

Callogénesis embriogénica en hojas inmaduras de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.)

Juan C. GUERRERO¹, Reynaldo SOLIS², Henry RUIZ³, Maria E. RUIZ⁴, Danter CACHIQUÉ⁵

^{1,2,3,5}Programa PROBOSQUES, Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, San Martín, Perú; ⁴Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú
¹jc.guerrero.abad@usp.br, ²rsolisleyva@yahoo.com.pe, ³henryproyecto@gmail.com,
⁴mariemiliaruizdlr@hotmail.com, ⁵dcachique@gmail.com

Resumen

Con el propósito de inducir callo embriogénico en sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), se estudió el efecto de cinco concentraciones hormonales de thidiazurón bajo tres diferentes periodos de inducción en hojas inmaduras de sachá inchi. El empleo de 0,005 mg/L de thidiazurón bajo siete días a condiciones de oscuridad generó callo embriogénico que garantizó la diferenciación del primer estadio globular. Asimismo, se manifestó callo no embriogénico de consistencia cremosa, cristalina, delgada e irregular. La rizogénesis como producto de la organogénesis indirecta en hojas inmaduras fue una de las más importantes observaciones durante el trabajo de investigación.

Abstract

The objective of this work was to induce embryogenic callus in sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). We studied the effect of five thidiazuron hormone concentrations in three different periods of induction, in immature leaves of sachá inchi. The use of 0,005 mg/L of thidiazuron in seven days of dark conditions, produced embryogenic callus which guaranteed the differentiation of the first globular stage. We also observed non embryogenic callus which was creamy, crystalline, thin and irregular. Rhizogenesis as a result of indirect organogenesis in immature leaves, was one of the most important observations during this research.

INTRODUCCIÓN

Plukenetia volubilis L., durante estos últimos años viene recobrando importancia en el desarrollo de investigación básica como parte del proceso de domesticación, que involucra su mejora genética mediante técnicas modernas y convencionales. El aprecio de sus ácidos grasos esenciales insaturados tipo omega (3, 6 y 9) la calificó como una especie potencial para la agroindustria y por tanto patrimonio nacional. Sin embargo, existe la necesidad de llevar a cabo más investigación básica y aplicada a fin de lograr el desarrollo de la especie como cultivo. El cultivo de tejidos vegetales como herramienta biotecnológica contribuye a la facilitación de procesos modernos de mejora vegetal, es así que en el presente trabajo de investigación busca determinar una metodología para lograr callogénesis embriogénica a partir de hojas inmaduras, como proceso inicial de la embriogénesis somática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Genético. Se emplearon explantes de hoja inmadura de 25-26 mm, desinfectados por inmersión con alcohol etílico a 70° por tres segundos seguido de desinfección con 0,5 % de NaOCl por diez minutos.

Medio de Cultivo. El estudio consistió en la evaluación de 12 tratamientos con diferentes combinaciones de dos factores [Thidiazurón (0,000, 0,003, 0,005, 0,008, 0,010 mg/L) – periodos de inducción (5, 7, 10 días)]. El medio de cultivo base estuvo constituido por los compuestos minerales M&S (1962) suplementado con vitaminas DKW (1984), 2,0 mg/L de 2,4-D, 2,0 g/L phytigel ajustado a un pH=5,75. Se inocularon 4 explantes en frascos de 7 onz. que contenían 15 ml de medio de cultivo. Se incubó en condiciones oscuras a 24°C ± 1, con una humedad relativa de 46%. Al término del periodo de inducción, los explantes fueron transferidos e incubados en oscuridad por un periodo de 6 días a un medio de crecimiento secundario de callos (MCSC) constituido por compuestos minerales M&S (1962) suplementado con vitaminas Gamborg (1966), 20,0 g/L de glucosa, 2,0 mg/L de 2,4-D, 0,14 mg/L de kinetina, 50 ml/L de agua de coco y 2,2 g/L de phytigel, todo esto ajustado a un pH de 5,78. Se subcultivó nuevamente durante un periodo de 14 días de oscuridad y luego fueron expuestos a una intensidad

luminosa de 700 lux, sobre un medio de cultivo de desarrollo embrionario (MDE) constituido por sales minerales y vitaminas M&S (1962), suplementado con 1,0 mg/L de ácido nicotínico, 2,0 mg/L de tiamina-HCl, 2,0 mg/L de glicina, 100,0 mg/L de myo-inositol, 1 g/L de glucosa, 30,0 g/L de sacarosa, 2,0 g/L de carbón activado y 2,0 g/L de phytigel, todo esto ajustado a un pH de 5,76.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de inducción de callos evaluados en todos los tratamientos demostró que a los 9 días de inducción existió un 100% de reactividad callogénica. Asimismo, el peso de callo fresco demostró que existió una ganancia de callo promedio en 3,86 a 4,99 mg/día evidenciándose una alta tasa de multiplicación celular. La aparición de estados globulares pro-embrionarios de *Sacha inchi* se manifestaron en los tratamientos T2(0,000mg/L – 7 días), T4(0,005mg/L – 7 días), T9(0,008mg/L – 10 días) y T10(0,01mg/l – 5 días), y la conformación del primer estado embrionario (estado globular) se manifestó en el tratamiento T4 (0,005mg/l – 7 días). La exposición de thidiazurón del grupo de las fenilúreas resulta tener cierto comportamiento durante la diferenciación celular, por comportarse mayoritariamente como una citoquinina que regula el comportamiento hormonal en las células (George & Sherrington, 1984; Li *et al.*, 1998).

Fig. 1. A-F: A (10X). Hoja inmadura con 05 días de inducción con crecimiento internodal. B (20X); Meristemoides expresados en organogénesis indirecta (rhizogénesis); C (80X). Callo con estructuras globulares pre-embrionarias en condiciones oscuras; D (50X). Callo compacto no embriogénico con 20 días de incubado en el (MDE); E (60X). Proembrioides globulares pigmentados (expuestos a luz) a los 30 días de incubado en el (MDE); F (80X). Proembrioides globulares con embrioides en estadio globular a los 40 días de incubado en el (MDE). Rh1 = rhizogénesis indirecta, Cp1 = callo



Proembrionario cristalino, Cp2 = callo proembrionario pigmentado, Eg = estado globular.

Cabe mencionar que durante el proceso de inducción de callos se identificaron callos no embriogénicos de consistencia cremosa y cristalina delgada e irregular. La rizogénesis como producto de la organogénesis indirecta en las hojas inmaduras fue una de las más importantes observaciones en este trabajo de investigación.

REFERENCIAS

- Chanatásig, I. 2004. Inducción de la Embriogénesis Somática en Clones Superiores de Cacao (*Theobroma cacao* L.), con Resistencia a Enfermedades Fungosas. M.Sc. Tesis. CATIE. Turrialba -Costa Rica. 33-65 p.
- George, EF; Sherrington, PD. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Part. 1. The Technology. Exegetics Ltd. 709 pp.
- Li, Z; Traore, A; Maximova, S; Gultinan, MJ. 1998. Somatic Embriogenesis and Plant Regeneration from Floral Explants of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Using Thidiazuron. Pennsylvania. Edición P. Ozias-Akins. 1-7 pp.