



ISSN  
1019-1100

NUMBER 38, 2012

# ASD OIL PALM PAPERS



**“ASD OIL PALM PAPERS”**  
**IS A BIENNIAL PUBLICATION OF**  
**ASD COSTA RICA**  
**(Agricultural Services and Development)**

**Number 38**

**2012**

EDITOR: Carlos Chinchilla  
EDITORIAL BOARD: Amancio Alvarado, Emmanuel Araya,  
Francisco Peralta, Ricardo Escobar.

**MAILING ADDRESS**

ASD OIL PALM PAPERS  
ASD Costa Rica  
P.O. Box 30-1000 San José, Costa Rica  
Ph.(506) 2284-1120, Fax (506) 2257-2667  
E-mail: sales@asd-cr.com  
Web site: <http://www.asd-cr.com>

**CONTENT**

1. *Seed germination in oil palm (Elaeis guineensis): effect of seed storage time before and after heat treatment for breaking dormancy*
10. *Germinación de semillas de palma aceitera (Elaeis guineensis): almacenamiento previo y posterior al tratamiento calor para romper el reposo*  
Ramiro Alizaga, Jorge Herrera and Amancio Alvarado.
19. *Recovery of low-grade (weak) oil palm ramets during the hardening period: use of anti-stress products and antagonist and symbiotic microorganisms*
26. *Rescate de Ramets de palma aceitera con desarrollo subóptimo durante el periodo de endurecimiento: uso de antitranspirantes y microorganismos simbióticos y antagonistas*  
Paula Gadea, Carlos Chinchilla, Nidia Guzmán.

**Cover page**

Brotos obtenidos de tejido embriogénico multiplicado en suspensión líquida.  
*(Shoots obtained from embryogenic tissue multiplied in liquid suspension.)*

To all our readers: ASD Oil Palm Papers is open to contributions (papers) related to the oil palm agro-industry.  
*A todos nuestros lectores: la publicación ASD Oil Palm Papers, está abierta a contribuciones (artículos) relacionados con el cultivo e industria de la palma aceitera*

## **Seed germination in oil palm (*Elaeis guineensis*): effect of seed storage time before and after heat treatment for breaking dormancy**

Ramiro Alizaga<sup>1</sup>, Jorge Herrera<sup>1</sup> and Amancio Alvarado<sup>2</sup>

### **Abstract**

Heat treatment is the procedure used commercially to overcome seed dormancy in oil palm (*Elaeis guineensis*). However there is no information regarding the combined effect of different periods of heat treatment on the germination of seed stored before or after such treatment. Seeds of the Deli x Ekona variety that were not stored or had been stored for 60 days, were subjected to 0, 10, 20, 30, 40, 45 and 50 days of heating (40° C). In another experiment, the seeds were subjected to the following combinations of prior storage (in days) and heat treatments (in days): 0-50, 10-40, 20-30, 30-20, 40-10, 50-0, 60-50, 70-40, 80-30, 90-20, 100-10 and 110-0. Heat treatment for 10, 20 and 30 days increased the percentage of germinated seeds and normal seedlings; especially when applied to seeds stored previously for 60 days, although these percentages were reduced when the heat treatment was extended to 45 or 50 days. It was found that prior storage reduced the intensity of seed dormancy and heating periods of 45 or 50 days negatively affected seed physiological quality. A positive effect of storage following heat treatment on germination was also observed in seeds, even with a heat treatment of only 10 days. Furthermore, in seeds with no prior storage, no negative effect was observed due to the longer heating periods (45 and 50 days).

---

<sup>1</sup> Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, ramiro.alizaga@ucr.ac.cr

<sup>2</sup> ASD de Costa Rica, a.alvarado@asd-cr.com

## Introduction

Palm seeds (Arecaceae) commonly show extended dormancy periods and do not germinate soon after ripening and detached from bunches (Ellis et al. 1985). According to Tomlinson (1990), not less than one fourth of palm species require 100 or more days to germinate, and even after that period, germination can be as low as 20%. The dormancy period is a nuisance for the commercial production of germinated palm seeds, since most species are seed propagated.

Germination of oil palm seeds under natural conditions is very low (Murugesan et al. 2005), and dormancy is due to physiological and morphological impediments (Baskin and Baskin 1998). Breeding programs and commercial seed

producers normally use a heat treatment to break dormancy and accelerate and increase germination. The most common procedure is dry heat treatment: 40 °C for 40-70 days (Corrado and Wuidart 1990, Osafo et al. 1988). Other treatments are not as efficient, such as immersing the seeds in a hydrogen cyanamid solution ( $\text{CHN}_2\text{N}_2$ : 2%) for 24 hours (Herrera et al. 1998).

The dry heat method of Rees (1959), later modified by Mok and Hor (1977) and Corrado and Wuidart (1990), has been used to promote germination of oil palm seeds regardless of their origin. This paper presents information on the influence of storage on oil palm seeds before and after the normal heat treatment for breaking dormancy (or a variation of this treatment).

## Materials and Methods

All experiments were performed on recently harvested seeds of the *tenera* variety Deli x Ekona obtained from the ASD Costa Rica breeding garden in Coto, in Costa Rica's southern Pacific region. The experiments were conducted at CIGRAS (Grain and Seeds Research Center of the University of Costa Rica). Seeds from different bunches harvested the same day were mixed in order to get enough material for all experiments, and three homogeneous seed sub-lots for the three experiments were obtained.

Seeds were kept at 18-20°C, with a moisture content of 18% (dry base) during storage before and after the heat treatment for breaking dormancy (40 °C). During this period, seeds were kept in polyethylene bags (0.17 mm, flexoprint) that were hermetically closed to maintain seed moisture content.

For a first experiment, seeds that were fresh or that had been stored for 60 days were used in combination with a heat treatment and subsequent storage for a total of 50 days in all cases.

The days of heat treatment-days of subsequent storage combinations were: 0-50, 10-40, 20 -30, 30-20, 40-10, 45-5 and 50-0.

In a second experiment, seeds that were fresh or that had been stored for 60 days were then exposed to heat treatments for 0, 10, 20, 30, 40, 45 (commercial) or 50 days. In the final experiment, seeds received the following combinations of treatments (days of prior storage-days of heat treatment): 0-50, 10-40, 20-30, 30-20, 40-10, 50-0, 60-50, 70-40, 80-30, 90-20, 100-10 and 110-0.

After applying the treatments, the seeds were soaked in tap water for seven days and then air dried for approximately eight hours. After this, seeds were divided into groups of 100 (21-22% moisture content, dry basis), treated with a commercial fungicide (Vitavax<sup>®</sup> 400: carboxin 20% + thiram 20%), and put into polyethylene bags that were placed in the germination room where the average temperature was 29 °C during the day and 25 °C at night. There were four replications of 100 seeds each.

The variable evaluated was the percentage of germination (*sensu stricto*: at 7, 14, 21 and 28 days after initiating the tests). During the last evaluation (28 days), the percentage of normal and abnormal plantlets (loss of geotropism, weak

plantlets, and lack of radicle or plumule) was determined. An analysis of variance was performed with data for percentage of germination (7, 14 and 28 days (accumulated)), and that of normal plantlets. Means were separated by Tukey test.

## Results and Discussion

### First experiment

Seed dormancy is an adaptive solution of plants to guarantee their survival in time and space. The intensity and duration of dormancy is determined by genetic factors, whose expression is influenced by the environment before and after the seed reaches its physiological ripeness (Bethke et al. 2004, Baskin and Baskin 1998). In oil palm, dormancy is interrupted by a heat treatment (40°C) during a variable period of time (Addae-Kagyah et al. 1988, Mok and Hor 1977). The main objective is to obtain the largest percentage of germination in the shortest period.

Data from the first experiment showed a significant positive effect on germination ( $p \leq 0.01$ )

of the 60-day storage period, even with 0 or 10 days of subsequent heat treatment, as assessed at 14 days. By contrast, germination was significantly reduced ( $p \leq 0.05$ ) when the seed was previously stored for 60 days and then subjected to heat treatments of 45 or 50 days (Fig. 1). Increasing the duration of the heat treatment between 10 and 50 days promoted better germination when the seed was not previously stored after harvesting. When seeds were stored for 60 days, germination at seven days was higher in those treatments with the following combinations: 10-40, 20-30 and 30-20 (days of heat treatment and prior storage) (Fig. 2).

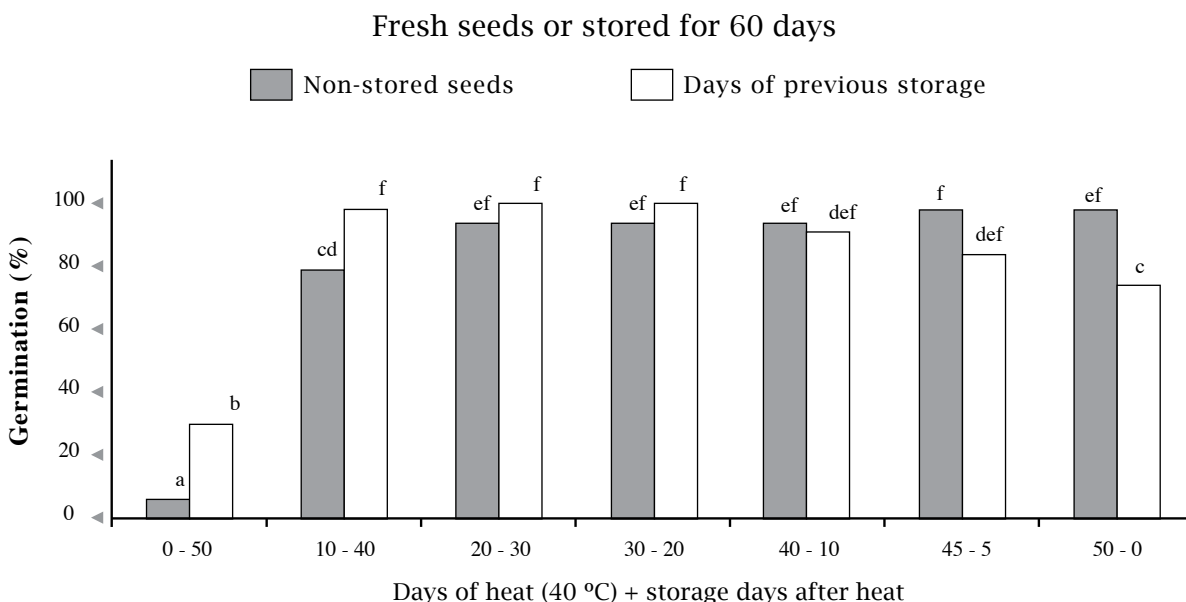


Fig.1. Percent germination (at 14 days) of oil palm seed with no prior storage or 60 days of storage prior to heat treatment (40 °C). Seeds were grouped to receive one of several combinations of days of heat and posterior storage period. Columns with the same letters do not differ (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).

Regardless of the duration of the prior storage period, germination at 7, 14 and 28 days was always lower in groups of seeds that received no heat treatment and were later stored for 50 days. Germination did not increase much between 14 and 28 days, since it had already been quite high at seven days (Figs. 1, 2). Germination improved in all groups of seeds that received the heat treatment, but the differences were not large from a practical point of view. The positive effect of the heat treatment for breaking dormancy in oil palm seeds has been well documented in the

literature (Hussey 1958, Rees 1959, Mok and Hor 1977, Zambrano 1991). A heat treatment of only ten days followed by 40 days of storage was enough to get 60 and 78% germination at seven and 28 days respectively (Fig. 2).

With the exception of the non-heated treatment (0-50: 7% germination at seven days), no differences were observed in all other treatments without prior storage (from 60 to 76% germination). The situation was similar after 28 days, but germination reached up to 90% in some treatments.

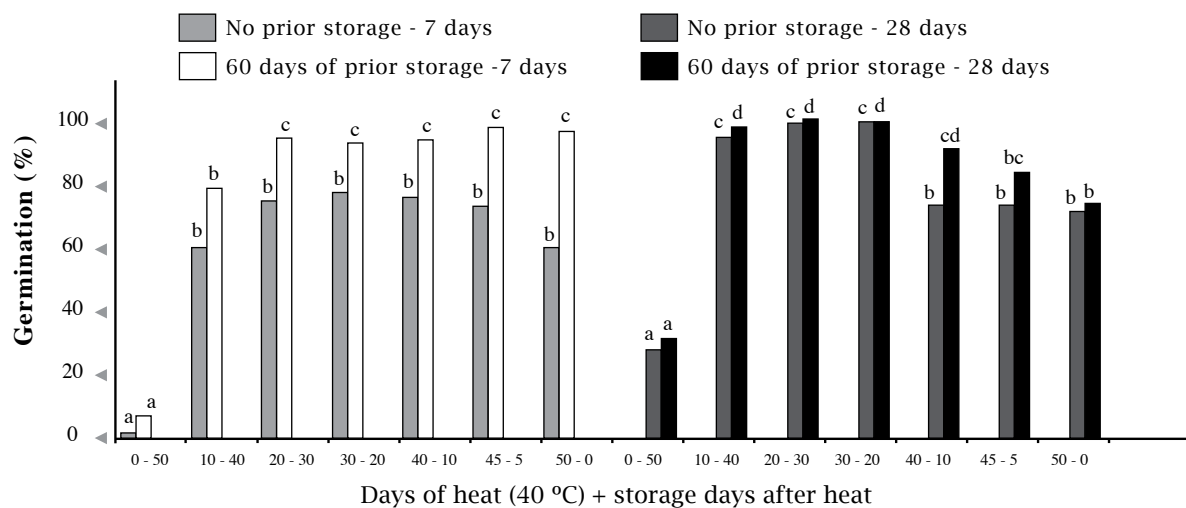


Fig. 2. Percent germination after 7 and 28 days in seeds with and without 60 days of prior storage and subsequently exposed to several combinations of heat treatment and posterior storage. Columns of the same type with the same letters do not differ (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).

Percent germination was very low for recently harvested seeds (dormant), but after storage for 60 days, germination was 29% (Figs. 1, 2). The positive effects of storage have been well documented (Adkins W. et al. 2002, Betake et al. 2004, Hacker J. 1984, Tiwari et al. 2004).

Results from the first experiment indicated that dormancy in oil palm seeds can be interrupted by some period of storage before and after a heat treatment. However, periods

longer than 45 days in seeds previously stored for 60 days apparently had negative effects and germination was reduced, at least in the genotype studied. In these seeds, dormancy could have already been partially broken; hence the heat treatment applied to seeds with longer storage periods had rather severe effects on them. Actually, it appears that dormancy in about one third of the seeds can be broken with even a short period of storage.

The highest percentage of normal seedlings was obtained with seeds previously stored for 60 days ( $p \leq 0.01$ ) and heat treated for 10, 20 or 30 days combined with decreasing lengths of time in post-storage of 40, 30 or 20 days. With longer periods of heating (45 and 50 days) the percentage

of normal plantlets was reduced ( $p \leq 0.05$ ). But for seeds with no prior storage, a longer heating period of 45 or 50 days was needed to attain similar high values, which is an indication that these seeds were in a deeper dormancy before receiving the heat treatment (Fig. 3).

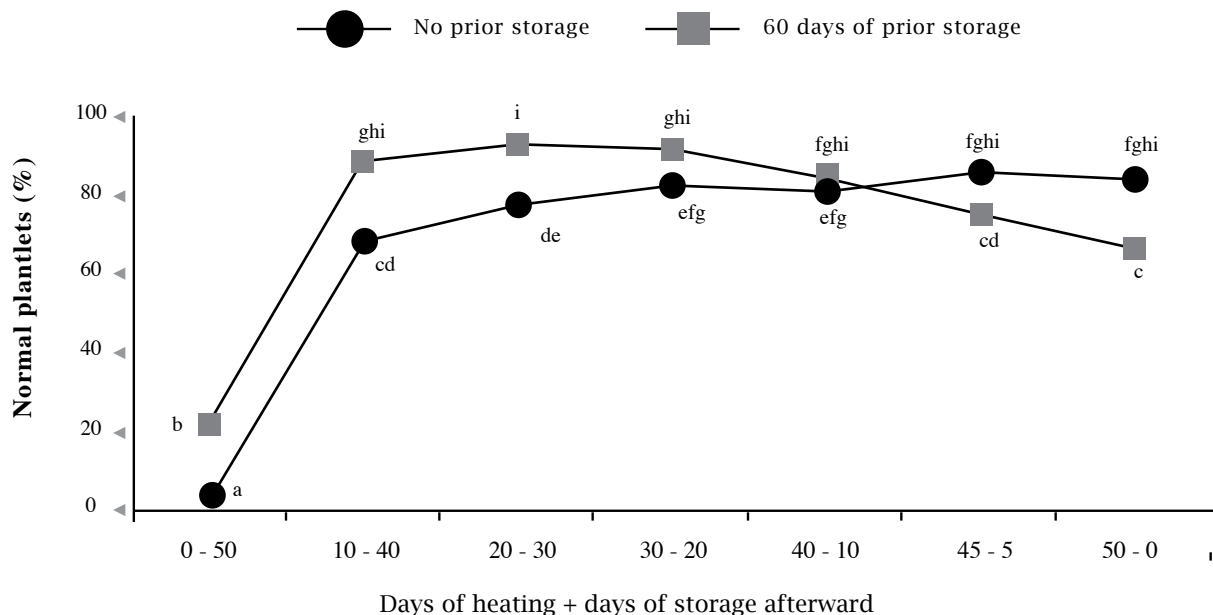


Fig. 3. Percentage of normal plantlets (7 and 28 days) obtained from seeds with or without 60 days of prior storage and later subjected to different combinations of heat treatment durations and subsequent storage periods. Same letters indicate no differences (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).

## Second experiment

The information obtained from the first experiment indicated that a storage period before the heat treatment for breaking dormancy had a better effect on posterior germination of oil palm seeds than storage after the heat treatment. This information was taken as the basis for planning a second experiment where the heating periods were studied further.

Once again, it was found that prior storage of seeds (before they were exposed to heat to break dormancy) favored posterior germination. This was clear from data taken at seven and 14 days after placing the seeds for germination. In general, the highest germination was obtained with heat treatments lasting 30 or more days. With 40 or 45 days of heat treatment, maximum germination was obtained in just two weeks (Fig. 4).

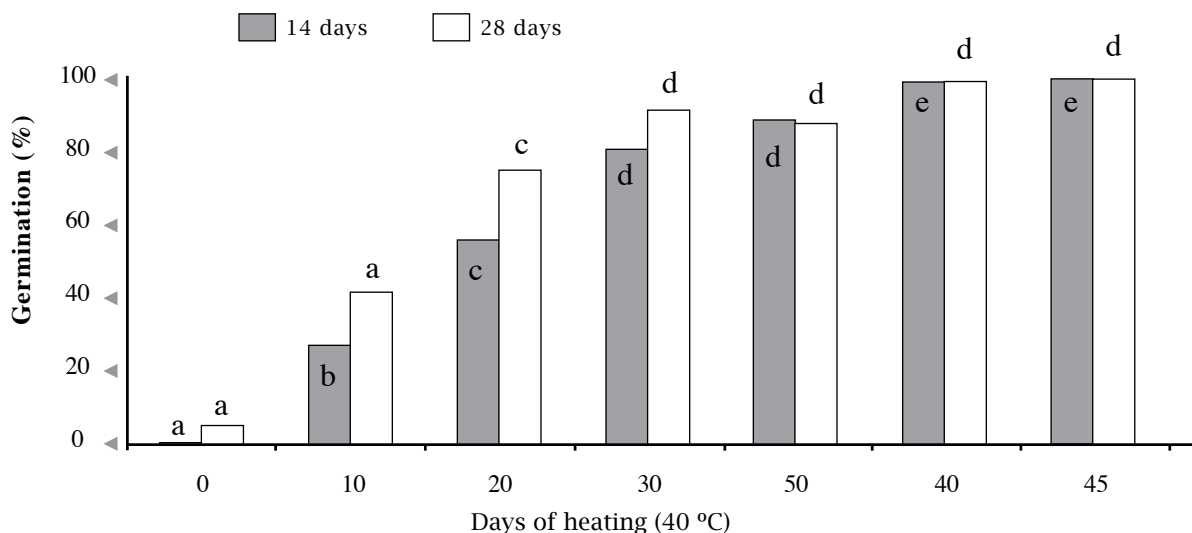


Fig. 4. Effect of heat treatment periods on seed germination regardless of storage before or after heating. Columns with the same letters are not different (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).

Prior storage takes on more importance for heating periods shorter than 30 days, and the inverse also seems to be also true, since germination decreased ( $p \leq 0.05$ ) with a 60-day prior storage treatment and heating for 50 days. As suggested before, the effect could be one of an 'excessively long' heating period on seeds where dormancy had been already partially broken. When seed is previously stored for about two months, a heating period of one month seems to

be enough to break dormancy satisfactorily to then get a high percentage of germination.

Regardless of the length of the storage period (before or after heating), germination at 14 and 28 days was improved by increasing the heating period to 30 or 45 days (Fig. 5). Zambrano (1991) had found that germination was initially rather low after a heating treatment of only 20 days, but with time an acceptable level was reached.

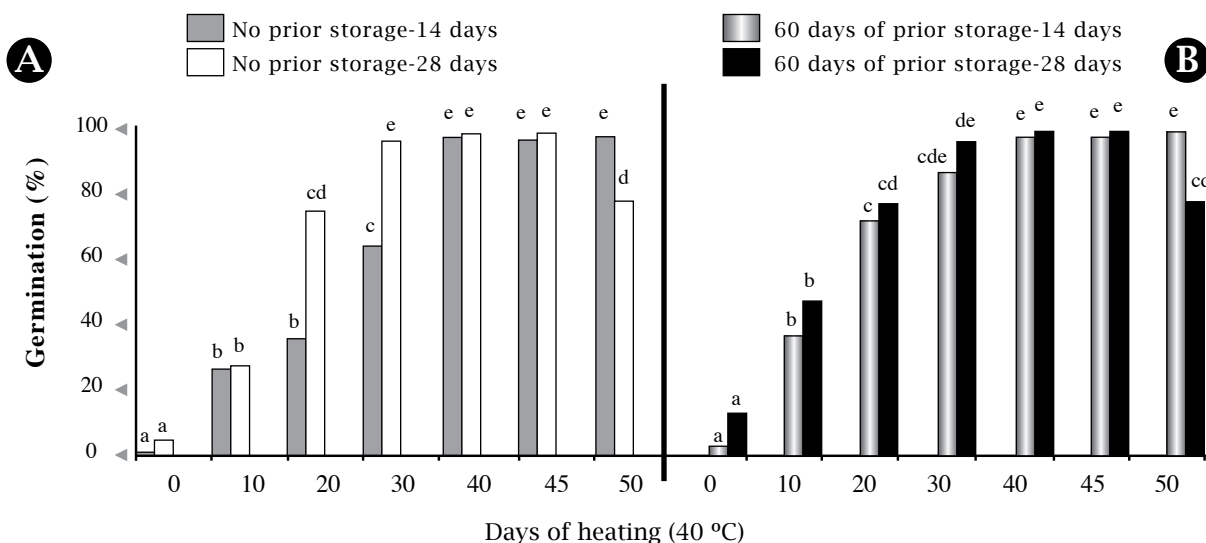


Fig. 5. Effect on seed germination of several heating periods to break dormancy after 14 and 28 days, in seeds with and without prior storage. Columns with the same letters do not differ (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).



Most seeds that germinated had normal morphology and it was again observed that rapid germination gave rise to more normal plantlets. The 50-day heat treatment in seeds stored previously showed more abnormal plantlets (Fig. 6). These observations clearly indicate that the heat treatment should definitely consider the prior storage history of the seeds.

Concerning the percentage of normal plantlets, heat treatments of 0, 10 and 20 days were generally not suitable for overcoming seed dormancy, from a

commercial standpoint. In contrast, non-stored seeds heated for 40, 45 and 50 days and stored seeds heated for 30, 40 and 45 days attained higher percentages of normal plantlets ( $p \leq 0.05$ ) ranging from 85 to 90%. In contrast, treatment with prior storage and 50 days of heat treatment showed a significant decrease in the percentage of normal plantlets ( $P \leq 0.05$ ) with respect to the best treatments (Fig. 6). This further strengthens the position that the heat treatment should not be done indiscriminately and the history of the seed should be taken into account.

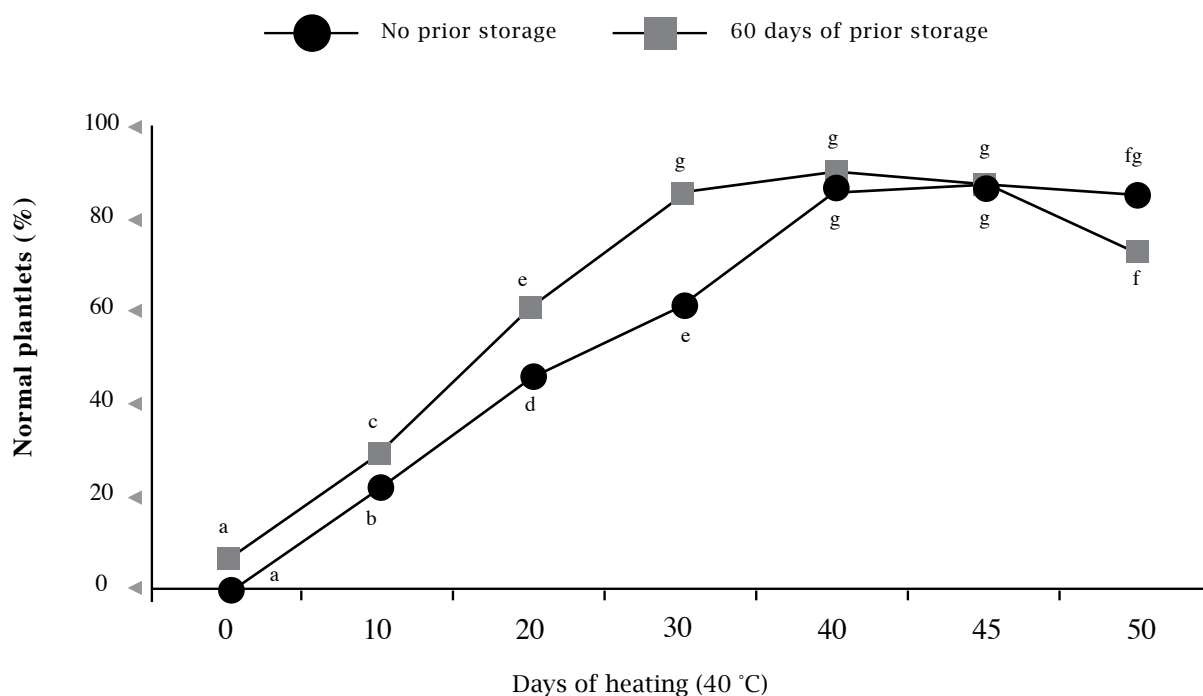


Fig. 6. Percentage of normal plantlets at 28 days obtained from seed with and without 60 days of storage prior to heating. Numbers with same letter do not differ (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).

### Third experiment

This experiment was conducted to evaluate storage periods longer than 60 days prior to the heating treatment. The positive effect ( $p \leq 0.01$ ) of an appropriate combination of prior storage and the posterior heat treatment was corroborated. Within the range studied, the best treatments for stimulating germination and normal plantlets were those where the prior storage period lasted 70 to

90 days combined with 40 to 20 days of heat treatment. Of similar magnitude was the germination obtained from heating the seeds for 50, 40 and 30 days, but with shorter periods of prior storage (0, 10 and 20 days). These results agree with those observed in previous experiments. Once again, the best treatment for germination also gave rise to higher quality plantlets (Fig. 7).

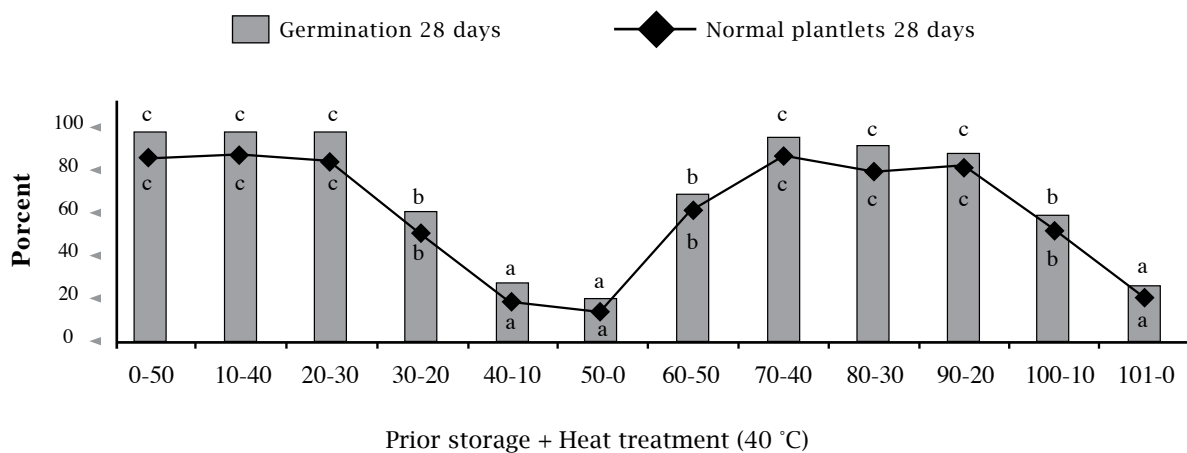


Fig. 7. Germination and normal plantlets (28 days) from seeds that received different combinations of prior storage and days of heat treatment for breaking dormancy. Data with the same letters do not differ (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).

Most seeds that germinated in all three experiments were morphologically normal and the small percentage of abnormalities were not related to any treatment in particular. It was clear that those seed lots that germinated faster after soaking in water produced higher numbers of normal plantlets. When germination reached 85% or more after seven days, the plantlets obtained were more vigorous. On the contrary, more abnormalities were found in those seeds that germinated later. Faster germination may be a consequence of higher seed vigor (Association of Official Seed Analysis 2002, Tekrony and Egli 1991) or the result of a partially broken dormancy or combination of both factors.

A period of storage prior to the heat treatment for breaking dormancy allowed a reduction in heat exposure, faster germination and more plantlets with desirable characteristics. All this reduces time and cost during seed processing for germination.

Corrado and Wuidart (1990) obtained high germination after six months of storage and by using heat 39 °C) for 80 days. However, our results indicate that there can be a negative effect on germination if the seed is stored for

50-60 days and then exposed to a prolonged period of heating (40°C: 45-50 days), at least for the seed variety used in these experiments. A similar situation was found by Beugré et al. (2009), who noted a negative effect of the heating treatment on germination in oil palm seeds that were stored for increasing periods of time.

There are other possibilities that could help reduce the dormancy period in oil palm seeds, but they have not been widely accepted. For example, Myint et al. (2010) determined that by removing the operculum, germination could reach up to 80%, comparable to the results obtained with the heating method.

Oil palm dormancy seems to be the result of both physical and physiological impediments for germination, which was confirmed by the work of Jiménez et al. (2008), who found an important reduction in abscisic acid concentration after the heat treatment. It is however possible that seeds from different genotypes (Beugré et al. 2009), latitudes and even ripeness may show differences when exposed to a particular treatment to break dormancy.

## Literature

- Addae-Kagyah K. A., Osafo D. M., Olympio N. S., Atubra O. K. (1988). Effect of seed storage, heat pre-treatment and its duration on germination and growth of nursery stock of the idolatrica palm, *Elaeis guineensis* var *idolatrica* (Chevalier). Trop. Agric. (Trinidad) 65: 77-83
- Adkins S., Bellairs S., Loch D. 2002. Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. *Euphytica* 126: 13-20
- Association of Official Seed Analysts (AOSA). (2002). Seed Vigor Testing Handbook. Contribution No. 32. Association of Official Seed Analysts. New Mexico 88003
- Baskin C.C., Baskin J. M. (1998). Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, San Diego, 666p
- Bethke, P., Gubler, F., Jacobsen J., Rusell J. 2004. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* 219(5): 847-855
- Beugré-Manéhonon M., Kouakou-Kouakou L., Bognonkpé J.P., Konan- Kouakou, E., Kouakou-Tanoh H., Kouadio-Yatty J. (2009). African J. of Agric. Res. 4(10):931-937
- Corrado F., Wuidart W. (1990). Germination des graines de palmier à huile (*Elaeis guineensis*) en sac de polyéthylène. Méthode par "chaleur sèche" Oléagineux 45 (11) : 511-518
- Ellis R. H., Hong, T. D., Roberts E. H. (1985). Handbook of seed technology for genebanks. Vol. II: Compendium of specific germination information and test recommendations, International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 456 p
- Hacker J. B., Andrew M. H., McIvor J. G., Mott J. J. 1984. Evaluation in contrasting climates of dormancy characteristics of seed of *Digitaria milaniana*. J. of Applied Ecology 21(3): 961-969
- Herrera J., Alizaga R., Guevara E. (1998). Use of chemical treatments to induce seed germination in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). ASD Oil Palm Papers 18: 1-1
- Hussey G. (1958). An analysis of the factors controlling the germination of the seed of oil palm, *Elaeis guineensis* (jacq.). Annals of Bot. 22:259-284
- Jiménez, V., Guevara, E., Herrera, J., Alizaga, R., Bangerth F. (2008). Changes in hormone concentrations during dormancy release of oil palm (*Elaeis guineensis*) seeds. Seed Science and Technology 6(3): 575-587
- Mok C. K. and Hor Y. L. (1977). The storage of oil palm (*Elaeis guineensis*) seed after high temperature treatment. Seed Science and Technology 5: 499-508
- Murugesan P., Mathur R. K., Pillai R. S. and Babu M. K. (2005). Effect of accelerated aging on seed germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.). Seed Technology 27(1): 108-112
- Murugesan, P., Bijimol G. and Haseela H. 2008. Effect of different substrates on growth of germinated oil palm hybrids seeds. Indian J. of Hort. 65(4)
- Myint, T., Chanprasert W., Srikul S. Germination of seed of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as affected by different mechanical scarification methods. Seed Sci. and Tech. 38 (3): 635-645
- Rees A. R. (1959). Germination of oil palm seed: large scale germination. J. of West African Inst. for Oil Palm Res. 3:76-82
- Tekrony D. M., Egli D. B. (1991). Relationship of seed vigor to crop yield: A Review. Crop Sci. 31:816-822
- Tiwari, C.; Sharma, S.; Verma, R. 2004. Effect of fungicide and plant growth hormones on germination of teak (*Tectona grandis*). J. of Trop. Forest Sci. 16:25-34
- Tomlinson P. B. (1990). The structural biology of palms. Oxford University Press, New York. 477 pp
- Zambrano R. 1991. Influencia de períodos de almacenamiento y calentamiento sobre la germinación de semilla de palma africana. Tesis de grado. Fac. Ing. Agron. Universidad Técnica de Manabí (Ecuador). 70 p

# Germinación de semillas de palma aceitera (*Elaeis guineensis*): almacenamiento previo y posterior al tratamiento de calor para romper el reposo

Ramiro Alizaga<sup>1</sup>, Jorge Herrera<sup>1</sup> y Amancio Alvarado<sup>2</sup>

## Resumen

El tratamiento térmico es el procedimiento utilizado comercialmente para superar el reposo en semillas de palma aceitera (*Elaeis guineensis*). Sin embargo no hay información con respecto al efecto combinado de diferentes períodos de tratamiento térmico sobre la germinación de semilla almacenada previa o posteriormente a dicho tratamiento. Semillas del híbrido Deli x Ekona (DXE) sin almacenamiento previo y almacenadas por 60 días, se sometieron a 0, 10, 20, 30, 40, 45 y 50 días de calor (40°C). También se sometieron a las siguientes combinaciones de almacenamiento previo por tratamiento térmico (en días): 0-50, 10-40, 20-30, 30-20, 40-10, 50-0, 60-50, 70-40, 80-30, 90-20, 100-10 y 110-0. El tratamiento térmico por 10, 20 y 30 días aumentó el porcentaje de semillas germinadas y de plántulas normales, en especial cuando se aplicó a semillas almacenadas previamente por 60 días; aunque dichos porcentajes se redujeron cuando el tratamiento térmico se aplicó por 45 o 50 días. También se observó un efecto positivo del almacenamiento posterior aún con tratamiento térmico de sólo 10 días. Se determinó que el almacenamiento previo reduce la intensidad del reposo de las semillas, por lo que períodos prolongados de calentamiento (45 o 50 días) afectan negativamente la calidad fisiológica de las mismas. Por el contrario, en semilla sin almacenamiento previo no se observó efecto negativo de los períodos de calentamiento mayores (45 y 50 días).

---

<sup>1</sup> Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, ramiro.alizaga@ucr.ac.cr

<sup>2</sup> ASD de Costa Rica, a.alvarado@asd-cr.com

## Introducción

Las semillas de palmas (Arecaceae) en general presentan períodos de reposo extensos; por lo que recién cosechadas germinan en baja proporción (Ellis et al. 1985). Según Tomlinson (1990), al menos una cuarta parte de las especies de palmas requieren un plazo mayor de 100 días para germinar y durante este período solo se obtiene 20 % de la germinación potencial. Esta condición de reposo restringe o dificulta la propagación comercial de las diferentes especies de palmas, las cuales salvo muy pocas excepciones, únicamente se propagan por semilla sexual.

En condiciones naturales las semillas de palma aceitera germinan esporádicamente y en baja proporción (Murugesan et al. 2005). El reposo se debe a impedimentos fisiológicos y morfológicos (Baskin y Baskin 1998), y es un inconveniente que las compañías que comercializan semilla germinada deben superar a través de algún tratamiento que acelere la germinación.

Comúnmente el reposo de las semillas se interrumpe con un tratamiento de calor (seco o húmedo: 40 °C) durante 40-70 días (Corrado y Wuidart 1990, Osafo et al. 1988). Otro tratamiento, aunque no tan eficiente como el anterior, es la inmersión de las semillas en una solución de cianamida hidrogenada (CHN<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) al 2% durante 24 horas (Herrera et al. 1998).

El método de calor seco propuesto por Rees (1959) y luego modificado por Mok y Hor, (1977) y Corrado y Wuidart (1990) se ha usado en forma indiscriminada para promover la germinación de la semilla de la palma aceitera de diferentes orígenes. Sin embargo, no se dispone de información relacionada con la influencia de períodos de almacenamiento previos o posteriores al tratamiento tradicional con calor o a variaciones del mismo, sobre la germinación de las semillas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de los períodos de almacenamiento previo y posterior al tratamiento usual de calor, o variaciones del mismo.

## Materiales y Métodos

Los experimentos se realizaron con semillas recién cosechadas de *Elaeis guineensis* del tipo tenera (Deli x Ekona) suministradas por ASD Costa Rica. Para obtener suficiente semilla para los diferentes experimentos se mezclaron racimos con la misma edad de cosecha, y se obtuvo tres sublotos representativos y homogéneos.

En los experimentos en que se almacenó semilla previo y posterior al tratamiento térmico (calor seco), las mismas se mantuvieron a 18-20 °C, con un contenido de humedad de 18% en base seca. Para los tratamientos térmicos, las semillas se almacenaron a 40 °C con 18 % de contenido de humedad (base seca), en bolsas de polietileno de 0.17 mm de espesor (Flexoprint) herméticamente cerradas para mantener el contenido de agua de las semillas.

En un primer experimento, las semillas se almacenaron previamente durante cero o 60 días, y luego se hicieron las siguientes combinaciones según el tratamiento térmico y el almacenamiento posterior; de tal manera que siempre sumaran 50 días: 0-50, 10-40, 20-30, 30-20, 40-10, 45-5 y 50-0.

En un segundo experimento, las semillas se almacenaron por cero o 60 días, y en cada caso se sometieron a tratamientos térmicos de 0, 10, 20, 30, 40, 45 (tratamiento comercial) y 50 días. En un tercer experimento, las semillas se sometieron a las siguientes combinaciones de almacenamiento previo por tratamiento térmico (en días): 0-50, 10-40, 20-30, 30-20, 40-10, 50-0, 60-50, 70-40, 80-30, 90-20, 100-10 y 110-0.

Una vez realizados los tratamientos, las semillas se sumergieron en agua corriente durante siete días y se colocaron al aire ambiente durante aproximadamente ocho horas; luego de lo cual se hicieron grupos de 100 semillas (21-22 % de humedad, base seca), se trataron con el fungicida comercial Vitavax<sup>®</sup> 400 (carboxin 20% + thiram 20%), se introdujeron en bolsas de polipropileno, y se colocaron en cuartos de germinación, donde la temperatura promedio fue de 29 °C durante el día y de 25 °C durante la noche.

Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones de 100 semillas cada una. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de germinación (*sensu stricto*: a los 7, 14, 21 y 28 días después de iniciada la prueba), el porcentaje de plántulas normales (28 días) y el porcentaje de plántulas anormales (pérdida de geotropismo, plántulas raquílicas y falta de radícula o plúmula). Se realizó luego un análisis de varianza para cada experimento, con las variables semilla germinada (7, 14 y 28 días (acumulado), y para el porcentaje de plántulas normales. La separación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey.

## Resultados y Discusión

### Primer experimento

El reposo en las semillas es una solución adaptativa de las plantas para garantizar su sobrevivencia en el tiempo y el espacio. La intensidad y permanencia del mismo está determinada por factores genéticos que a la vez son influenciados por el ambiente antes y después de la madurez fisiológica de las semillas (Bethke et al. 2004, Baskin y Baskin 1998). Para romper el reposo y estimular luego la germinación de las semillas, normalmente se utiliza un tratamiento térmico (40°C) durante períodos de tiempo variables (Addae-Kagyah et al. 1988, Mok y Hor 1977). El objetivo es lograr el mayor porcentaje de germinación en el menor tiempo posible.

En el primer experimento se encontró un incremento significativo ( $p \leq 0.01$ ) en la germinación debido al almacenamiento previo (60 días) al calentamiento a los 14 días de iniciada la prueba en los tratamientos de 0-50 y 10-40. Por el contrario, la germinación se redujo significativamente ( $p \leq 0.05$ ) cuando la semilla se almacenó previamente por 60 días y posteriormente se sometió al tratamiento térmico de 45 y 50 días. No se observó efecto en los tratamientos 20-30, 30-20 y 40-10 (Fig.1). El incremento en los días de calor entre 10 y 45 se asoció con un aumento en la germinación cuando no se almacenó la semilla previamente.

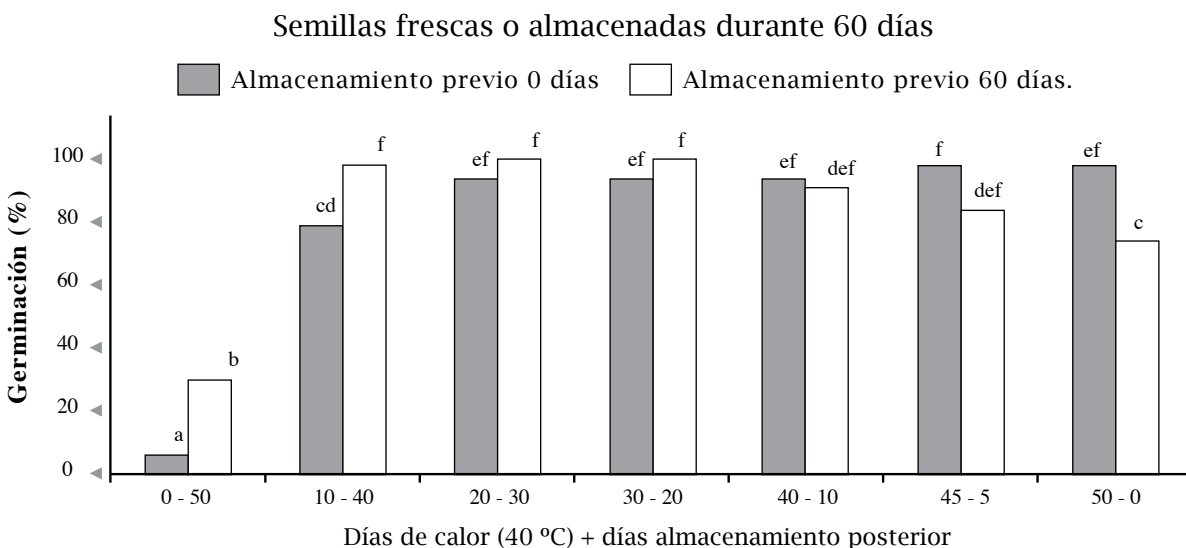


Fig. 1. Porcentaje de germinación (14 días) de semillas de palma aceitera sin y con 60 días de almacenamiento previo al tratamiento de calor (40 °C). Las semillas se agruparon para recibir diferentes combinaciones de días de tratamiento térmico y tiempo de almacenamiento posterior. Columnas con igual letra no difieren entre sí (Tukey:  $p \leq 0.05$ ). En el eje x, el primer número denota los días de calor y el segundo días de almacenamiento posterior.

La germinación a los siete días fue mayor cuando la semilla se almacenó previamente durante 60 días con las combinaciones 10-40, 20-30 y 30-20 (días de calor y almacenamiento posterior respectivamente) (Fig. 2).

Independientemente del almacenamiento previo, la germinación a los 7 y 28 días de iniciada la prueba fue menor en los grupos de semillas que no recibieron el tratamiento de calor y que luego fueron almacenadas durante 50 días ( $p \leq 0.05$ ). También es evidente el efecto positivo ( $p \leq 0.01$ ) del almacenamiento previo sobre la germinación, ya que no aumentó mucho entre los 14 y 28 días (final de la prueba) debido a los altos porcentajes que habían sido alcanzados previamente.

La germinación mejoró en todos los grupos de semillas que recibieron calor, pero las diferencias, aunque significativas, no se consideraron importantes desde el punto de vista práctico.

El efecto positivo del tratamiento térmico fue significativo ( $p \leq 0.01$ ) en ambos grupos de semillas que recibieron o no un almacenamiento previo (Figs. 1 y 2). El efecto del calor para romper el reposo de la semilla de la palma aceitera está ampliamente documentado en la literatura (Hussey 1958, Rees 1959, Mok y Hor 1977, Zambrano 1991).

Un periodo de calentamiento de solo 10 días, seguido de 40 días de almacenamiento a 18 °C fue suficiente para obtener 60% y 78% de germinación a los siete y 28 días respectivamente (Fig. 2)

Con la excepción del tratamiento sin calor (0-50: 7% de germinación a los siete días), no se encontró diferencias significativas en los demás tratamientos sin almacenamiento previo (60 y 76% de germinación). A los 28 días la situación se mantuvo, pero la germinación alcanzó 90% en algunos tratamientos.

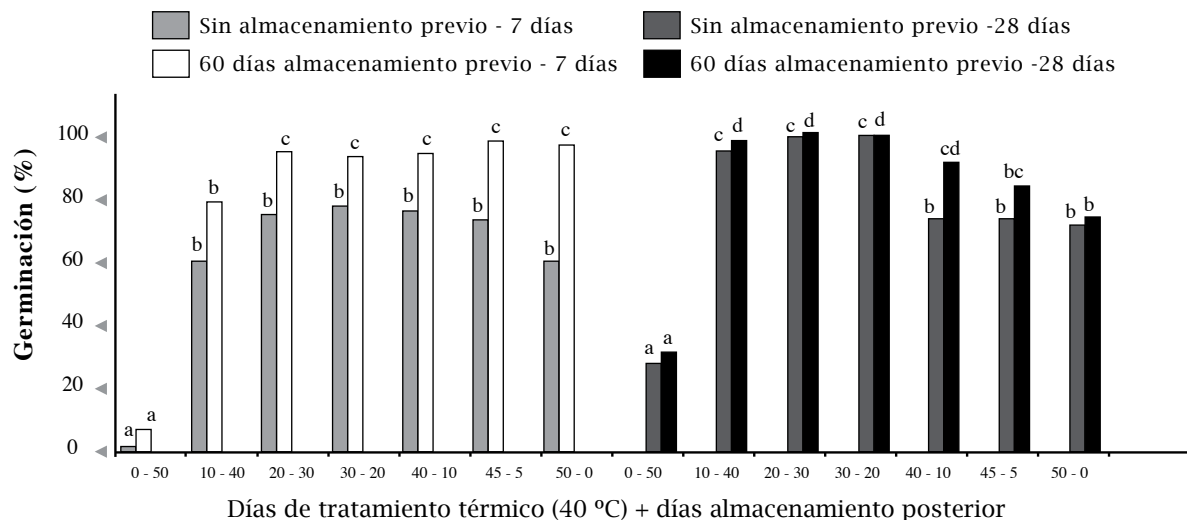


Fig. 2. Porcentaje de germinación a los 7 y 28 días en semillas sin y con 60 días de almacenamiento previo y posteriormente sometidas a diferentes combinaciones en la duración del tratamiento térmico y el almacenamiento posterior. Columnas del mismo tipo con igual letra no difieren entre si (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).

La semilla recién cosechada tuvo una germinación muy baja debido a su reposo, pero cuando se almacenó por 60 días, la germinación se incrementó hasta alcanzar 29% (Figs. 1 y 2). El efecto positivo del almacenamiento está también documentado en la literatura (Adkins W. et al. 2002, Bethke et al. 2004, Hacker J. 1984, Tiwari et al. 2004).

Los resultados de este primer experimento indican que la germinación de la semilla de palma aceitera puede aumentar si esta se almacena por un periodo antes o después del tratamiento de calor para romper el reposo. No obstante, periodos mayores a 45 días de calor en semillas previamente almacenadas durante 60 días, redujeron la germinación en el genotipo estudiado. En este caso podría haberse presentado una superación parcial del reposo, por lo que el tratamiento térmico aplicado en los periodos mayores pudo afectar la calidad de las semillas.

El mayor porcentaje de plantas normales se obtuvo con semillas previamente almacenadas durante 60

días ( $p \leq 0.01$ ) y con los tratamientos con días crecientes de calor (10, 20 y 30), combinados con cantidad decreciente de días en pos-almacenamiento (40, 30 y 20). Con los mayores periodos de calentamiento (45 y 50 días) se redujo ( $p \leq 0.05$ ) el porcentaje de plántulas normales (Fig. 3).

Los mayores porcentajes de plántulas normales ( $p \leq 0.05$ ) se obtuvieron con semilla almacenada previamente por 60 días con los tratamientos de 10-40, 20-30 y 30-20 (días de calor y almacenamiento posterior); sin embargo en los tratamientos de 45-5 y 50-0 el porcentaje de plántulas normales mostró una disminución ( $p \leq 0.05$ ), posiblemente debido a que sufrió deterioro por el tratamiento térmico. Por otra parte, en la semilla sin almacenamiento previo (60 días), los tratamientos de 0-50 y 10-40 presentaron los menores porcentajes de plántulas normales ( $p \leq 0.05$ ), mientras que los mayores valores se obtuvieron con los tratamientos de 45-5 y 50-0, debido a que presentaban mayor reposo por lo que el tratamiento térmico no afectó negativamente el porcentaje de plántulas normales.

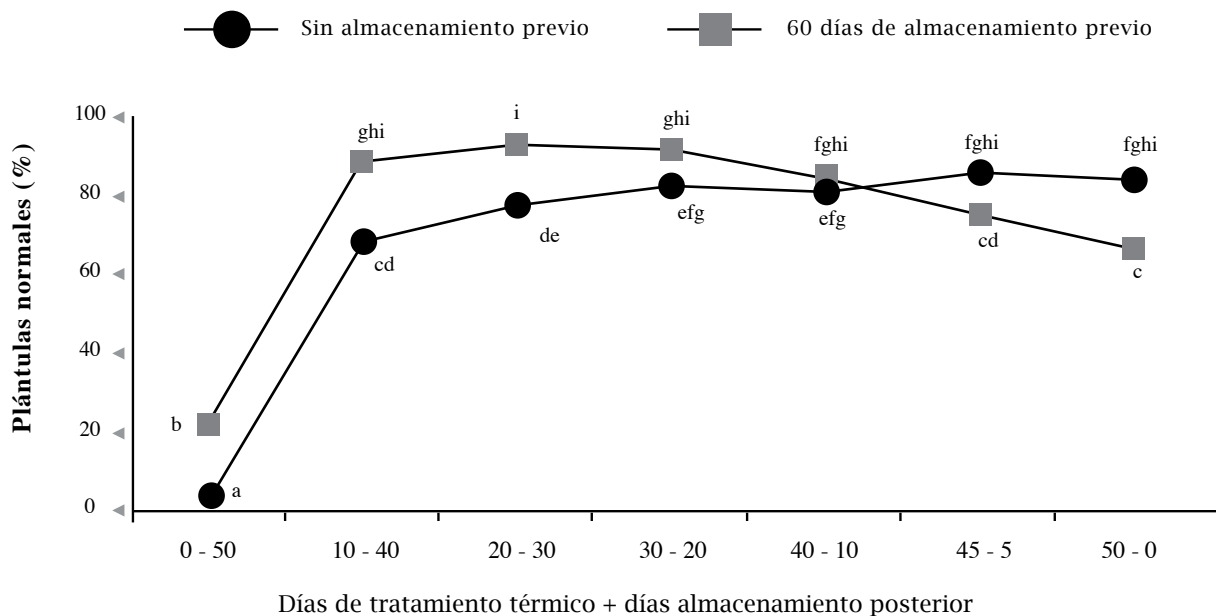


Fig. 3. Porcentaje de plántulas normales (7 y 28 días) provenientes de semillas sin y con 60 días de almacenamiento previo, y que luego fueron sometidas a diferentes combinaciones en la duración del tratamiento térmico y almacenamiento posterior. Resultados con igual letra no difieren entre sí (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).



## Segundo experimento

Los datos del primer experimento indicaron que el periodo de almacenamiento previo al calentamiento para romper el reposo tuvo un efecto mayor sobre la germinación, que el almacenamiento posterior al tratamiento térmico. Con esta información se planeó un segundo experimento variando el periodo de calentamiento.

El almacenamiento previo al calentamiento

favoreció significativamente la germinación ( $p \leq 0.01$ ) en los recuentos hechos a los 7 y 14 días, pero no a los 28 días. En general, los mejores resultados de germinación se obtuvieron con un periodo de calentamiento de 30 días o más. Con un calentamiento igual o superior a los 40 días se logró la máxima germinación en solo dos semanas (Fig. 4).

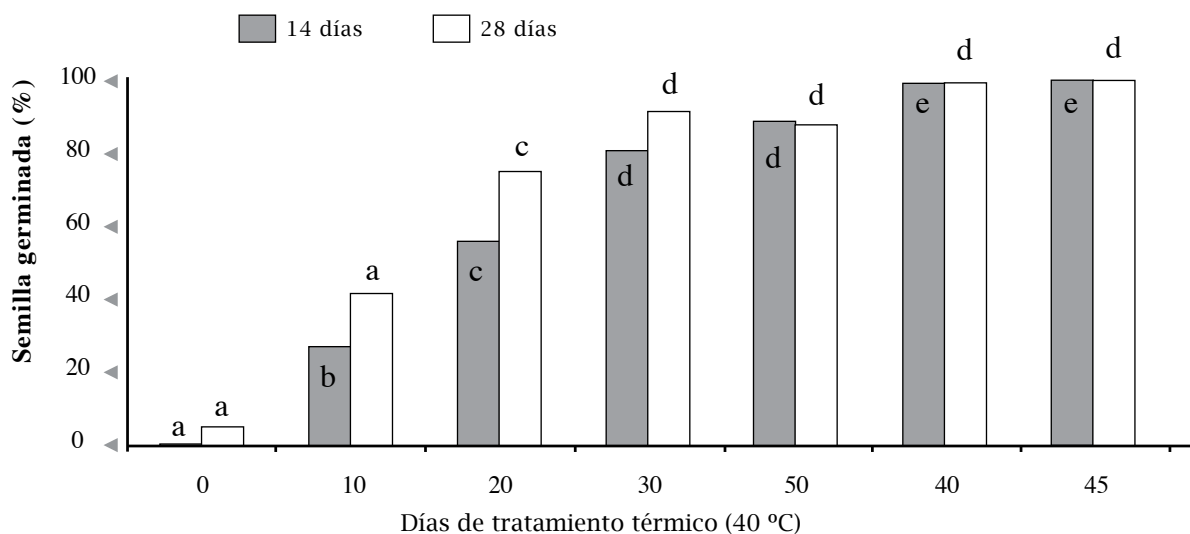


Fig. 4. Efecto del período de tratamiento térmico sobre el porcentaje de semillas germinadas, sin considerar almacenamiento previo o posterior. Columnas del mismo tipo con igual letra no difieren entre sí (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).

Se encontró que cuando no se utilizó almacenamiento previo (60 días), periodos de calentamiento menores a 30 días no produjeron una germinación alta. Zambrano (1991) encontró que la germinación fue lenta con un tratamiento de calor de solo 20 días, aunque eventualmente se obtuvo una germinación aceptable. Además, con o sin almacenamiento previo los valores mayores de germinación se obtuvieron con 40 y 45 días de calor ( $p \leq 0.05$ ). Se observó un descenso en la

germinación con el tratamiento de 50 días de calor cuando la semilla se almacenó previamente por 60 días (Fig. 5). Esto reafirma la observación de que el almacenamiento previo reduce la intensidad del reposo de la semilla y la hace más sensible a periodos prolongados con altas temperaturas. Por la misma razón, con un almacenamiento de dos meses, resulta suficiente un mes de calentamiento para lograr una alta germinación.

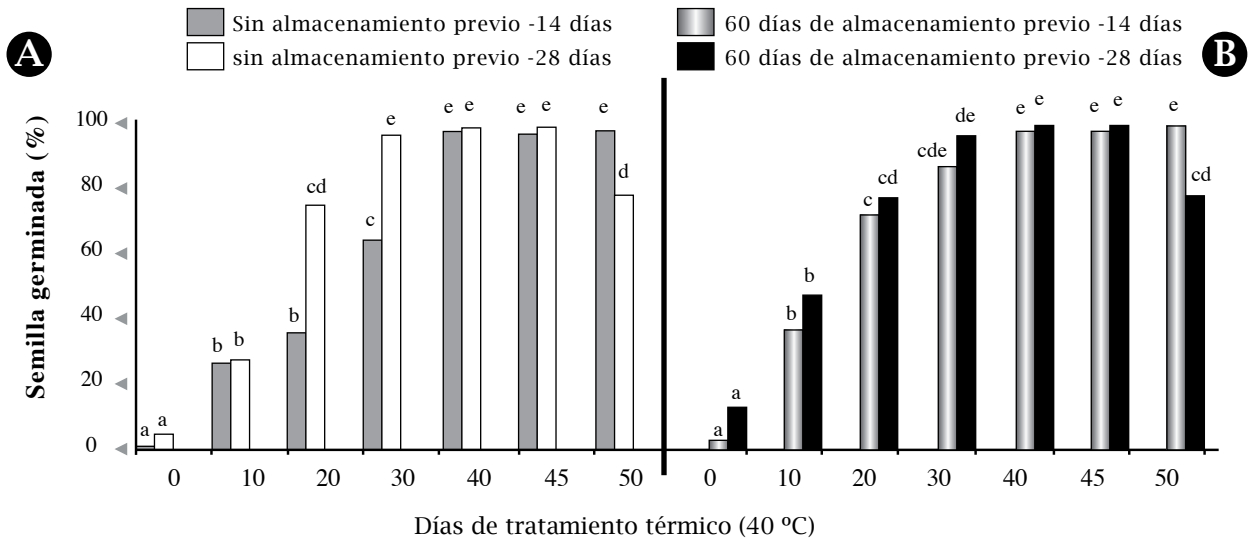


Fig. 5. Duración del tratamiento de calor para romper el reposo y porcentaje de semillas germinadas, con o sin un periodo de almacenamiento previo. Columnas del mismo tipo con igual letra no difieren entre sí (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).

Con respecto al porcentaje de plántulas normales, en general los tratamientos térmicos de 0, 10 y 20 días no fueron adecuados, desde un punto de vista comercial, para superar el reposo de las semillas. Por el contrario, semillas sin almacenamiento previo con 40, 45 y 50 días de calor y semillas con almacenamiento previo calentadas por 30, 40 y 45 días alcanzaron porcentajes de plántulas normales superiores ( $p \leq 0.05$ ) que variaron entre 85 y 90%.

En contraposición el tratamiento con almacenamiento previo y 50 días de calor, mostró una disminución significativa en el porcentaje de plántulas normales ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a los mejores tratamientos (Fig. 6). Lo que refuerza la posición de que el tratamiento térmico no debe realizarse indiscriminadamente y que debe considerarse el historial de la semilla.

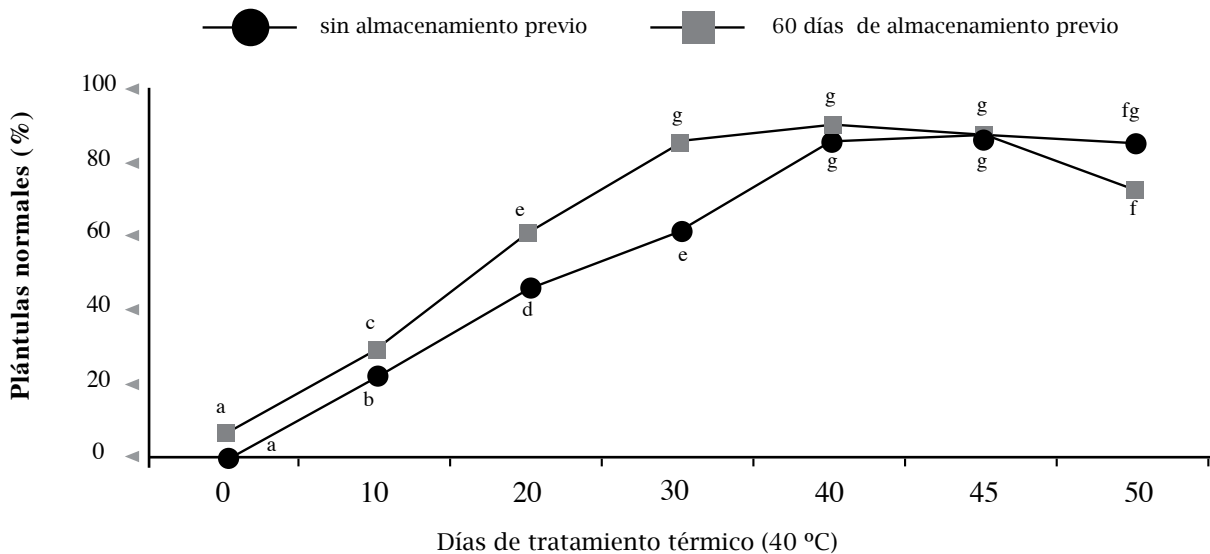


Fig. 6. Porcentaje de plántulas normales a los 7 y 28 días obtenidas de semillas sin y con 60 días de almacenamiento previo al calentamiento y luego sometidas a diferentes combinaciones de tratamientos térmicos y de almacenamiento posterior. Números con igual letra no difieren entre sí (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).

### Tercer experimento

En este experimento se evaluaron periodos de almacenamiento mayores a 60 días previos al tratamiento de calor. Se corroboró el efecto positivo ( $p \leq 0.01$ ) del almacenamiento previo en combinación con el calentamiento, ya que en las tres evaluaciones de germinación (7, 14 y 28 días), los mejores tratamientos fueron aquellos donde la duración del almacenamiento previo fue de 70, 80 o 90 días con periodos de calentamiento de 40, 30 y 20 días respectivamente. En todos los casos, el efecto fue similar en lo que se refiere a plántulas

normales (Fig. 7). De similar magnitud fue la germinación obtenida con los tratamientos de 50, 40 y 30 días de calor pero con cortos periodos de almacenamiento previo (0, 10 y 20 días), resultados que coinciden con lo observado en los experimentos anteriores.

Se observa que los tratamientos térmicos de 0 y 10 no son suficientes para superar el reposo (Figs. 5, 6 y 7), aún con almacenamientos previos tan prolongados como 100 o 110 días.

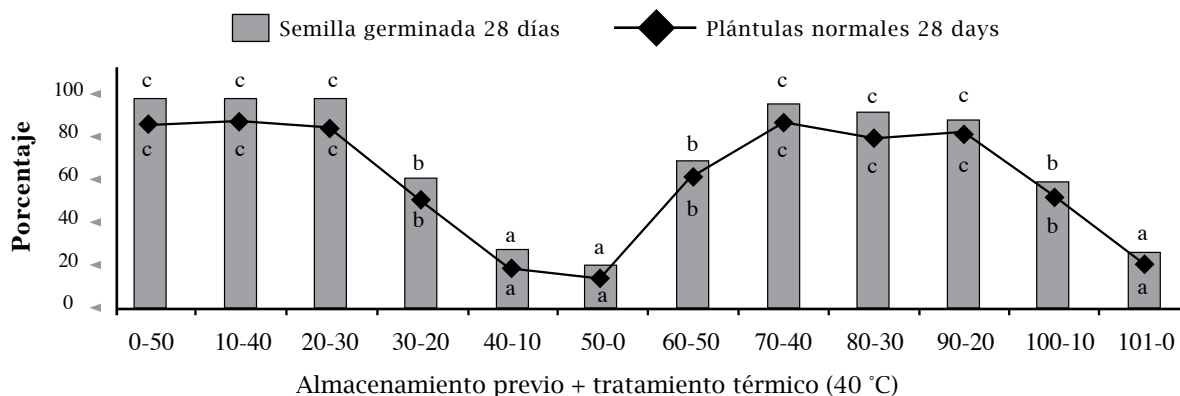


Fig. 7. Porcentaje de semillas germinadas y de plántulas normales a los 28 días en semillas con diferentes periodos de almacenamiento previo y luego sometidas a diferentes periodos de tratamiento térmico. Columnas y resultados con igual letra no difieren entre sí (Tukey:  $p \leq 0.05$ ).

Durante los experimentos, en general se observó una baja proporción de plántulas anormales (pérdida de geotropismo y plántulas raquílicas) y el porcentaje observado no se relacionó con ningún tratamiento en particular. También fue evidente que las semillas con la germinación más temprana (7 días) presentaron los porcentajes más bajos de plántulas anormales, especialmente cuando la germinación fue 85% o mayor. Las anomalías aumentaron en las semillas de más lenta germinación, lo cual posiblemente se relacione con el vigor de la semilla (Association of Official Seed Analysts 2002, Tekrony y Egli 1991).

El almacenamiento previo de las semillas (18-20 °C) luego de la cosecha contribuye a superar el reposo y permite entonces utilizar periodos de calentamiento más cortos para obtener altos porcentajes de germinación y de plántulas normales;

lo cual ahorra tiempo, facilita la entrega de semillas germinadas a los clientes y garantiza un mayor porcentaje de plantas normales luego de la siembra en el previvero.

Corrado y Wuidart (1990) obtuvieron una alta germinación en semilla de *Elaeis guineensis* luego de seis meses de almacenamiento y un tratamiento térmico de 80 días a 39 °C. Por el contrario, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la germinación puede verse afectada en forma negativa si se almacena la semilla por 50-60 días y luego se expone a un periodo de calentamiento (40°C) de 50 días, al menos en la variedad utilizada en estos experimentos. Una respuesta similar fue obtenida por Beugré et al. (2009), quienes determinaron un efecto negativo del tratamiento térmico sobre la germinación de semillas de *E. guineensis* conforme aumentó el tiempo de almacenamiento.

Myint et al. (2010) determinaron que la remoción del opérculo en semillas de *E. guineensis* produjo porcentajes de germinación mayores de 80% y comparables con los obtenidos con la aplicación de calor seco, mientras que Jiménez et al. 2008 midieron una importante reducción en la concentración de ácido abscísico posterior al tratamiento térmico, lo que sugiere que la

latencia en esta especie es un fenómeno físico y fisiológico. También es posible que semillas de diferentes genotipos (Beugré et al. 2009), de diversas latitudes, e incluso de diferentes períodos de cosecha puedan comportarse de manera diferente ante un determinado tratamiento de calor para romper su latencia.

## Literatura citada

- Addae-Kagyah K. A., Osafo D. M., Olympio N. S., Atubra O. K. (1988). Effect of seed storage, heat pre-treatment and its duration on germination and growth of nursery stock of the idolatrica palm, *Elaeis guineensis* var *idolatrica* (Chevalier). *Trop. Agric. (Trinidad)* 65: 77-83
- Adkins S., Bellairs S., Loch D. 2002. Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. *Euphytica* 126: 13-20
- Association of Official Seed Analysts (AOSA). (2002). Seed Vigor Testing Handbook. Contribution No. 32. Association of Official Seed Analysts. New Mexico 88003
- Baskin C.C., Baskin J. M. (1998). Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, San Diego, 666p
- Bethke, P., Gubler, F., Jacobsen J., Rusell J. 2004. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* 219(5): 847-855
- Beugré-Manéhonon M., Kouakou-Kouakou L., Bognonkpé J.P., Konan- Kouakou, E., Kouakou-Tanoh H., Kouadio-Yatty J. (2009). *African J. of Agric. Res.* 4(10):931-937
- Corrado F., Wuidart W. (1990). Germination des graines de palmier à huile (*Elaeis guineensis*) en sac de polyéthylène. Méthode par "chaleur sèche" *Oléagineux* 45 (11) : 511-518
- Ellis R. H., Hong, T. D., Roberts E. H. (1985). Handbook of seed technology for genebanks. Vol. II: Compendium of specific germination information and test recommendations, International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 456 p
- Hacker J. B., Andrew M. H., McIvor J. G., Mott J. J. 1984. Evaluation in contrasting climates of dormancy characteristics of seed of *Digitaria milanjiana*. *J. of Applied Ecology* 21(3): 961-969
- Herrera J., Alizaga R., Guevara E. (1998). Use of chemical treatments to induce seed germination in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *ASD Oil Palm Papers* 18: 1-1
- Hussey G. (1958). An analysis of the factors controlling the germination of the seed of oil palm, *Elaeis guineensis* (jacq.). *Annals of Bot.* 22:259-284
- Jiménez, V., Guevara, E., Herrera, J., Alizaga, R., Bangerth F. (2008). Changes in hormone concentrations during dormancy release of oil palm (*Elaeis guineensis*) seeds. *Seed Science and Technology* 6(3): 575-587
- Mok C. K. and Hor Y. L. (1977). The storage of oil palm (*Elaeis guineensis*) seed after high temperature treatment. *Seed Science and Technology* 5: 499-508
- Murugesan P., Mathur R. K., Pillai R. S. and Babu M. K. (2005). Effect of accelerated aging on seed germination of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.). *Seed Technology* 27(1): 108-112
- Murugesan, P., Bijimol G. and Haseela H. 2008. Effect of different substrates on growth of germinated oil palm hybrids seeds. *Indian J. of Hort.* 65(4)
- Myint, T., Chanprasert W., Srikul S. Germination of seed of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as affected by different mechanical scarification methods. *Seed Sci. and Tech.* 38 (3): 635-645
- Rees A. R. (1959). Germination of oil palm seed: large scale germination. *J. of West African Inst. for Oil Palm Res.* 3:76-82
- Tekrony D. M., Egli D. B. (1991). Relationship of seed vigor to crop yield: A Review. *Crop Sci.* 31:816-822
- Tiwari, C.; Sharma, S.; Verma, R. 2004. Effect of fungicide and plant growth hormones on germination of teak (*Tectona grandis*). *J. of Trop. Forest Sci.* 16:25-34
- Tomlinson P. B. (1990). The structural biology of palms. Oxford University Press, New York. 477 pp
- Zambrano R. 1991. Influencia de períodos de almacenamiento y calentamiento sobre la germinación de semilla de palma africana. Tesis de grado. Fac. Ing. Agron. Universidad Técnica de Manabí (Ecuador). 70 p

# Recovery of low-grade (weak) oil palm *ramets* during the hardening period: use of anti-stress products and antagonist and symbiotic microorganisms

Paula Gadea<sup>1</sup>, Carlos Chinchilla<sup>2</sup>, Nidia Guzmán<sup>3</sup>

## Abstract

Several anti-stress products and microorganisms were used in an attempt to increase the survival rate of oil palm *ramets* showing suboptimal development when they were removed from the tissue culture laboratory. Most *ramets* with suboptimal growth in the laboratory may die prematurely when taken to ex vitro conditions, since they dehydrate and are unable to form a robust root system. Additionally, many of them may succumb to attack from soil-dwelling pathogens causing damping-off. However, considering that the desired genes of superior palms (*ortets*) are still present, attempts to recover a portion of such ramets were considered worthwhile.

Products tested were sucrose (table sugar), a brassinosteroid (phytohormone), two anti-transpirant agents (Vapor Gard® 98% pinolene and Frutiber®), hydrogenated triacylglycerol), the fungus *Trichoderma* spp. (as an antagonistic organism) and two commercial mycorrhizal fungi (Ecomic® and Ecofungi®). Drenching the planting substrate with the fungicide Banrot was used as a control to eliminate soil-dwelling pathogens. Treatments were applied on *ramets* of three compact clones that were considered to have a suboptimal vegetative growth for commercialization.

The survival rate of treated *ramets* of two clones (Fran and Conte) did not increase when compared with the control, but in Zeus, survival rate improved with the application of sucrose, Frutiber 10% and Banrot. Leaf turgidity improved in plants treated with *Trichoderma* fungi and when the fungicide Banrot was used to drench the planting substrate. *Trichoderma* spp. increased by 20% the number of turgid plants in Fran. The use of Banrot, Ecomic, *Trichoderma* spp. and Ecofungi was associated with an increase in leaf emission rate in Fran clones, but for Zeus the best results were obtained with sucrose 10% and Vapor Gard (1.25%). The many inconsistencies found in the responses to the different treatments seem to indicate that there were other factors that had a stronger influence on determining the response of the vitro plants during the acclimatization process. *Ramet* quality, particularly in terms of the development of the root system (and basal bulb) when removed from the tissue culture laboratory, seemed to be a determining factor during acclimatization, and as such, it cannot be obviated by applying any of the treatments used, whether anti-stress products or microorganisms.

**Key words:** *ramet*, acclimatization, anti-stressing agent, mycorrhiza

<sup>1</sup> M.Sc. student. Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica

<sup>2</sup> Consultant for ASD Costa Rica, cmlchinchilla@asd-cr.com

<sup>3</sup> ASD de Costa Rica, n.guzman@asd-cr.com

## Introduction

Plants developed in vitro (known as *ramets* in oil palm) suffer severe stress while trying to readapt their physiology and anatomy from a heterotrophic (tissue culture laboratory) to an autotrophic condition during the acclimatization process (Serret and Trillas 2000, Schultz 2001). During this period, some *ramets* succumb to dehydration or are killed by soil-dwelling pathogens, and this problem is more common in *ramets* presenting suboptimal development, particularly a poor root system or a thin stem (basal bulb). Besides this, micro propagation is done under aseptic conditions, where both beneficial and harmful microorganisms are excluded.

There are many products that are used to increase survival of stressed plants (anti-transpirants,

phytohormones, plant extracts, etc.) and to reduce losses caused by soil-dwelling pathogens by inoculating the soil with beneficial (mycorrhizae) or antagonistic (*Trichoderma* spp.) organisms (Chaves M. et al. 1985, Nuñez M. and Rodríguez C. 2000, Schultz C. 2001). Sucrose (table sugar) is not a true anti-transpirant; it is an osmotically active substance that promotes water uptake, serving as an anti-stressing product. True anti-transpirants act by forming a film on leaf surfaces reducing water loss (Chaves et al. 1985).

Considering the cost of producing vitro plants and that valuable genes are still present in each *ramet*, it was considered important to try to increase the survival rate during the hardening process by treating the *ramets* with the above mentioned products, regardless of their aspect.

## Materials and Methods

The work was done in the Coto locality on the Pacific coast of Costa Rica in 2006. Average temperature during the period was 26 °C (max. 33, min. 22.7 °C) and relative humidity was 91%.

*Ramets* of three (Fran, Conte and Zeus) compact clones (Alvarado et al. 2006) produced in the tissue culture laboratory of ASD Costa Rica were acclimatized following the standard procedure at that time. To start the acclimatization process, the ramets were planted in black polyethylene bags containing a loam soil as a substrate, and placed under shade (saran fabric, 70%) within a plastic chamber (relative humidity > 90%). The acclimatization chamber and the shade were gradually removed to expose the plants to lower relative humidity and to increase the light intensity reaching the plants. During this period, temperature, nutrition and the substrate (aeration) were carefully monitored to maintain them within determined ranges.

Previous experiences with these three clones had shown that low survival rates during acclimatization had several causes and treatments were chosen accordingly. Mycorrhizal products (Ecomic® and

Ecofungi®), the antagonistic fungi *Trichoderma* sp. and a plant extract (Bromorex®) were used on the Fran clone, considered very susceptible to damping-off. Ecomic® and Ecofungi® are commercial products containing the mycorrhizal fungi *Glomus fasciculatum* and a mixture of *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices* and *Glomus mosseae* respectively.

Ecomic® and Ecofungi® were also used on the Conte clone, which had problems in establishing a functional root system after planting. These products were used at doses of 1.0, 2.5 and 5.0 g/plant (Ecomic®), and 0.1, 0.2 and 0.4 g/plant (Ecofungi®) applied on the substrate before planting the *ramets*. The fungicide Banrot was used as a control, applied as a soil drench. Anti-transpirants (Vapor Gard®, 98% pinolene and Frutiber®, hydrogenated triacylglycerol) and anti-stress products (table sugar, 10% p/v and the phytohormone brassinosteroid, 2 ppm) were applied on the clone Zeus, where losses were due mainly to desiccation. Vapor Gard® was used at 1.0, 2.5 and 5% (v/v) and Frutiber® at 10, 12.5 and 15% (v/v). The *ramets* were submerged for 20 seconds in a water solution containing the product. Other details of the treatments appear in Table 1.

## Data processing

Treatments and doses were treated as independent variables. Dependent variables were *ramet* survival rate, plant quality expressed as turgidity (determined at 15, 33 and 45 days after planting), time taken for 50% of the plants to produce the first fully developed leaf after planting, and total number of leaves at the end of the hardening period.

Treatments were arranged in a complete randomized block design with six replications of 10 plants each per treatment. Means of number of leaves per plant were separated using LSD-Fisher, 5% (Infostat ver. 1.0). The variables with binomial and multinomial distributions (survival rate and turgidity) were analyzed using contrasts (logistic regression test, type 3 of Chi<sup>2</sup> (SAS ver. 9.1)).

## Results

### Survival

There were no statistical differences in survival rate between treatments at the end of the hardening period for the clones Fran (Fig.1a) and Conte (Fig.1b).

For the clone Zeus, there was a better survival rate when sucrose and Frutiber 10% were used, but still, results were not considered conclusive (Fig.1c).

Table 1. Details of treatments applied to clone Fran *ramets*, which were known for their susceptibility to soil-borne pathogens during the hardening period

Treatments	Doses	Time of application	Form of application
<i>Trichoderma sp</i>	2.8 g/plant: 1x10 <sup>7</sup> spores/g	7 days before planting	Soil <sup>1</sup>
		At planting	Root immersion
		7 days after planting	Soil <sup>1</sup>
<b>Ecomic</b> <sup>®</sup> ( <i>Glomus fasciculatum</i> )	2.5 g/plant	At planting	At bottom of planting hole
<b>Ecofungi</b> <sup>®</sup> ( <i>Glomus aggregatum</i> , <i>Glomus intraradices</i> and <i>Glomus mosseae</i> )	0.2 g/plant	At planting	Immersion of roots
<b>Bromorex</b> <sup>®</sup> (oily plant extract: pepper, mustard, garlic)	2,5 cc/l	One day before planting 7 days post planting	Soil <sup>1</sup>
<b>Control: Banrot</b> <sup>®</sup> (etridiazol 15%, methylthiofanate 25%)	0,8g/l	2-3 days before planting	

### Turgidity

Ramet turgidity was classified into three categories: normal (plants erect, hydrated and with no signs of flaccidity), intermediate, and not turgid (wilted) (Fig. 2). In general, the use of the fungus *Trichoderma* sp. improved the appearance (turgidity) of ramets of the clone Fran (Fig. 3). However, the clone Conte seemed to

respond better to some doses of Ecofungi while Zeus performance was better in the control plants treated with the fungicide Banrot. At the end of the experiments it was clear that neither the mycorrhizal treatments nor the anti-transpirants used improved ramet performance.

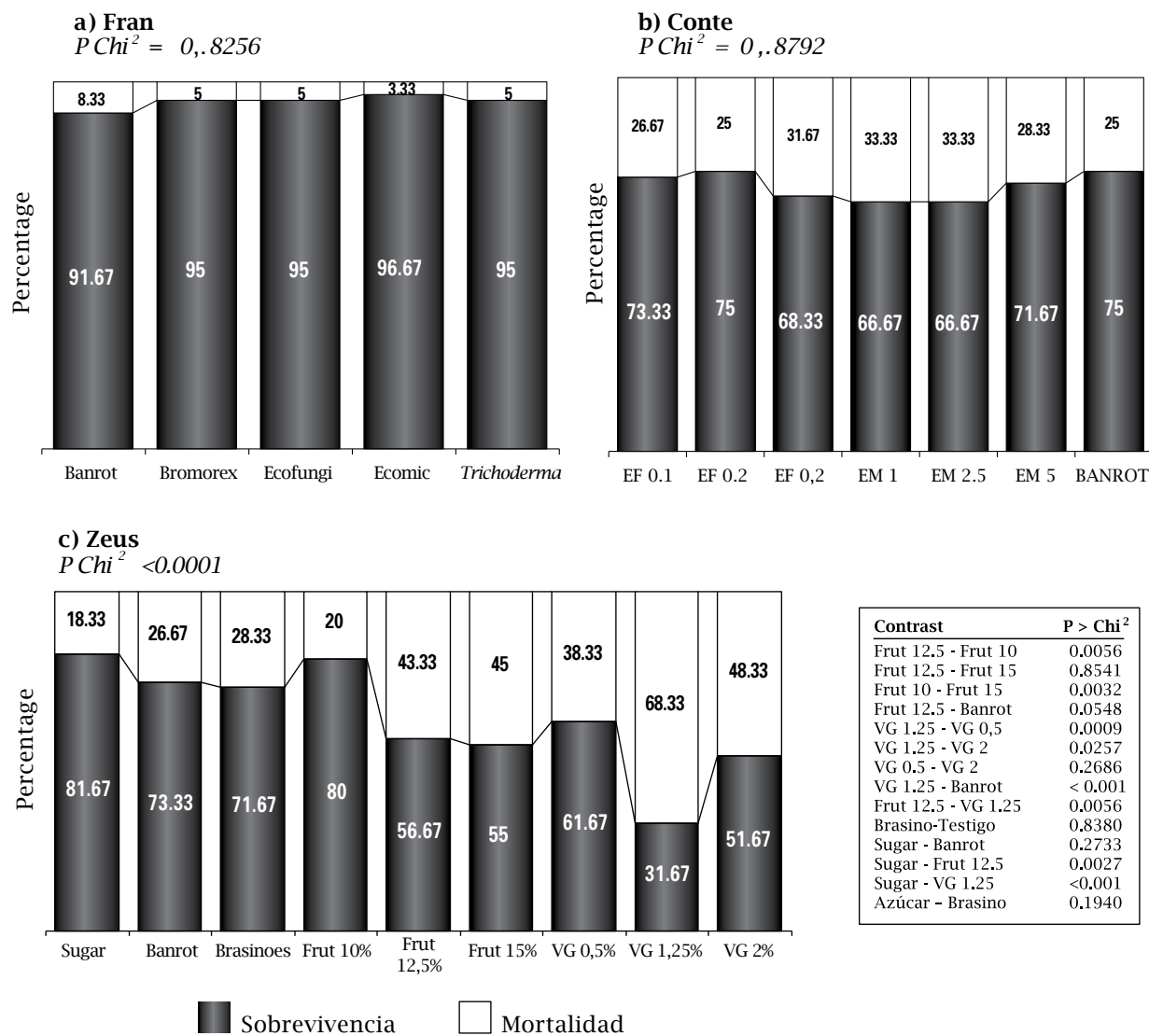


Fig.1. Contrast tests (logistic regression), survival (%) and accumulated mortality at the end of the hardening period for the clones Fran (a), Conte (b) and Zeus (c), n=60.



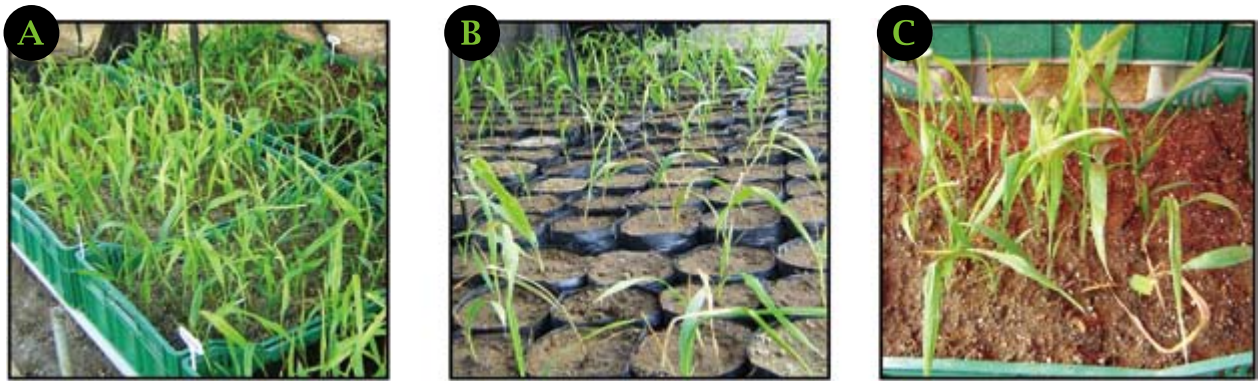


Fig. 2. Aspect (turgidity) of oil palm ramets: A. normal, B. intermediate, C. wilted.

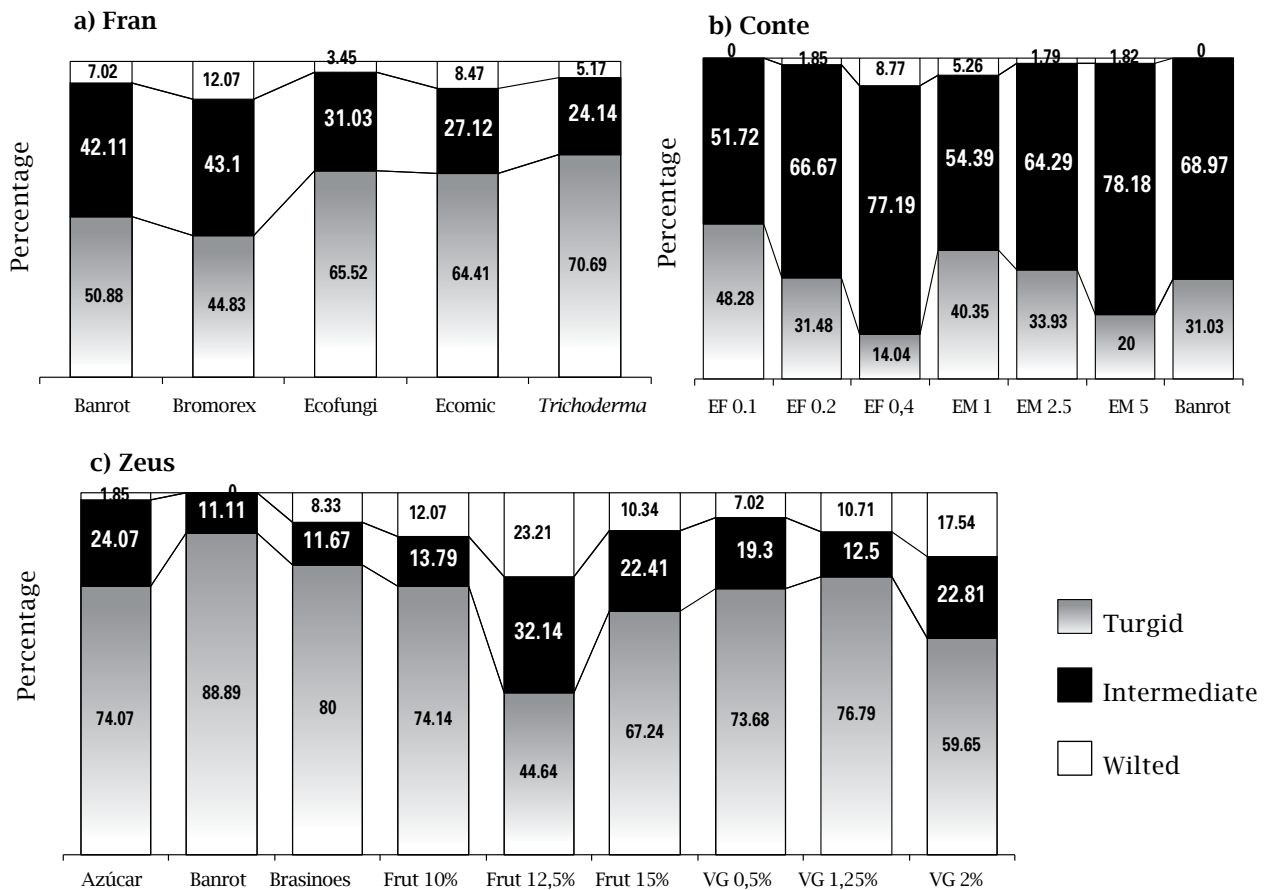


Fig. 3. Aspects (turgidity) of the ramets of three clones 45 days after planting. Ramets were exposed to several treatments to improve survival and quality during the hardening process.

## New leaves produced after planting

Th50 (time taken for 50% of *ramets* to produce the first fully developed leaf) was similar in all three clones studied. For Zeus and Fran this period was 95 and 91 days respectively. Conte had a poor aspect at the end of the hardening period, so no data were collected for this clone.

There were no differences due to treatments with respect to total number of new leaves produced after planting, but there was a tendency for improvement when sucrose and VG were used on Zeus, and *Trichoderma* and Ecofungi on Fran (Fig. 4).

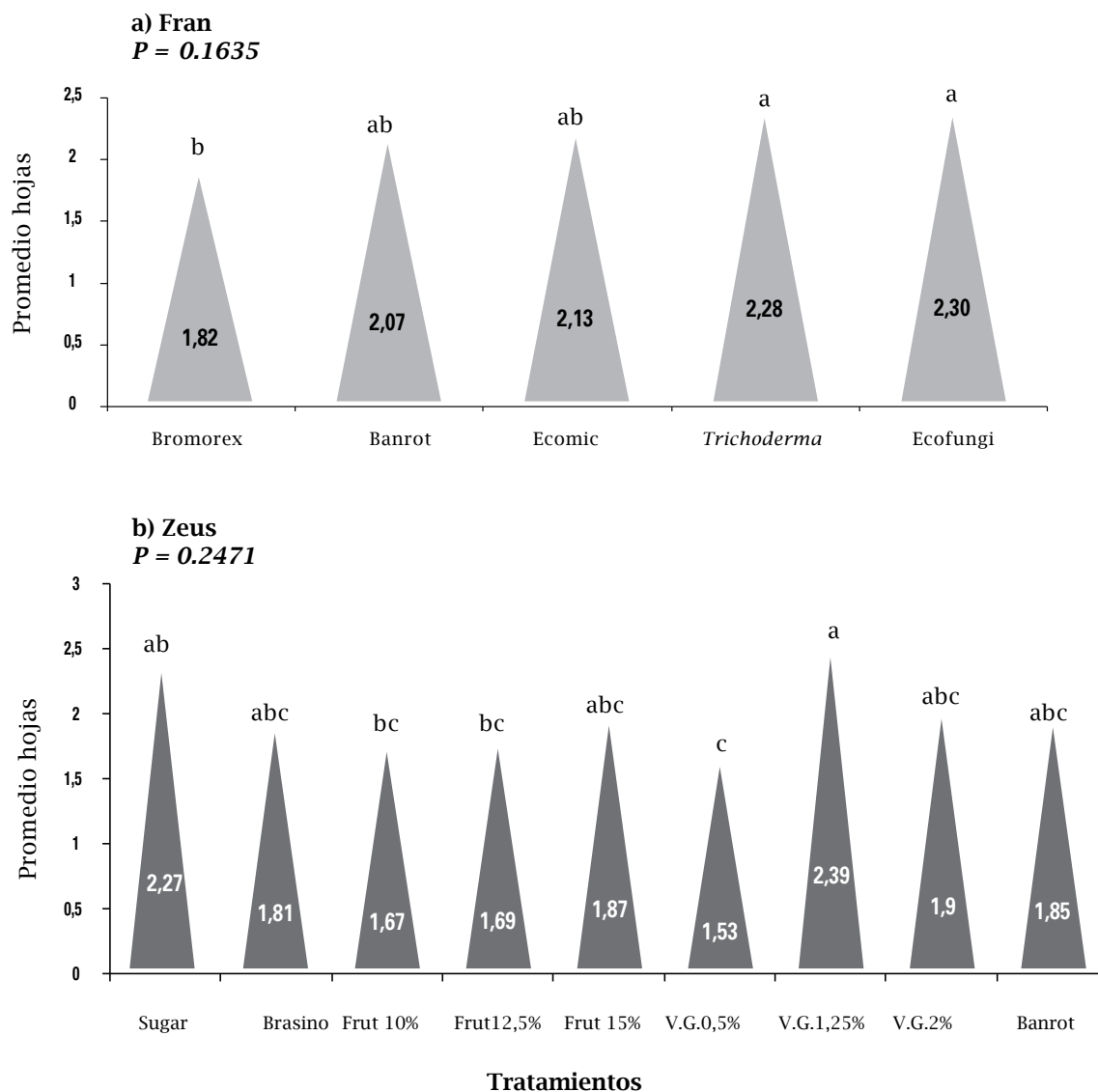


Fig. 4. New leaves produced during the hardening process in three clones according to several treatments aimed to improve survival rate. LSD Fisher (5%). n=60.

## Conclusions

Several treatments were applied to oil palm *ramets* that were considered to have suboptimal quality for commercial use when they left the tissue culture laboratory. The main objections to these *ramets* were the amount (few) and appearance of the root system (color). Besides this, these plantlets showed a thin basal bulb. It was known that when *ramets* like these were put into the acclimatization chamber, they normally had poor survival rates or produced under-developed plants at the end of the prenursery phase. Most losses were normally due to desiccation and/or the attack of soil-borne pathogens. However, theoretically these plants still carry the desired traits of the *ortet* (superior palm) from which they were obtained, and attempts to recover some of them through the application of a particular treatment were considered worthwhile.

The results showed that there could be no compromise with *ramet* quality, since this was a crucial aspect for guaranteeing the successful establishment of the plantlets during the hardening process.

*Ramets* showing underdeveloped root systems or aerial parts were more susceptible to desiccation or to suffering attacks by soil-borne pathogens during acclimatization. The attempts to improve performance during the hardening of such *ramets* through the application of a “recovery” treatment such as anti-transpirants, mycorrhizae, sucrose, or fungi like *Trichoderma* did not achieve conclusive results.

Nevertheless, it may still be possible to obtain a better response in these suboptimal *ramets* by applying other treatments or even changing the way such treatments are applied. For example, the anti-transpirants lose effectiveness over time (Chavez et al. 1985) and it is possible that they lost their protective action after some time considering that the hardening period is quite long. Products such as sucrose and the fungus *Trichoderma* may have some potential to improve *ramet* performance during acclimatization.

## Literature

- Chaves S., Hernández B., Gutiérrez Z. 1985. Efecto de antitranspirantes y azúcar utilizados en el trasplante de cafetos en raíz desnuda. *Agronomía Costarricense* 9 (1):71-78.
- Guzmán N., Peralta F. 2010. Advances in tissue culture propagation of compact oil palm clones in Costa Rica. *ASD Oil Palm Papers (Costa Rica)*. 35:1-12
- Núñez M., Robaina C. 2000. Brasinoesteroides: nuevos reguladores del crecimiento vegetal con amplias perspectivas para la agricultura. Ed. MA Teixeira Zullo. (Documentos Instituto Agronómico Campinas, nº 68). Campinas, BR. 83 p.
- Schultz C. 2001. Effect of vesicular arbuscular mycorrhiza on survival and post vitro development of micropropagated oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.). Tesis Ph. D. Fakultät für Agrarwissenschaften, Universität Göttingen. GER. 151 p.
- Serret M., Trillas M. 2000. Effect of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultured *in vitro*. *Int. J. Plant. Sci.* 161: 281-289.

# Rescate de *ramets* de palma aceitera con desarrollo subóptimo durante el periodo de endurecimiento: uso de antitranspirantes y microorganismos simbióticos y antagonistas

Paula Gadea<sup>1</sup>, Carlos Chinchilla<sup>2</sup>, Nidia Guzmán<sup>3</sup>

## Resumen

Se probaron varios productos anti-estrés y microorganismos benéficos en un intento para aumentar la tasa de sobrevivencia de *ramets* de palma aceitera que mostraban un desarrollo subóptimo al salir del laboratorio de cultivo de tejidos. Estos *ramets* tienen una alta tasa de mortalidad o bien producen plantas de poca calidad durante el periodo de aclimatación, dado que sufren fuerte desecación o son atacados por patógenos habitantes del suelo. No obstante, si se considera que estos *ramets* también llevan consigo los genes deseables de la planta superior (*ortet*) de donde se originaron, es justificable intentar recuperar una proporción mayor de estas plantas al final del periodo de endurecimiento.

Con este fin en mente, se probó sacarosa, un brasinosteroide (phytohormone), dos antitranspirantes (Vapor Gard®, 98% pinolene y Frutiber®: triacilglicerol hydrogenado), el hongo *Trichoderma* spp. (antagónico) y dos formulaciones comerciales de micorrizas (Ecomic® y Ecofungi®).

Se utilizó un 'drench' con el fungicida Banrot aplicado al sustrato de siembra como tratamiento testigo para eliminar los hongos patógenos en el suelo. Los tratamientos fueron aplicados sobre *ramets* de tres clones compactos, los cuales presentaban un desarrollo considerado subóptimo al salir del laboratorio.

La sobrevivencia durante la aclimatización de los clones Fran y Conte no fue mayor que en el control, pero en Zeus mejoró con la aplicación de azúcar, Frutiber 10% y Banrot. La turgencia de las hojas mejoró en las plantas tratadas con el hongo *Trichoderma* y cuando se utilizó el fungicida Banrot. El uso de *Trichoderma* spp. se asoció con un incremento de 20% en el número de plantas turgentes en el clon Fran al final del periodo de aclimatación. El fungicida Banrot, Ecomic, *Trichoderma* spp y Ecofungi se asoció con un aumento en la tasa de emisión foliar en Fran. No obstante, en el clon Zeus, los mejores resultados fueron con sacarosa al 10% y Vapor Gard a 1.25%.

Las muchas e importantes inconsistencias observadas en la respuesta a los tratamientos usados parecen indicar que existieron otros factores que tuvieron una influencia muy notoria sobre la habilidad de los *ramets* de superar con éxito la etapa de endurecimiento luego de abandonar las condiciones de laboratorio. En particular, la calidad de *ramet*, definida por la cantidad y apariencia del sistema radical (y posiblemente en menor grado por el grosor del bulbo) parecen haber sido los factores determinantes en el desempeño de la planta, de manera que no puede haber compromiso con este factor.

**Palabras clave:** *ramet*, aclimatización, endurecimiento, agentes antiestresantes, organismos benéficos, micorrizas

<sup>1</sup> M.Sc. student. Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica

<sup>2</sup> Consultant for ASD Costa Rica, cmlchinchilla@asd-cr.com

<sup>3</sup> ASD de Costa Rica, n.guzman@asd-cr.com

## Introducción

Las vitroplantas, conocidas como *ramets* en palma aceitera, sufren un fuerte estrés mientras tratan de readaptar su fisiología y anatomía desde una condición heterotrófica (en el laboratorio de cultivo de tejidos) hacia una autotrófica durante el periodo de endurecimiento (Serret y Trillas 2000, Schultz 2001). Durante este periodo, algunos *ramets* se deshidratan o bien son atacados por patógenos habitantes del suelo, y este problema es más frecuente en aquellos *ramets* con un desarrollo del sistema radical considerado subóptimo, y en menor grado del bulbo o base. Adicionalmente, el *ramet* es formado en el laboratorio en un ambiente aséptico, en donde se excluyen microorganismos, tanto beneficiosos como patogénicos.

En el mercado se encuentran varios productos que son utilizados para incrementar la sobrevivencia de plantas estresadas (antitranspirantes, fitohormonas, extractos de plantas etc.). También se ha tratado de reducir la mortalidad causada por patógenos en

el suelo aplicando organismos benéficos como micorrizas y antagonistas como *Trichoderma* spp. (Chaves M. et al. 1985, Nuñez M. y Rodríguez C. 2000, Schultz C. 2001). El azúcar de mesa (sacarosa), no es verdadero antitranspirante, sino un agente antiestresante, puesto que es osmóticamente activa y promueve la toma de agua. Los verdaderos antitranspirantes, forman una película sobre la superficie de la hoja que reduce la pérdida de agua (Chaves et al. 1985).

Si se considera que el costo de producir una vitroplanta es alto comparado con la semilla sexual y que todas las plantas provenientes de una planta superior (*ortet*) llevan los genes deseables independientemente de su aspecto, es importante entonces intentar recuperar la mayor proporción de los *ramets* para ser utilizados en siembras comerciales. En este trabajo se siguió esta idea, para lo cual se aplicaron varios tratamientos sobre *ramets* que presentaban un desarrollo físico considerado por debajo del óptimo.

## Materiales y Metodos

El estudio fue realizado en la localidad de Coto en el Pacífico sur de Costa Rica durante el 2006. La temperatura promedio durante este periodo fue de 26 °C (Max. 33, Min. 22.7 °C) y la humedad relativa de 91%.

Se utilizaron *ramets* de tres clones compactos (Fran, Conte y Zeus) producidos en el laboratorio de tejidos de ASD Costa Rica (Alvarado et al. 2006), los cuales fueron endurecidos siguiendo el protocolo estándar de la compañía en ese momento. En general, el procedimiento consistió en sembrar los *ramets* en bolsas de polietileno negras llenas con suelo franco arenoso y ponerlos en cámaras húmedas construidas con plástico transparente para mantener una alta humedad relativa. Estas estructuras a su vez, se construyeron bajo otra que sostenía una sombra de sarán de 70%. La cámara húmeda y la sombra fueron removidas gradualmente para permitir la exposición de los *ramets* a las condiciones externas. Durante el periodo de aclimatización, las condiciones de temperatura, humedad relativa y nutrición

de las plantas fueron mantenidas dentro de los parámetros establecidos.

Experiencias previas con estos tres clones indicaban que su sobrevivencia al periodo de endurecimiento era baja, lo cual se podía deber a diferentes razones, por lo cual los tratamientos aplicados se escogieron tomando esto en consideración. Los productos con micorrizas (Ecomic® y Ecofungi®), el hongo antagonista *Trichoderma* sp. y un extracto de plantas (Bromorex®) se usaron en el clon Fran, el cual había mostrado mucha susceptibilidad a los hongos del suelo causantes del mal del talluelo (dumping-off). Ecomic® y Ecofungi® son productos comerciales que contienen el hongo *Glomus fasciculatum* y una mezcla de *G. aggregatum*, *G. intraradices* y *G. mosseae* respectivamente.

Ecomic® y Ecofungi® también se usaron en el clon Conte, el cual había tenido problemas para establecer

un sistema radical funcional durante la aclimatización. Estos productos se usaron con dosis de 1.0, 2.5 y 5.0 g/planta (Ecomic®), y de 0.1, 0.2 y 0.4 g/planta (Ecofungi®), aplicados sobre el sustrato antes de la siembra. El fungicida Banrot se usó como tratamiento testigo aplicado como 'drench' al sustrato.

Los antitranspirantes Vapor Gard® (98% pinoleno) y Frutiber® (triglicerol hidrogenado) y otros productos

### Análisis de la información

Los tratamientos y las dosis se consideraron las variables independientes y las dependientes fueron la tasa de sobrevivencia de los *ramets*, la calidad de la planta obtenida expresada por su turgencia (determinada a los 15, 33 y 45 días después de la siembra), el tiempo transcurrido para que 50% de las plantas emitieran la primera hoja totalmente desarrollada y el número total de hojas producidas al final del periodo de endurecimiento.

antiestrés (azúcar de mesa, 10% p/v y la fitohormona brasinosteroides, 2 ppm) se aplicaron en el clon Zeus, en donde las pérdidas durante el endurecimiento se asociaban principalmente a la desecación de las plantas. El Vapor Gard® se usó a 1.0, 2.5 y 5 % (v/v) y el Frutiber® a 10, 12.5 y 15% (v/v). Los *ramets* se sumergieron durante 20 segundos en una solución acuosa que contenía el producto. Otros detalles se muestran en el Cuadro 1.

Los tratamientos se arreglaron como un DBCA con seis repeticiones de 10 *ramets* cada una. Las medias del número de hojas por planta se separaron con LSD-Fisher, 5% (Infostat ver. 1.0). Las variables con distribución binomial y multinomial (tasa de sobrevivencia y turgencia) se analizaron usando contrastes (logistic regression test, type 3 of Chi<sup>2</sup> (SAS ver. 9.1).

## Resultados

### Sobrevivencia

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de sobrevivencia de los *ramets* de los clones Fran y Conte debidas a tratamientos (Fig.1).

En el caso del clon Zeus, se observó una mejora en la sobrevivencia cuando se utilizó azúcar de mesa y el Frutiber 10%.

Cuadro 1. Detalle de los tratamientos usados sobre *ramets* del clone Fran, conocido por su susceptibilidad al ataque de hongos patógenos habitantes del suelo durante la aclimatización

Tratamientos	Dosis	Tiempo de aplicación	Forma de aplicación
<i>Trichoderma sp</i>	2.8 g/planta: 1x10 <sup>7</sup> esporas/g	7 días antes de la siembra	Suelo <sup>1</sup>
		A la siembra	Inmersión de raíces
		7 días después de la siembra	Suelo <sup>1</sup>
<b>Ecomic®</b> ( <i>Glomus fasciculatum</i> )	2.5 g/planta	A la siembra	Al fondo del hoyo de siembra
<b>Ecofungi®</b> ( <i>Glomus aggregatum</i> , <i>Glomus intraradices</i> and <i>Glomus mosseae</i> )	0.2 g/planta	A la siembra	Inmersión de raíces
<b>Bromorex®</b> (extracto de plantas: pimienta, mostaza, ajo)	2,5 cc/l	Un día antes de la siembra 7 días después de la siembra	Suelo <sup>1</sup>
<b>Control: Banrot®</b> (etridiazol 15%, methylthiofanate 25%)	0,8g/l	2-3 días antes de la siembra	

## Turgencia

La turgencia de los *ramets* fue clasificada en tres categoría: normal (plantas erectas con tejidos hidratados sin señales de flacidez), intermedia y sin turgencia (flácidos) (Fig. 2). En general, el uso del hongo *Trichoderma* sp. mejoró la apariencia (turgencia) de los *ramets* del clon Fran (Fig. 3). No obstante, el clon Conte

pareció ser más favorecido con algunas de las dosis de Ecofungi, y el clon Zeus lució mejor en plantas en donde el sustrato había sido tratado con el fungicida Banrot. Al final de los experimentos fue claro que ni las micorrizas, ni los antitranspirantes mejoraron el desempeño de los *ramets* al final de periodo de aclimatación.

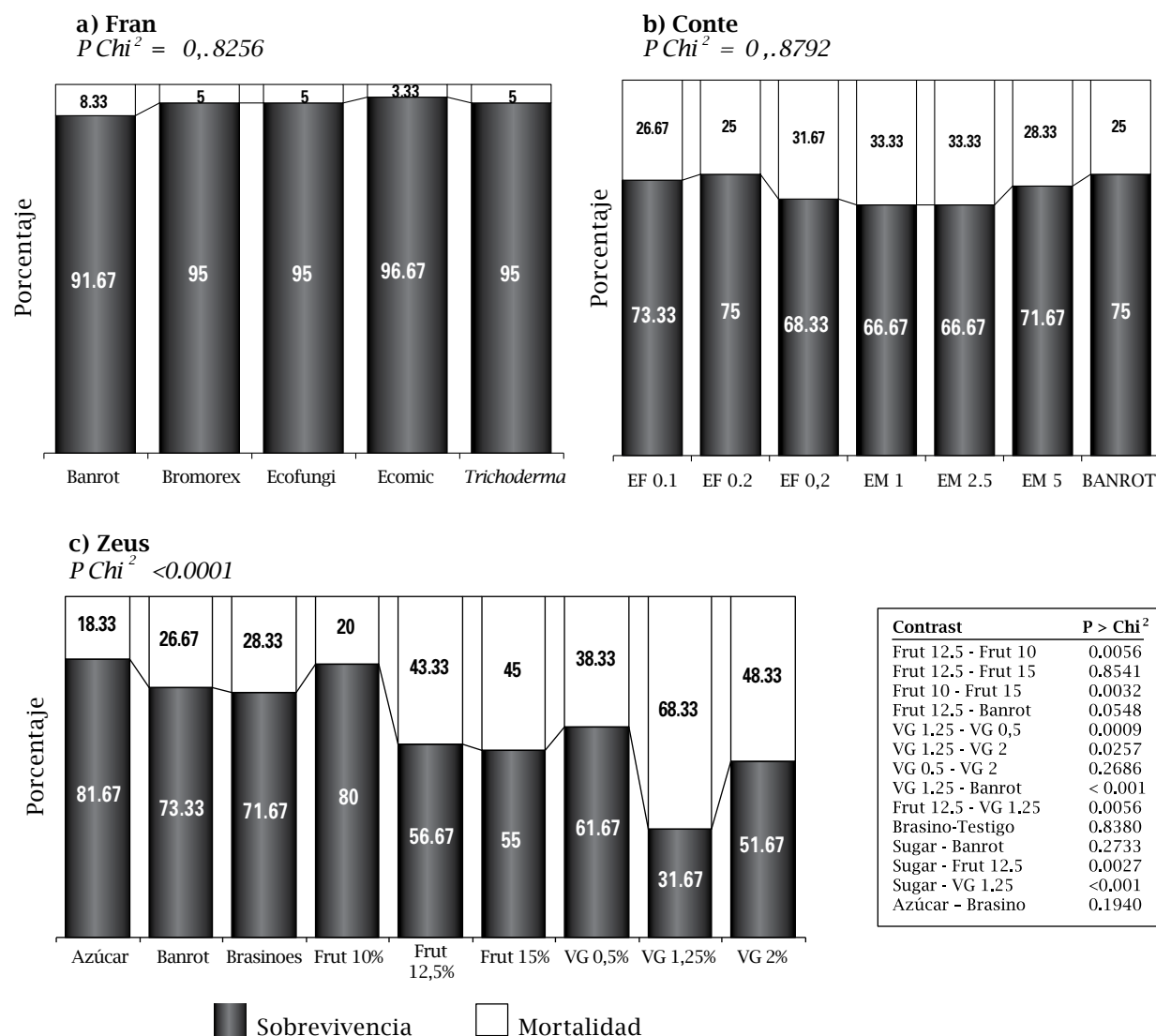


Fig.1. Prueba de contrastes (logistic regression). Sobrevivencia (%) y mortalidad acumulada al final del periodo de endurecimiento de los clones Fran (a), Conte (b) y Zeus (c), n=60.

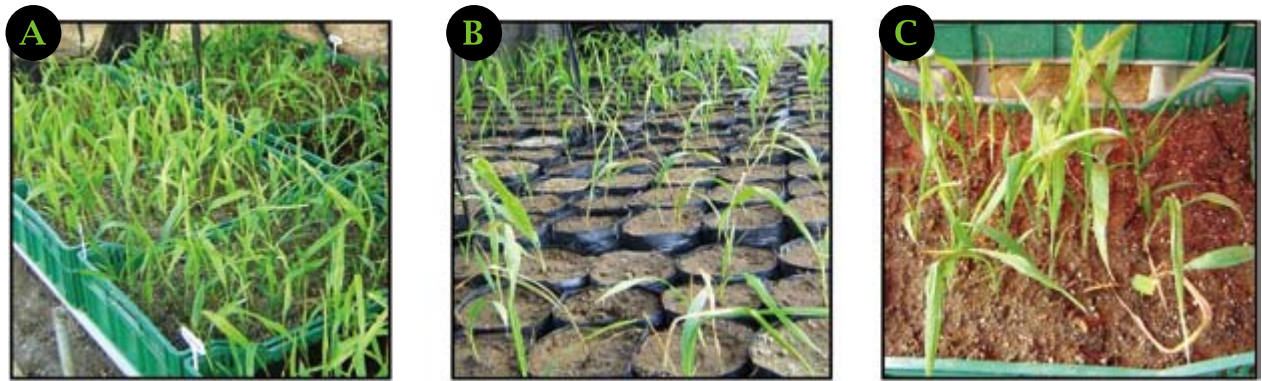


Fig. 2. Aspecto (turgencia) de los *ramets* A. normal, B. intermedio, C. sin turgencia

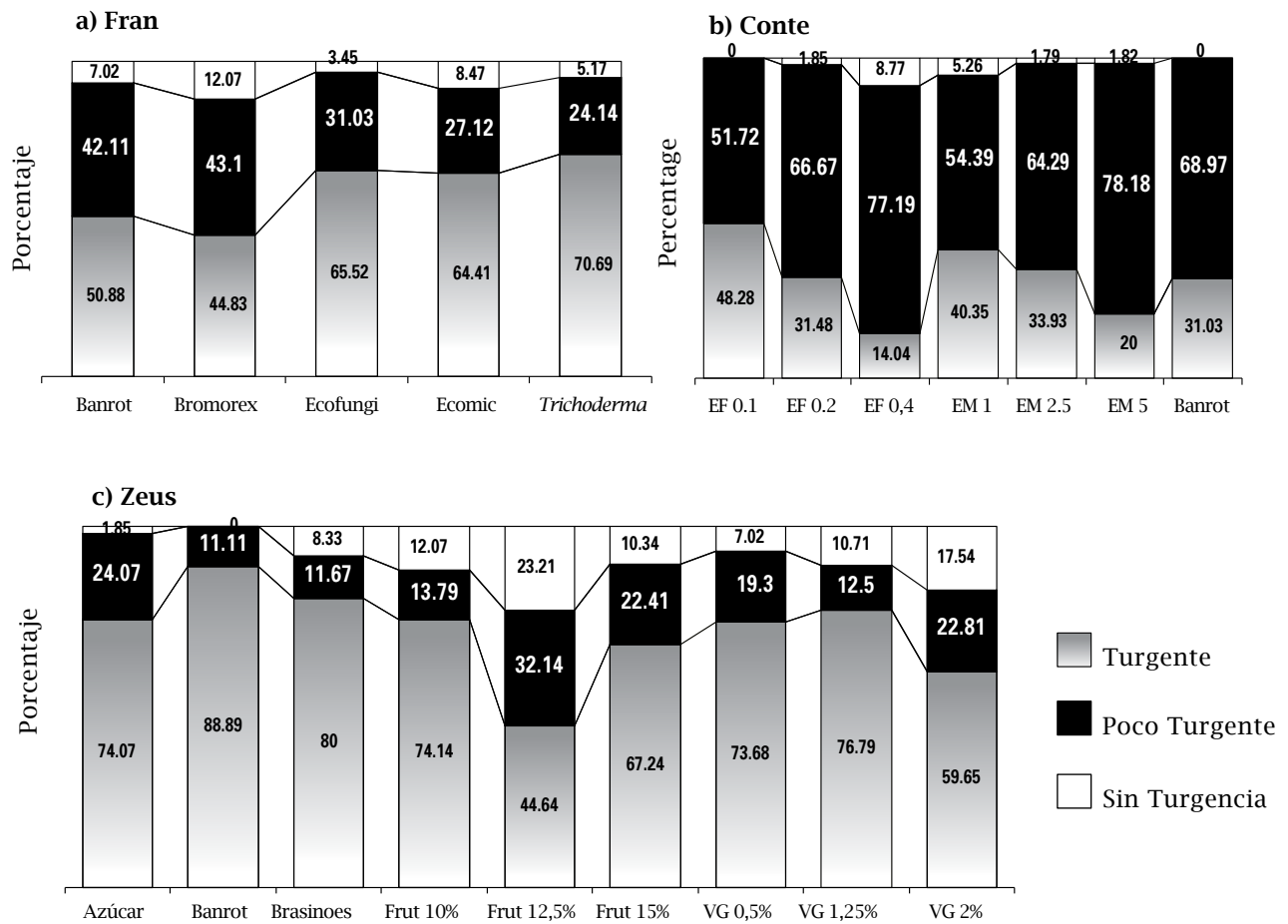


Fig. 3. Aspecto (turgencia) de los *ramets* de tres clones 45 días después de la siembra (periodo de endurecimiento). Los *ramets* fueron tratados con varias sustancias y microorganismos para mejorar la sobrevivencia y la calidad de las plantas



## Hojas nuevas producidas al final del endurecimiento

El Th50 (tiempo transcurrido para que 50% de las plantas de un clon determinado produjera la primera hoja totalmente formada) fue similar en los tres clones. Para Zeus y Fran, este periodo fue de 95 y 91 días. En el caso del clon Conte, esta variable no se determinó dado el pobre aspecto de la mayoría de las plantas al final del

endurecimiento. Tampoco se encontraron diferencias debidas a tratamientos para el total de hojas nuevas producidas durante el endurecimiento. Sin embargo, se puede destacar una tendencia a favor del azúcar de mesa y el VG en el clon Zeus y de *Trichoderma* y Ecofungi en Fran (Fig. 4).

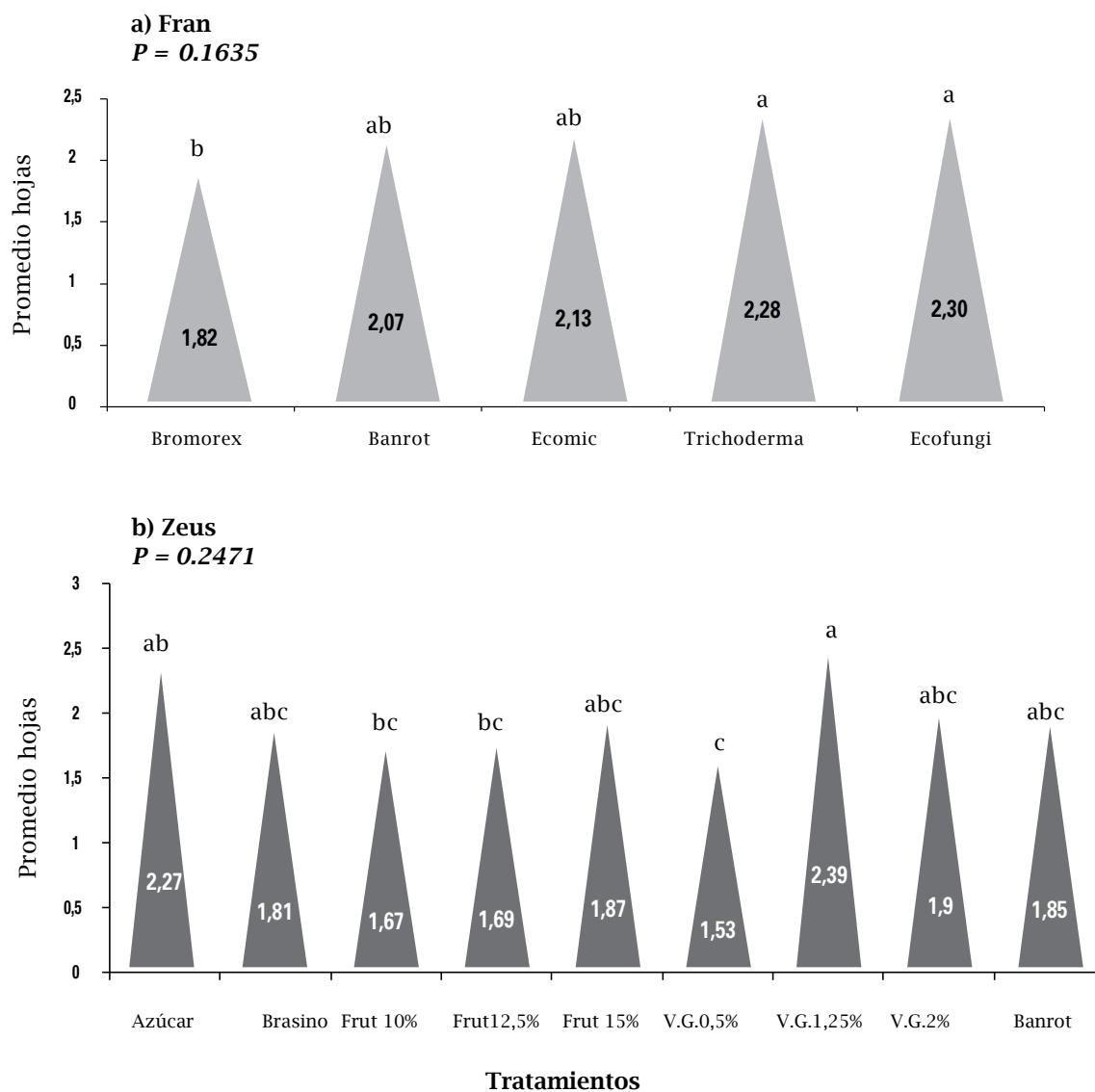


Fig. 4. Hojas nuevas producidas durante el periodo de endurecimiento de tres clones según varios tratamientos aplicados para mejorar su sobrevivencia y calidad. LSD Fisher (5%). n=60.

## Conclusiones

Se aplicaron varios productos y microorganismos benéficos en *ramets* de palma aceitera antes de someterlos al periodo de aclimatación con el objetivo de aumentar la sobrevivencia y mejorar la calidad de las plántulas obtenidas. Los *ramets* escogidos estaban por debajo del estándar de calidad acordado por el laboratorio, ya que presentaban pocas raíces o bien el color de las mismas no era satisfactorio. Además de esto, muchas de las plántulas presentaban un bulbo basal delgado. La experiencia previa con estos *ramets* era que tenían una baja tasa de sobrevivencia y muchas de las plantas que sobrevivían al endurecimiento no eran de buena calidad. La mayoría de las pérdidas se debían a desecación y al ataque de hongos patógenos habitantes del suelo. No obstante, en teoría, todos los *ramets* llevan consigo los genes deseables de la palma superior (*ortet*) de donde fueron tomados, por lo cual se justificaba realizar un intento por recuperar una proporción de tales plantas al final del endurecimiento.

Los resultados mostraron que no puede comprometerse la calidad del *ramet* que sale del laboratorio de cultivo de tejidos, puesto que este es un

aspecto crucial que determina la habilidad de la planta de superar la etapa de aclimatación y producir una planta de alta calidad para llevar a una siembra comercial.

Los intentos por mejorar el desempeño de un *ramet* de poca calidad (medida por la apariencia y cantidad de raíces y por el desarrollo de su bulbo) a través de la aplicación de productos como antitranspirantes o azúcar de mesa, o microorganismos benéficos (micorrizas o antagonistas) no fueron satisfactorios. No obstante, es posible que puedan obtenerse mejores resultados con otros productos (existe una amplia oferta en el mercado) o bien utilizando otras dosis y formas de aplicación. En el caso de los antitranspirantes, su efectividad se reduce con el tiempo y es posible que perdieran su acción protectora (Chávez et al. 1985) luego del largo periodo de endurecimiento que toma varias semanas. Por otro lado, algunos productos como el azúcar de mesa (sacarosa) y el hongo *Trichoderma* spp. pueden tener cierto potencial para mejorar el desempeño de los *ramets* comerciales durante el periodo de aclimatación.

## Literatura

- Chaves S., Hernández B., Gutiérrez Z. 1985. Efecto de antitranspirantes y azúcar utilizados en el trasplante de cafetos en raíz desnuda. *Agronomía Costarricense* 9 (1):71-78.
- Guzmán N., Peralta F. 2010. Advances in tissue culture propagation of compact oil palm clones in Costa Rica. *ASD Oil Palm Papers (Costa Rica)*. 35:1-12
- Núñez M., Robaina C. 2000. Brasinoesteroides: nuevos reguladores del crecimiento vegetal con amplias perspectivas para la agricultura. Ed. MA Teixeira Zullo. (Documentos Instituto Agronómico Campinas, n° 68). Campinas, BR. 83 p.
- Schultz C. 2001. Effect of vesicular arbuscular mycorrhiza on survival and post vitro development of micropropagated oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.). Tesis Ph. D. Fakultät für Agrarwissenschaften, Universität Göttingen. GER. 151 p.
- Serret M., Trillas M. 2000. Effect of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultured *in vitro*. *Int. J. Plant. Sci.* 161: 281-289.



---

Ph.(506) 2284-1120 / 2257-2666 · Fax (506) 2257-2667 · E-mail: [sales@asd-cr.com](mailto:sales@asd-cr.com)  
Web site: [www.asd-cr.com](http://www.asd-cr.com) · P.O. Box 30-1000 San José, Costa Rica