

Inducción de organogénesis indirecta en Abarco (*Cariniana pyriformis* Miers.)

Inducing indirect organogenesis in Abarco (*Cariniana pyriformis* Miers.)

Mary Luz Yaya¹, Olga Lucía Rodríguez², William Usaquén³ y Alejandro Chaparro⁴

Resumen: Se indujeron procesos primarios de morfogénesis *de novo* vía organogénesis indirecta en segmentos de hipocótilo de abarco, provenientes de plántulas *in vitro* de dos semanas de edad. El material fuente se obtuvo por germinación de embriones en Woody Plant Medium (WPM) diluido a la mitad y sin reguladores de crecimiento. La formación de callo organogénico se estimuló mediante la adición de ácido indolacético (AIA) conjuntamente con 6-bencilaminopurina (BAP). Después de cuatro semanas el mayor porcentaje de formación de callo (75%) se observó con la combinación AIA 1,21 μM y BAP 7,6 μM .

Palabras clave adicionales: Lecythidaceae, callo organogénico, brotes adventicios.

Abstract: Morphogenesis was induced in *Cariniana pyriformis* hypocotyl explants via indirect organogenesis. Explants were taken from two-week-old *in vitro* plants. The source material was obtained from germinating embryos in Woody Plant Medium (50%) without hormones. Callus formation was stimulated by IAA (indolacetic acid) and BAP (6-benzyl amino purine). The highest percentage (75%) of callus development (after four weeks) resulted from a combination of 1.21 μM IAA and 7.6 μM BAP.

Additional key words: Lecythidaceae, organogenic callus, adventitious bud.

Introducción

EL ABARCO (*CARINIANA PYRIFORMIS* MIERS.) es una especie forestal que pertenece a la familia Lecythidaceae, la cual incluye aproximadamente 20 géneros y cerca de 440 especies de hierbas y árboles pantropicales (Morton *et al.*, 1997). Los reportes bibliográficos indican que *C. pyriformis* se encuentra restringida a Panamá y Colombia, aunque existen especies muy similares en otros países. En nuestro país, su distribución se extiende a las tres cordilleras principalmente en la región del Magdalena Medio, Chocó, Urabá, las serranías de San Lucas, Abibe, San Jerónimo, Ayapel, Los Motilones y el Baudó. Su

distribución natural corresponde a bosques húmedos y muy húmedos tropicales y a altitudes entre 500 y 800 m.s.n.m. (CONIF, 1996).

Debido a su alta calidad y durabilidad, la madera de abarco es muy apreciada, tanto en el mercado nacional como internacional, constituyéndose en una especie de alto potencial comercial para el país, razón por la cual hace parte de las especies vegetales promisorias incluidas en el convenio Andrés Bello (Bernal y Correa, 1994). Sus principales usos comprenden el área de construcción y fabricación de muebles; también es apta para construcciones navales, instrumentos de laboratorio y,

Fecha de recepción: 14 de septiembre de 2004
Aceptado para publicación: 27 de mayo de 2005

- 1 Bióloga, Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: mlyayal@unal.edu.co
- 2 Investigadora, Unidad de Biotecnología, Instituto SINCHI, Bogotá. e-mail: olgarod@softhome.com
- 3 Instructor Asociado, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: wusaquenm@unal.edu.co
- 4 Profesor Asistente, Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: achaparro@unal.edu.co

en algunas regiones, es importante para la fabricación de canoas (PROEXPO, 1972; CONIF, 1996).

Además de su importancia como recurso maderable, *C. pyriformis* es una especie altamente promisorio en el área de reforestación de bosques nativos, obteniéndose buenos resultados en estudios con formaciones ecológicas de bosque húmedo tropical (Castro *et al.*, 1993).

Diversas entidades nacionales, entre ellas el Instituto SINCHI, se han enfocado en estudiar y mejorar distintos procesos de propagación del Abarco. Respecto de los sistemas de propagación *in vitro*, hasta la fecha sólo se había reportado el trabajo realizado por Castro *et al.* (1993) en micropropagación de microestacas provenientes de material *ex vitro*.

Con el fin de inducir procesos morfogénicos *de novo* como embriogénesis somática y organogénesis, se evaluó la respuesta de varios tipos de explantes juveniles procedentes de plántulas establecidas en condiciones *in vitro*, a distintas combinaciones de fitoreguladores. En el presente artículo se reportan los resultados obtenidos en los procesos de inducción de organogénesis indirecta.

Materiales y métodos

Obtención de material fuente y germinación *in vitro*

Se extrajeron semillas a partir de frutos maduros las cuales, después de lavado con agua corriente, se sometieron a un proceso de desinfección mediante inmersión en polivinilpirrolidona (Isodine®) al 10% por 1 h y posteriormente en hipoclorito de sodio al 5,25 % por una hora. Después de tres enjuagues con agua destilada estéril, y en condiciones asépticas, se aislaron los embriones que se sembraron, al igual que semillas completas, en medio Woody Plant diluido a la mitad, suplementado con sacarosa al 30% y agar al 6% (Castro *et al.*, 1993). El medio previamente se ajustó a pH 5,8 con HCl 1N y NaOH 1N y se esterilizó en autoclave por 15 min a 20 lbs de presión.

Inducción de callo organogénico

A partir de plántulas de dos semanas de edad obtenidas por germinación *in vitro* de embriones, se aislaron segmentos de hipocótilos, cotiledones y hojas jóvenes, los cuales se inocularon en el medio anteriormente descrito, suplementado con las distintas combinaciones de fitoreguladores a evaluar (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del ácido indolacético (AIA) y la 6-bencilaminopurina (BAP) en la formación de callo organogénico sobre segmentos de hipocotilo de Abarco (*Cariniana pyriformis*)^a.

Tratamiento	AIA [μ M]	BAP [μ M]	% hipocótilos ^b que formaron callo
Control	-	-	0
1	1,21		0
2	3,42		0
3	6,84		0
4	-	7,6	0
5	-	13,1	0
6	-	26,2	0
7	1,21	7,6	75*
8	3,42	13,1	45
9	6,84	26,2	60

a. Datos tomados después de cuatro semanas de cultivo.

b. Porcentaje promedio calculado para dos ensayos, cada uno con 10 réplicas por tratamiento.

Tomando como referencia el trabajo de Vengadesan *et al.* (2000) en la especie leñosa *Acacia sinuata*, se evaluaron tres combinaciones auxina-citoquinina de ácido indolacético (AIA) y 6-bencilaminopurina (BAP) (1,21 y 7,6 μ M; 3,42 y 13,1 μ M; 6,84 μ M y 26,2 μ M, respectivamente), al igual que el efecto de cada una de las concentraciones individuales de los fitoreguladores sobre los explantes, estableciendo así un total de 9 tratamientos (Tabla 1). Por cada tratamiento se evaluaron 10 réplicas (segmentos de hipocotilo, cotiledón y hoja, respectivamente), y el ensayo completo se realizó dos veces. En cada tratamiento se evaluó el porcentaje de formación de callo organogénico (callo a partir del cual se formaron brotes caulinares y/o radicales) después de cuatro semanas. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos se detectaron utilizando la prueba de los signos (Siecel, 1995) considerando un nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

Los explantes inoculados fueron ubicados en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo 12/12 y temperatura de $26 \pm 2^\circ$ C.

Análisis histológicos

Los callos obtenidos fueron fijados en carnoy (3 etanol : 1 ácido acético glacial) por 48 horas, deshidratados a través de inmersión en una serie gradual de concentraciones de alcohol etílico, y por último, bañados en parafina. Se cortaron secciones de 7-10 μ m en un micrótopo rotatorio, que se sometieron a tinción mediante la técnica *fast green-saffranina* (Roth, 1964). Posteriormente las láminas fueron

observadas al microscopio para evidenciar las estructuras morfogénicas.

Resultados y discusión

Germinación in vitro

En los ensayos realizados, solamente se obtuvo respuesta germinativa en los embriones con porcentajes de germinación entre 80 y 90% (datos no mostrados). Previamente, Castro *et al.* (1993) intentaron establecer procesos de germinación de embriones *in vitro*; sin embargo, la alta contaminación y efectos tóxicos de los antibióticos empleados para controlar el crecimiento de los agentes patógenos no les permitieron desarrollar el proceso. En nuestro caso, la contaminación fue muy baja (0-5%, datos no mostrados) y no representó un problema para la germinación y establecimiento del stock *in vitro* de plantas.

La velocidad del proceso de germinación *in vitro* fue mayor con respecto al proceso de germinación en suelo, que como lo reportan Diez y Moreno (1998) tiene una duración de 12 a 27 días. En condiciones *in vitro*, la germinación del embrión comienza a ser notable hacia el quinto día después de la siembra, y aproximadamente 25-30 días después, la plántula se encuentra bien desarrollada con cotiledones completamente expandidos y con las primeras hojas bien formadas. Probablemente, como lo afirma Piekrik (1990), debido a la pérdida de inhibidores ocasionada al eliminar la testa, el proceso de germinación se acelera y la plántula se desarrolla rápidamente.

Organogénesis indirecta

De los tres tipos de explantes evaluados, sólo los segmentos de hipocótilo generaron respuesta callogénica. En todos los casos, el callo se originó en los extremos de los explantes y se extendió progresivamente por toda la superficie.

En los tratamientos en los que se aplicó únicamente AIA (tratamientos 1-3, Tabla 1), la mayor parte de los explantes inoculados (80%, datos no mostrados) generaron callo compacto de color blanco-amarillo o amarillo, sin ninguna evidencia morfológica ni histológica de posibles estructuras organogénicas. Cuando se aplicó únicamente BAP (tratamientos 4-6, Tabla 1) se formó callo de tipo compacto de color marrón-verde (70% de los explantes inoculados, datos no mostrados), pero igualmente sin evidencias de estructuras organogénicas.

Independientemente de las concentraciones utilizadas, las combinaciones auxina-citoquinina evaluadas (tratamientos 7-9, Tabla 1) originaron callos de coloración marrón-verde de tipo organogénico (Figura 1A), en los que se formaron, tanto yemas caulinares como radicales (Figuras 1B y C).

La combinación AIA (1,21 μM) + BAP (26,2 μM) generó un porcentaje de formación de callo organogénico altamente significativo (75%, $p = 0,04122$), mientras que las combinaciones AIA (6,84 μM) + BAP (26,2 μM) y AIA (3,42 μM) + BAP (13,1 μM) generaron porcentajes de callo organogénico de 60 y 45%, respectivamente (Tabla 1).

Los análisis histológicos confirmaron la formación de brotes adventicios a partir de los callos organogénicos. La Figura 1D muestra la formación de zonas meristemáticas (domos) y de primordios foliares a partir del tejido parenquimático del callo en el caso de brotes caulinares.

Puesto que la 'recalcitrancia' es una característica común de muchas especies leñosas, el proceso de establecimiento y propagación *in vitro* de gran parte de ellas se inicia tomando como base explantes juveniles provenientes de líneas germinales debido a su mayor potencial morfogénico (Segura, 1993).

En esta clase de explantes la respuesta callogénica de un tipo particular –como los hipocótilos–, puede indicar, como lo sugieren Sujatha y Mukta (1996), un efecto de predisposición del tejido a sufrir procesos de multiplicación celular a una velocidad mayor que otros, debido a que presenta distinto potencial morfogénico, y/o como sugieren Tonon *et al.* (2001), como resultado de diferencias en el contenido hormonal del tejido que afectan la interacción con los fitorreguladores exógenos aplicados.

La efectividad de la combinación AIA-BAP en la inducción de brotes adventicios ha sido reportada en varias especies leñosas: *Acacia sinuata*, *Sesbania sesban*, *Prosopis cineraria*, *Dalbergia sissoo*, entre otras (Rao, 1988; Vengadesan *et al.*, 2000), evidenciando el papel relevante que juega la interacción específica auxina-citoquinina dentro del proceso de desdiferenciación celular, adquisición de potencial morfogénico y neoformación de estructuras ocurridas en el callo (Street, 1979; De Klerk, 1997, Quoirin *et al.*, 1998).

Recientes estudios moleculares realizados en *Arabidopsis*, han identificado genes relacionados con la regulación hor-

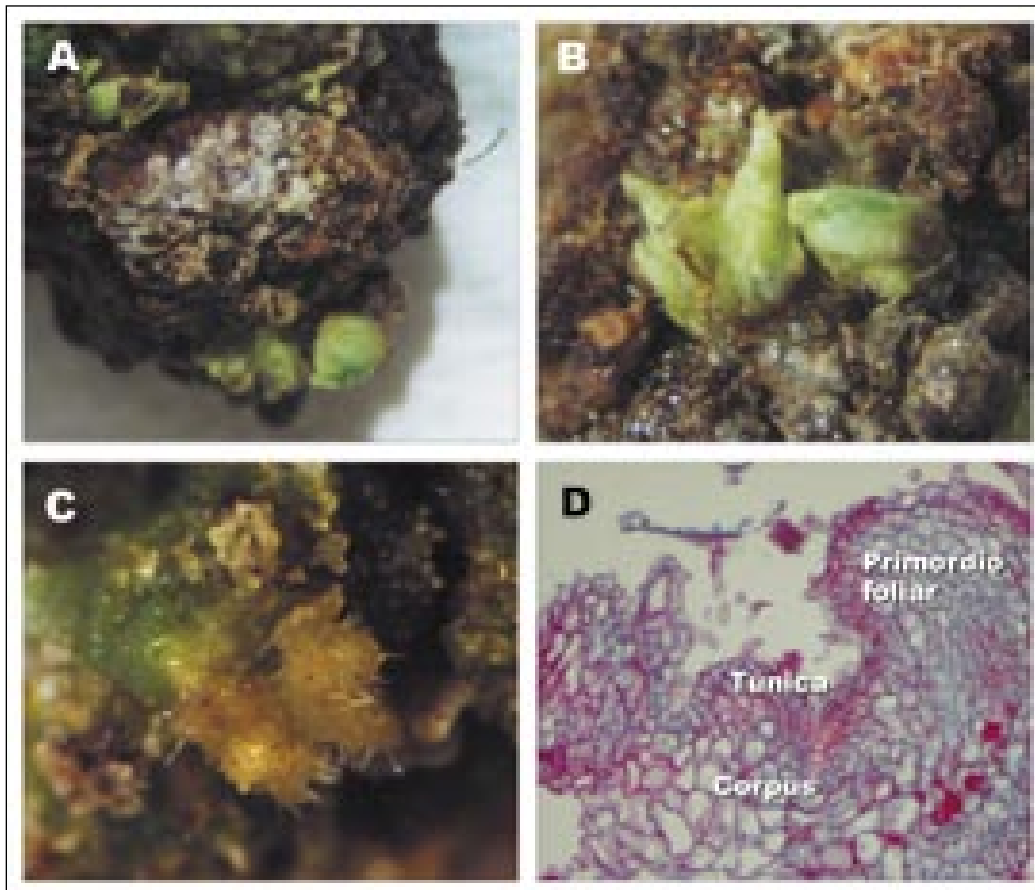


Figura 1. Organogénesis indirecta en Abarco. A. Callo organogénico, B. Brotes caulinares adventicios, C. Brotes radiculares adventicios, D. Corte histológico de primordio caulinar originado en callo organogénico; aumento 10X.

monal en los procesos organogénicos. El gen *REV/IFL1* (*Revoluta/Interfascicular fiberless*) por ejemplo, es importante en el transporte polar de auxinas, en la formación de meristemas de brotes y en procesos de diferenciación celular. De otro lado, el gen *ABPI* (Proteína 1 de ligamiento a auxina), al parecer está involucrado con la regulación de auxinas en procesos de expansión celular. Adicionalmente, se ha propuesto que elementos reguladores del ciclo celular como las ciclinas-D, juegan un papel relevante en los procesos de multiplicación celular que conllevan al desarrollo de callos, como resultado de su inducción por citoquininas (Mizukami, 2001). Dentro de estos hallazgos, uno de gran interés es la respuesta callogénica inducida por la acción ectópica del gen *Ant* (Antegumenta) en tejidos diferenciados y sin la adición exógena de auxinas o citoquininas, lo que sugiere un papel primordial de este gen en el mantenimiento de la 'competencia meristemática', es decir, la capacidad celular de crecimiento y multiplicación que surge como respuesta a señales de crecimiento y desarrollo durante los procesos organogénicos vegetales (Mizukami, 2001).

La formación de un tipo determinado de estructura (brotes caulinares o radicales) es dirigida en gran parte por la proporción auxina/citoquinina aplicada (Hartmann *et al.*, 1997). Sin embargo, en nuestro estudio, la formación conjunta de brotes caulinares y radicales en el callo no nos permitió establecer un requerimiento específico de esta proporción para direccionar el desarrollo de uno u otro tipo.

Siguiendo el proceso realizado por Vengadesan *et al.* (2000), algunos callos se inocularon en medio suplementado con AG_3 (datos no mostrados), con el fin de inducir la elongación de los brotes caulinares; sin embargo, los fuertes procesos oxidativos presentados a lo largo de la primera semana después del cambio de medio, llevaron a su necrosis y pérdida total.

La oxidación es uno de los mayores problemas encontrados durante el desarrollo de procesos *in vitro* con especies leñosas. No obstante, en muchos casos se ha podido

solucionar y los sistemas de propagación han logrado ser optimizados con éxito (George, 1993). Es necesario para el caso de abarco, enfocar esfuerzos en la búsqueda de tratamientos que solucionen el problema oxidativo, de manera que se pueda continuar y mejorar el desarrollo de un sistema de multiplicación por brotación adventicia.

La formación de brotes adventicios, y su posterior desarrollo a plantas, constituye un sistema con altas tasas de multiplicación (Jones, 1983; Hartmann *et al.*, 1997); y ha sido utilizado con éxito en la propagación de especies leñosas de alta importancia económica como *Citrus sp.* y palma de aceite (Jones, 1983; George, 1993).

En el caso del abarco, la optimización de este tipo de sistema y de otros procesos de propagación *in vitro*, probablemente requieran de una ardua investigación. Sin embargo, por tratarse de una especie nativa de alto potencial económico y ambiental para el país, es importante continuar explorando todas las vías posibles para su multiplicación y futuro mejoramiento, paralelamente a investigaciones sobre su genética, fisiología y ecología, con el fin de generar el conocimiento necesario para aprovechar al máximo sus beneficios.

Conclusión

Sí bien el sistema de brotación adventicia en abarco necesita ser optimizado, la inducción de brotes lograda mediante la adición conjunta de AIA y BAP constituye un primer paso en el desarrollo de éste y otros procesos *in vitro*, que en un futuro contribuyan en los programas de propagación y mejoramiento de esta especie maderable nativa.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Gobernación del Guaviare y al Plan Nacional de Desarrollo Alternativo (PNDA) por la financiación brindada, así como al Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI, por facilitar los elementos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

Literatura citada

Bernal, H. y J. Correa. 1994. Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Tomo X. Editora Guadalupe, Bogotá. 325 p.

Castro, D.; C. Jiménez; D. Ríos; A. Restrepo y M. Giraldo. 1993. Utilización de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para la propagación y conservación de germoplasma de cuatro especies vegetales en vía de extinción en el oriente antioqueño:

Comino (*Aniba perutilis*), abarco (*Cariniana pyriformis*), almedrón (*Caryocar glabrum*) y guayacán (*Tabebuia serratifolia*). pp. 21-44. En: Cuadernos de Investigación y Desarrollo Regional CORNARE. El Santuario, Antioquia. 94 p.

Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal (CONIF). 1996. Latifoliadas de zona baja. CONIF, Bogotá. 104 p.

Díez, A. y M. Moreno. 1998. Árboles de los bosques húmedos tropicales del sur oriente de Antioquia, Colombia. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 5(2), 9-25.

De Klerk, G.; B. Arnholdt-Schmitt; R. Lieberei y K. Newmann. 1997. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum* 39(1), 53-66.

Fondo de Promoción de Exportaciones (PROEXPO), Colombia. 1972. Maderas colombianas. Editorial Itualgraf, Bogotá. 117 p.

George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture: the technology. Segunda edición. Editorial Hardcover, New York. 574 p.

Hartmann, H.; D. Kester; F. Davies y R. Genere. 1997. Plant propagation, principles and practices. Sixth edition. Ed. Prentice Hall, New York. 770 p.

Jones, O. 1983. *In vitro* propagation of tree crops. pp. 139-159. En: Miantell, S. y H. Suiter (eds.). Plant biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. 582 p.

Mizukami, Y. 2001. A matter of size: developmental control of organ size in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 533-539.

Morton, C.; S. Mori; G. Prance; K. Karol y M. Chase. 1997. Phylogenetic relationships of Lecythidaceae: A cladistic analysis using *RBCL* sequence and morphological data. *American Journal of Botany* 84(4), 530-540.

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Editorial Mundi-Prensa, Madrid. 326 p.

Quoirin, M.; J. Bittencourt; F. Zanette y D. de Oliveira. 1998. Effect of growth regulators on indirect organogenesis of *Acacia mearnsii* tissues cultured *in vitro*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 10(2), 101-105.

Rao, A. 1988. *In vitro* culture studies on economically important tropical trees. pp. 9-195. En: The application of tissue culture techniques in economically important tropical trees. Biotrop. Special Publication N° 35. Editorial SEAMEO-BIOTROP. Indonesia. 229 p.

Roth, I. 1964. Microtécnica vegetal. Editorial Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 132 p.

Segura, J. 1993. Morfogénesis *in vitro*. pp. 240-325. En: Azcón-Bieto J. y M. Talón (eds.). Fisiología y bioquímica vegetal. Editorial McGraw Hill-Interamericana, Madrid. 581 p.

Siecel, S. 1995. Estadística no paramétrica. Ed. Trillos, Barcelona. 250 p.

Street, H.E. 1979. Embryogenesis y chemically induced organogenesis. pp. 123-153. En: Sharp, W.; P. Larsen; E. Paddock y V. Raghavan (eds). Plant cell and tissue culture, principles and applications. University Press, Columbus, Ohio. 650 p.

Sujatha, M. y N. Mukta. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44, 135-141.

Tonon, G.; M. Capuana y A. Di Marco. 2001. Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis. *Scientia Horticulturae* 87, 291-301.

Vengadesan, G.; A. Ganapathi; R. Premanand y V. Ramesh. 2000. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61, 23-28.