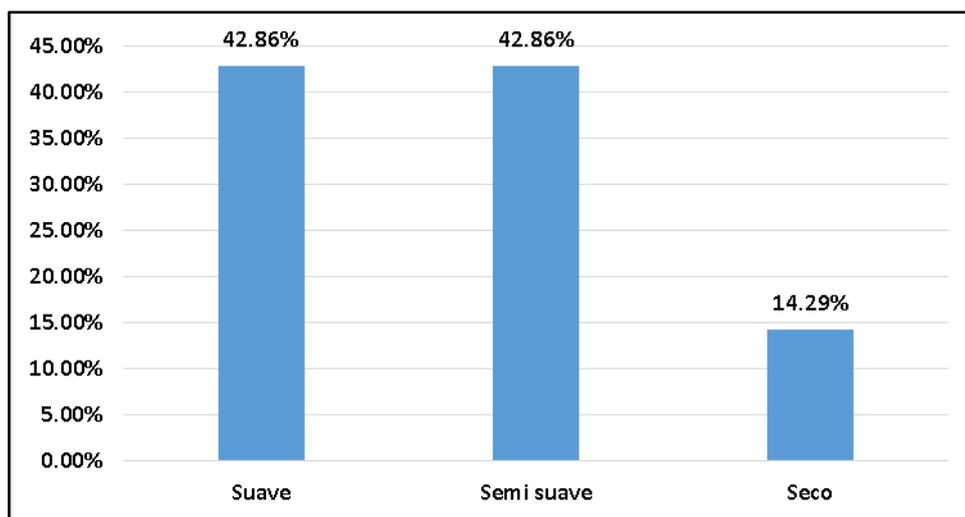


Figura 35: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica de acuerdo al carácter Consistencia de fruto.

En la Figura 36 se puede observar que en la provincia de Pisco se puede encontrar ecotipos con frutos de Consistencia Seco, Semi suave y Suave, encontrándolos en la población a un porcentaje de 54.55%, 36.36 y 9.09%, respectivamente

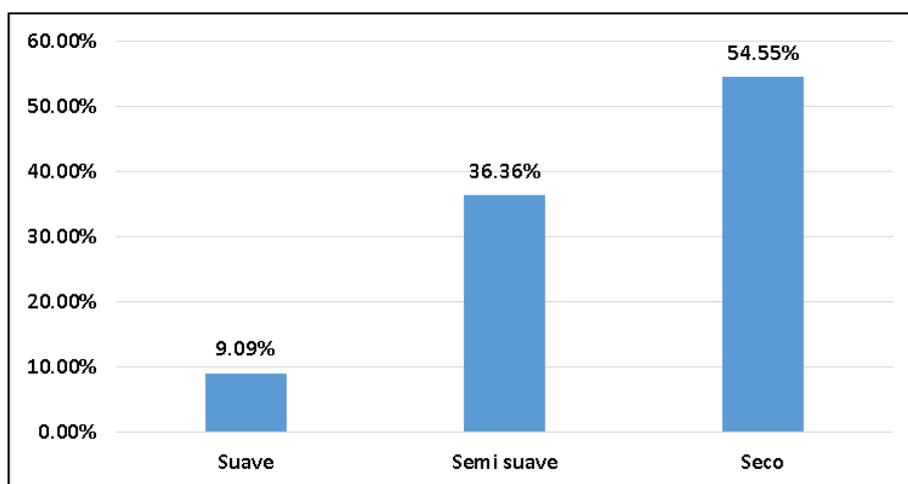


Figura 36: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco de acuerdo al carácter Consistencia de fruto.

. En la Figura 37 se puede observar que en la Región de Ica se puede encontrar ecotipos con frutos de Gusto y Sabor de pulpa otro (dulce), Insípido, Agrio y Fermentado, encontrándolos en la población a una proporción de 0.52, 0.16, 0.16, 0.16, respectivamente.

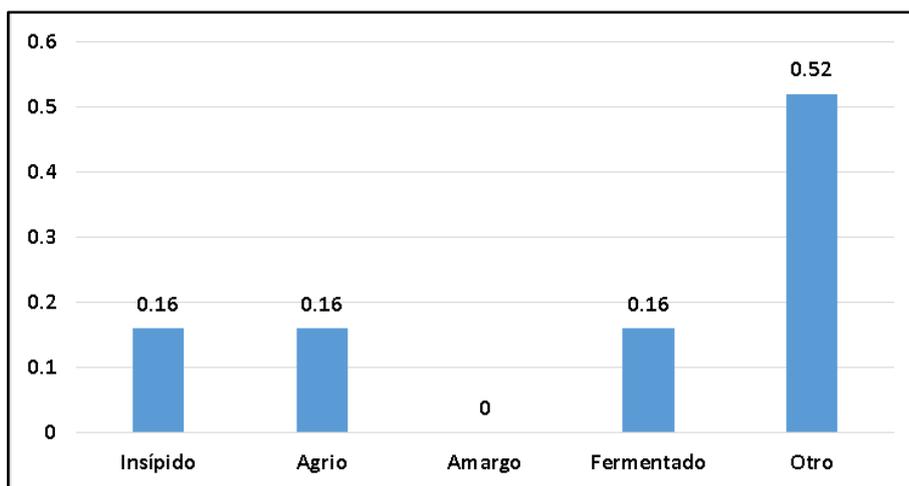


Figura 37: Proporción de ecotipos en la Región Ica de acuerdo al carácter de Gusto y Sabor de pulpa.

En la Figura 38 se puede observar que en la provincia de Ica se puede encontrar ecotipos con frutos de Gusto y Sabor de pulpa otro (dulce), Insípido y Agrio, encontrándolos en la población a un porcentaje de 71, 43%, 21,43 y 7.14%, respectivamente.

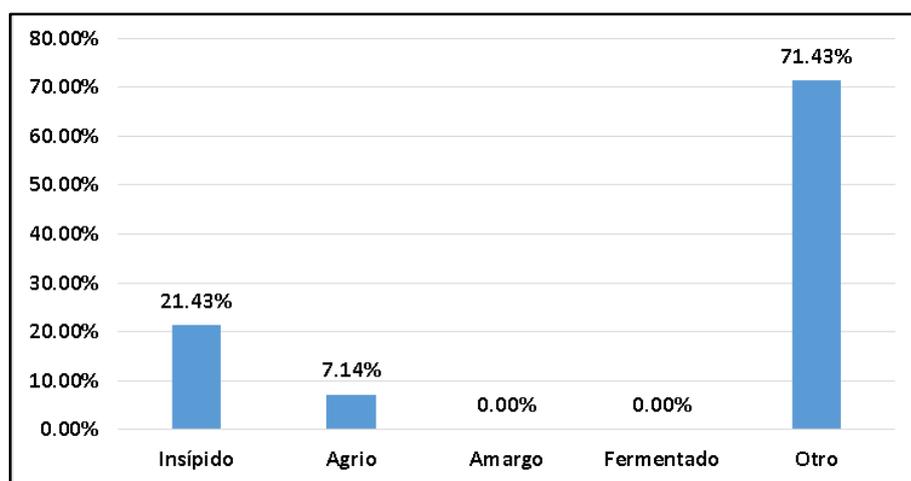


Figura 38: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica de acuerdo al carácter de Gusto y Sabor de pulpa.

En la Figura 39 se puede observar que en la provincia de Ica se puede encontrar ecotipos con frutos de Gusto y Sabor de pulpa Fermentado, Dulce (Otro), Agrio e Insípido, encontrándolos en la población a un porcentaje de 36.36%, 27.27%, 27.27% y 9.09%, respectivamente.

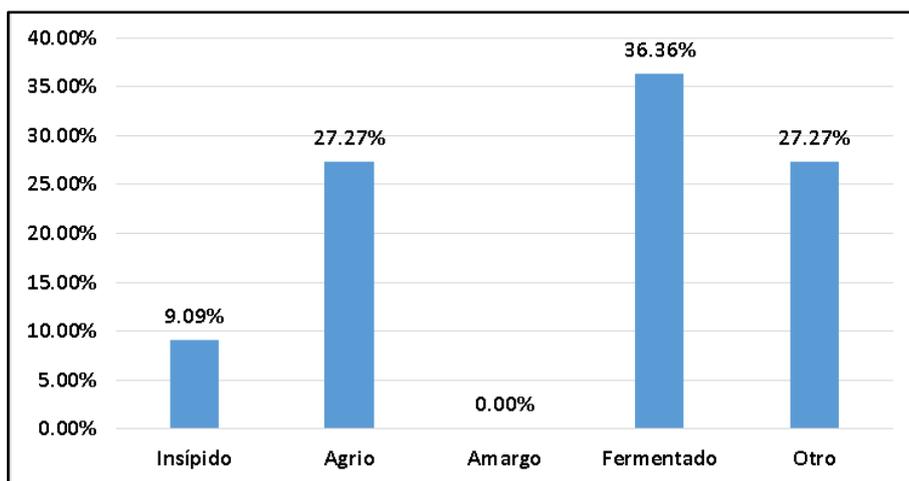


Figura 39: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco de acuerdo al carácter de Gusto y Sabor de pulpa.

En la Figura 40 se puede observar que en la Región de Ica se puede encontrar ecotipos con frutos de Textura de pulpa Fibrosa, Harinosa y Melosa, encontrándolos en la población a una proporción de 0.44, 0.4 y 0.16, respectivamente.

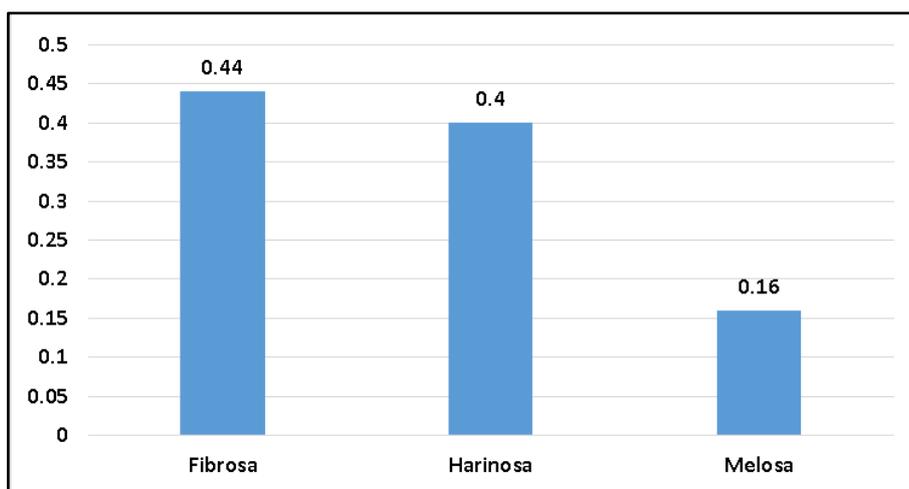


Figura 40: Proporción de ecotipos en la Región Ica de acuerdo al carácter de Textura de pulpa.

En la Figura 41 se puede observar que en la provincia de Ica se puede encontrar ecotipos con frutos de Textura de pulpa Harinosa, Fibrosa y Melosa, encontrándolos en la población a un porcentaje de 64.29%, 21.43% y 14.29%, respectivamente.

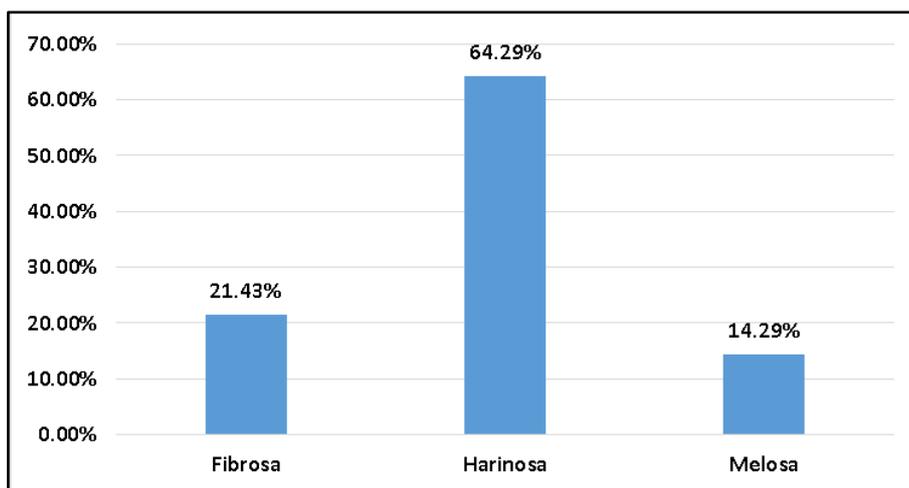


Figura 41: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica de acuerdo al carácter de Textura de pulpa.

En la Figura 42 se puede observar que en la provincia de Pisco se puede encontrar ecotipos con frutos de Textura de pulpa Fibrosa, Melosa y Harinosa, encontrándolos en la población a un porcentaje de 72.73%, 18.18% y 9.09%, respectivamente.

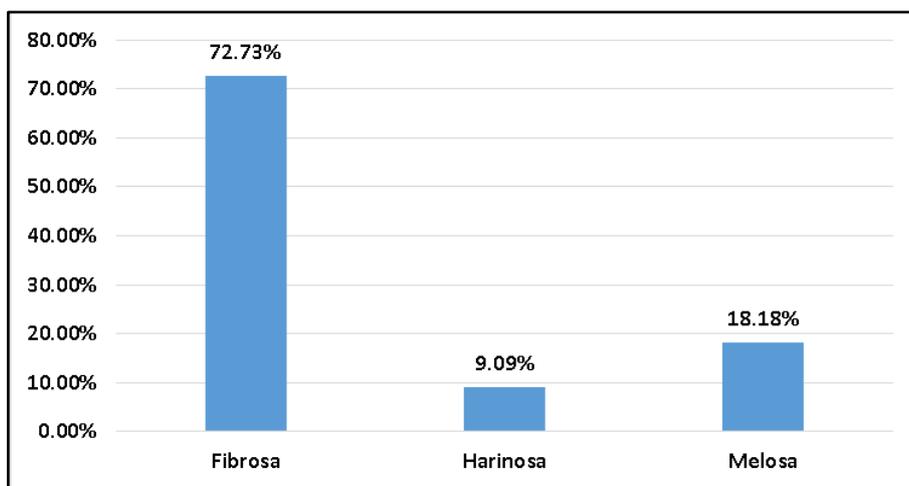


Figura 42: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco de acuerdo al carácter de Textura de pulpa.

En la Figura 43 se puede observar que en la Región de Ica se puede encontrar ecotipos con frutos de color Ámbar, Amarillo, Miel, Rojo, Marrón y Verdoso, encontrándolos en la población a una proporción de 0.4, 0.2, 0.2, 0.12, 0.04 y 0.04, respectivamente.

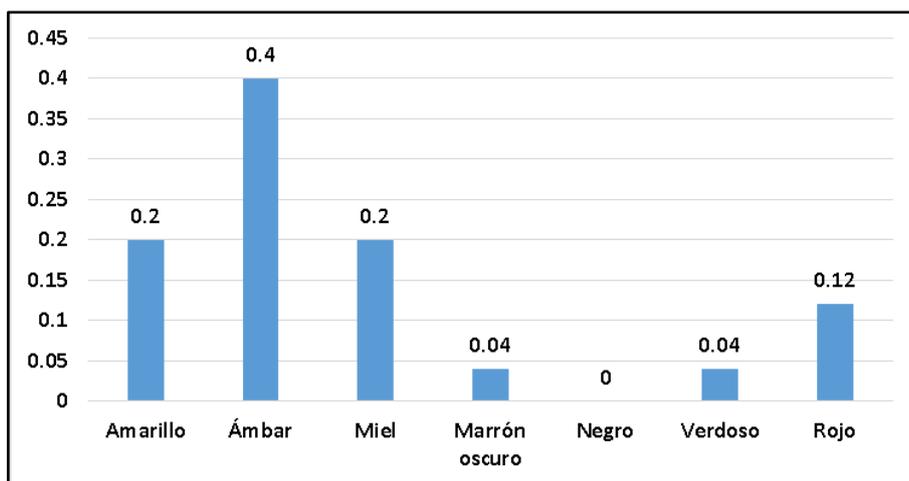


Figura 43: Proporción de ecotipos en la Región Ica de acuerdo al carácter de Color de fruto

En la Figura 44 se puede observar que en la provincia de Ica se puede encontrar ecotipos con frutos de color Amarillo, Ámbar, Miel y Rojo, encontrándolos en la población a un porcentaje de 35.71%, 28.57%, 21.43%, 7.14% y 7.14%, respectivamente.

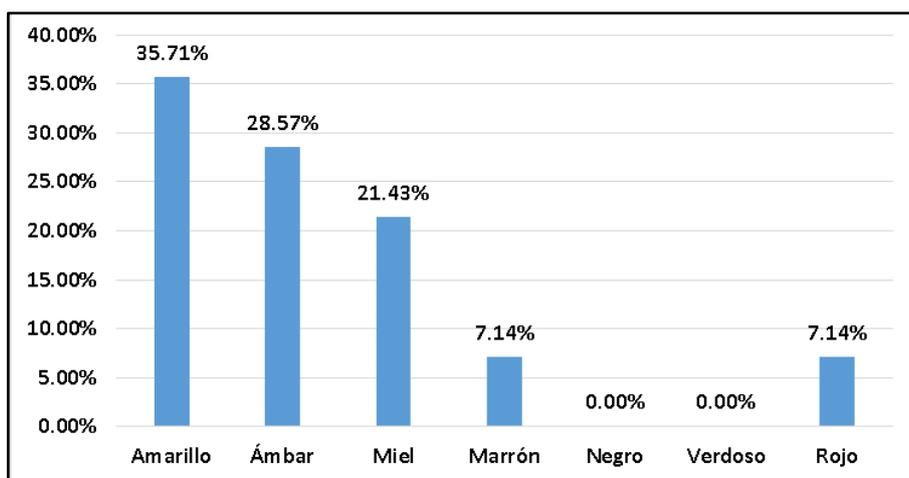


Figura 44: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Ica de acuerdo al carácter de Color de fruto

En la Figura 45 se puede observar que en la provincia de Pisco se puede encontrar ecotipos con frutos de color Ámbar, Miel, Rojo y Verdoso, encontrándolos en la población a un porcentaje de 54.55%, 18.18%, 18.18% y 9.09%, respectivamente.

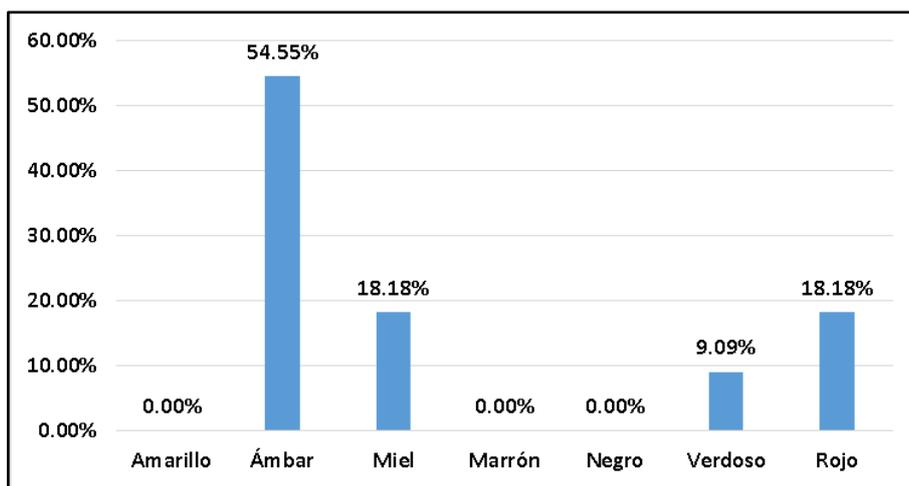


Figura 45: Porcentaje de ecotipos en la Provincia de Pisco de acuerdo al carácter de Color de fruto

Tabla 9: Caracteres morfológicos relacionados al rendimiento de las palmas datileras

ECOTIPO	N° RACIMOS	FRUTOS POR RACIMO	FRUTOS TOTALES	PESO 20 FRUTOS (GR)	PESO SEMILLA (GR)	RDT PLANTA (KG)	RELACIÓN P FRUTO / P SEMILLA
2	15	138	2070	394	25.86	40.78	15.24
7	12	1320	15840	173.4	30.94	137.33	5.60
8	15	980	14700	308.65	56.5	226.86	5.46
9	12	1110	13320	138.74	14.76	92.40	9.40
10	6	1680	10080	103.42	19.27	52.12	5.37
11	15	1260	18900	141.9	29.76	134.10	2.38
12	6	460	2760	122.23	25.32	16.87	4.83
13	20	567	11340	116.33	10.56	65.96	3.81
16	6	1508	9048	312.36	38.32	141.31	8.15
17	12	536	6432	338.36	21.24	108.82	10.83
22	5	1575	7875	240.56	27.72	94.72	4.34
23	5	576	2880	275.68	24.44	39.70	5.64
24	9	1920	17280	138.95	27.36	120.05	5.08
26	6	284	1704	178.63	14	15.22	12.76
27	4	806	3224	267.28	19.1	43.09	3.50
28	7	1080	7560	241.6	14.26	91.32	4.24
32	6	1225	7350	157.44	16.56	57.86	9.51
33	6	1440	8640	114.82	25.25	49.60	4.55
34	10	945	9450	209.62	22.8	99.05	9.19
35	6	480	2880	146.92	23.32	21.16	3.15
36	15	987	14805	152.41	38.27	112.82	3.98
37	7	1178	8246	115.48	22.36	47.61	5.16
46	15	1185	17775	122.36	19.06	108.75	6.42
65	10	684	6840	216.56	30.56	74.06	7.09
83	5	936	4680	169.01	23.64	39.55	7.15

En la Figura 46 se puede observar tres grupos, el grupo 1 consiste en individuos con una producción menor a 5,000 frutos por planta y con rendimientos menores a 45 kg por planta. El grupo 3 consiste en individuos con una producción mayor a 12,000 frutos por planta. El grupo 2 consiste en individuos con una producción de frutos mayor a 5,000 y menor a 12,000.

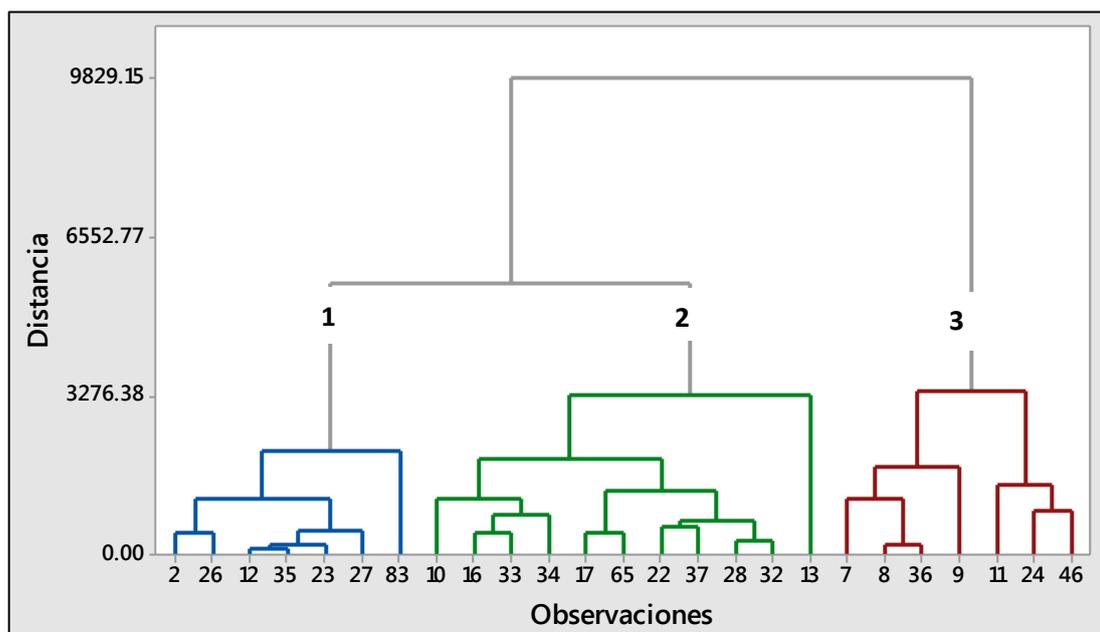


Figura 46: Dendrograma de ecotipos de la Región Ica tomando los caracteres relacionados al rendimiento, utilizando el método medición de distancia tipo Euclidiana y ligamiento por promedios (Minitab 17). Distancia de corte: 4000.0

4.2.1. Análisis de componentes principales

En la Figura 47 se observa que hasta el componente principal 6 tiene un valor propio cercano a 1 y explicaría el 83.4 % de la variabilidad observada, lo cual se puede corroborar en la Tabla 10.

Tabla 10: Análisis de los valores propios de la matriz de correlación de las 16 Componentes principales

Valor propio	3.9342	3.2129	2.2553	1.6898
Proporción	0.246	0.201	0.141	0.106
Acumulada	0.246	0.447	0.588	0.693
Valor propio	1.3403	0.9111	0.8146	0.5514
Proporción	0.084	0.057	0.051	0.034
Acumulada	0.777	0.834	0.885	0.919
Valor propio	0.4389	0.2943	0.2468	0.1562
Proporción	0.027	0.018	0.015	0.01
Acumulada	0.947	0.965	0.981	0.99
Valor propio	0.0921	0.0397	0.0154	0.0071
Proporción	0.006	0.002	0.001	0
Acumulada	0.996	0.999	1	1

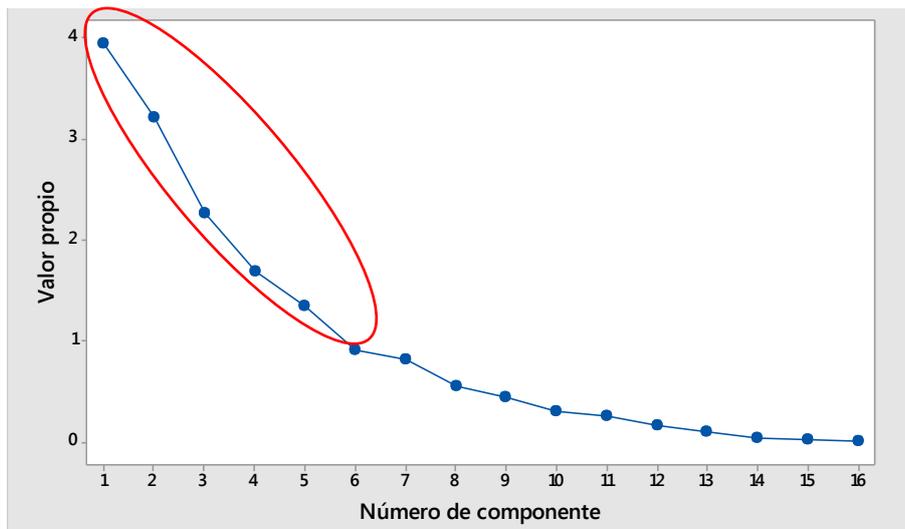


Figura 47: Gráfica de sedimentación de los 16 componentes principales

En la Figura 48 se observa que la forma y longitud del fruto están altamente correlacionado, y posiblemente están influenciados por la altitud (msnm); el rendimiento está correlacionado con número de racimos y peso de semillas y frutos totales; y la consistencia de la fruta está correlacionada negativamente con la textura de la pulpa. Además, se puede observar que los ecotipos están delimitados contrastantemente entre Ica y Pisco, derecho Ica e izquierdo Pisco. Los ecotipos 17 y 2 son los que presentaron mayor peso en 20 frutos y el 8 con mayor rendimiento. Esta figura indica que las variables de estudio seleccionadas explican el 45% de la variabilidad observada.

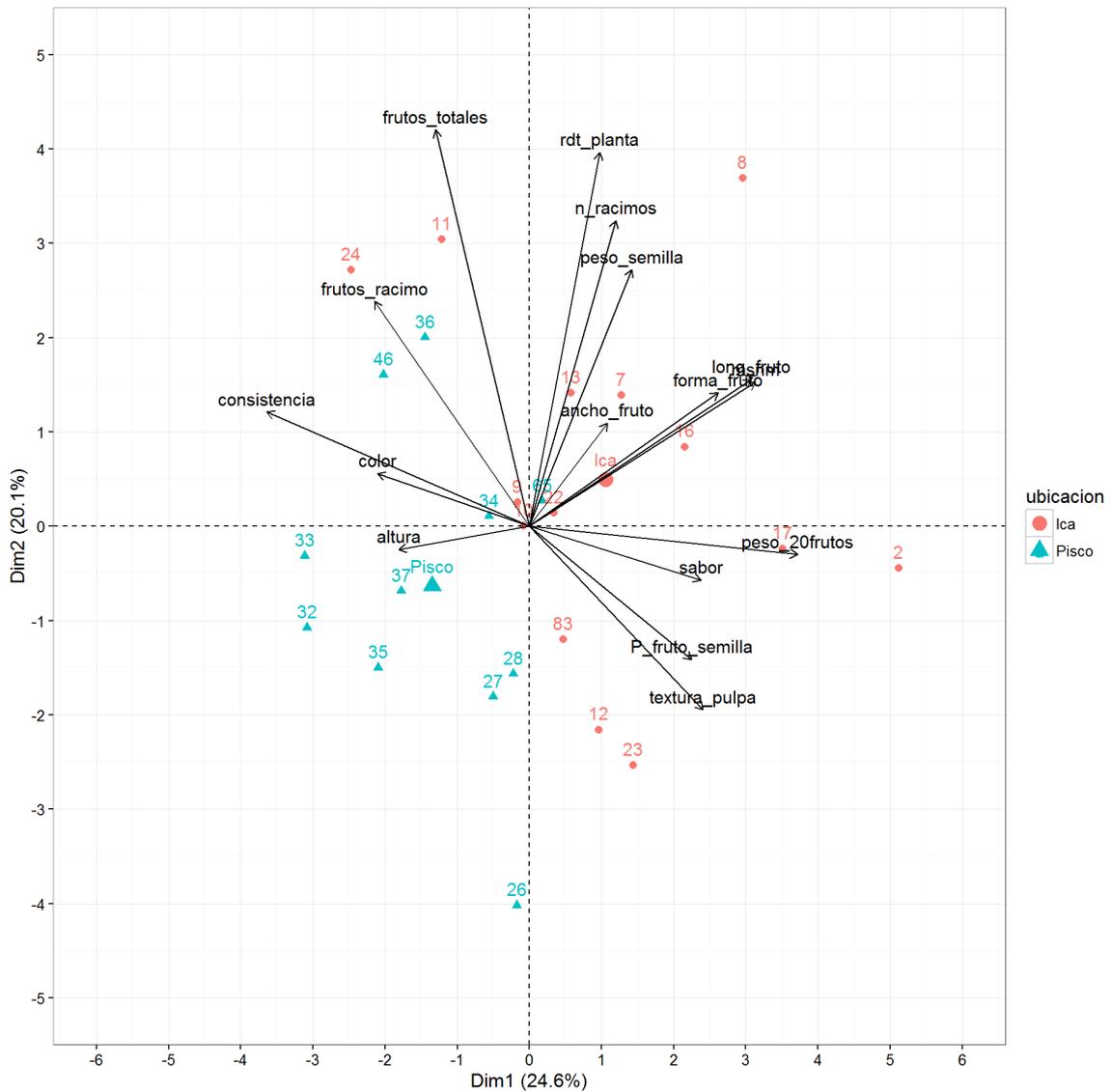


Figura 48: Biplot del Análisis de los componentes principales

En la Tabla 11 se muestra la contribución de las variables en los primeros 6 componentes principales.

El PC1 tiene la contribución de las variables “Peso de 20 frutos” y “consistencia de fruto”.

El PC2 tiene la contribución de las variables “Frutos totales” y “Rendimiento”. Este componente se basa en los caracteres de productividad.

El PC3 tiene la contribución de la variable “Forma de fruto”.

El PC4 y PC5 tienen la contribución de la variable “Ancho de fruto”.

El PC6 tiene la contribución de la variable “Altura de planta”.

Tabla 11: Vectores propios de la matriz de correlación de las 16 Componentes principales

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
Msnm	0.331	0.179	-0.03	0.348	-0.09	-0.29
Altura	-0.19	-0.03	0.296	-0.3	0.047	0.504
forma_fruto	0.277	0.166	0.409	0.078	-0.31	-0.09
long_fruto	0.326	0.182	0.333	-0.05	-0.29	-0.09
ancho_fruto	0.115	0.128	-0.08	-0.5	0.4	-0.37
n_racimos	0.127	0.379	0.298	0.03	0.362	-0.02
frutos_racimo	-0.23	0.279	-0.31	0.079	-0.26	-0.18
frutos_totales	-0.14	0.492	-0.1	0.106	0.221	-0.08
peso_20frutos	0.394	-0.04	-0.02	-0.23	-0.13	0.264
peso_semilla	0.15	0.319	-0.27	-0.26	-0.13	0.357
rdt_planta	0.103	0.464	-0.21	-0.05	0.112	0.27
P_fruto_semilla	0.238	-0.17	0.176	-0.33	0.251	-0.26
Consistencia	-0.39	0.142	0.212	-0.08	-0.09	-0.2
Sabor	0.252	-0.07	-0.33	-0.19	-0.3	-0.08
textura_pulpa	0.254	-0.23	-0.36	0.109	0.254	-0.04
Color	-0.22	0.065	-0.07	-0.49	-0.35	-0.3

El análisis de componentes principales (PCA) se utilizó para revelar las diferencias generales entre genotipos como valores numéricos, que indican los rasgos que podrían utilizarse para diferenciar los genotipos (Balkaya *et al.*, 2010). En este estudio se utilizó un PCA en poblaciones de palmas datileras que consideraron características del fruto que incluían 5 caracteres cualitativos (forma de fruto, color de fruto, sabor, consistencia y textura de la pulpa) y 5 caracteres cuantitativos (longitud, ancho, peso de 20 frutos, peso de semillas y relación entre peso de frutos/semilla), además se consideró 4 caracteres de rendimiento (número de racimos, número de frutos por racimo, frutos totales y rendimiento) y 1 carácter de ubicación (msnm) y 1 carácter de planta (altura); los ejes de este análisis representaron el 83.4 % de la variación total multivariante entre los ecotipos detallados de palma datilera (Tabla 11). El primer eje representó el 24.6% de la variación, mientras el segundo eje representó el 20.1% dando un total de 44.7% de la variación, lo que sugiere una considerable diversidad entre los caracteres de fruto. En este estudio, los rasgos con altos coeficientes en el primero y segundo componentes principales se deben considerar más importantes ya que estos ejes explican la mayor parte de la variación total.

En la Tabla 12 se observa la transformación hecha en los valores de las variables originales con los valores de la matriz de correlación, generando nuevos valores para cada componente y ecotipo.

Tabla 12: Caracterización de ecotipos mediante el uso de Componentes Principales

ECOTIPO	PRN1	PRN2	PRN3	PRN4	PRN5	PRN6
2	5.0146831	-0.430724	3.0252705	-1.501182	-0.369727	-1.217349
7	1.2485789	1.365084	-2.211206	0.3241674	1.3813745	-0.121175
8	2.8966475	3.6186715	-1.836889	-1.224348	0.304256	1.5640465
9	-0.160362	0.2545681	0.2877833	2.2005517	1.5088224	-0.938546
10	-0.080002	0.006691	-0.853999	1.657613	-1.520862	-1.610113
11	-1.192145	2.9844609	0.453632	2.3369684	0.5566762	0.2086482
12	0.9399297	-2.10961	-0.766779	1.752878	-0.329716	-0.108252
13	0.5631736	1.3879559	4.027328	2.017659	0.0425868	0.1398497
16	2.1047459	0.830006	-1.64188	0.0489585	-1.50532	0.6431125
17	3.4322751	-0.231961	0.4999626	-0.48354	0.7230513	-0.259105
22	0.324829	0.1422889	-0.567635	0.436375	-1.628333	1.0120622
23	1.4030764	-2.481895	-1.045319	0.4612663	-0.303101	1.0987446
24	-2.428746	2.6670322	-0.192919	-0.85552	-0.363608	-1.420964
26	-0.173838	-3.937267	-0.132414	-1.210344	2.9988141	0.2936569
27	-0.493692	-1.769094	-0.229615	0.6168155	-1.153685	0.4630825
28	-0.21936	-1.532007	-1.852659	1.0708263	0.2227544	0.18105
32	-3.023565	-1.052775	0.9280727	-1.170289	-0.344934	0.1495548
33	-3.04935	-0.306909	-0.397571	-1.304204	-1.742223	0.0793659
34	-0.551675	0.1067258	1.9041994	-0.417148	0.1077597	1.5309981
35	-2.053277	-1.468003	1.9799246	0.4769142	-0.424033	1.2716385
36	-1.418863	1.9620924	-0.277789	-0.976927	1.2161876	0.8137156
37	-1.739709	-0.671351	-0.67068	-0.644083	0.5487632	-0.722813
46	-1.980028	1.5761729	0.0810134	-0.751054	1.5477674	-0.631284
65	0.1758573	0.2637326	0.6821346	-2.57973	-1.169204	-0.573802
83	0.4608154	-1.173886	-1.191967	-0.282623	-0.304068	-1.846124

En la Figura 49 se conglomeró en 10 grupos y se describió tomando como referencia los valores observados en las Tabla 6, Tabla 7, Tabla 8 y Tabla 9 siendo el Grupo 1 conformado por ecotipos con peso de fruto mayor a 330 gramos, ancho de fruto grande, sabor dulce (otro) y textura de pulpa harinosa. El Grupo 2 corresponde aquellos ecotipos que tienen frutos de longitud corta y ancho grande. El Grupo 3 corresponde aquellos ecotipos con frutos de textura de pulpa harinosa. El Grupo 4 corresponde a ecotipos con frutos de ancho medio. El Grupo 5 corresponde a ecotipos con frutos de textura de pulpa fibrosa. El Grupo 6

corresponde a frutos de color ámbar, con forma subcilíndrica, ancho medio y textura de pulpa fibrosa. El Grupo 7 corresponde a frutos cortos con ancho medio y sabor de pulpa insípido. El Grupo 8 corresponde a frutos amarillos, de forma curva, grandes, de consistencia semisuave, textura de pulpa fibrosa y sabor agrio. El Grupo 9 corresponde a frutos color miel, ancho grande, consistencia suave, sabor de pulpa dulce (otro) y textura harinosa. El Grupo 10 corresponde a frutos de color ámbar, de forma esférica, muy corto, ancho grande, consistencia suave, sabor de pulpa agrio y textura melosa.

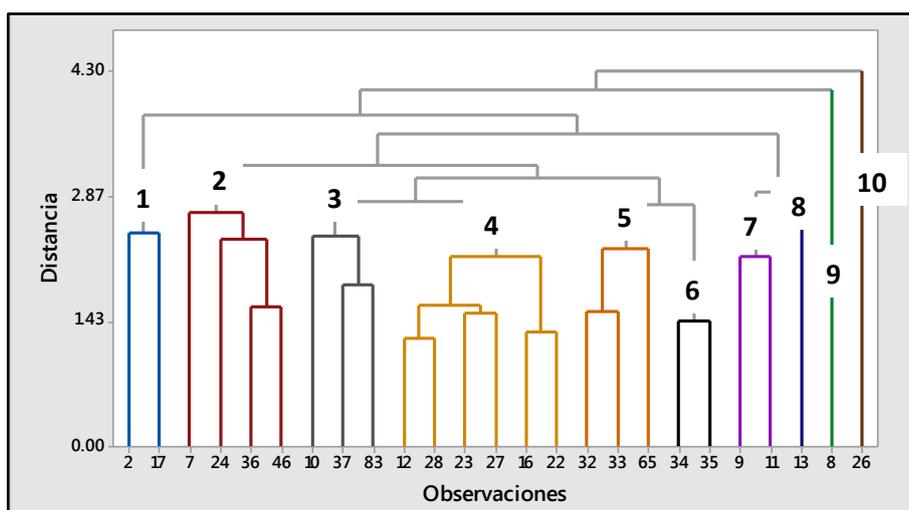


Figura 49: Dendrograma de ecotipos de la Región Ica considerando los valores de los componentes principales seleccionados, utilizando el método medición de distancia tipo Euclidiana y ligamiento por promedios (Minitab 17). Distancia de corte: 2.87

De acuerdo a las exigencias del mercado, para fruto fresco se consideraron los ecotipos con frutos de longitud media a muy grande (de 4 cm a más) con ancho medio a muy ancho (de 2.5 cm a más), con un peso promedio mayor a 300 gramos, con una consistencia de semisuave a suave, con sabor otro (dulce), con una textura de pulpa harinosa (Tabla 13), según Markhand *et al.* (2010), estos ecotipos poseen frutos de tamaño mediano a grande. Esta tabla también muestra los ecotipos candidatos para su micropropagación. El estado de desarrollo de los frutos durante la evaluación fue el Rutab, donde ya presentaban dulzor en su pulpa, característica muy importante en variedades comerciales de calidad superior.

Tabla 13: Ecotipos superiores de acuerdo a su calidad de fruto.

ECOTIPO	LONG. FRUTO	ANCHO FRUTO	COLOR	CONSISTENCIA	SABOR	TEXTURA PULPA	PESO 20 FRUTOS	PESO SEMILLA	PESO FRUTO/SEMILLA
2	Muy grande	Grande	Ámbar	Semi suave	Dulce	Harinosa	394	25.86	15.24
8	Medio	Grande	Miel	Suave	Dulce	Harinosa	308.65	56.5	5.46
17	Medio	Grande	Amarillo	Suave	Dulce	Harinosa	338.36	21.24	15.93

4.3. Protocolo de formación de callo embriogénico

4.3.1. Desinfección

En la Figura 50 se muestra la eficiencia de dos protocolos de desinfección, mostrando alta eficiencia (92%) esto puede ser debido al uso de fungicida y lejía Clorox (4% hipoclorito de sodio) en la parte inicial de la desinfección.

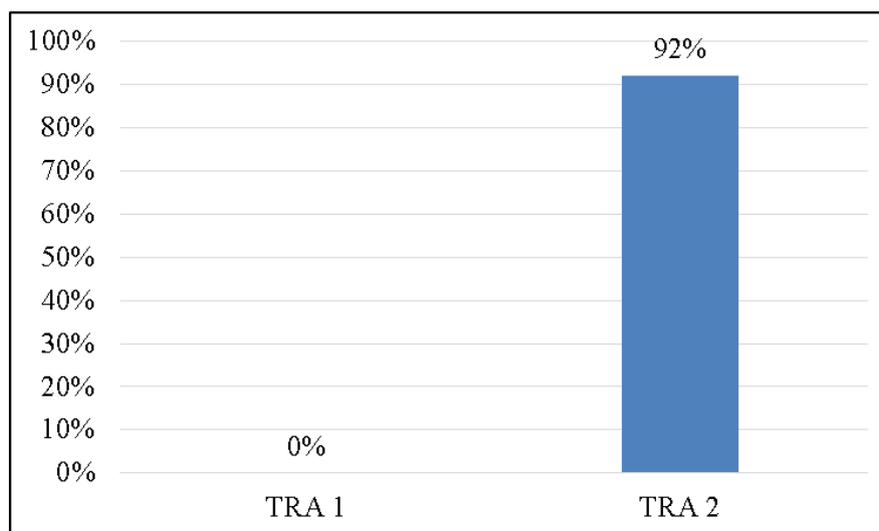


Figura 50: Porcentaje de éxito en la desinfección

En la Figura 50 se observa que la desinfección fuera de cámara, fue muy importante, resultando esencial el uso de lejía y pesticidas antes del ingreso del explante a cámara de flujo laminar, resultando en nuestro caso el Tratamiento 2 el mejor, para el Tratamiento 1 se tomó como referencia a Al-Khayri (2010), Kurup (2010), no resultando efectivo.

4.3.2. Inducción de callos

En la Tabla 14 , se observa el análisis de varianza del porcentaje de explantes inducidos a callogénesis después de haber transformado los datos ya que inicialmente se obtenía un Coeficiente de Variabilidad de 85% siendo muy alto, disminuyó a 11.94%. El ANVA no mostró diferencias significativas ($\alpha=0.05$), respecto a los tratamientos utilizados para la inducción de callo.

Tabla 14: Análisis de varianza del porcentaje de explantes con callos a las seis semanas de siembra con transformación $\sqrt{(X+1)}$.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRA	2	0.0520548	0.0260274	1.34	0.3305 (ns)
Error	6	0.1166304	0.0194384		
Total	8	0.1686852			

Coefficiente de Variabilidad= 11.94%

Se observa en las Figura 51 y Figura 52 que el medio de inducción I2 fue el que mejor respuesta se tuvo en la Inducción de callo, tanto para distintos genotipos como en su respuesta general al comparar medios de inducción, respectivamente, concordando con los resultados obtenidos por Kurup *et al.* (2014).

En la Figura 51 se puede observar que cada genotipo responde mejor a un medio de inducción siendo para el genotipo 16 el mejor medio de inducción el I1, para el genotipo 17 el I3 y para el genotipo 83 el I2. Pero es en el medio I2 donde se obtuvo respuesta en todos los genotipos introducidos, aunque no existan diferencias significativas en la respuesta a la inducción en los tres medios comparados (Figura 52).

Además se puede observar que la calidad de callo formado es consistente y no friable en el medio I2 (Figura 54) e I3 (Figura 55) que en el medio de inducción I1 (Figura 53) ya que se observa una consistencia muy friable (no embriogénica).

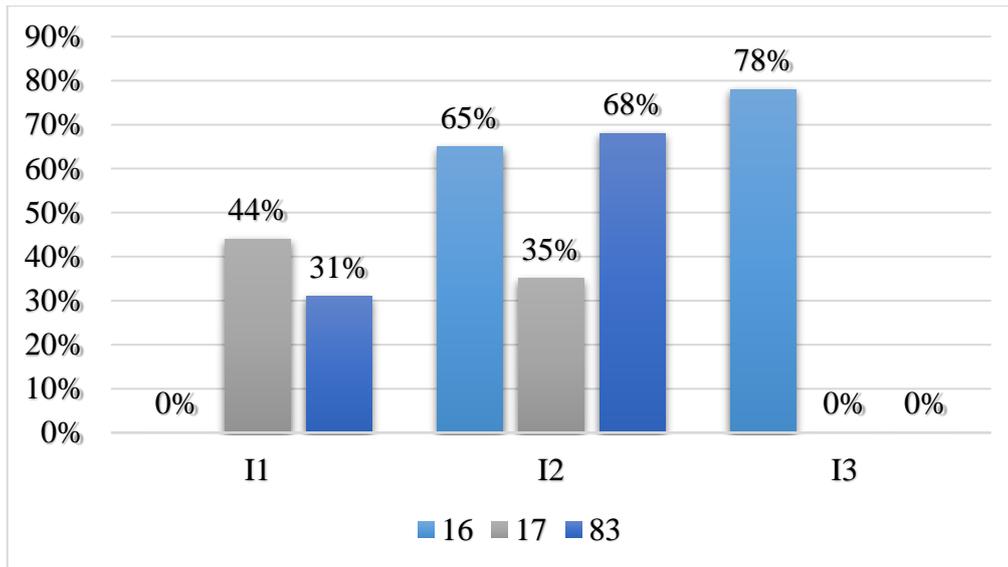


Figura 51: Influencia del genotipo-medio de cultivo en la Inducción de callo

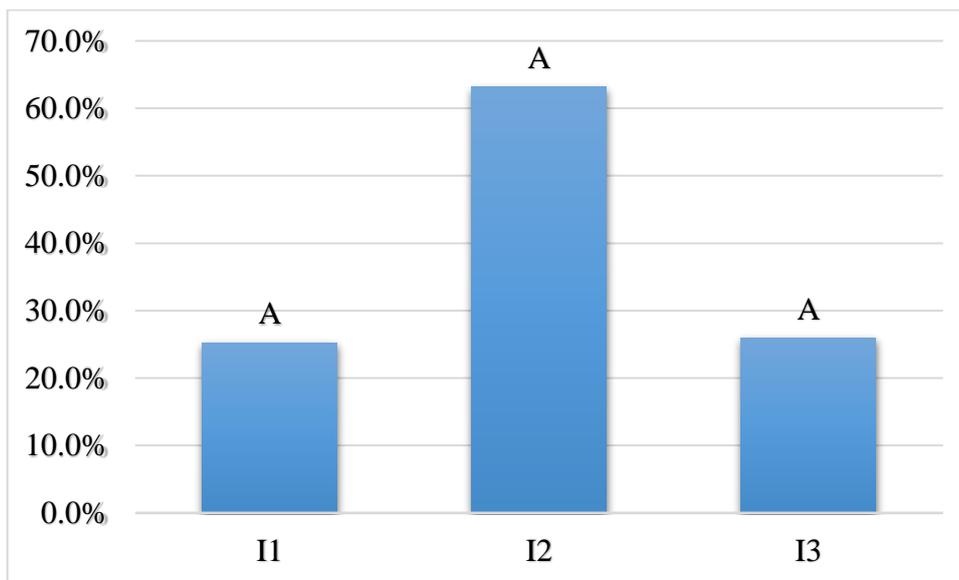


Figura 52: Comparación en la respuesta de Inducción de callo en tres medios diferentes (Tukey $\alpha=0.05$)

La Inducción de callo en los explantes sembrados, se logró un mayor porcentaje de inducción en aquellos sembrados en medio MS suplementado con altas concentraciones de 2,4-D (100mg/L) con ausencia de citoquininas (BAP, 2iP), pero con la adición de carbón activado (3 g/L) que deja de 2 – 4 mg/L de 2,4-D en acción. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Kurup *et al.* (2014) logrando una inducción rápida a la callogénesis a altas concentraciones de 2,4-D.

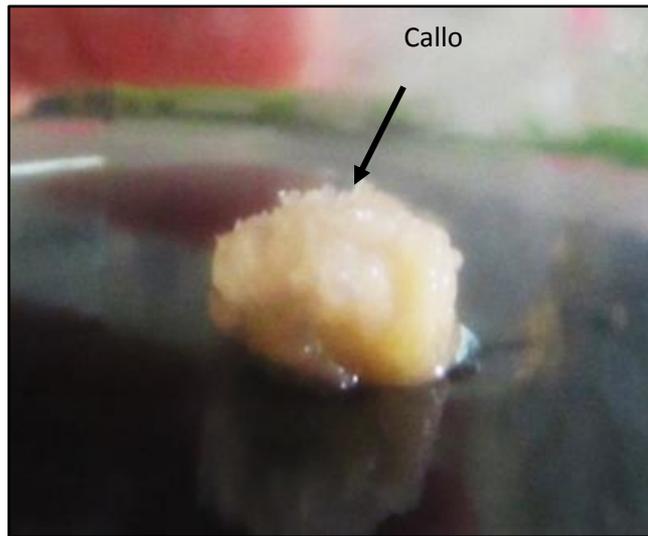


Figura 53: Callo formado en el medio de inducción I1

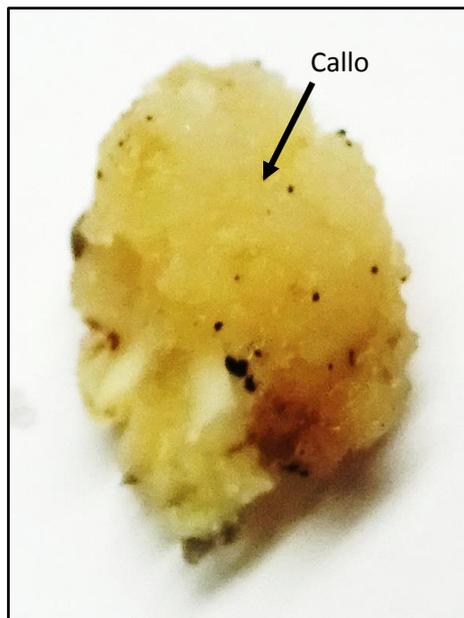


Figura 54: Callo formado en el medio de inducción I2

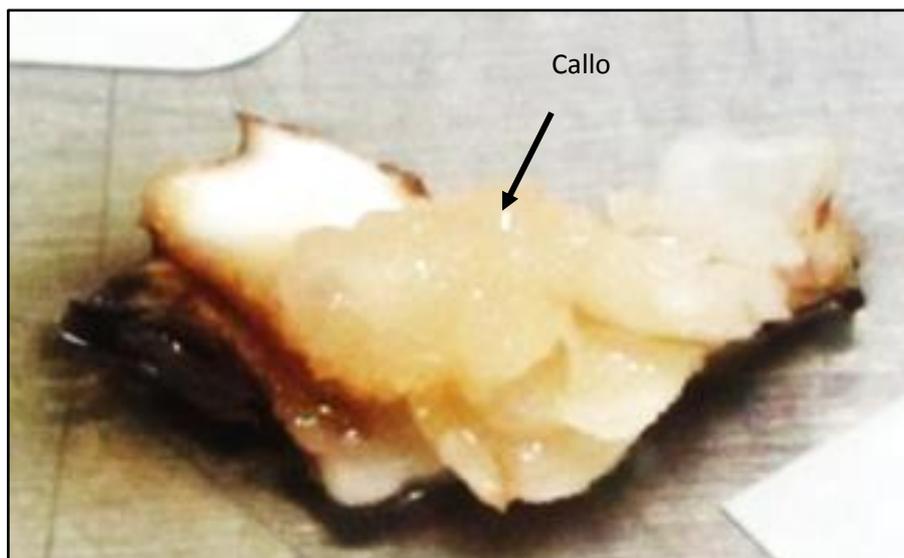


Figura 55: Callo formado en el medio de inducción I3

4.3.3. Proliferación de callo

En la

Tabla 15, se observa el análisis de varianza de los resultados obtenidos del crecimiento de callo en la etapa de Proliferación de callo en los tres tratamientos después de haber transformado los datos, ya que inicialmente se obtenía un Coeficiente de Variabilidad de 30.81% se disminuyó a 12.41%. El ANVA no mostró diferencias significativas ($\alpha=0.05$), respecto a los tratamientos utilizados para la proliferación de callo.

Tabla 15: Análisis de varianza del crecimiento de callo en la etapa de Proliferación de callo con transformación $\sqrt{(X+1)}$.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Trat	2	0.5140054	0.2570027	4.4	0.0666 (ns)
Error	6	0.3503031	0.0583839		
Total	8	0.8643086			

Coeficiente de variabilidad= 12.41%

Se observa en la Figura 56 y Figura 57 que no hubo diferencias significativas en la respuesta de proliferación de callo en los tres tratamientos probados, aunque se obtuvo mayor cantidad de masa callosa con el medio de proliferación P2, obteniendo al finalizar esta etapa (6 semanas) una masa de callo 4 veces el tamaño inicial. Cabe resaltar que los callos en P2 contaban con buenas características morfológicas como se observa en la Figura 59, es un tejido de mucha mayor consistencia que el callo proliferado en medios de proliferación P1 (Figura 58) o del P3 (Figura 60).

En la Tabla 16, se observa el análisis de varianza del porcentaje de explantes muertos en la etapa de Proliferación de callo en los tres tratamientos, el Coeficiente de Variabilidad fue 83.69%, disminuyó a 11.27%. El ANVA no mostró diferencias significativas ($\alpha=0.05$), respecto a los tratamientos utilizados para la proliferación de callo.

Tabla 16: Análisis de varianza del porcentaje de explantes muertos en la etapa de Proliferación de callo con transformación $\sqrt{(X+1)}$.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRA	2	0.1082821	0.054141	3.17	0.0498 (*)
Error	27	0.4604366	0.0170532		
Total	29	0.5687187			

Coeficiente de variabilidad= 11.27%

En la Figura 61 se puede observar el porcentaje de muertes de callo en los tres medios probados, siendo significativamente mejor en el medio de proliferación P2. Esta muerte se observó con la fenolización del callo (Figura 62) causada por la falta de antioxidantes o capturadores de fenoles en el medio, y con el pasmamiento del callo (Figura 63) que es el resultado de un callo no embriogénico.

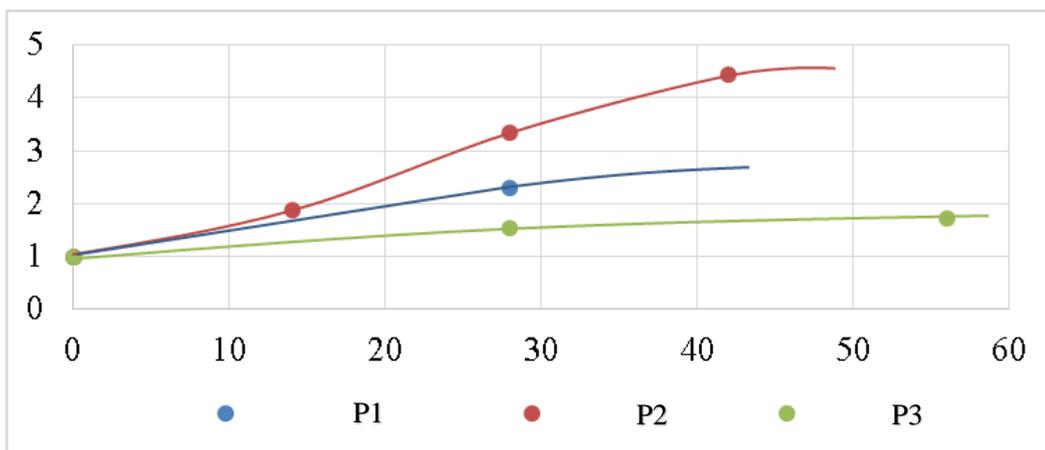


Figura 56: Curva de crecimiento de callo

Según Sané *et al.* (2011) la actividad morfogénica es caracterizada por la proliferación del callo granular compacto en explantes foliares después de 4 semanas de cultivo en medios suplementados con 2,4-D de 2 a 3 mm de diámetro, estos callos desarrollaron y lograron tamaños de 6-7 mm después de 8 semanas de cultivo. Es decir aumentó su tamaño en relación de 1:3 o 1:4, concordando con los resultados obtenidos en el experimento de proliferación de callo P2 (MS + Caseína hidrolizada + Carbón).

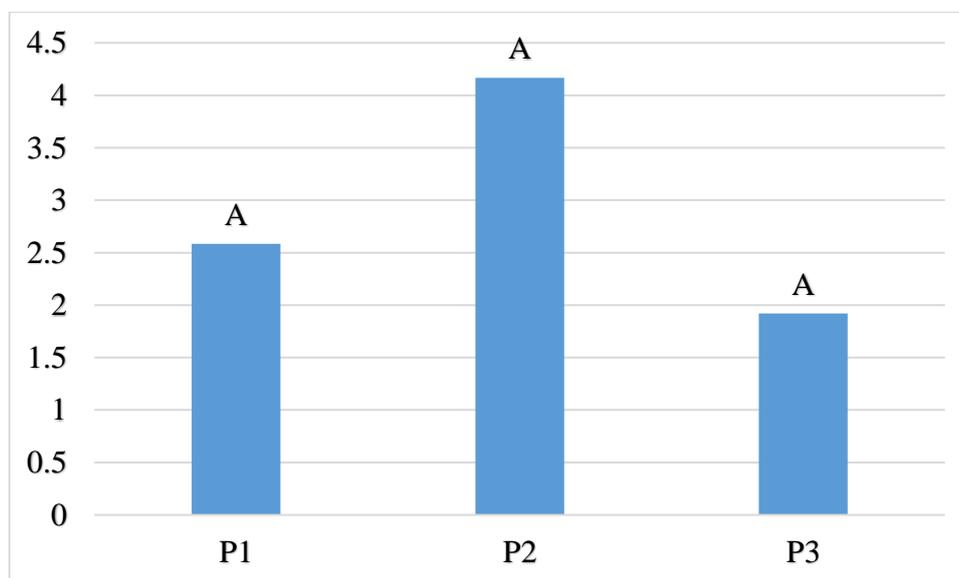


Figura 57: Comparación en la respuesta de proliferación de callo en tres medios diferentes (Tukey $\alpha=0.05$)

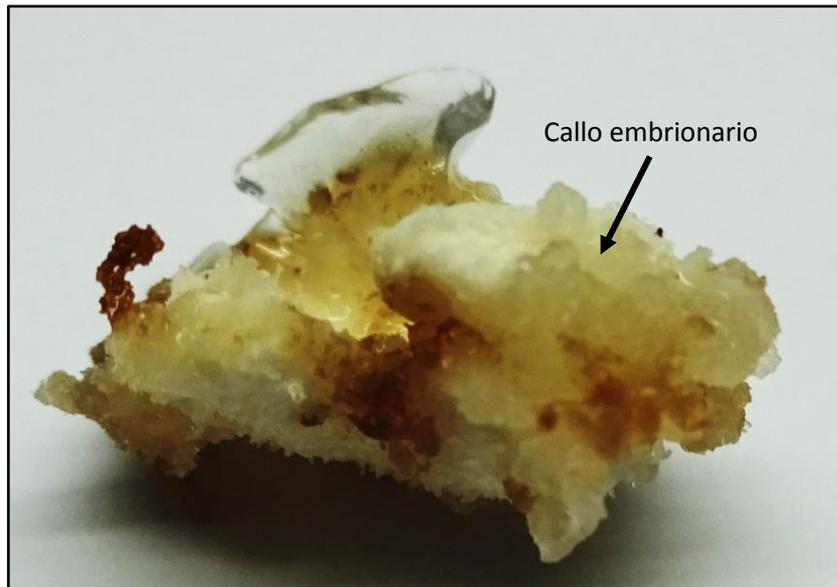


Figura 58: Callo formado en el medio de proliferación P1

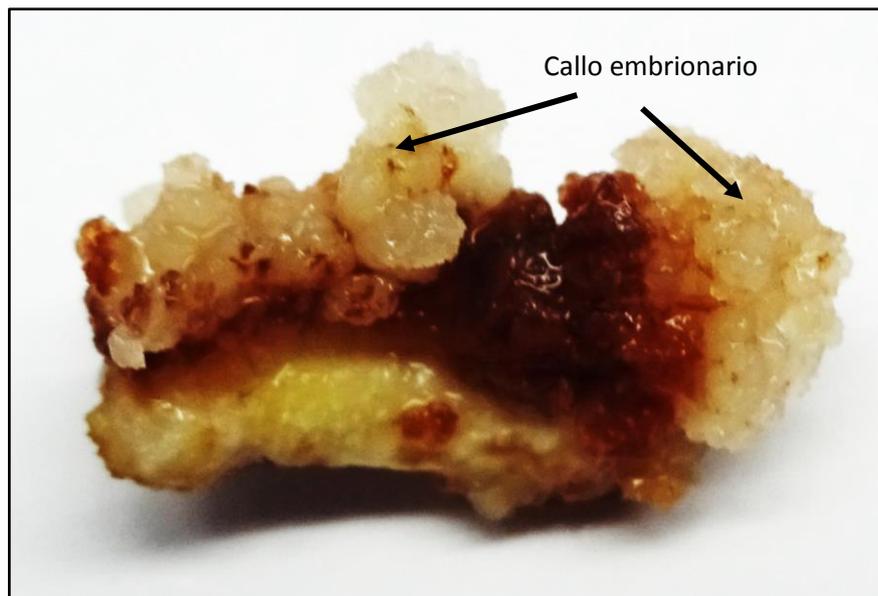


Figura 59: Callo formado en el medio de proliferación P2

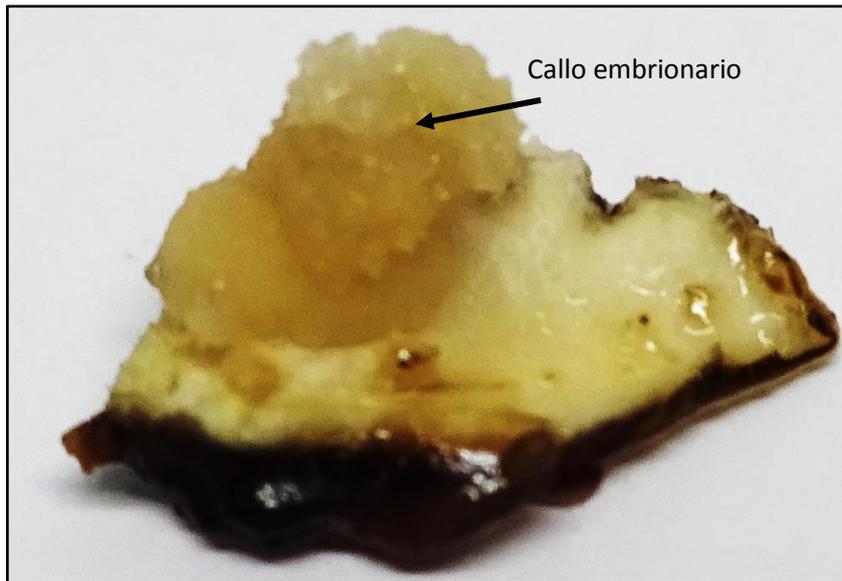


Figura 60: Callo formado en el medio de proliferación P3

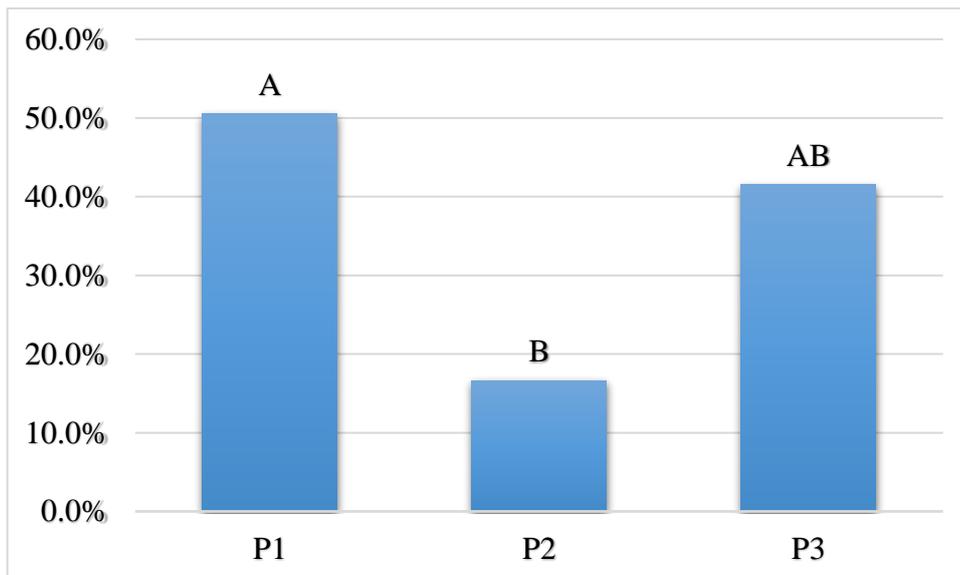


Figura 61: Porcentaje de explantes muertos en los tres medios de proliferación de callo
(Tukey $\alpha=0.05$)

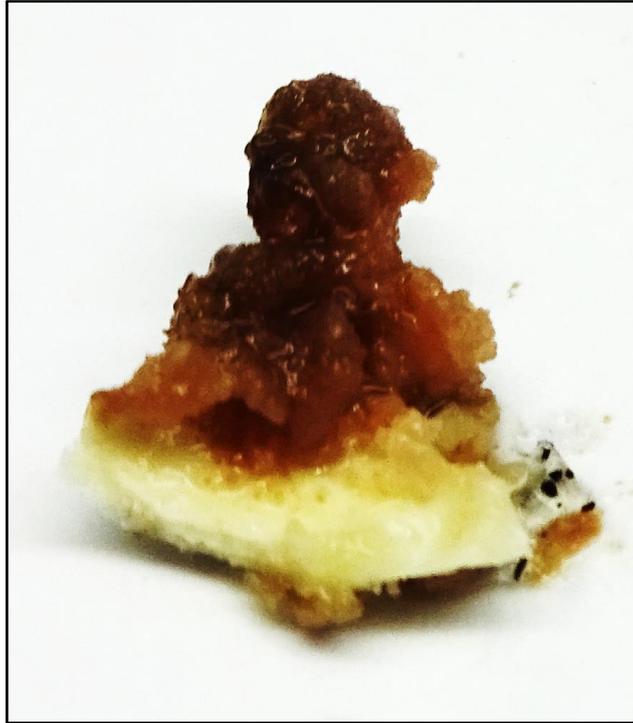


Figura 62: Callo fenolizado



Figura 63: Callo pasmado

Se logró una mejor calidad de callo (compacto y globular) en un medio libre de hormonas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Kurup, *et al.*, 2014 y Eke *et al.*, 2005. Esto puede ser debido a que el medio libre de hormonas anula el efecto residual del 2,4-D en el tejido calloso. La adición de caseína hidrolizada al medio, mejoró el crecimiento y desarrollo del callo, reduciendo el porcentaje de muerte por vitrificación, fenolización o pasmado del explante/callos, lo cual también fue observado por Al Khayri (2011), Khierallah and Husein (2013).

4.3.4. Callo embriogénico

Los callos resultantes de los medios de proliferación, se transfirieron a los medios embriogénesis somática, algunos callos no soportaron el cambio de condiciones y se pasmaron en su desarrollo, teniendo un menor porcentaje de sobrevivencia (47.9%) el medio para el desarrollo de callo embriogénico C1. En la Figura 63 se observa que los callos se adaptaron mejor en el medio C3 (76.1%) seguido por el C2 con un 68.6% de sobrevivencia.

En la Tabla 17, se observa el análisis de varianza del porcentaje callos que desarrollaron embriones en la etapa de desarrollo de embriones somáticos en los tres tratamientos, inicialmente se obtenía un Coeficiente de Variabilidad de 47% siendo muy alto para una investigación. Después de la transformación el Coeficiente de Variabilidad disminuyó a 9.43%. El ANVA no mostró diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la respuesta de callo en los tres medios utilizados (Figura 64).

Tabla 17: análisis de varianza del porcentaje callos que desarrollaron embriones en la etapa de Callo embriogénico con transformación $\sqrt{(X+1)}$.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRA	2	0.04279212	0.02139606	1.48	0.2544 (n.s.)
Error	18	0.26052528	0.01447363		
Total	20	0.3033174			

Coeficiente de variabilidad= 9.43%

Durante las transferencias se puede observar el cambio morfológico que ocurre en el tejido calloso inicial (Figura 65), las células empiezan a diferenciarse formando primero en embrión globular (Figura 66), después en corazón y torpedo (Figura 67)

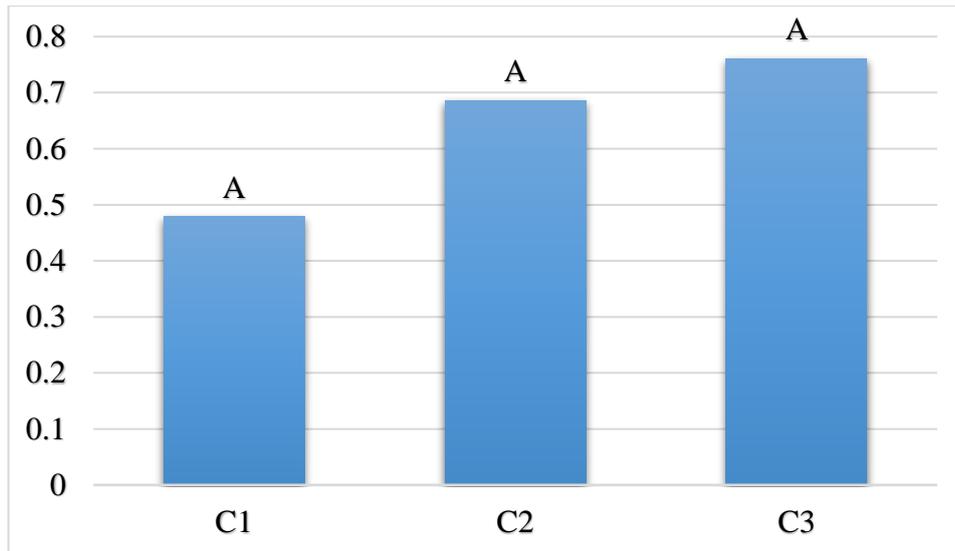


Figura 64: Porcentaje de callos que formaron embriones (Tukey $\alpha=0.05$)

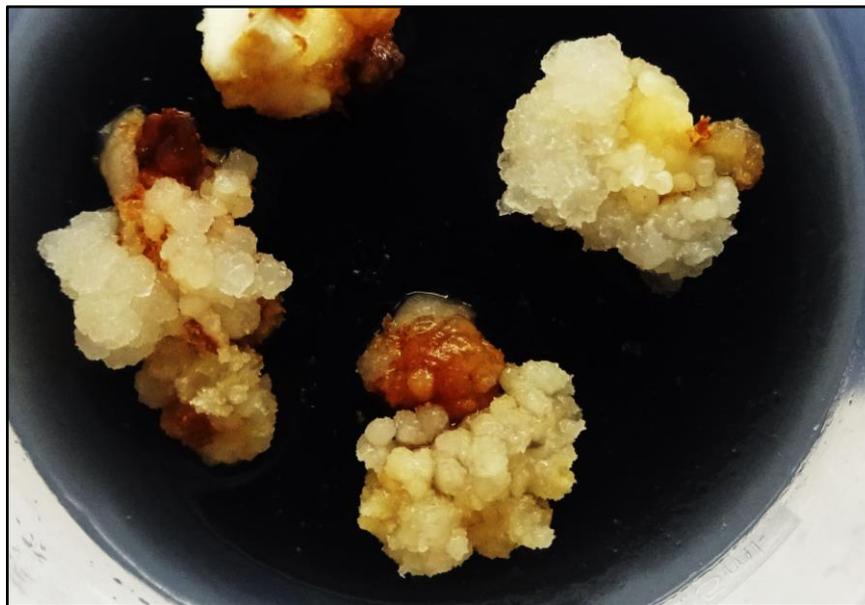


Figura 65: Callos en medio de proliferación P2 que se utilizaron para los tratamientos en los medios de CE



Figura 66: Callo embriogénico en fase globular



Figura 67: Embriones somáticos

V. CONCLUSIONES

La georreferenciación brinda una base de datos que permitirá seleccionar y ubicar ecotipos de acuerdo a los objetivos de mejoramiento genético que se desee realizar en un futuro, esto reforzado con la conservación *in vitro* debido a su alta vulnerabilidad a las condiciones que se desarrollan actualmente.

La caracterización morfológica de frutos permite la selección de ecotipos promisorios para el mejoramiento genético de esta especie, los cuales se distinguirán por su calidad de fruto, tanto en tamaño, textura y sabor.

La desinfección con lejía, Benomyl (1 gr/L) y Sulfato de Cobre pentahidratado con 24 % p/v (1ml/L) antes de la introducción de la columna de hojas a la cámara de flujo laminar, nos permite tener un bajo porcentaje de contaminación en la fase de establecimiento "*in vitro*".

Para la etapa de Inducción de callo fue en el medio I2 donde se obtuvo mayor número de explantes con callo inducido, el cual contiene alto contenido de 2,4-D (100 mg/L) y mayor contenido de carbón (3 gr/L) en comparación a los otros tratamientos.

Para la etapa de proliferación fue en el medio P2 donde se obtuvo más masa callosa con buenas características morfológicas, el cual demuestra la importancia de la eliminación total del 2,4-D en el medio y la adición de caseína hidrolizada para la promoción de multiplicación de células embriogénicas.

El medio C3 para la fase de desarrollo de embriones somáticos fue el que más embriones somáticos se desarrollaron con características normales, además el porcentaje de muerte de callos fue bajo, logrando de esta manera la obtención de callos embriogénicos.

De esta manera se da a conocer ecotipos promisorios por su calidad de fruto de acuerdo a las exigencias del mercado actual, que servirán de material de selección para el mejoramiento de esta especie, además, se propone un protocolo de embriogénesis somática eficaz y rápido en comparación con los protocolos existentes en la actualidad.

VI. RECOMENDACIONES

Para el trabajo de caracterización morfológica, es conveniente tener como referencia el conocimiento de los pobladores de la zona, debido a que ellos pueden cosechar los frutos en la época adecuada para la descripción morfológica de los frutos, obteniendo de esta manera los datos de fecha de inicio de floración, fecha de inicio de fructificación, estadios de desarrollo y fecha de cosecha, datos muy importantes para los trabajos de mejoramiento genético.

Para la técnica de embriogénesis somática, es recomendable realizar trabajos de investigación para la obtención de embriones somáticos a partir de otros tejidos, tales como: las inflorescencias inmaduras, ápices de raíces, etc. debido a que no todos los ecotipos tienen la capacidad de formar hijuelos, pero producen muy buenos frutos.

La investigación en embriogénesis somática debe seguir hasta la obtención de plantas, es decir, considerar la fase de aclimatación, para posteriormente evaluar su comportamiento en campo, de esta manera sería de provecho para los pobladores de zonas que desean cultivar esta especie.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABERLENC-BERTOSI, F., NOIROT, M. & DUVAL, Y. 1999. "BA enhances the germination of oil palm somatic embryos derived from embryogenic suspension cultures," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 56, no. 1, pp. 53–57.
2. ABOHATEM, M., ZOUINE, J., & 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 horticultrae*, 130(1), 344-348.
3. AGUILAR, V. 2008. "Embriogénesis somática en plátanos y bananos: perspectivas y limitaciones/ María Elena Aguilar V., Juan Luis Ortiz V. y Jorge Arturo Sandoval F. –. 1 ed. – Turrialba, C.R: CATIE. 50 p.: il. – (Serie técnica. Boletín técnico / CATIE ; no.27)
4. AHMED, M., BOUNA, Z., LEMINE, F., DJEH, T., MOKHTAR, T. & SALEM, A. 2011. Use of multivariate analysis to assess phenotypic diversity of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 127(3), 367-371.
5. AL-KHAYRI, J. 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.
6. AL-KHAYRI, J. 2010. "Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera*) Improved by Coconut Water". *Biotechnology* 9 (4): 477-484.
7. AL-KHAYRI, J. 2011. Influence of yeast extract and casein hydrolysate on callus multiplication and somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Sci. Hort.* 130:531–535.
8. ASEMOTA, O., EKE, C. & ODEWALE, J. 2007. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. *African Journal of Biotechnology* 6: 2353-2357.

9. BADAWEY, E., HABIB, A., EL-BANA, A. & YOSRY, G. 2005. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants by using tissue culture technique. *Arabian Journal of Biotechnology* 8: 343-354.
10. BAHARAN, E., MOHAMMADI, P., SHAHBAZI, E., & HOSSEINI, S. 2015. Effects of some plant growth regulators and light on callus induction and explants browning in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro leaves culture. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 5(4).
11. BALKAYA, A., OZBAKIR, M. & KURTAR E. 2010. The phenotypic and fruit characterization of winter squash (*Cucurbita maxima*) populations from the black Sea region of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 9(2): 152-162.
12. BARROW, S. 1998. A monograph of *Phoenix* L. (*Palmae: Coryphoideae*). *Kew Bull.* 53: 513–575.
13. BRAMARDI, S. 2002. Análisis multivariado. Su aplicación en la caracterización de recursos genéticos. Facultad de Ciencias Agrarias, Univ. Conahue, Estación Exp. INTA, Argentina. 60 p.
14. BROWN, O. 1988. "Germplasm determination of in vitro somatic embryogenesis in alfalfa," *Hort Science*, vol. 23, no. 3, pp. 526–531.
15. CAKIR, Z., BALKAYA, A., SARIBAS, S., & KANDEMIR, D. 2017. The Morphological Diversity and Fruit Characterization of Turkish Eggplant (*Solanum melongena* L.) Populations. *Ekin J*, 3(2), 34-44.
16. CAUSEVIC, A., DELAUNAY, A., OUNNAR, S., RIGHEZZA, M., DELMOTTE, F., BRIGNOLAS, F., HAGÈGE, D. & 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.
17. COHEN, Y., KORCHINSKY, R. & TRIPLER, E. 2004. Flower abnormalities cause abnormal fruit setting in tissue culture-propagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 79, no. 6, pp. 1007–1013.
18. CONSTANTIN, M., NCHU, W., GODSWILL, N., WIENDI, N., WACHJAR, A., & FRANK, N. 2015. Induction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* Vol, 3(04), 004-010.
19. COSTA, S., & SHAW, P. 2007. 'Open minded' cells: how cells can change fate. *Trends in cell biology*, 17(3), 101-106.

20. DE OLIVEIRA, E., DIAS, N. & DANTAS, J. 2012. Selection of morpho-agronomic descriptors for characterization of papaya cultivars. *Euphytica*, 185(2), 253-265.
21. D'ONOFRIO, C., & MORINI, S. 2006. Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration in in vitro grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. *Scientia horticulturae*, 107(2), 194-199.
22. DODEMAN, V., DUCREUX, G. & KREIS, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48: 1493-1509.
23. EBERT A., TAYLOR, F. & BLAKE J. 1993. Changes of 6-benzylaminopurine and 2, 4 - dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tiss Org Cult* 33:157-162.
24. EBERT, A., TAYLOR HF. 1990. Assessment of the changes of 2, 4 - dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tiss Org Cult* 20:165-172.
25. EKE, C., AKOMEAH, P. & ASEMOTA, O. 2005. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. *Afr. J. Biotech.* 4(3):244-246.
26. FAO. 2002. "Date Palm Cultivation". Producido en el marco del Programa de apoyo de la producción de dátil en Namibia. Edición revisada por Zaid A. Rome. 156 pp.
27. FAO. 2013. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/567/desktopdefault.aspx#anchor>
28. FEHÉR, A., PASTERNAK, T. & DUDITS, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201-228.
29. GABR, M. & TISSERAT, B. 1985. Propagating palms in vitro with special emphasis on the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae*, vol. 25, no. 3, pp. 255–262, 1985.
30. GIRALDO, E., LÓPEZ-CORRALES, M., & HORMAZA, J. I. 2010. Selection of the most discriminating morphological qualitative variables for characterization of fig germplasm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135(3), 240-249.
31. GLIMN-LACY, J., and KAUFMAN, P. 2006. Palm Family (Arecaceae). *Botany Illustrated: Introduction to Plants, Major Groups, Flowering Plant Families*, 125-125.
32. GRACIA, L. Y ORTIZ, C. 1996. "Characterizacion of the illicitan dates destined to human consumption. Selection standars" en *Options mediterraneennes Serie A: Seminaires Méditerranéens*, Numero 28. *Le Palmier Dattier dans L'Agriculture d'Oasis des Pays Méditerranéens*. Elche, 1995. Eds. M. Ferry et D. Greiner.

33. GUEYE, B., MORCILLO, F., COLLIN, M., GARGANI, D., OVERVOORDE, P., ABERLENC-BERTOSSI, F., TRANBARGER, T., SANE, D., TREGEAR, J., BORGEL, A. & VERDEIL, J. 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.
34. HASSAN, M., & TAHA, R. 2012. Callogenesis, somatic embryogenesis and regeneration of date palm *Phoenix dactylifera* L. cultivars affected by carbohydrate sources. *International Journal of Agricultural Research*, 7(5), 231-242.
35. HERNÁNDEZ VILLARREAL, A. 2013. Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Revista biociencias*, Volumen 2, pp. 113-118.
36. IPGRI, INRAA, INRAM, INRAT, FEM PNUD. 2005. Descripteurs du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Institut des Ressources phytogénétiques internationaux, Rome, Italie; Fonds pour l'Environnement Mondial, Washington, Etats-Unis Programme des Nations United pour le Développement, New York, Etats-Unis Institut National de la Recherche Agronomique, d'Algérie, du Maroc et de Tunisie.
37. JAIN, S. 2011. Prospects of in vitro conservation of date palm genetic diversity for sustainable production. *Emir. J. Food Agric.* 23(2):110-119.
38. JAIN, S. 2012. Date palm biotechnology: Current status and prospective-an overview. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(5), 386.
39. JEMENEZ, V. & BANGERTH, F. 2001. "Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis in vitro," *Plant Science*, vol. 160, no. 2, pp. 247–257.
40. JORDAN, M., HUMAM, M., BIERI, S., CHRISTEN, P., POBLETE, E., & MUNOZ, O. 2006. In vitro shoot and root organogenesis, plant regeneration and production of tropane alkaloids in some species of *Schizanthus*. *Phytochemistry*, 67(6), 570-578.
41. KANMEGNE, G. & OMOKOLO, N. 2003. Changes in phenol content and peroxidase activity during in vitro organogenesis in *Xanthosoma sagittifolium* L. *Plant Growth Regulation*, 40(1), 53-57.
42. KHIERALLAH, H. & HUSSEIN, N. 2013. The role of coconut water and casein hydrolysate in somatic embryogenesis of date palm and genetic stability detection using RAPD markers. *Res. Biotech.* 4(3):20-28.
43. KURUP, S., ALY, M., LEKSHMI G. & TAWFIK, N. 2014. "Rapid in vitro regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Kheneizi using tender leaf explant". *Emir. J. Food Agric.* 26 (6): 539-544.

44. LELU, M., KLIMASZEWSKA, K., JONES, C., WARD, C., VON ADERKAS, P. & CHAREST, P. 1993. A laboratory guide to somatic embryogenesis in spruce and larch. Petawawa National Forestry Institute. Canada. Publications Distribution Centre. 57 p.
45. LOW, E., ALIAS, H., BOON, S., SHARIFF, E., TAN, C., OOI, L., CHEAH, S., RAHA, A., WAN, K., SINGH, R. 2008. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. BMC Plant Biol. 8: 62.
46. MARKHAND, G., ABUL-SOAD, A., MIRBAHAR, A. & KANHAR, N. 2010. Fruit characterization of Pakistani dates. Pak. J. Bot, 42(6), 3715-3722.
47. MATHERI, F., MWANGI, M., RUNO, S., NGUGI, M., KIRUBI, D., NJOROGE, A., MAWIA, A., KIOKO, F., LAGAT, R. & KAMAU, D. 2016. Phenotypic Characterization of Selected Kenyan Purple and Yellow Passion Fruit Genotypes Based on Morpho-Agronomic Descriptors. Advances in Crop Science and Technology.
48. MICHALCZUK, L., RIBNICKY, D., COOKE, T. & COHEN, J. 1992. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. Plant Physiology, vol. 100, no. 3, pp. 1346–1353.
49. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3), 473-497.
50. NASSER, A. 2012. Date Palm tissue culture and genetical and morphological identification of cultivars Grown in Saudi Arabia. 264pp.
51. NASSER, A., SHANAVASKHAN, A. 2012. “Micropropagation of Date Palms”. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB) and association of Agricultural Research Institutions in the Near East and North Africa (AARINENA). 54 pp.
52. NEWTON, R., MAREK-SWIZE, K., MAGALLANES-CEDENO, M., DONG, N., SEN, S. & JAIN, S. 1994. Somatic embryogenesis in Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) in S. Jain., P. Gupta and R. Newton (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Khaver Netherlands 183-195 p.
53. NIXON, R. & CARPENTER, J. 1978. Growing Dates in the United States. U.S. Dept. of Agriculture, Agric. Information Bulletin No. 207: USDA. Technical Document 63 pp.
54. OTHMANI, A., BAYOUDH, C., DRIRA, N., MARRAKCHI, 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.
55. PASTERNAK, T., MISKOLCZI, P., AYAYDIN, F., MÉSZAROS, T., DUDITS, D. & FEHÉR, A. 2000. Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa,” *Plant Growth Regulation*, vol. 32, no. 2-3, pp. 129–141.
 56. PERERA, P., VIDHANAARACHCHI, V., GUNATHILAKE, T., YAKANDAWALA, D., HOCHER, V., VERDEIL, J. & WEERAKOON, L. 2009. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 73-81.
 57. PINTAUD, J., LUDENÑA, B., ABERLENC-BERTOSSI, F., ZEHDI, S., GROSBALTHAZARD, M., IVORRA, S., NEWTON, C., TENGBERG, M., ABDOULKADER, S., NABIL, M., SARO, I., GONAZALEZ, M., SOSA, P., SANTONI, S., MOUSSOUNI F., SI-DEHBI, F., BOUGUEDOURA, N. & DAHER, A. 2011. Biogeography of the date palm (*Phoenix dactylifera* L., Arecaceae): insights on the origin and on the structure of modern diversity. In I International Symposium on Date Palm 994 (pp. 19-38).
 58. REINERT, J. 1958. Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus karotten. *Naturewissenschaften* 45:344–345.
 59. RIVERA, D., JOHNSON, D., DELGADILLO, J., CARRILLO, M., OBÓN, C., KRUEGER, R., ALCARAZ, F., RÍOS, S. & CARREÑO, E. 2013. Historical evidence of the Spanish introduction of date palm (*Phoenix dactylifera* L., Arecaceae) into the Americas. *Genetic resources and crop evolution*, 60(4), 1433-1452.
 60. SÁENZ, L., HERRERA-HERRERA, G., UICAB-BALLOTE, F., CHAN, J., & OROPEZA, C. 2010. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 100(3), 301-308.
 61. SANE, D., ABERLENC-BERTOSSI, F., DJITININGO DIATTA, L., GUÈYE, B., DAHER, A., SAGNA, M., DUVAL, Y. & BORGE, A. 2012. Influence of Growth Regulators on Callogenesis and Somatic Embryo Development in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian Cultivars. *Sci. World J.* pp. 1-8.
 62. SANÉ, D., ABERLENC-BERTOSSI, F., GASSAMA-DIA, Y., SAGNA, M., TROUSLOT, M., DUVAL, Y. & BORGEL, A. 2006. “Histocytological Analysis of

- Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*)”. *Annals of Botany* 98: 301–308.
63. SANÉ, D., ABERLENC-BERTOSI, F., IBRAHIMA DJITININGO DIATTA, L., GUÈYE, B., DAHER, A., SAGNA, M., DUVAL, Y., & BORGEL, A. 2011. “Influence of Growth regulators on Callogenesis and Somatic Embryo Development in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian Cultivars”. *The ScientificWorld Journal*, vol. 2012, 8 pp.
 64. SANI, L., ALIYU, A., HAMZA, O., ADETUNJI, R., GIDADO, M. & SOLOMON, B. 2010. Exploring the Nigerian Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm for in vitro callogénesis. *Acta Hort.*882:177-184.
 65. SEVILLA, R. y HOLLE, M. 2004. Recursos Genéticos Vegetales. pp. 283 - 310.
 66. SOLER, R. 1993. Fruticultura moderna. Imp. Albatros. Buenos Aires, Argentina. 294p.
 67. STEINMACHER, D., CLEMENT C. & GUERRA, M. 2007. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 89: 15-22.
 68. STEWARD, F., MAPES, M., MEARS, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures growth from freely suspended cells. *American Journal of Botany* 45:704–708.
 69. SYMS, C. 2008. Principal components analysis. Elsevier, 2940-2949.
 70. TERRAL, J., NEWTON, C., IVORRA, S., GROS-BALTHAZARD, M., DE MORAIS, C., PICQ, S.,TENGBERG, M. & PINTAUD, J. 2012. Insights into the historical biogeography of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using geometric morphometry of modern and ancient seeds. *Journal of Biogeography*, 39(5), 929-941.
 71. TERZI, M. & LO SCHIAVO, F. 1990. Somatic embryogenesis. In: Bhojwani,; S.S. (ed). *Plant tissue culture: applications and limitations*. The Netherlands: Elsevier. pp. 54-66.
 72. TOMES, D. 1985. “Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets,” in *Cereal Tissue and Cell Culture*, S. M. J. Bright and M. G. K. Jones, Eds., pp. 175–203, Martinus Nijhoff/Junk, Amsterdam, The Netherlands.
 73. TOMLINSON, P. 2006. The uniqueness of palms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151(1), 5-14.

74. VERAMENDI, J. & NAVARRO, L. 1997. Influence of explant sources of adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) on embryogenic callus formation. *Journal of Horticultural Science*, 72(5), 665-671.
75. VERDEIL, J., HUET, C., GROSDÉMANGE, F. & BUFFARD-MOREL, J. 1994. "Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis," *Plant Cell Reports*, vol. 13, no. 3-4, pp. 218–221.
76. VON ARNOLD, S. 2008. Somatic embryogenesis. In: George, E., Hall, M. and de Klerk, G. (eds). *Plant propagation by tissue culture*. Capítulo 9. 3 ed. The Netherlands: Springer. pp. 335-354.
77. VON ARNOLD, S., SABALA, I., BOZHKOVA, P., DYACHOK, J. & FILONOVA, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233-249.
78. WEATHERHEAD, M., BURDON L., HENSHAW, G. 1978. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Z. Pflanzenphysiol* 89:141-147.
79. WHALEY, O., ORELLANA, A., PÉREZ, E., TENORIO, M., QUINTEROS, F., MENDOZA, M., & PECHO, O. 2010. *Plantas y Vegetación de Ica, Perú – Un recurso para su restauración y conservación*. Royal Botanic Gardens, Kew. 100 pp.
80. WOODWARD, A., & BARTEL, B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany*, 95(5), 707-735.
81. ZAID, A. & DE WET, P. 2002. Date palm cultivation. FAO Corporate document repository.
82. ZIZUMBO, D., FERNÁNDEZ, M., TORRES, N., & COLUNGA, P. 2005. Morphological variation of fruit in Mexican populations of *Cocos nucifera* L.(Arecaceae) under in situ and ex situ conditions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(4), 421-434.