

**RESPUESTA MORFOGENETICA DE LOS APICES DE PEJIBAYE
(*Bactris gasipaes* H. B.K.) CULTIVADOS *in vitro*
EN CONDICIONES DE LUZ Y OSCURIDAD^{1/}**

Roberto Valverde*
Luis Gómez*
Oscar Arias*
Trevor Thorpe**

ABSTRACT

Morphogenesis in shoot tips callus of pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) under light and dark conditions. Morphogenesis in callus from shoot tips of pejibaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) cultured under different light conditions is reported. Callus was induced on a modified Murashige and Skoog medium, supplemented with 0.60 mg/L picloram (4-amino, 3, 5, 6-trichloro picolinic acid) and 5.0 mg/L N⁶-benzyladenine (BA), after three months in the dark. The concentration of picloram was then reduced to 0.03 mg/L and the tissues were maintained in the dark during an additional three month period on this medium, before final transfer to a solid medium without phytohormones. The experiment had 100 replicates, and fifty of these were transferred to the light after the initial six month period. Under dark conditions callus was pale yellow in color, growth was rapid, and new shoots arose via organogenesis. In contrast with this situation when these calli were exposed to the light, oxidation occurred and after one month a new callus having a low multiplication potential appeared. Within this callus, however, a low frequency of somatic embryos and organogenic shoots were observed.

INTRODUCCION

El alto valor nutritivo de la harina de pejibaye como sustituto del maíz en las raciones alimenticias para animales, así como el potencial de exportación de sus frutos y el palmito, ubican a esta palma como un excelente cultivo para los sistemas de producción en el trópico. Sin embargo, por ser naturalmente autoincompatible, la propagación por semilla de aquellos materiales con características agronómicas deseables, se torna difícil

debido a la variabilidad genética de la progenie (Mora-Urpí, 1983). Bajo estas condiciones la propagación vegetativa *in vitro* aparece como la única alternativa para solucionar la problemática de la reproducción clonal y masiva del pejibaye, tal y como se ha hecho en otras palmas (Pannetier *et al.*, 1981; Fischer y Tsai, 1978; Paranjothy y Othman, 1982; Hanower y Pannetier, 1982; Tisserat, 1979).

En tales condiciones de propagación, la luz juega un papel muy importante en la expresión morfo genética de los tejidos que se utilizan para el establecimiento del cultivo; así, el inicio de la división celular de los explantes y el crecimiento de callos se puede favorecer regulando la luz tanto en intensidad como en calidad.

George y Sherrington (1984) informan que, para ciertas especies, un período de oscuridad estimula la formación del callo y su crecimiento posterior, inhibiendo la formación de brotes adventicios. En pejibaye, Arias y Huete (1983), observaron

1/ Recibido para su publicación el 3 de diciembre de 1986.

* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica.

** Grupo de Investigación en Fisiología Vegetal, Departamento de Biología, Universidad de Calgary, Canadá.

que luego de dos meses en la oscuridad, los callos que se transfieren a la luz entran en un proceso organogénico, que se caracteriza por la producción de brotes y raíces en forma independiente. Igualmente Huxter *et al.*, (1981) indican que los callos de tabaco crecen más cuando se cultivan en la oscuridad, aún cuando la producción de brotes es más lenta, ya que se necesita del estímulo de la luz para que se manifieste la organogénesis.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la morfogénesis del pejibaye en condiciones de luz y de oscuridad.

MATERIALES Y METODOS

Las plántulas usadas en este experimento las donó la Asociación Bananera Nacional (ASBANA), de la Finca La Rita, ubicada en Guápiles, Costa Rica.

Se usaron plántulas de aproximadamente 15 meses de edad a las cuales se les eliminó la parte aérea y las raíces, hasta dejar una sección de tallo de 2 cm donde se encuentra el meristema. Estas secciones se desinfectaron superficialmente con alcohol de 70% por un minuto, luego con hipoclorito de sodio al 2,5% v/v por 15 minutos, y en la cámara de transferencia se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Se disectaron asépticamente hasta tener un ápice de 5 mm que se puso sobre un puente de papel en el medio de Murashige y Skoog (1962) modificado de la siguiente manera: se sustituyó el NH_4NO_3 por NH_4Cl (535 mg/L) y el KNO_3 se aumentó a 2528 mg/L, además se adicionó myo-inositol (100 mg/L), tiamina HCl (0,4 mg/L), piridoxina HCl (0,5 mg/L) ácido nicotínico (0,5 mg/L), picloram (ácido, 4-amino 3,5,6-tricloro picolínico) (0,06 mg/L), BAP (6-benzilaminopurina) (5 mg/L), sacarosa (30 g/L) y agua de coco 15% v/v. El pH del medio se ajustó a 5,7.

Para este ensayo se utilizaron 100 repeticiones, que se cultivaron en la oscuridad y a una temperatura de 25 a 28 C por seis meses; el medio se renovó a los tres meses, y se disminuyó la concentración de picloram a 0,03 mg/L; al final de este período los explantes se cambiaron mensualmente a un medio sin hormonas y solidificado con gelrite (2 g/L). A partir de este momento el 50% de las repeticiones se mantuvo en la oscuridad y el otro 50% en condiciones de luz, con un fotoperíodo de 12 horas y una intensidad de 46 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}$.

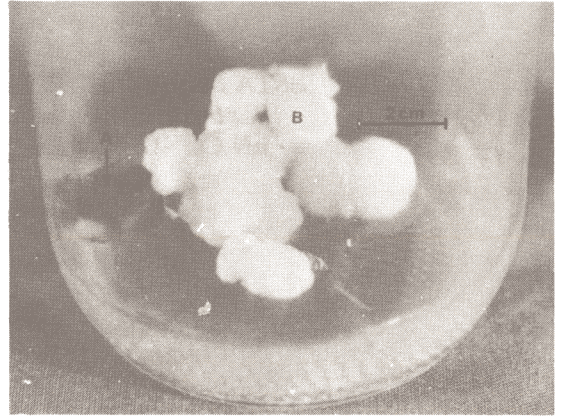


Fig. 1. Crecimiento de un callo secundario a partir de un callo oxidado cultivado a la luz. (A = tejido oxidado, B = callo secundario).

Además, los tejidos se pesaron cada 10 días y se les evaluó su potencial morfogenético.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la presente investigación demuestran que el picloram en la dosis de 0,06 mg/L y en condiciones de oscuridad, induce en pejibaye la formación de callos a partir de ápices, los cuales muestran un crecimiento acelerado cuando se reduce la concentración de picloram a 0,03 mg/L, para alcanzar a los seis meses un tamaño aproximado de 1,0 cm^2 . Arias y Huete (1983) encontraron resultados similares en la misma planta al usar 2,4-D. Los tejidos que se transfieren a la luz sufren un proceso oxidativo total (Figura 1A); no así aquellos callos que se subcultivan en la oscuridad. Esta oxidación a la luz se mantiene por aproximadamente un mes, momento en el cual se inicia la formación de un nuevo callo a partir del tejido oxidado (Figura 1B), fenómeno que también se ha observado en café (Sondahl *et al.*, 1981).

Las determinaciones de peso de los callos cada 10 días muestran un efecto favorable en el crecimiento cuando estos se cultivan a la oscuridad. Los valores acumulativos de la Figura 2 indican que hay un mayor crecimiento en los callos que se cultivaron en condiciones de oscuridad, con ganancias de peso de hasta 1,1 g al final de las mediciones, con respecto a los materiales que crecieron a la luz. Esta respuesta es concordante con las observaciones de Huxter *et al.*, (1981) en tabaco. También se observa que en los callos que cre-

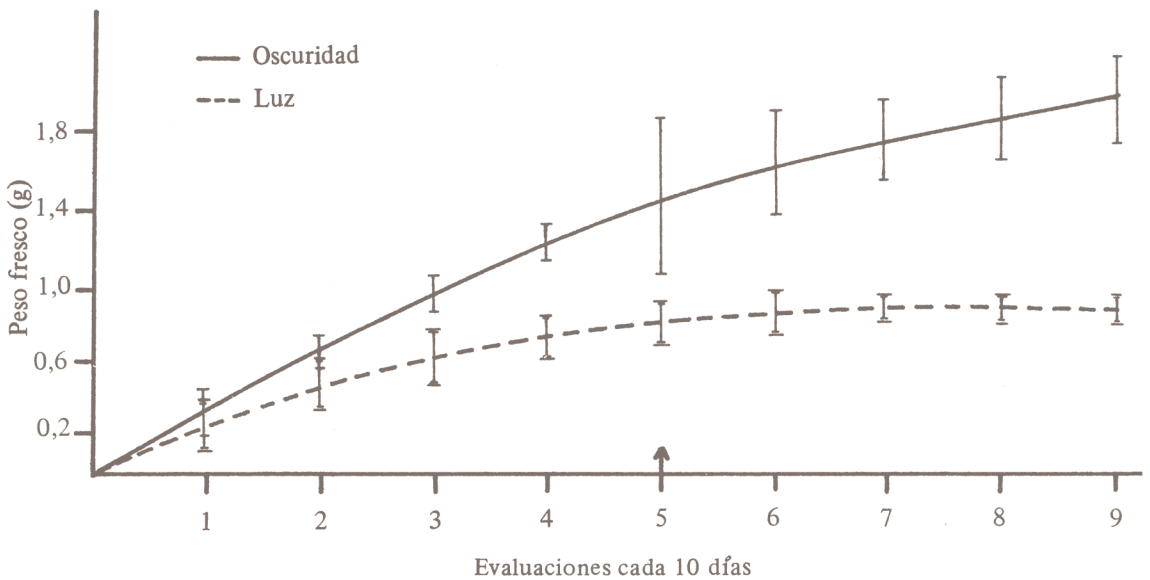


Fig. 2. Efecto de la luz sobre el crecimiento de callos ya formados en el medio MS CIA (Murashige y Skoog, modificado para pejibaye), con una renovación del medio en la evaluación 5 (↑).

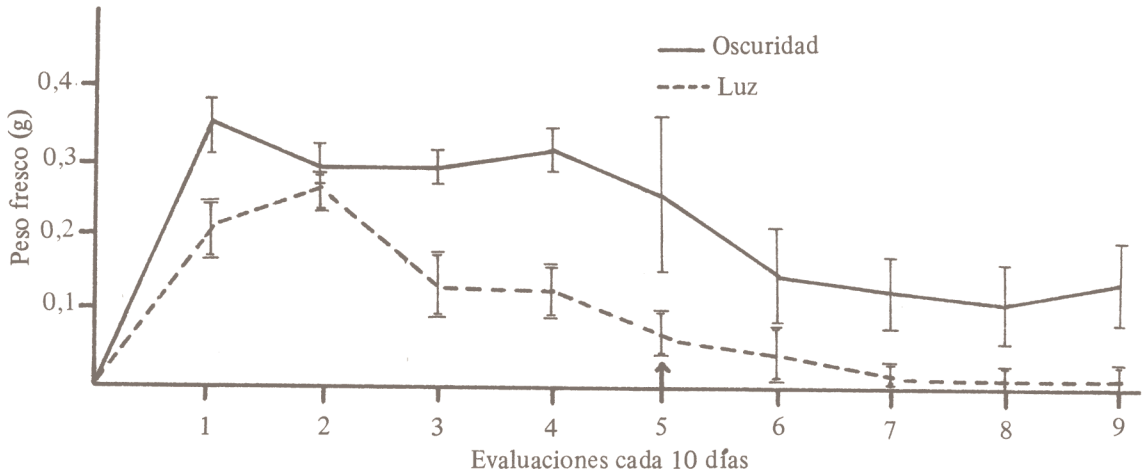


Fig. 3. Efecto de la luz sobre el incremento en peso fresco obtenido en cada evaluación, La flecha (↑) corresponde a una renovación del medio.

cieron a la luz hubo una disminución marcada en su ritmo de crecimiento, fenómeno que George y Sherrington (1984) y Grant *et al.* (1983) mencionan como frecuente en una gran cantidad de especies.

En la Figura 3 se presentan las variaciones en el peso de los callos en cada medición. A la luz se observa un crecimiento acelerado hasta los 20 días y luego ocurre una disminución progresiva del peso de los tejidos, que se mantiene hasta los 60

días. A partir de este momento, el callo casi no crece, debido, probablemente a varios factores como son el agotamiento del medio, la acumulación de metabolitos tóxicos y la evaporación que acompaña cambios en la concentración de los nutrientes del medio (George y Sherrington, 1984), fenómenos que, obviamente, se dan con mayor intensidad en los cultivos a la luz.

En el caso particular del pejibaye, se puede inferir que estas condiciones de cultivo a la luz

favorecen el desarrollo de una embriogénesis somática precoz en detrimento de la multiplicación del callo (Valverde *et al.*, 1987).

Por el contrario, cuando los tejidos se mantienen en la oscuridad los callos tienen un crecimiento casi constante hasta los 40 días y luego empiezan a reducir en forma gradual su crecimiento; esto pareciera indicar un agotamiento menos acelerado del medio. No se observa la presencia de oxidación en los explantes, fenómeno que generalmente está asociado con la producción de sustancias fenólicas y que se favorece en presencia de la luz.

Una permanencia prolongada de los cultivos a la oscuridad generalmente conduce a la organogénesis, proceso que Thorpe (1980), describe como posible cuando los medios se suplementan con fuentes orgánicas.

Los resultados de la Figura 3 parecieran indicar también que, en el caso particular del peji-baye, el cambio de medio debe realizarse cada tres o cuatro semanas cuando se desea la multiplicación rápida de callos, particularmente en los tejidos expuestos a la luz, donde el deterioro del medio es más acentuado.

En el seguimiento de los procesos morfogénéticos en los cultivos mantenidos en la oscuridad, se observó, una tendencia netamente organogénica que se caracterizó por una alta producción de brotes apicales (Figura 4A), la cual según George y Sherrington (1984) en otros cultivos sólo se induce en la oscuridad si se adiciona al medio una alta cantidad de citocinina (aproximadamente 10 veces más que a la luz).

Por el contrario, los tejidos expuestos a la luz mostraron un proceso embriogénico (Figura 4B), donde además se formaron brotes de origen organogénico, aunque en poca cantidad (Figura 4C). Esta respuesta morfogénica ocurre cuando los tejidos pasan de la oscuridad a la luz, ya que son las calidades de luz blanca y roja del espectro las que promueven la formación de brotes a partir de los callos (George y Sherrington, 1984). Fraser *et al.* (1967) y, Yeoman y Davison (1971), sugieren que la cantidad de brotes es baja debido a que las células externas de los tejidos sirven de filtro a las internas contra tales longitudes de onda. Chandler y Thorpe (1985), indicaron que la formación de brotes se inhibe en condiciones de luz superiores a los $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}$. En síntesis, los callos muestran un desarrollo mayor en la oscuridad, debido a que no se inhibe la división celular

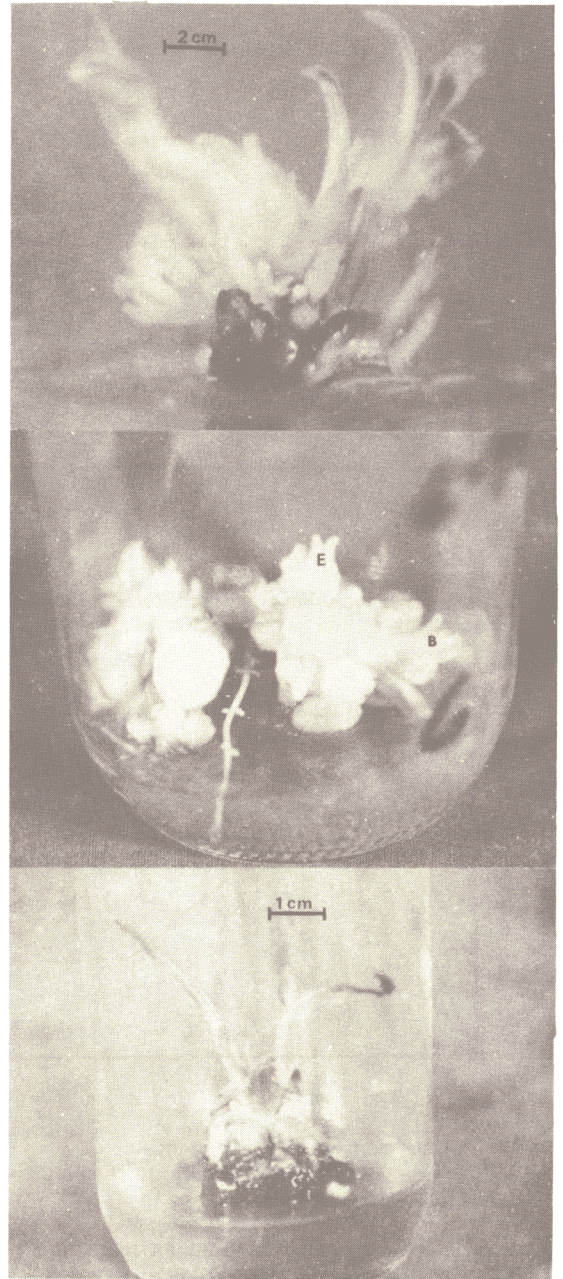


Fig. 4. A. Callo organogénico a la oscuridad, nótese la gran producción de brotes.

B. Callo a la luz, nótese la presencia de embrioides (E) y de brotes de origen organogénico (B), de baja frecuencia en el mismo callo.

C. Callo organogénico a la luz, nótese una menor formación de brotes que la observada en la figura 4A.

por parte de la luz (Fraser *et al.* 1967) y la organogénesis ocurre luego de períodos prolongados en esta condición (Thorpe, 1980). Se han observado respuestas similares en otras especies, como café, cultivar Robusta (Conger, 1981).

Cuando los callos se cultivaron a la luz, aunque su desarrollo fue lento; se observó un proceso claro de embriogénesis somática (Valverde *et al.*, 1987), el cual no excluye que algunos callos produzcan brotes de origen organogénico. Este fenómeno coincide con las observaciones de Arias y Huete (1983), quienes desarrollaron callos de pejibaye en la oscuridad, de los que posteriormente se formaron brotes a la luz.

Como consecuencia de los resultados aquí expuestos, es claro que el manejo de la luz tiene gran influencia sobre las respuestas morfogénicas de los tejidos de pejibaye *in vitro*, lo que obliga a una rigurosa selección del tiempo de exposición, calidad e intensidad del espectro, con el fin de obtener respuestas claras y constantes que permitan la aplicación sistemática de la metodología para la propagación clonal del pejibaye.

RESUMEN

Se estudió el efecto de la luz sobre la morfogénesis de ápices de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) cultivados en un medio líquido de Murashige y Skoog (1962) modificado, al cual se le agregaron 0,06 mg/L de picloram y 5 mg/L de 6 BAP. Después de tres meses se redujo la concentración de picloram a 0,03 mg/L y los tejidos se mantuvieron por tres meses más en ese medio. Luego se pasaron a un medio sólido y sin hormonas que se renovó mensualmente. El experimento constó de 100 repeticiones, que se cultivaron en la oscuridad por seis meses, pasando luego 50 a la luz y las restantes 50 se mantuvieron a la oscuridad.

Los resultados indican que en oscuridad se desarrolla un callo de apariencia friable, color amarillo pálido y de crecimiento rápido, a partir del cual se forman gran cantidad de brotes de origen organogénico. Cuando estos callos se exponen a la luz se oxidan, y luego de un mes se forma un nuevo callo de bajo potencial de multiplicación, del cual se originan, en baja frecuencia, embrioides somáticos y brotes organogénicos.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean dejar constancia de su agradecimiento al Centro de Investigaciones para el Desarrollo de Canadá (CIID) por su auspicio y financiamiento.

LITERATURA CITADA

- ARIAS, O.; HUETE, F. 1983. Propagación vegetativa *in vitro* del pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Turrialba 33(2): 103-108.
- CHANDLER, S. F.; THORPE, T. A. 1985. Setting up and maintenance of tissue and cell cultures. *In* Techniques in the life sciences. Ed. by K. Jurstak. Ireland, Elsevier Scientific Publishers. 21 p.
- CONGER, B. V. (ed). 1981. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. Florida, CRC Press. 272 p.
- FISHER, J. B.; TSAI, J. H. 1978. *In vitro* growth of embryos and callus of coconut palm. *In vitro* 14(3): 307-311.
- FRASER, R. S. S.; LOENING, V. E.; YEOMAN, M. M. 1967. Effect of light on cell division in plant tissue culture. *Nature* 215:873.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture. England, Exegetics, 709 p.
- GRANT, L; BEVERSDORF, W. D.; ZILKA, J. 1983. Response of light -and dark- grown callus of atrazine-resistant and susceptible rapeseed (*Brassica napus*) to varying concentrations of atrazine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2(3): 185-189.
- HANOWER, J.; PANNETIER, C. 1982. *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. *In* Plant tissue culture. Ed by A. Fujiwara. Tokyo. p. 745-746.
- HUXTER, T.; THORPE, T. A.; REID, D. 1981. Shoot initiation in light and dark-grown tabaco callus: the role of ethylene. *Physiologia Plantarum* 53: 319-326.
- MORA-URPI, J. 1983. El pejibaye *Bactris gasipaes* H.B.K.: origen, biología floral y manejo agronómico. *In* Palmeras poco utilizadas en América Tropical. Informe de la reunión de consulta FAO y CATIE. San José, Costa Rica. 172 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-487.
- PANNETIER, C.; ARTHUIS, P.; LIEVOUX, D. 1981. Neoformation de jeunes plantes d' *Elaeis guineensis* a partir de cals primaires obtenus sur fragments

- foliaires cultivées *in vitro*. *Oléagineux* 36(6): 119-120.
- PARANJOTHY, K.; OTHMAN, R. 1982. *In vitro* propagation of oil palm. *In Plant tissue culture*. Ed. by A. Fujiwara. Tokyo. p. 747-748.
- SONDAHL, M. R.; MONACO, L. C.; SHARP, W. R. 1981. *In vitro* methods applied to coffee. *In Plant tissue culture; methods and applications in agriculture*. Ed. by T. A. Thorpe. New York, Academic Press. p. 325-347.
- THORPE, T. A. 1980. Organogenesis *in vitro* structural, physiological and biochemical aspects. *In Int. Rev. Cytol.*, suppl. A. Ed. by I. K. Vasil. New York, Academic Press. 253 p.
- TISSERAT, B. 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* 30 (119): 1275-1283.
- VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. A. 1987. Picloram induced somatic embryogenesis in peji-baye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (en prensa).
- YEOMAN, M. M.; DAVISON, A. W. 1971. Effect of light on cell division in developing callus cultures. *Ann Bot.* 35: 1085-1100.