

## **Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de borojón (*Borojoa patinoi* Cuatr.) fase I.**

### **Optimization of a protocol to obtain friable calli of borojón (*Borojoa patinoi* Cuatr.) phase I.**

*Mauricio Martínez D.<sup>1</sup>, César Augusto Hernández R.<sup>2</sup>, Luis Fernando Restrepo B.<sup>3</sup>.*

#### **Resumen**

Se investigó la influencia de los reguladores de crecimiento para la obtención de callos friables en borojón (*Borojoa patinoi* Cuatr). El material vegetal utilizado se obtuvo de árboles en producción ubicados en el Municipio de San Luis, Antioquia, Colombia. Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% por 25 min más etanol al 70% por 15 min con la adición de dos gotas de Tween 20. Para los diferentes tratamientos se utilizaron como explantes hojas jóvenes obtenidas *in vitro* a partir de semilla, las cuales se cultivaron en el medio MS (1962) suplementado con 2,4-D en combinación con BAP y TDZ, sin obtener respuesta favorable para la obtención de callo friable entre el día 15 al 45 después de iniciado el cultivo. Sin embargo, se realizó otro ensayo con el mismo explante en el medio de cultivo MS (1962) con la adición de 1 mg/L de 2-4 D, como medio para la iniciación de embriogénesis, observándose a los 45 días la formación de callos friables y de color amarillo-verde. Este trabajo es un informe parcial de un macroproyecto sobre la optimización de un protocolo para la obtención de metabolitos secundarios de interés comercial mediante la utilización de suspensiones celulares de *Borojoa patinoi*.

**Palabras claves:** *Borojoa patinoi*, iniciación de callogénesis, callo friable, cultivo *in vitro*, borojón.

#### **Abstract**

The influence of growth regulators to obtain friable calli in borojo (*Borojoa patinoi* Cuatr) was investigated. The used vegetable material was obtained from productive trees located in the town of San Luis, Antioquia, Colombia. Seeds were disinfected with 3% sodium hypochlorite for 20 minutes, plus 70% ethanol for 15 minutes with the addition of two tween 20 drops. In the different experiments, young leaves obtained *in vitro* from seeds were used as explants. They were cultivated in the MS medium supplemented with 2,4-D and combined with BAP and TDZ. No positive response related to the obtaining of friable callus was shown between the days 15 to 45.

- 
- 1 Ingeniero Agropecuario. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Correo electrónico: mauricioam@une.net.co
  - 2 Biólogo, MSc. Facultad de Ciencias Agrarias. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Carrera 58 No 27B- 125, Bello, Antioquia, Colombia. Tel. (4) 4520999 Ext 102, (4) 4663734. Correo electrónico: cesaraugu@une.net.co
  - 3 Especialista. Escuela de Producción Agropecuaria. Universidad de Antioquia. Cra 75 No 65- 87, Medellín, Colombia. Tel: 4259148. Correo electrónico: frbstatistical@yahoo.com.es

However, another test was carried out with the same explants in the MS medium with the addition of 1mg/L 2,4-D, as a medium for the embryogenesis initiation, 45 days later the formation of green yellow friable calli was observed. This work is a partial report of a macro project about the optimization of a protocol to obtain secondary metabolites of commercial interest through cellular suspensions of *Borojoa patinoi*.

**Key words:** Borojo, *Borojoa patinoi*, callogenesis initiation, friable calli, *in vitro* culture.

Recibido: Mayo 24 de 2007      Aceptado: Noviembre 21 de 2007

## INTRODUCCIÓN

El borojó es un árbol frutal perenne de la familia Rubiácea, es un frutal dioico (Mejía, 1984; Arenas, 1985; Jiménez y Restrepo, 1987). Su nombre se deriva del dialecto cítara que traduce "Árbol de cabezas colgantes" (Arenas, *op. cit.*; Córdoba, 1988). Es un árbol de 4 a 6 metros de altura, el fruto tiene un peso promedio entre 450 a 600 g con 8 a 10 cm de diámetro aproximadamente.

Es una especie arbustiva del Chocó localizada especialmente en la Región Central surcada por el río Atrato y sus afluentes, en la Amazonía Colombiana en donde las condiciones ambientales de humedad, sombrío natural y demás factores ecológicos, actúan e influyen en la producción de esta especie.

En las poblaciones de la costa pacífica y la amazonía, tiene diversos usos en procesos agroindustriales y medicinales. En la agroindustria se utiliza para la elaboración de jugos, helados, néctares, mermeladas, vinos, compotas, jaleas, cócteles, bocadillos y tinto (Erazo, 1999). Además, es utilizado por algunas tribus indígenas para preservar cadáveres (Jiménez y Restrepo, *op. cit.*; Correa, 1994), en la medicina casera se utiliza para regular la hipertensión, como diurético, para problemas pulmonares, cicatrización de heridas y la curación de herpes (Bernal et ál, 1999; Jiménez y Restrepo, 1987; Gentry, 1982 y 1988 en Giraldo et ál, 2004).

Uno de sus usos y tal vez el de mayor importancia, es el de combatir la desnutrición,

debido a que se encontró que una libra de pulpa de Borojó equivale a tres libras de carne (Jiménez y Restrepo, *op. cit.*).

Otro de los usos potenciales del borojó según Echeverri, et ál, (1981), es el poseer fitoalexinas, que en la mayoría de los casos, han demostrado poseer acción antifúngica y bactericida.

Por esta gran cantidad de usos, el borojó es un frutal donde los procesos biotecnológicos como la embriogénesis somática y las suspensiones celulares, son técnicas que permiten grandes posibilidades para la obtención de metabolitos secundarios utilizados en la agricultura, en el campo alimentario, farmacéutico, medicinal, en la agroindustria y en el control de plagas (Orozco, et ál, 2002, González, 2003, Caballero, et ál, 2007).

Con base en lo expuesto, se realizó este trabajo mediante el cual se obtuvieron callos friables para ser utilizados posteriormente en suspensiones celulares que permitan la obtención en un futuro de metabolitos secundarios de interés comercial e industrial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, ubicado en el Centro de Laboratorios y Experimentación (CLE), sede Bello, Medellín, Colombia, a 1.420 msnm con una temperatura ambiente promedio de 25°C.

### Origen del material vegetal

El material vegetal se obtuvo de árboles de Borojó ubicados en la vereda Altavista del municipio de San Luis, departamento de Antioquia, Colombia.

### Obtención de los explantes

Para la regeneración de las plantas *in vitro*, se obtuvieron semillas de frutos maduros de árboles de borojó previamente seleccionados. Para la inducción de callos friables se obtuvieron hojas procedentes del material *in vitro* previamente regenerado.

### Desinfección de la semilla

A los frutos maduros procedentes de campo se le extrajeron las semillas, las cuales fueron lavadas cuidadosamente con abundante agua y jabón Tego 51 (Merck®) al 2% para limpiarles el mucílago. Posteriormente se realizó un raspado a las semillas (una especie de lijado o escarificación física) con el propósito de acelerar el proceso de germinación. Se llevaron a la cámara de flujo laminar para realizar la desinfección sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 3% y luego en etanol al 70%, a diferentes tiempos adicionando dos gotas de Tween 20 en 100 ml de solución, seguido de cinco lavados con agua destilada estéril (Tabla 1).

### Obtención de plántulas a partir de semillas

Las semillas se sembraron en el medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con sacarosa (20 g/L) y phytigel (2 g/l), con un pH de 5.7. Se utilizaron 100 semillas debidamente desinfectadas las cuales se sembraron en la cámara de flujo laminar, evaluando el desarrollo germinativo a los 45 días bajo condiciones de luz (2000 lux) y a una temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### Obtención de callos a partir de la siembra de hojas provenientes de plantas obtenidas *in vitro*

Una vez obtenidas las plántulas *in vitro* a los 45 días, se tomaron las hojas como explante para la inducción de callos friables. Se realizaron cortes de la hoja en forma de disco de un tamaño de 0.9 cm de diámetro, sembrando dos discos en cada frasco de composta los cuales contenían el medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D (Acido 2,4 Diclorofenoxiacético), TDZ (Thidiazuron) y BAP (6, Bencilaminopurina) como se describe a continuación, colocando los cultivos bajo condiciones de luz y oscuridad, realizando observaciones a los 45 días para determinar el mejor tratamiento. Los Ensayos realizados fueron los siguientes:

#### 1. Efecto del 2,4-D y BAP en la iniciación de callos friables a partir de hoja procedente de material *in vitro*

**Tabla 1.** Ensayos realizados para la desinfección de la semilla de borojó.

Tratamientos	Dosis	No de semillas utilizadas
Tratamiento 1	Hipoclorito de sodio al 3% x 25 min. + Etanol 70% x 15 min.	50
Tratamiento 2	Hipoclorito de sodio al 3% x 30 min. + Etanol 70% x 5 min.	50
Tratamiento 3	Hipoclorito de sodio al 3% x 40 min. + Etanol 70% x 7 min.	50

Se sembraron las hojas procedentes de *in vitro* en el medio MS (1962) suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D (0, 1, 2 y 3 mg/L) y 6-Bencilaminopurina (BAP) (0, 0.5 y 1 mg/L).

## 2. Efecto del 2,4-D y TDZ en la iniciación de callos friables a partir de hoja procedente de material *in vitro*

Se evaluó el efecto del 2,4-D con concentraciones de 0, 1, 2 y 3 mg/L en combinación con TDZ con concentraciones de 0, 0.5 y 1 mg/L, para la iniciación de callos friables a partir de hoja procedente de material *in vitro*.

## 3. Efecto del 2,4-D en la iniciación de callos friables a partir de hoja procedente de material *in vitro*

Se evaluaron concentraciones de 0, 1, 2, 3 y 4 mg/L de 2,4-D.

Una vez realizados los ensayos anteriormente mencionados, se procedió a evaluar en cada uno de los tratamientos la friabilidad de los callos medida en porcentaje, peso en gramos y el color bajo condiciones de luz y oscuridad.

### Diseño estadístico

Se utilizó un diseño de clasificación experimental en bloques aleatorizados, de efecto fijo, balanceado con base en los arreglos factoriales 3 X 4 para los experimentos 1 y 2 en los cuales se emplearon 40 replicaciones por tratamiento. Para el experimento 3 se empleó un diseño en bloques aleatorizados, efecto fijo, balanceado con cinco clasificaciones y las mismas replicaciones. Se comparó el efecto de los tratamientos y los ambientes para cada una de las variables de clasificación mediante la Técnica de Tukey a un nivel de significancia del 5% complementándose con un análisis descriptivo univariado por tratamiento y ambiente, con el propósito de establecer el promedio, la desviación típica y el coeficiente de variación. La variable número de callos fue transformada con base en  $\sqrt{}$ , mientras que la variable friabilidad se transformó utilizando la función arcoseno

con el objetivo de validar los supuestos. La variable color del callo que es una variable de índole cualitativo, se evaluó con base en una clasificación de colores diseñada por los investigadores.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Desinfección

Como contaminantes más comunes en los cultivos *in vitro* se encuentran los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras; muchos de estos no son problema en campo, sin embargo, se convierten en patógenos *in vitro* ("vitropatógenos"), los cuales generan pérdidas considerables desde el punto de vista investigativo y económico (Alvarado et ál, 1993, 1997 en Pérez, 1998).

Para el control de la contaminación pueden utilizarse sustancias antimicrobianas como son los antibióticos y fungicidas; entre los más empleados se encuentran: cefotaxima (claforan), rifampicina, gentamicina, amfotericin B, benomil y carbendazin (Silva, et ál, 1988; Debergh, 1993; George, 1993 en Pérez, 1998), los cuales no fue necesario utilizar en este trabajo.

En este estudio se evaluaron tres ensayos de desinfección de la semilla de borjón utilizando 50 semillas para cada uno de los tratamientos realizados.

Se encontró que al realizar un lavado con hipoclorito de sodio al 3% por 25 minutos, luego con etanol al 70% por 15 minutos con la adición de dos gotas de Tween 20 al 0.02% (Tratamiento 1), se obtuvo el menor porcentaje de contaminación (8%), comparado con los tratamientos 2 y 3 en los cuales se presentó el 92% y el 14% de contaminación respectivamente, tal y como se observa en la Tabla 2.

Igualmente se encontró que el tratamiento 1, presentó el mayor número de germinación de semillas correspondiente al 95% seguido del tratamiento 3 con el 93% y el tratamiento 2 con el 4%.

**Tabla 2.** Resultados de desinfección de la semilla.

Tratamiento No	No. de semillas evaluadas	No. de semillas contaminadas	% de semillas contaminadas	No. de semillas germinadas	% de germinación de semillas
1 Hipoclorito de sodio al 3% x 25 min + Etanol 70% x 15 min	50	4	8%	44	95%
2 Hipoclorito de sodio al 3% x 30 min. + Etanol 70% x 5 min.	50	48	92%	2	4%
3 Hipoclorito de sodio al 3% x 40 min. + Etanol 70% x 7 min.	50	7	14%	40	93%

Se encontró que la principal fuente de contaminación fue por hongos del tipo levaduras y por otros hongos no identificados; la incidencia de bacterias en los diferentes ensayos evaluados fue nula.

#### **Proceso de germinación de la semilla vía *in vitro* comparado con la germinación vía tradicional.**

Para el proceso de germinación vía *in vitro* se utilizaron un total de 100 semillas. En este trabajo se observó para la germinación de semillas de borjój vía *in vitro*, un comportamiento similar a lo reportado por Erazo (1999) para la germinación en campo vía tradicional, iniciándose el proceso germinativo a los 15 días y obteniendo a los 30 días el 32% y a los 45 días el 95% de emergencia de las vitroplantas.

Como puede observarse, el proceso de germinación de la semilla vía *in vitro* comparado con el proceso de germinación vía tradicional, son procesos similares en lo que tiene que ver con en el porcentaje de plantas obtenidas y el tiempo de germinación; sin embargo, para este tipo de estudios es

más conveniente utilizar el sistema de propagación *in vitro*, ya que la obtención de la vitroplanta completa evita el proceso de desinfección de las hojas comparado con el material obtenido mediante la germinación tradicional, además de permitir la posibilidad de trabajar con material joven para la iniciación de los callos.

En este trabajo se evaluó la germinación *in vitro* de la semilla de borjój a los 15, 30 y 45 días, con el propósito de obtener hojas *in vitro* que posteriormente se utilizaron como explantes para la obtención de callos friables. A los 15 días se observó inicialmente la aparición de una raíz delgada, a los 30 días se observó la manifestación de la plántula completa en 32 semillas de las 100 inicialmente cultivadas pero de un tamaño pequeño, aproximadamente de 3.5 cm de largo y con la presencia de 5 hojas en promedio; a los 45 se observó la presencia de 53 plantas completas adicionales de un tamaño de 6 cm con un promedio de 10 hojas, siendo este el tiempo seleccionado como el mejor para la obtención de los explantes a partir de las hojas formadas *in vitro*. La germinación de unas semillas inicialmente, y posteriormente

de las demás, posiblemente pueda ser ocasionado por los diferentes genotipos de los árboles de Borojó seleccionados como material de estudio. El proceso completo desde el momento inicial de la siembra de la semilla hasta la obtención de la planta completa, se puede observar en la Figura 1.

**Efecto del 2,4-D en combinación con diferentes concentraciones de BAP y TDZ en la iniciación de callos friables a partir de hojas provenientes de cultivo *in vitro***

El callo es un crecimiento de células desorganizado obtenido a partir de un determinado tejido. La formación de callos comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente se desdiferencian ante la presencia de una auxina exógena en el medio de cultivo (Pérez, 1998). El callo se inicia por la proliferación de células en el punto de corte del explante o en la superficie interna del integumento (cerca al núcleo) y también a partir de células perivasculares (Michaux-Ferrière y Carron, 1989).

Se realizaron dos ensayos diferentes con

el propósito de obtener callos friables de borjón a partir de hojas provenientes de cultivo *in vitro*, utilizando diferentes concentraciones de 2,4-D en combinación con BAP y TDZ, igualmente con diferentes concentraciones.

En los ensayos anteriormente mencionados a partir del día 15 y hasta los 45 días de cultivo, se comenzó a observar la presencia y formación de callos friables tanto bajo condiciones de luz como de oscuridad en el tratamiento No 1 en los dos experimentos realizados (0 mg/L de BAP y TDZ y 1 mg/L de 2,4-D); sin embargo, los demás tratamientos en los dos experimentos, fueron de apariencia dura (compactos), de tamaño pequeño y color blanco o café. Por esta razón, se realizó el tercer experimento utilizando únicamente diferentes concentraciones de 2,4-D, cuyos resultados se reportan mas adelante.

Según Ettiene et ál, (1991), el análisis que se puede hacer de la influencia de los reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro* generalmente se ve alterado debido a que es muy poco lo que se conoce sobre el grado de absorción, migración y metabolismo de estos elementos vía embriogénesis somática. Algunos investigadores, comenta



Figura 1. Apariencia de las semillas y vitroplantas en el tiempo discriminado por días.

el autor, reportan que los tejidos embriogénicos son muy ricos en ABA (Acido Abscísico) mientras que el contenido de auxinas varía considerablemente de una especie a otra. La adquisición de la capacidad embriogénica de los callos puede estar relacionada con el establecimiento de un balance específico entre diferentes hormonas de tipo endógeno. La manifestación de callos duros, pequeños y de color blanco entre los 15 a los 45 días, y su permanencia en este estado, probablemente está relacionada con el rompimiento de este balance hormonal.

Para este ensayo se considera que el genotipo de los árboles de borjój seleccionados, las concentraciones de las hormonas de crecimiento y sus combinaciones, posiblemente tengan incidencia en los resultados, lo cual puede verse reflejado en una respuesta negativa que impide la manifestación y aptitud de la hoja *in vitro* para la formación de líneas de callos friables proliferantes.

#### Efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en la iniciación de callos friables a partir de hojas provenientes de cultivo *in vitro*

Es necesario la presencia de una auxina para la iniciación de un callo friable. Por lo general, una de las auxinas más utilizadas es el 2,4-D, el cual, aparentemente brinda el estímulo o inicia la inducción de la callogénesis, sin embargo, la maduración de los embriones y la germinación no ocurre en presencia del 2,4-D para lo cual es necesario realizar varios subcultivos (Roca y Mroginski, 1991).

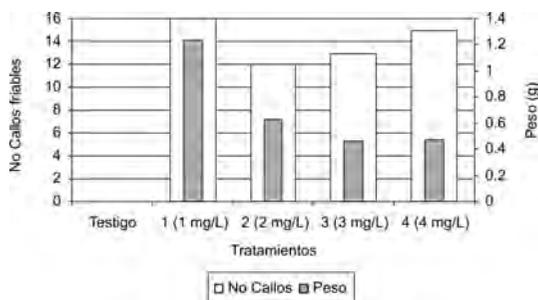
Son muchos los investigadores que han utilizado el 2,4-D, y muchas las plantas con las que se ha trabajado este regulador de crecimiento para obtener callogénesis debido a su potente efecto. En trabajos realizados por Dublin (1980), Gallardo y Yuffá (2000), y González, 2003, reportan la utilización del 2,4-D en café (especie de la misma familia del borjój), en los cuales obtuvieron callos friables.

Son muy pocos los trabajos realizados con Borjój (*Borojoa patinoi*) en los cuales se

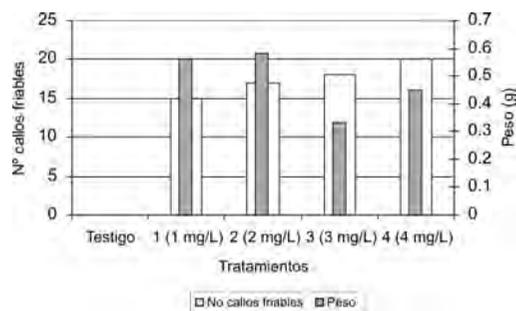
haya reportado la obtención de callos friables a partir de hoja joven como explante inicial.

En trabajos realizados por Martínez y Gutiérrez (2005) en Noni (*Morinda citrifolia*) otra especie de la familia de las rubiáceas, establecieron que la concentración de 1mg/L de 2,4-D induce la formación de callos friables utilizando las hojas jóvenes como explante inicial de árboles de campo, concentración que igualmente se encontró en este trabajo como la ideal en los tres experimentos realizados.

En este ensayo se evaluó el efecto únicamente de diferentes concentraciones de 2,4-D para la producción de callos, su peso en gramos y la friabilidad, a partir de hojas procedentes de cultivo *in vitro* sembradas en el medio MS (1962), bajo condiciones de luz y oscuridad. Los resultados obtenidos a los



**Gráfica 1.** Peso promedio en gramos y número de callos friables observados en cada uno de los tratamientos realizados con diferentes concentraciones de 2,4-D, evaluados a los 45 días bajo condiciones de luz.



**Gráfica 2.** Peso promedio en gramos y número de callos friables observados en cada uno de los tratamientos realizados con diferentes concentraciones 2,4-D evaluados a los 45 días bajo condiciones de oscuridad.

45 días bajo condiciones de los dos ambientes evaluados se observan en las gráficas 1 y 2:

En las evaluaciones realizadas en este estudio bajo condiciones de luz, se observó que el tratamiento No 1 (1 mg/L de 2,4-D) presentó el mejor peso promedio (1.235 g) y una buena producción de callos friables (16), seguido del tratamiento No 4 en el cual se encontraron 15 callos friables pero con un peso promedio de 0.476 g, el cual es inferior al obtenido con el tratamiento No 1.

Bajo condiciones de oscuridad se encontró que el tratamiento No 2 (2 mg/L de 2,4-D) fue el que mejor peso promedio presentó (0.581 g), aproximadamente la mitad del peso encontrado en el experimento realizado bajo condiciones de luz, y un número de 16 callos friables que es un número muy similar para ambos ambientes (gráfica 2).

Con base en estos resultados se observó que bajo condiciones de luz, se encontró mayor formación de masa de callo friable de color variable (Tratamiento No 1), lo cual permitirá realizar adecuadamente en un futuro, el proceso de suspensiones celulares con el propósito de aislar metabolitos secundarios de amplia utilidad tanto a nivel industrial como medicinal.

Se ha observado que la sacarosa, el calcio, las concentraciones de los reguladores de crecimiento y diferentes fotoperíodos (luz y oscuridad), tienen algo que ver con los diferentes colores que presentan los callos friables. Además, el color de estos no tiene mucha incidencia cuando estos son colocados en un medio líquido para llevar a cabo cultivos en suspensión (Montoro, et ál, 1993)

De acuerdo con los análisis estadísticos basados en  $\bar{X} \pm Std$ , Cv y en la Prueba de Comparación de Tukey (Tabla 3), se pudo establecer que se presentaron diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento No. 1 y los demás ( $P < 0.05$ ) y entre todos los tratamientos y el testigo ( $P < 0.05$ ), pero no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos 2, 3 y 4 ( $P > 0.05$ ), siendo

el tratamiento No 1 el mejor para la variable peso promedio del callo, En lo que tiene referencia con la friabilidad, se presentaron diferencias entre los tratamientos 1, 2, 3 y 4 con respecto al testigo ( $P < 0.05$ ), sin embargo, entre los tratamientos 1, 2, 3 y 4 no se encontró diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) lo cual significa que los tratamientos realizados presentaron desde el punto de vista estadístico una friabilidad similar.

De acuerdo con los análisis estadísticos que se muestran en la Tabla 4, se encontró que los ensayos realizados bajo condiciones de luz y oscuridad presentaron diferencias estadísticas para la variable peso ( $P < 0.05$ ), lo cual significa que es más conveniente un ambiente luminoso para obtener callos de buen tamaño, color y peso. No se encontraron diferencias estadísticas para la variable friabilidad ( $P > 0.05$ ), lo que quiere decir que no hay incidencia del ambiente para la obtención de callos friables.

Michaux- F y Carron (1989), comentan que la luz suministrada a los cultivos debe ser evaluada en cuanto a la calidad, intensidad y período de suministro. La respuesta morfogénica de un explante puede variar según se le proporcione luz o no. Para estimular la formación de callos es común que se prefiera la oscuridad, sin embargo esto depende de la especie que se seleccione para evaluar. Sin embargo, se ha observado que la luz tiene efecto sobre los colores que presentan los callos asociados con los reguladores de crecimiento. El suministro de luz favorece la diferenciación de órganos, lo cual no es el objetivo de este estudio.

En este estudio se encontraron callos con colores que variaron desde el amarillo claro pasando por el verde hasta el café, con base en los colores predeterminados por los investigadores.

El callo puede tener diferentes apariencias y color en dependencia de la especie o genotipo con que se trabaje, y por las condiciones del cultivo *in vitro* como luz y oscuridad o por el tipo de reguladores de crecimiento que se utilicen.

**Tabla 3.** Análisis descriptivo y comparativo entre los diferentes tratamientos con 2,4-D para las variables peso y friabilidad.

Variable	Tratamientos				
	Testigo	1	2	3	4
	$\bar{X} \pm St_d \quad Cv$				
Peso	0±0 . c	0.897±0.74 82.7 a	0.606±0.44 74.2 b	0.398±0.32 80.3 b	0.463±0.27 59.9 b
Friabilidad	0±0 . b	82.5±32.8 39.8 a	77.5±32.8 42.3 a	82.5±27.1 32.8 a	95±14.1 14.8 a

Letras distintas muestran diferencias estadísticas.

**Tabla 4.** Análisis comparativo bajo condiciones luz y oscuridad para las variables peso y friabilidad

Variable	Ambiente	
	Luz	Oscuridad
	$\bar{X} \pm St_d \quad Cv$	
Peso	0.56 ± 0.59 105.4 a	0.38±0.41 108.5 b
Friabilidad	1.15 ± 42.7 70.1 a	0.97±41 55.5 a

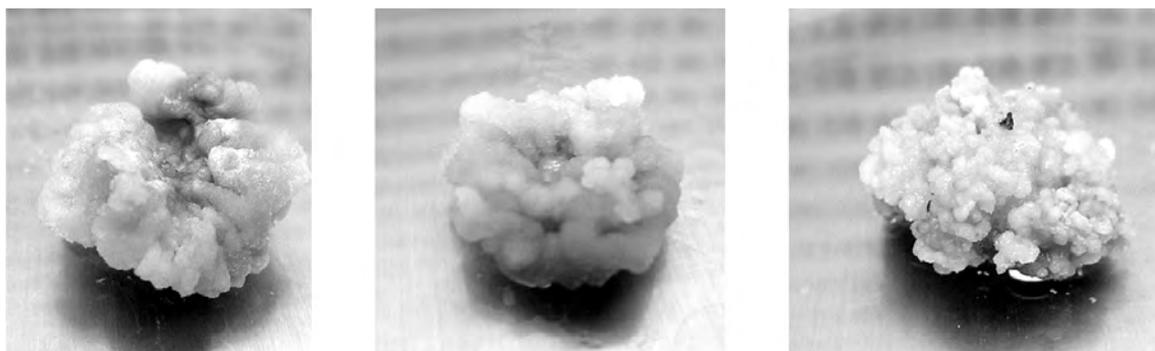
Letras distintas muestran diferencias estadísticas.

En el tratamiento No 1 (1 mg/L de 2,4-D) bajo condiciones de luz, el cual fue seleccionado como el mejor para la variable color, se encontraron dos callos de color café y el resto estuvieron entre el amarillo y el verde (amarillo claro 7 callos, amarillo 2 callos, verde claro 3 callos y verde amarillo se obtuvieron 6), los cuales presentaron excelente friabilidad, lo cual es la base fundamental

para el desarrollo y posterior utilización en suspensiones celulares tal y como se puede observar en la figura 2.

## CONCLUSIONES

Para la desinfección de la semilla se estableció al tratamiento No 1 como el mejor, el cual



**Figura 2.** Aspecto de los callos friables obtenidos al día 45 con una concentración de 1 mg/L de 2,4-D bajo condiciones de luz.

consistió en lavar la semilla con hipoclorito de sodio al 3% por 25 min, luego con etanol al 70% por 15 min con la adición de dos gotas de Tween 20 al 0.02% y cinco enjuagues con agua destilada estéril.

Se estableció que una concentración de 1 mg/L bajo condiciones de luz, es el mejor tratamiento para la obtención de callo friable, con el mayor peso promedio, y de color entre el amarillo y el verde, el cual puede estar relacionado con el genotipo o con la acción de la hormona de crecimiento utilizada.

Se obtuvo una germinación del 95% a partir de la semilla al día 45 utilizando el método de cultivo *in vitro*.

No existen diferencias entre el proceso de germinación de la semilla vía *in vitro* comparado con el sistema de propagación tradicional, en cuanto a la eficiencia de germinación.

Combinaciones de 2,4-D con BAP y TDZ no manifestaron proliferación de callo friable a partir de hoja procedente de material *in vitro*.

Se obtuvieron callos friables cuyo color varió desde el blanco, blanco amarillento, verde hasta el pardo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a las directivas de la Facultad de Ciencias Agrarias del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, a Silvia Elisa Buitrago, monitora del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Politécnico Colombiano, al Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada, GIBA de la misma institución.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarado, Y.; Herrera Y. L.; García, A. 1993. Estudio preliminar sobre la contaminación microbiana en la biofábrica de Villa Clara. En tercer coloquio internacional de biotecnología de las plantas. Memorias. Santa Clara, Cuba, p. 15.

Alvarado, Y.; Herrera, M.; Suárez, O.; Rivero, L.; García, A.; Acosta, M. 1997. Control de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. En: Tercer seminario internacional de sanidad vegetal, (1997) La Habana, Cuba. Palacio de Convenciones, Memorias. Habana, Cuba, p. 76-77.

Arenas, L. E. 1985. El borojó (*Borojoa patinoi*, Cuatr.) y sus posibilidades de explotación en el Chocó, Codechocó. En: Memorias seminario recursos genéticos promisorios (1981-2001) (2001: Medellín). Memorias. Medellín, Universidad Nacional de Colombia, p. 168-181.

BernaL, J. A.; Tamayo, A.; Londoño, M.; Hincapié, M. 1999. Frutales de clima cálido: El Borojó, Rionegro: Cartilla divulgativa, Corpoica, Centro de Investigaciones La Selva, p. 10.

Caballero, C.; Cardona, N.; Giraldo, C.; Hernández, C. 2007. Evaluación del crecimiento celular y consumo de sustrato a partir del establecimiento de suspensiones celulares de borojó (*Borojoa patinoi*, Cuatrec.). Trabajo de grado Ingeniería de Procesos, Facultad de Ingenierías, EAFIT. Medellín, p. 17.

Córdoba, J.Á. 1988 El Cultivo del Borojó. Revista El cacaotero colombiano. Vol 11, No 36: 35-49.

Correa, G. 1994. Evaluación *in vitro* del posible efecto citoestimulante del *Borojoa Patinoi*, Cuatr. Tesis ( Químico Farmacéutico). Universidad de Antioquia, Medellín, p. 26.

Debergh, P.C. 1993. Carbendazim. A Fungicide that promotes micropropagation. *Agricell Report* Vol. 21. p.8.

Dublin, P. 1980. Induction de bourgeons neoformes et embryogenese somatique. En: Roca W. M, Mroginski, L.A, (1991) Cultivo de tejidos en la agricultura "Fundamentos y aplicaciones". Ed. CIAT, p. 953.

Echeverry, F.; Quijano, J.; Muñoz, F.; Layos, E. 1981. Fitoalexina en *Borojoa Patinoi* Cuatrecasas. En: Seminario recursos genéticos promisorios (1981- 2001) (2001: Medellín) Memorias. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, P. 2.

Erazo, Y. 1999. Especies promisorias de la Amazonía, Corpoica, p. 60-71.

Ettine, H.; Berger, A.; Carron, M.P. 1991. Water status of callus from *Hevea brasiliensis* during

- induction of somatic embryogenesis. *Physol. Plant* Copenhagen, p. 213-218.
- Gallardo, L.H.; Yuffá, A.M. 2000. Multiplicación masiva del café (*Coffea arabica* L. cv. Cati-mor) mediante cultivo de suspensiones celulares embriogénicas. <http://acta.ivic.ve/51-2/articulo5.pdf>
- Gentry, A.H. 1982. Phytogeography patterns as evidence for a Choco refuge.. In G.T. Prance, ed. Biological diversifications in the tropic. Columbia University press, New York, USA, p.112-136.
- Gentry, A.H. 1988. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. *Ann. Missouri Botanical Garden*. 75:1-34.
- George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, Part 1. 2nd Ed., p. 130-143.
- Giraldo, C.I.; Rengifo, L.; Aguilar, E.; Gaviria, D.; Alegría, A. 2004. Determinación del sexo en borojón (*Borojoa patinoi*, Cuatrecasas) mediante marcadores moleculares. *Revista Colombiana de Biotecnología* Vol. 6, No 2: 9-14.
- González, V. 2003. Estudio del proceso de callogénesis en genotipos promisorios de cafeto (*Coffea canerophora* P). *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol 5 No 1, 16-22.
- Jiménez, B.; Restrepo, D. I. 1987. Aspectos agronómicos y botánicos del cultivo de borojón (*Borojoa patinoi* Cuatr.). Tesis (Ing. Agrónomo) Facultad de Agronomía. Universidad Nacional, Sede Medellín. p. 70.
- Martínez, A. D.; Gutiérrez, A. L. 2005. Obtención de callos friables a partir de hoja de la *Morinda citrifolia*. Bioproyecto, EAFIT. Medellín, p. 15.
- Mejía, M. 1984. Borojón. Fruta Ecuatorial Colombiana. Colombia Amazónica. Vol 1 (2): 89-106.
- Michaux, F. N.; Carron, M. P. 1989. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. The importance of the timing of subculturing. *Netherlands Plant cell tissue and organ culture*. Vol. 19: 243- 256.
- Montoro, P.; Etienne, H.; Michaux-ferriere, N.; Carron, M. P. 1993. Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 331-338.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum* 15: 473-497.
- Orozco, F.; Hoyos, R.; Arias, M. 2002. Cultivo de células vegetales en biorreactores: Un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. Vol 55, No 1: 1473- 1495.
- Pérez, J. N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. pp 390.
- Roca, W. M.; Mroginski, L.A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura "Fundamentos y aplicaciones". Ed CIAT. p 953.
- Silva, S.; Pereira, T.; Luz, E .D. 1988. Propagacao do guarana in vitro I. Selecao de fungicidas. *Fitopatologia Brasileira* 13: 183-185.