

CULTURAL ANSWER AND MORFOGENÉTIC OF THREE EXPLANTS OF BOROJÓ (*Borojoa* *patinoi* CUATRECASAS)

RESUMEN

Se estudiaron los requerimientos culturales y morfogénicos en tres explantes primarios de Borojó, con el fin de encontrar unas condiciones que permitan la regeneración de plantas a partir de explantes de material adulto. Se utilizaron medios de inducción con diferentes tipos y concentraciones de auxinas y citoquininas. La respuesta embriogénica se estimó con base en el índice de crecimiento, las frecuencias de callos con embriones y al número de embriones por callo. La mejor respuesta se observó en embriones de semillas, los cuales mostraron un alto índice de crecimiento y un elevado número de callos embriogénicos con desarrollo apical. El mayor número de callos con embriones se obtuvo partiendo de explantes de hojas de plántulas. En los explantes procedentes de hojas de plantas adultas, se logró también la inducción de embriones somáticos. Los reguladores de crecimiento que promovieron mayor respuesta embriogénica fueron la auxina NAA y las citoquininas 2-IP y 6-BA.

Palabras clave: *Borojoa patinoi*; Embriogénesis somática; Morefogénesis; Auxinas; Citoquinas.

ABSTRACT

We studied the cultural and morphogenetic requirements for three primary explants of Borojó, in order to determine adequate conditions for the regeneration of plants from adult material explants. We used Induction mediums containing different types and concentrations of auxins and cytokinins. The embryogenic response was estimated based on the growth index, frequency of calluses with embryos and on the number of embryos per callus. The best response was observed in the embryos of seeds, which showed a high growth index and a high number of embryogenetic calluses with a shoot bud differentiation and development. The greater number of calluses with embryos was obtained from explants of leaves from seedling. Induction of somatic embryos was also obtained in explants from adult plants. The growth regulators with the best embryogenetic response were auxin NAA and cytokinins 2-IP and 6-BA.

Keyword: *Borojoa patinoi*; Somatic embryogenesis; Morphogenetic; Auxin; Cytokinins.

RESPUESTA CULTURAL Y MORFOGENÉTICA DE TRES EXPLANTES DE BOROJÓ (*Borojoa* *patinoi* CUATRECASAS)

José Raúl Moreno*
Miguel Ángel Medina Rivas*

INTRODUCCIÓN

El Borojó es un arbusto frutal tropical propio del sotobosque del interior del departamento del Chocó (cuenca de los ríos Atrato, San Juan y Baudó y distribuido en el Chocó biogeográfico), el cual ha evolucionado con el ritmo de la interacción selva-hombre, dándole características especiales al sentido cultural del pueblo chocoano. El Borojó en la práctica agrícola actual se propaga por semillas. Es una planta dioica y la población de árboles macho, no productores de frutos, es difícilmente diferenciable de las hembras, productoras de fruto, en el momento de establecer el cultivo. Lo anterior obedece a que la característica sexual sólo se reconoce en el momento de la floración, cuando la planta es adulta. Esta situación causa una importante reducción en la productividad potencial y no permite estimar la producción global por hectárea, ya que no se puede estar seguro de la cantidad de hembras y machos que se van a sembrar. Con frecuencia, cuando se establecen cultivos de Borojó, el número de árboles machos por hectárea está en torno al 60%, generando una merma en la producción (datos obtenidos a partir de los cultivadores y expertos de la granja experimental de la Universidad Tecnológica del Chocó, Lloró).

* Grupo de Investigación en Biotecnología y Recursos fitogenéticos. Universidad Tecnológica del Chocó. Barrio Medrano, Carrera 22 N° 18B-10 PBX: 6710237 – 6711616 – Fax: 6710172. Quibdó – Chocó, Colombia. e-mail: mmedinarivas@gmail.com

Así en la actualidad, no existe un método para distinguir las plantas femeninas de las masculinas antes de la edad de floración. Por lo tanto, cualquier método que permita realizar una selección por sexo en el momento de la plantación facilitaría el establecimiento de cultivos comerciales más productivos y sostenibles. Hasta la fecha no se ha desarrollado una metodología adecuada que garantice la efectividad de la propagación vegetativa por métodos convencionales viables como injertos, estaquillas, acodo, etc. (Mena y Palacios, 1978; Arena y Cuéllar, 1948; Córdoba, 1988).

El control del número de individuos hembras para la plantación se puede abordar por varias vías, pero consideramos que las dos más aplicables e inmediatas son: 1) La propagación clonal de los mejores individuos mediante técnicas de cultivo *in vitro* y 2) La identificación de marcadores genéticos ligados a la determinación del sexo.

Por todo ello en el presente trabajo hemos optado por la segunda vía. La idea a medio plazo es conseguir un método que permita la propagación clonal de individuos adultos seleccionados. De esta forma, se podría emprender programas de propagación a gran escala a partir de plantas hembras y machos y elegir el número de individuos de cada sexo que se va a cultivar en una superficie determinada, lo que se traduciría en un aumento de la producción por unidad de superficie a un costo más bajo, ya que la técnica utilizada, micropropagación, suele ser más económica que la aplicación de marcadores moleculares.

Con independencia de su utilidad para fijar de antemano el número de plantas macho y hembra que se van a cultivar por unidad de superficie, el método de propagación a partir de individuos adultos permitiría emprender también programas de mejora basados en la selección y propagación clonal de genotipos élite.

Además, el desarrollo de un método para la regeneración en cultivo *in vitro* serviría de base para emprender programas de mejora basados en la transferencia de genes vía transformación genética.

El problema es que la generación de plantas a partir de explantes de individuos adultos suele ser difícil y, en este caso particular, lo es mucho más porque no existe ningún trabajo previo sobre cultivo *in vitro* de Borojó.

La dificultad de propagación eficiente del borojó ha retardado la selección técnica de genotipos sobresalientes, por el sexo, producción, precocidad, arquitectura de la planta, tamaño y calidad del fruto, resistencia a enfermedades y adaptabilidad a diferentes tipos de suelos y climas para el establecimiento de cultivos comerciales. Por tanto, no existen paquetes tecnológicos para el manejo del cultivo validado y unificado en las diferentes zonas donde se cultiva.

Por ello, en este trabajo de investigación hemos planteado un estudio sobre los factores que afectan el proceso de inducción de embriones partiendo de material juvenil, embriones de semillas maduras, plántulas de semillas crecidas en condiciones axénicas y hojas nuevas de brotes recientes de plantas adultas cultivadas en el campo que permite abordar la selección clonal para diversos aspectos arriba mencionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y condiciones del cultivo *in vitro*

El objetivo final de estos experimentos eran lograr el desarrollo de métodos que posibilitaran la regeneración de plantas a partir de explantes primarios de *B. patinoi*. En estos experimentos hicimos especial hincapié en el estudio de distintos tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento (principalmente auxinas y citoquininas), y la influencia del material vegetal empleado para la obtención de explantes.

Material vegetal

- Embriones cigóticos de semillas maduras.
- Hojas de plantas de semillas obtenidas *in vitro* a partir de embriones cigóticos (plantas axénicas cultivadas *in vitro*).

- Hojas nuevas de brotes recientes de plantas adultas en edad de fructificación cultivadas en el campo de con una edad aproximada de cinco años.

Embriones cigóticos de semillas maduras

· **Desinfección del material vegetal.** Se emplearon semillas maduras peladas y se utilizaron los embriones cigóticos como explantes primarios. Antes de la esterilización, las semillas se mantuvieron durante 8 horas en agua destilada y a continuación se procedió a la desinfección con (20% de hipoclorito sódico equivalente a 50 g/l de cloro activo). Después de la desinfección se eliminó la solución de hipoclorito mediante tres lavados sucesivos con agua destilada estéril en cabina de flujo laminar durante cinco, diez y quince minutos, respectivamente.

· **Obtención de los explantes.** Después del último lavado, las semillas se extendieron sobre la superficie de papel de filtro estéril y se procedió a la obtención de los explantes. A las semillas se les eliminó la corteza ejerciendo presión con una pinza, se abrieron los cotiledones con un bisturí y se extrajeron los embriones.

Plántulas de semillas obtenidas *in vitro* a partir de embriones cigóticos

· **Crecimiento de plantas en condiciones axénicas.** Para el desarrollo y crecimiento de las plántulas procedentes de semillas maduras se utilizó un medio básico sin reguladores de crecimiento (solución mineral MS +3% de sacarosa + 1mg/l de Tiamina HCl + 100 mg/l myoinositol + vitaminas). Los embriones se sembraron en medio de cultivo sólido en recipientes de vidrio de 250 ml de capacidad con tapadera de plástico, con unos 40 ml de medio de cultivo sólido y a razón de seis embriones por recipiente. Durante el periodo de cultivo los botes se sellaron con parafilm para evitar una excesiva evaporación.

· **Obtención de los explantes.** De las hojas de las plántulas axénicas se utilizó como explante la porciones

del pecíolo y la parte central del limbo, de aproximadamente 7 mm de longitud.

Hojas nuevas de brotes recientes de plantas adultas cultivadas en campo

Se utilizaron como explantes hojas nuevas de brotes recientes de plantas adultas de *B. patinoi* cultivadas en el campo

· **Esterilización del material vegetal.** Antes de la esterilización del material vegetal, las hojas se lavan con agua y a continuación, con alcohol etílico al 70% durante 30 segundos. La desinfección superficial se hizo por inmersión durante 20 minutos en una solución diluida al 40% de lejía comercial (5% de hipoclorito sódico equivalente a 50 g/l de cloro activo). Después de la esterilización se eliminó la solución de hipoclorito mediante tres lavados sucesivos con agua destilada estéril en cabina de flujo laminar durante 5, 10 y 15 minutos, respectivamente.

· **Obtención de explantes.** Tras la desinfección, es decir después del último lavado, se procedió a la extracción de los explantes. A las hojas se les eliminó un milímetro de los bordes laterales y luego se obtiene segmentos de aproximadamente 7 mm del limbo y de la porción del pecíolo. Una vez cortados, los explantes se sembraron, con el envés en contacto con el medio de cultivo, en recipientes de vidrios. En cada recipiente se distribuye 20 ml de medio de cultivo y se siembran 6 explantes. Durante el periodo de incubación los botes se sellaron con parafilm para evitar una excesiva evaporación.

· **Condiciones de incubación.** En el experimento para la obtención de plantas axénicas, el cultivo se realizó en condiciones de fotoperiodo (16 horas luz/ 8 horas oscuridad) durante 45 días. En los experimentos diseñados para obtener respuesta embriogénica, el cultivo se realizó en dos fases:

1ª fase en medio de inducción: oscuridad; $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 20 días.

2° fase en medio de desarrollo: fotoperíodo; 27°C. $\pm$ 1°C, 20 días.

Intensidad luminosa: 1500 a 2000 lux y fuente de luz fría/suministrada por tubos fluorescentes Golux de 36W, Silvana) equivalente a 34-90 mE/s/m².

Repeticiones: 150 explantes por tratamiento en la fase de oscuridad y 150 inóculos en la fase de fotoperíodo.

Evaluación del crecimiento y respuesta embriogénica

· **Crecimiento:** Índice de crecimiento (Media $\pm$ SE). El índice de crecimiento estimado de forma cualitativa, es el valor medio que se obtiene al asignar un valor arbitrario (de 0 a 3) a cada callo según el tamaño del mismo. De esta manera se obtiene un índice de crecimiento (IC) que permite comparar los resultados obtenidos en los distintos medios. Los valores asignados al índice de crecimiento son los siguientes:

0 = no crecimiento del callo

1 = poco crecimiento

2 = crecimiento medio

3 = gran crecimiento

Número de embriones por callo (Media $\pm$ SE).

Frecuencia de callos con embriones (Media $\pm$ SE).

Los explantes fueron colocados en el medio de inducción el cual contenía sales Murashige y Skoog (1962), con 30 g/l de Sacarosa, 100 mg/l de caseína hidrolizada, 400 mg/l de extracto de malta, 10 mg/l de tiamina, 1 mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de piridoxina, 1 mg/l de glicina, 100 mg/l de mioinositol y 7 g/l de agar, medio básico. Se ensayaron las siguientes concentraciones de auxina: 2,4-D, NAA, 2,4,5-T y picloram: 2.5 mg/l, 5.0 mg/l, 10 mg/l y citoquinas 6-BA, 2iP, zeatina, tidiazuron y kinetina: 1.0 mg/l, 2.5 mg/l y 5.0 mg/l, con un diseño experimental factorial, el pH se ajustó a 5.7 antes de autoclavar.

Medio de maduración y desarrollo

Después de 30 días los explantes con sus callos fueron transferidos a 7 medios de maduración y desarrollo diferentes para determinar en cual de ellos se observa la

aparición de ápices así: 1 MB=medio básico, 2A-(medio básico+ABA 0.1 mg/l), 3B-(medio básico+ BA 0.1 mg/l) 4 BA -(medio básico + BA 0.1mg/l+ ABA 1.0 mg/l), 5NB -(medio básico NAA 0.01 mg/l+ BA 0.1 mg/l), 6NBA-(medio básico NAA 0.01 mg/l+ BA 0.1 mg/l+ABA 1 mg/l) y 7 NBAG-(medio básico NAA 0.01 mg/l+ BA 0.1 mg/l+ABA 1 mg/l+ AG 1 mg/l). El cultivo se realizó en fotoperíodo a 27 $\pm$ 1°C durante 21 días, la intensidad luminosa fue de 1500 a 2000 lux y la fuente del luz fría/suministrada por tubos fluorescente Golux de 36W, Silvana) equivalente a 34-90 mE/s/m² en una cámara de crecimiento.

Desarrollo de plantas

Después de 21 días de crecimiento en el medio de desarrollo los ápices se subcultivaron en un medio sin reguladores de crecimiento, por 18 días para observar el desarrollo de las plantas, y posteriormente se plantaron en un medio de multiplicación que contenía 6-BA 2mg/l y los brotes obtenido se cortaron y se plantaron en un medio de enraizamiento que contenía IBA 2 mg/l y ANA 0,1mg/l

Análisis de datos

Para todos los datos se utilizó el ANOVA; suma de cuadrados para el modelo factorial. La diferencia entre las medias de los tratamientos fue analizada por el test de Neuman-Keules. Las diferencias significativas con un nivel de probabilidad de 5% se consideraron significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de embriogénesis somática en embriones de semillas maduras

Durante el cultivo en el medio de inducción después de 30 días se formó un callo crema friable con desarrollo radicular, los resultados óptimos fueron las combinación de NAA 10 mg/l, BA 5 mg/l y NAA 10 mg/l, 2-iP 5 mg/l y se observó que tanto el índice de crecimiento como la respuesta embriogénica aumentan a medida que aumenta las concentraciones de estos reguladores (Tablas 1a a 2b).

Tabla 1a
Efecto de distintas concentraciones de NAA y 6-BA sobre el crecimiento de callos
derivados de embriones de semillas maduras en medio de inducción

		Concentración de NAA mg/l		
		2,5	5,0	10,0
Concentración de 6-BA mg/l	1,0	1,51±0,01*	2,31±0,03	2,53±0,03
	2,5	1,73±0,02	2,40±0,03	2,54±0,03
	5,0	2,10±0,03	2,53±0,03	2,54±0,03

Media ± DE, 150 explantes por tratamiento

Tabla 1b
Efecto de distintas concentraciones de NAA y 2-iP sobre el crecimiento de callos
derivados de embriones de semillas maduras en medio de inducción

		Concentración de NAA mg/l		
		2,5	5,0	10,0
Concentración de 2-iP mg/l	1,0	1,89±0,03*	2,24±0,04	2,41±0,03
	2,5	1,98±0,03	2,27±0,23	2,48±0,02
	5,0	2,10±0,03	2,38±0,03	2,47±0,02

Media ± DE, 150 explantes por tratamiento

Tabla 2a
Efecto de distintas concentraciones de NAA y 6-BA sus concentraciones sobre la respuesta embriogénica
en callos derivados de embriones de semillas maduras en medio de inducción.

Embriones		Concentración de NAA mg/l		
		2,5	5,0	10,0
Concentración de 6-BA mg/l	1,0	4,22±0,05*	5,34±0,05	5,57±0,06
	2,5	5,81±0,05	6,41±0,06	6,81±0,07
	5,0	7,32±0,32	8,51±0,07	9,62±0,10*

* Número de embriones por callo

Media ± DE, 150 explantes por tratamiento

Regeneración de embriones somáticos

Después de 30 días de incubación en condiciones de oscuridad los callos obtenidos en los medios de inducción NAA 10 mg/l y 2-iP 5 mg/l y NAA 10 mg/l 6-BA 5 mg/l los cuales presentaron mayor número de embri-

nes, se subcultivaron en 7 medio de maduración y desarrollo diferentes en condiciones de fotoperiodo a 27°C. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 3. Se aprecia que los tratamientos que presentaron mejores resultados fueron en los que estaba presente el ABA en combinación con NAA y 6-BA:7-NBAG

Tabla 2b
Efecto de distintas concentraciones de NAA y 2- iP sobre la respuesta embriogénica en callos derivados de embriones de semillas maduras en medio de inducción

Embriones		Concentración de NAA		
		2,5	5,0	10,0
Concentración de 2i-P	1,0	6,12±0,07*	6,45±0,07	6,82±0,08
	2,5	6,32±0,07	6,53±0,08	6,95±0,09
	5,0	6,43±0,07	6,61±0,08	7,21±0,09*

* Número de embriones por callo

Media ± DE, 150 explantes por tratamiento

Tabla 3
Embriogénica somática y germinación apical de callos derivados de embriones de semillas maduras en medio de maduración y desarrollo 21 días

MMD	Medio inicial de inducción NB++		Medio inicial de inducción NP++	
Medios de maduración y desarrollo	Número de embriones Media±DE	Embriones con germinación apical Media±DE	Número de Embriones Media±DE	Embriones con germinación apical Media±DE
MB	10,00±0,10	6,79±0,06*	8,83±0,10	4,58±0,04
A	9,41±0,10	8,91±0,06	7,45±0,11	5,79±0,08
B	7,83±0,07	3,12±0,03	13,87±0,4	5,29±0,05
BA	8,04±0,10	8,04±0,01	10,25±0,3	6,33±0,04
NB	7,41±0,10	4,54±0,05	16,95±0,4	8,58±0,04
NBA	9,36±0,11	8,45±0,07	15,36±0,05	9,21±0,05
NBAG	10,62±0,10	9,71±0,04	12,37±0,3	9,41±0,04

++ NB =Medios con NAA y 6-BA; NP = Medios con NAA y 2-iP

(medio básico+NAA 0.01mg/l+ 6-BA 0.1mg/l + ABA 1 mg/l+AG 1 mg/) ya que se observó mayor número de embriones por callo y callos con germinación apical de los cuales se desarrollaron plantas enteras.

Esta situación podría explicarse por la presencia de regulador de crecimiento ABA, el cual tiende favorecer el desarrollo embrionario, si observamos el efecto del ABA en el desarrollo apical en los tratamientos A(MB + ABA 1 mg/l), BA(MB+BA 0.1 mg/l+ABA 1 mg/l) y NBA(MB+NAA 0.01 mg/l+BA 0.1 mg/+ABA 1.0 mg/l) y los comparamos con los tratamientos MB(MB),

B(MB+BA 0.1 mg/l) y NB (NAA 0.01 mg/l+BA 0.1 mg/l), en donde no hay presencia de ABA, notamos que se observan diferencias con respecto al desarrollo apical, lo anterior indica que el ABA en este experimento tiene afecto tanto en el desarrollo embrionario como en el desarrollo apical. Existen embriones que muestran anomalías en su desarrollo («neomorfos») lo que se traduce en una inhibición del desarrollo apical debido a la formación temprana de raíces (Krikorian, Kann, 1981).

Cuando se utilizó en el medio de inducción el regulador de crecimiento 2-iP se aprecia que el número de em-

Tabla 4
Efecto de distintas concentraciones de NAA, 6-BA y 2-iP sobre el índice de crecimiento de los callos procedentes de limbo de hojas de plantas de semillas cultivadas *in vitro*

		Concentración de NAA (mg/l)		
		2.5	5.0	10.0
Concentración de 6-BA y 2-iP (mg/l)	1.0	1.00±0.00* 2.01±0.03**	2.14±0.05* 2.15±0.04**	1.13±0.04* 2.33±0.04**
	2.5	1.00±0.00* 1.85±0.04**	2.00±0.00* 2.07±0.04**	1.55±0.02* 2.28±0.03**
	5.0	1.00±0.00* 2.04±0.02**	1.55±0.02* 2.36±0.04**	1.54±0.02* 2.45±0.04**

* NAA + 6-BA; ** NAA + 2-iP Media± DE, 150 explantes por tratamiento

Tabla 5
Efecto de distintas concentraciones de NAA, 6-BA y 2-iP sobre el número de embriones somáticos por callo a partir de explantes de limbos de hojas de plantas de semillas cultivadas *in vitro* en medio de inducción

		Concentración de NAA (mg/l)		
		2.5	5.0	10.0
Concentración de 6-BA y 2-iP (mg/l)	1.0	14.26±0.04* 22.33±0.01**	23.60±0.03* 30.97±0.04**	25.70±0.04* 30.33±0.02**
	2.5	20.01±0.02* 31.30±0.02**	25.16±0.03* 30.36±0.04**	26.63±0.03* 30.64±0.02**
	5.0	21.44±0.05* 31.66±0.04**	25.58±0.03* 30.83±0.02**	27.10±0.03* 30.63±0.04**

* NAA + 6-BA; ** NAA + 2-iP, número de embriones por callo Media± DE, 150 explantes por tratamiento

briones con desarrollo radicular temprano fue mayor que con 6-BA, pero el desarrollo apical fue menor. En ambos experimentos, el índice de crecimiento fue similar, con la formación de un callo embriogénico semifrible con desarrollo radicular. La frecuencia de callos con embriones y germinación apical fue 100%.

Inducción de embriogénesis somática en explantes de hojas de plántulas de semillas cultivadas *in vitro*

Durante el cultivo en el medio de inducción después de

30 días se inició la aparición de embriones directamente del explante, embriogénesis somática casi directa, con desarrollo radicular, los resultados óptimos fueron con las combinaciones de reguladores NAA 10 mg/l, BA 5 mg/l y NAA 10 mg/l, 2-iP 5 mg/l y se observó que tanto el índice de crecimiento como la respuesta embriogénica aumentan a medida que aumentan las concentraciones de estos reguladores (Tablas 4 y 5). Los medios de inducción con las auxinas: ácido 2,4-dicloro fenoxi acético, ácido 2,4,5-tricloro fenoxi acético y picloram) no presentaron formación de embriones.

Tabla 6
Embriogénica somática y germinación apical de callos derivados de limbos de hojas de plantas de semillas cultivadas *in vitro* en medio de maduración y desarrollo

MMD	Medio inicial de inducción NB++		Medio inicial de inducción NP++	
Medios de maduración y desarrollo	Número de embriones Media±S.E	Embriones con germinación apical Media±S.E	Número de embriones Media±S.E	Embriones con germinación apical Media±S.E
MB	27,10±0,10	0,0±0,0	30,64±0,10	0,0±0,00
A	28,41±0,10	2,91±0,06	31,45±0,11	2,79±0,08
B	27,83±0,07	0,0±0,00	31,87±0,4	0,0±0,0
BA	28,04±0,10	2,33±0,01	31,25±0,3	2,03±0,04
NB	27,41±0,10	0,0±0,0	32,95±0,4	0,0±0,0
NBA	33,62±0,10	3,31±0,04	33,37±0,3	3,11±0,04
NBAG	35,62±0,10	4,51±0,04	33,37±0,3	3,35±0,04

++ NB =Medios con NAA y 6-BA; NP = Medios con NAA y 2-iP

Regeneración de embriones somáticos

Después de 30 días de incubación en condiciones de oscuridad los callos obtenidos en los medios de inducción NAA 10 mg/l y 2-iP 5 mg/l y NAA 10 mg/l 6-BA 5 mg/l los cuales presentaron mayor número de embriones, se subcultivaron en 7 medio de maduración y desarrollo diferentes en condiciones de fotoperiodo a 27°C.

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 6.

Se aprecia que los tratamientos que presentaron mejores resultados fueron en los que estaba presente el ABA en combinación con NAA y 6-BA: 7-NBAG (medio básico+NAA 0.01 mg/l+ 6-BA 0.1 mg/l + ABA 1 mg/l+AG 1 mg/) y 6-NBA (medio básico NAA 0.01 mg/l+ BA 0.1 mg/l+ABA 1 mg/l) ya que se observó mayor número de embriones por callo y callos con germinación apical de los cuales se desarrollaron plantas enteras. Esta situación podría explicarse por la presencia de regulador de crecimiento ABA, el cual tiende a mejorar el desarrollo embrionario, si observamos el efecto del ABA en el desarrollo apical en los tratamientos A(MB + ABA 1 mg/l), BA (MB+BA 0.1 mg/l+ABA 1 mg/l) y NBA

(MB+NAA 0.01 mg/l+BA 0.1 mg/+ABA 1 mg/l) y los comparamos con los tratamientos MB (MB), B (MB+BA 0.1 mg/l) y NB (NAA 0.01 mg/l+BA 0.1 mg/l), en donde no hay presencia de ABA, se observan diferencias con respecto a la germinación apical, lo anterior indica que el ABA solo y en combinación con NAA y 6-BA es efectivo tanto en la maduración del embrión como en la germinación apical, Neuensschwander y Baumann (1992) informaron que el proceso de maduración y desarrollo de embriones somáticos de café, planta de la misma familia del borojó, que el efecto del ABA en mejorar la maduración y desarrollo de los embriones somáticos fue en ausencia de otros reguladores de crecimiento y que el ABA en combinación con NAA y kinetina no fue efectivo. Existen embriones que muestran anomalías en su desarrollo («neomorfos») lo que se traduce en una inhibición del desarrollo apical debido a la formación temprana de raíces: Krikorian Kann 1981, Mchaux-Ferrière y Schwendiman (1992) informaron que la formación muy rápida de los embriones somáticos podría inducir anomalías debido a la baja cantidad de proteínas de reserva almacenadas durante el proceso de inducción, impidiendo la ausencia de ápice. Situación que no se observa cuando los explantes primarios son embriones cigóticos ya que estos están cargados de ele-

mento nutricionales para su función morfogénica la cual es regenerar planta.

Cuando se utilizó en el medio de inducción el regulador de crecimiento 2-iP se aprecia que el número de embriones con desarrollo radicular temprano fue mayor que con 6-BA, pero el desarrollo apical fue menor de forma similar al experimento NAA y 6-BA el regulador de crecimiento ABA presentó efectos importante en el desarrollo apical.

Inducción de embriogénesis somática en Hojas nuevas de brotes recientes de plantas adultas cultivadas en el campo

Durante el cultivo en el medio de inducción después de 30 días se formaron embriones directamente del explante, embriogénesis casi directa y, además, un callo embriogénico con desarrollo radicular, los resultados óptimos fueron con las combinaciones NAA 10 mg/l, BA 5 mg/l y NAA 10 mg/l, 2-iP 5 mg/l (Tablas 7, 8 y Figura 1).

Regeneración de embriones somáticos

Los resultados de estos experimentos se muestran en las Tablas 9. Se aprecia que en el medio de maduración y desarrollo, el tratamiento que presentó mayor número

de embriones fue el NBAG (medio básico + NAA 0.01 mg/l + 6-BA 0.1 mg/l + ABA 1 mg/l + AG 0.1 mg/l) con desarrollo radicular y mayor germinación apical, similar a lo observado con los embriones de semillas maduras. En donde el ABA tiene efectos similares al ocurrido con los embriones de semillas maduras, observándose que en los medios de maduración en donde el ABA se encuentra presente mostraron los mejores resultados.

Desarrollo de plantas

Después de 18 días de crecimiento en el medio sin reguladores de crecimiento, las plantas desarrollaron el primer par de hojas y después de 45 días de ser transplantadas el medio de multiplicación alcanzaron una altura de 3-4cm y 4 pares de hojas, posteriormente en el medio de enraizamiento se logró un sistema radicular extensivo.

En este trabajo se estudió la inducción de embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de callos obtenidos de embriones de semillas maduras, de hojas de plantas de semillas cultivadas *in vitro*, de hojas nuevas de brotes recientes de plantas adultas cultivadas en el campo de borojó. Se requirió de dos medios sucesivos con diferentes relación y concentraciones de reguladores del crecimiento (NAA y BA en el medio de inducción y NAA, BA, ABA y AG), en el medio de maduración y desarrollo la inducción

Tabla 7
Efecto de distintas concentraciones de NAA, 6-BA y 2-iP sobre el índice de crecimiento de los callos procedentes de limbo de hojas de plantas adultas cultivadas en el campo en medio de inducción

		Concentración de NAA (mg/l)		
		2.5	5.0	10.0
Concentración de 6-BA y 2-iP (mg/l)	1.0	1.11±0.02* 2.00±0.05**	2.11±0.07* 2.20±0.03**	1.20±0.04* 2.45±0.03**
	2.5	1.00±0.00* 1.90±0.08**	2.10±0.03* 2.15±0.07**	2.00±0.04* 2.40±0.03**
	5.0	1.00±0.00* 2.10±0.08**	1.60±0.04* 2.81±0.02**	2.00±0.05* 2.15±0.06**

* NAA + 6-BA; ** NAA + 2-iP,

Media± DE, 150 explantes por tratamiento

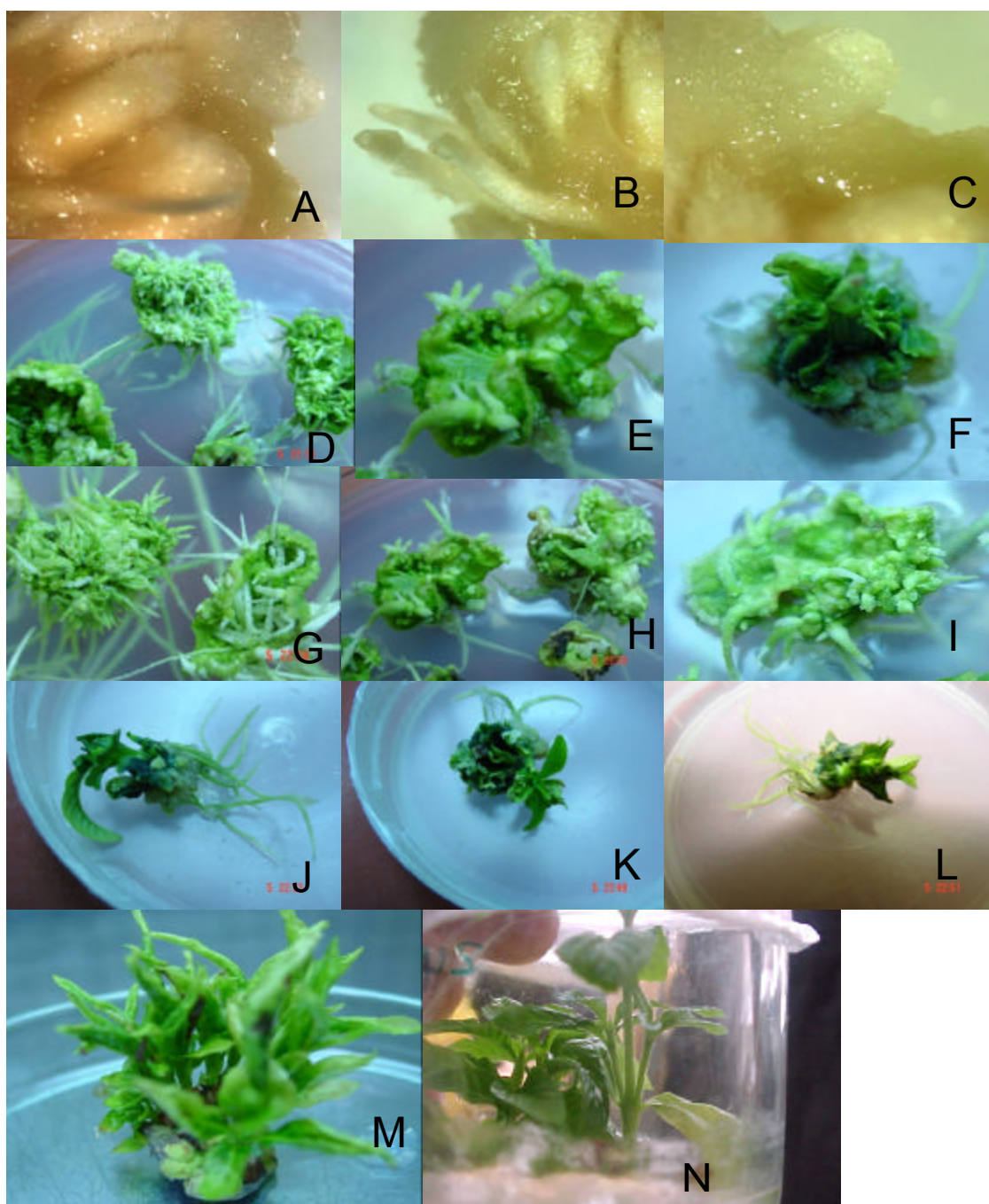


Figura 1. Embriogénesis somática. A, B, C embriones de semillas maduras; D, E, F hojas plántulas de semillas; G, H, I hojas nuevas de brotes recientes de plantas adultas cultivadas en el campo; J, K, L embriones con desarrollo apical; M, plántulas en medio de multiplicación; N plántulas en crecimiento de 90 días.

de las células embriogénicas correspondió a la desdiferenciación celular que ocurrió durante la fase de inducción, las condiciones que desencadenó este fenómeno no pudo ser definido.

El potencial embriogénico de una célula parece ser expresado durante el tiempo de inducción dependiendo de las condiciones del cultivo y del estado fisiológico de la célula, en el caso de embriones de semillas, los cuales son ricos en

Tabla 8

Efecto de distintas concentraciones de NAA, 6-BA y 2-iP sobre el número de embriones somáticos por callo a partir de explantes de limbos de hojas de plantas adultas cultivadas en el campo en medio de inducción

		Concentración de NAA (mg/l)		
		2.5	5.0	10.0
Concentración de 6-BA y 2-iP (mg/l)	1.0	12.23±0.05* 18.32±0.02**	19.61±0.04* 25.95±0.03**	20.71±0.06* 25.32±0.03**
	2.5	15.01±0.03* 23.31±0.04**	20.13±0.05* 28.38±0.08**	21.61±0.05* 24.38±0.03**
	5.0	19.45±0.06* 24.63±0.05**	20.48±0.05* 27.73±0.04**	15.11±0.04* 20.61±0.05**

* NAA + 6-BA; ** NAA + 2-iP, Número de embriones por callo

Media± DE, 150 explantes por tratamiento

Tabla 9

Embriogénica somática y germinación apical de callos derivados de limbos de hojas de plantas adultas cultivadas en el campo 30 días en medio de maduración y desarrollo.

MMD	Medio inicial de inducción NB++		Medio inicial de inducción NP++	
Medios de maduración y desarrollo	Número de Embriones Media±S.E	Embriones con germinación apical Media±S.E	Número de embriones Media±S.E	Embriones con germinación apical Media±S.E
MB	24.11±0,11	0,0±0,0	25.64±0,11	0,0±0,00
A	23,31±0,12	1,91±0,06	23,45±0,12	1,79±0,08
B	21,63±0,097	0,0±0,00	28,87±0,08	0,0±0,0
BA	25,14±0,12	1,33±0,01	27,25±0,09	1,03±0,04
NB	22,61±0,08	0,0±0,0	27,95±009	0,0±0,0
NBA	22,42±0,10	3,31±0,04	29,37±0,07	3,11±0,04
NBAG	25,32±0,09	4,51±0,04	30,37±0,08	2,35±0,04

++ NB =Medios con NAA y 6-BA;

NP = Medios con NAA y 2-iP

reservas nutricionales (carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas etc.) necesarias para el desarrollo de una planta, parece ser de interés para la formación de tejidos embrionarios porque los callos procedente de estos explantes presentaron el menor número de embriones anormales comparados con los callos de hojas de plantas de semillas cultivadas *in vitro* y de hojas nuevas de brotes recientes de plantas adultas cultivadas en el campo se puede observar que el número de embriones anormales se incrementó con el estado fisiológico del explante, edad de la planta.

El hecho que los embriones formados fueran capaces de desarrollarse y germinar y producir plantas en el medio de maduración y desarrollo y en el medio básico, es de gran importancia para abordar la inducción de embriogénesis somáticas en explantes foliares de material adulto.

De momento, la mayoría de los embriones obtenidos a partir de callos de hojas de plántulas de semillas y de material adulto presentan el problema de la falta de

germinación apical debido a un desarrollo prematuro de la parte radicular (germinación precoz). A pesar de ello, esto puede ser fácilmente solucionable optimizando la fase de maduración, a fin de conseguir que los embriones somáticos acumulen suficiente sustancia de reserva antes de que se produzca la germinación de los mismos.

Teniendo en cuenta el número de embriones somáticos por explante, si se normalizan el proceso de maduración, dispondremos de un método eficiente para la propagación vegetativa de plantas adultas seleccionadas de Borjón.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos sobre la respuesta cultural y morfogénica de explante primario de Borjón se puede concluir lo siguiente.

1. Los embriones de semillas maduras dieron callos con un alto índice de crecimiento y embriones con germinación apical y dan lugar a plantas enteras
2. Los explantes procedentes de hojas de plántulas de semillas cultivadas *in vitro*, presentaron el mayor nú-

mero de embriones somáticos, todos ellos con desarrollo radicular temprano, algunos exhiben germinación apical

3. En los explantes procedentes de hojas nuevas de brotes recientes de plantas adultas cultivadas en el campo, se logró la inducción de embriones somáticos, la maduración y desarrollo de los embriones y muy pocos exhiben germinación apical y dan lugar a plantas enteras
4. Los reguladores de crecimiento que promovieron mayor respuesta embriogénica fueron la auxina NAA y las citoquininas 2-iP y 6-BA.

Los resultados del presente trabajo, mediante la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos, permiten obtención de plántulas hembras y machos, lo cual garantiza una selección por sexo de esta especie, lo que facilita el control del número de individuos hembras para el establecimiento de cultivos comerciales más productivos y sostenibles. Como también, permite emprender programas de mejora basados en: 1- selección y propagación clonal de genotipos élite 2-basados en la transferencia de genes vía transformación genética y 3- libres de patógenos.

LITERATURA CITADA

- ARENAS, L. E.; CUELLAR, H.F.; DE LA CRUZ. 1985. El "borjón". *Borjón patinoi* Cuatrec. Cultivo promisorio para el trópico húmedo Colombiano. *Acta Agronómica* 35: 106 - 116.
- ARENAS, L. E., Y CUELLAR, H. 1984. El Borjón (*Borjón patinoi* Cuatr.) cultivo promisorio para el trópico húmedo colombiano. Trabajo de grado. Ingeniería Agrónoma, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 138 p.
- CÓRDOVA, J. A. 1988. Cultivo del Borjón. *Revista ESSO Agrícola* No.1 pp. 3-12. Bogotá. Colombia
- DURAND, R., Y DURAND, B. 1990. Sexual determination and sexual differentiation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9:295-316.
- IRISH, E. E., Y NELSON, T. 1989. Sex determination in monoecious and dioecious Plants. *Plant Cell* 1:737-744.
- Jelaska, S. 1986. Cucurbits. En: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry* 2. Crops I. Springer Verlag, Berlin. pp. 371- 386.
- MICHAUX-FERRIERE, N Y SCHWENDIMAN, J. 1992. Histológica al somatic embryogenesis. In Dattee Y, Dumas C and Gallasi A (eds) *Reproductive Biology and Plant Breeding*, 13th Eucarpia Congress, Angers, 6-11 July (pp 247-259). Springer-Verlag, Berlin
- MOREL, G. M. 1974. Clonal multiplication of orchids. En: Withner, C.L. (ed.). *The orchids: Scientific studies*. Wiley, New York. pp 169 - 222.
- MOSQUERA, L. J. Y ARENAS, E. 1995. El borjón, Cultivo Agroforestal del Chocó Fundamentos para el desarrollo sostenible. CODECHOCÓ. 120 p.
- MURASHIGE, T., Y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with

tabacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

NEUENSCHWANDER, B. Y BAUMANN T. 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea Arabica*. *Plant Cell Rep.* 10: 608 - 612.

WANNAN, BS. Y QUINN C. J. 1991. Floral structure and evolution in the Anacardiaceae. *Bot. J. Linn Soc.* 107: 349-385.