

## Micropropagación del híbrido Cubano de Papaya IBP 42-99

Jorge Gallardo Colina\*, Laisyn Posada Pérez, Rafael Gómez Kosky, Leticia Más Castellanos, Maritza Reyes e Idalia Herrera Ofarri. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas Carretera a Camajuaní Km 5½, Santa Clara. Cuba. C.P. 54830. e-mail: jorge\_gallardo2002@yahoo.es

### RESUMEN

El presente trabajo consistió en desarrollar una metodología para propagar híbridos de papaya mediante el cultivo *in vitro*. Como material vegetal se emplearon brotes laterales de plantas del híbrido I B P- 42 – 99, los explantes fueron establecidos siguiendo la metodología propuesta por Posada *et al.* (1999). Para la multiplicación se estudió la combinación de 6- BAP (0.225, 0.45, 0.90 mg.l<sup>-1</sup>) con ANA (0.14, 0.28 mg.l<sup>-1</sup>). Para el enraizamiento se compararon los medios de cultivo propuestos por Drew (1988) y Posada (1995). El medio de cultivo MS (1962) suplementado con 0.45 mg.l<sup>-1</sup> de 6- BAP y 0.14 mg.l<sup>-1</sup> de ANA resultó ser en este trabajo el más adecuado con un coeficiente de multiplicación de 3.93, para la etapa de enraizamiento fue 5mg.l<sup>-1</sup> de AIB con 10 días en el medio de cultivo donde se obtuvo un 68% de plantas enraizadas y en la fase de aclimatización se alcanzó un 71% de plantas adaptadas.

Palabras clave: aclimatización, *Caricas*, cultivo de plantas *in vitro*, enraizamiento

### ABSTRACT

This work consisted of developing a methodology to propagate papaya hybrids through *in vitro* culture. As plant material, lateral buds of plants of the hybrid IBP 42-99 were used. The explants were established following the methodology proposed by Posada *et al.* (1999). For the multiplication stage, the combinations of 6-BAP (0.225, 0.45 and 0.90 mg.l<sup>-1</sup>) and ANA (0.14 and 0.28 mg.l<sup>-1</sup>) were studied. In the rooting stage, a comparison was done between the culture media proposed by Drew (1988) and Posada (1995). The culture medium containing MS salts (1962) supplemented with 0.45 mg.l<sup>-1</sup> of 6-BAP and 0.14 mg.l<sup>-1</sup> of ANA was the most adequate for multiplication, while the best medium for rooting was 5mg.l<sup>-1</sup> of AIB with ten days in the culture medium, where 68% of rooted plants was obtained and in the acclimatization phase 71% of plant adaptation was achieved.

Keywords: acclimatization, *Caricas*, *in vitro* plant culture, rooting

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.) ocupa un lugar importante para la alimentación por su alta probabilidad de aprovechamiento, pues se puede usar el tallo, las hojas y los frutos, por su elevado contenido de proteínas y vitaminas (Díaz, 1984; Lima, 1991). Esta especie vegetal ha presentado dificultades en cuanto a rendimiento y calidad de sus frutos por lo que se ha hecho imprescindible la búsqueda de variedades e híbridos para mejorar estas características. La principal variedad que se cultiva en Cuba es la Maradol rojo, la misma a pesar de sus ventajas tiene como dificultad que sus frutos son de gran tamaño, posee un brix de 10, es susceptible a las principales enfermedades virales y lleva muchos años en explotación, por lo que se realizan trabajos encaminados a obtener nuevas variedades e introducir otras de diferentes países. Posada *et al.* (1995) obtuvieron un híbrido a partir del cruzamiento de esta variedad con la Strawberry, el cual posee menor peso y tamaño de los frutos y más alto brix que la variedad Maradol rojo. En Cuba se ha estudiado el comportamiento de este híbrido en condiciones de extensión en campo. La intensidad de las investigaciones sobre el cultivo de tejidos en la papaya de los últimos 20 años y su plasticidad *in vitro*,

ha permitido el desarrollo de una serie de técnicas eficientes en la propagación asexual de material élite de híbridos. Según Drew y Manshardt (1997) la multiplicación *in vitro* de la papaya solo se justifica económicamente si la misma se realiza para un genotipo híbrido. Uno de los grandes problemas que tiene esta metodología a nivel internacional, es el alto porcentaje de contaminación *in vitro* (bacterias y hongos), cuando se emplean como explantes iniciales ápices o meristemas de plantas adultas cultivadas en campo (Brar y Khush, 1994; Wilson, 1996). Posada *et al.* (1999) lograron establecer *in vitro* ápices del híbrido, pero se hace necesario estudiar las demás fases para proponer una metodología para la micropropagación del mismo. Es por ello que los objetivos del presente trabajo son: Establecer los medios de cultivo más adecuados para las fases de multiplicación y enraizamiento y lograr la aclimatización de las vitoplantas del híbrido.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal de partida se emplearon yemas laterales y apicales de plantas adultas del híbrido I B P 42-99, las cuales provenían de casas de cultivo con condiciones controladas de temperatura y humedad.

Para el establecimiento de los explantes se utilizó la metodología propuesta por Posada *et al.* (1999) alcanzándose un 85% de ápices establecidos.

## Fase de multiplicación

### Experimento 1

En la obtención de un medio de cultivo adecuado para la multiplicación de las vitroplantas ya establecidas, se utilizaron las sales Murashige y Skoog (MS) (1962)

con diferentes combinaciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Naftalenacético (ANA) (Tabla 1), para este experimento se emplearon como repetición ocho frascos plásticos con capacidad de 500 ml por tratamiento con cinco plantas cada uno.

Como control se utilizó el medio de cultivo propuesto por Posada (1995) el cual contenía las mismas sales e incluía como reguladores del crecimiento dos citoquininas 6 BAP (0.22 mg.l<sup>-1</sup>) y Kinetina (0.11 mg.l<sup>-1</sup>), los tratamientos se evaluaron a los 24 días.

Tabla 1. Diferentes Combinaciones de 6 BAP y ANA evaluadas para la multiplicación *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99.

Tratamientos	6 BAP mg.l <sup>-1</sup>	ANA mg.l <sup>-1</sup>
I	0.23	0.14
II	0.45	0.14
III	0.90	0.14
IV	0.23	0.28
V	0.45	0.28
VI	0.90	0.28

Las evaluaciones efectuadas por vitroplantas individuales fueron:

1-Altura (cm).

2-Número de brotes axilares.

### Experimento 2

Se estudió el efecto del tiempo de subcultivo (tratamiento 1 a los 24 días y tratamiento 2 a los 30 días) en el crecimiento de las vitroplantas en la formación de brotes axilares. Para esto se empleó el medio de cultivo del experimento anterior con el que se obtuvieron los mejores resultados, y se evaluaron las mismas variables: altura (cm) y número de brotes. Se utilizaron ocho frascos plásticos con capacidad de 500 ml por tratamiento con 60 ml de medio de cultivo y cinco plantas cada uno.

Ambos experimentos se realizaron tres veces como repetición. Los resultados fueron procesados en el SPSS. Versión 9.0 a los que se le realizaron ANOVA de clasificación simple con homogeneidad de varianza y prueba de Duncan y Dunett's C para una significación de 5%.

## Fase de enraizamiento

### Experimento 1

Para determinar el medio de cultivo más adecuado en el enraizamiento de las plantas del híbrido, se compararon dos medios de cultivo, el propuesto por Drew (1988), el cual contenía la mitad de las sales MS (1962) suplementadas con 2 mg.l<sup>-1</sup> de Ácido Indol-3- butírico (AIB) y el recomendado por Posada (1995) quien utilizó también la mitad de

las sales MS (1962) suplementadas con 5 mg.l<sup>-1</sup> de AIB, solidificados ambos medios con Gelrite (3 mg.l<sup>-1</sup>). Las vitroplantas fueron colocadas en el medio de cultivo durante 10 días, para el cual se utilizaron 10 frascos plásticos por tratamiento con capacidad de 500 ml con 60 ml de medio de cultivo y se ubicaron cinco plantas en cada uno. Luego se transfirieron las vitroplantas a medio de cultivo MS (1962) sin regulador del crecimiento por tres semanas para la formación de las raíces, pasado este tiempo se realizaron las evaluaciones de las siguientes variables:

- Plantas enraizadas (%).
- Altura de la planta (cm).
- Longitud de las raíces (cm).
- Número de hojas por plantas.

### Experimento 2

Con el objetivo de determinar el mejor tiempo de permanencia de las plantas en el medio de cultivo con AIB, se realizó un segundo experimento para el cual se mantuvieron las plantas en el medio de cultivo con la auxina durante siete y diez días. Luego se colocaron en medio de cultivo MS (1962) sin regulador de crecimiento. Para ello se emplearon 10 frascos plásticos por tratamiento con capacidad de 500 ml, se colocaron cinco plantas en cada uno y se evaluaron las mismas variables que en el experimento anterior. Los resultados fueron analizados por la prueba de ANOVA de clasificación simple y para determinar las diferencias entre las medias estadísticas en los distintos tratamientos, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan y Dunett's C, lo cual se especifica en cada tabla. Los resultados

expresados en porcentajes se procesaron en el Statistix 2.1 a los que se le realizó prueba de proporción.

## Fase de aclimatación

### Experimento 1

Obtenidas las vitroplantas con tres o más hojas activas y con 2-3cm de altura, cada una fue lavada en su base para eliminar restos de agar y fueron colocadas en bandejas con una solución compuesta por 15 ml.l<sup>-1</sup> de BIOBRAS- 16 y 3g.l<sup>-1</sup> de Benomil durante 24h. Para lograr altos porcentajes de plantas aclimatizadas se estudiaron dos variantes:

Tratamiento 1: en el cual se le colocaron frascos de cristal con capacidad de 250 ml a cada planta boca abajo, para de esta forma mantener la humedad relativa lo más próxima al 100%. Estos frascos se les retiraron en el momento del riego y luego se le colocaban nuevamente.

Tratamiento 2: en el mismo se dejaron las plantas expuestas a las condiciones ambientales del clima existente en la casa de cultivo.

En cada tratamiento se utilizaron tres contenedores de polieturano con 70 orificios alveolares y se sembraron 35 vitroplantas a cada uno. El sustrato estuvo compuesto por una mezcla de materia orgánica 70% y zeolita 30% y se les realizó un riego diario. La evaluación realizada fue: Supervivencia de las vitroplantas (%).

### Experimento 2

Para mejorar los porcentajes de aclimatación se decidió realizar un segundo experimento, para el

cual se le colocaron los frascos de cristal a las vitroplantas y se les mantuvo aun cuando se regaban para evitar el contacto del agua con la parte aérea de las plantas. Para este tratamiento se utilizaron tres contenedores de polieturano con 70 orificios alveolares y se les sembraron 35 vitroplantas a cada uno, el sustrato compuesto por una mezcla de materia orgánica 70% y zeolita 30%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fase de multiplicación

#### Experimento 1

El análisis de los resultados obtenidos al comparar el efecto de diferentes combinaciones de 6 BAP y ANA, demostró que al adicionar auxina al medio de cultivo en esta fase se lograron vitroplantas de mayor tamaño y por tanto un mayor número de explantes para el próximo subcultivo a partir de sus yemas laterales (Tabla 2).

Con los tratamientos dos y tres donde se utilizaron 0.45 mg.l<sup>-1</sup> de 6 BAP con 0.14 mg.l<sup>-1</sup> de ANA y 0.90 mg.l<sup>-1</sup> de 6BAP con 0.14 mg.l<sup>-1</sup> de ANA respectivamente se obtuvieron los mejores resultados sin diferencias significativas entre ellos, pero significativamente superiores al resto. Sin embargo se recomienda el tratamiento dos por tener una más baja concentración de 6 BAP en el medio de cultivo y también por una ligera superioridad respecto a la altura de las vitroplantas. Similares resultados señaló Drew (1988) pero en su caso utilizó la variedad solo. Pedroso (1990) utilizó para esta fase el 6 BAP solo y en combinación con diferentes auxinas, concluyendo que la más efectiva fue la asociación del ANA y 6 BAP, lo cual apoya los resultados alcanzados en el presente trabajo.

Tabla 2. Influencia de diferentes combinaciones de ANA y 6 BAP en la multiplicación de vitroplantas de papaya del híbrido I B P 42-99 a los 24 días de cultivo.

Tratamientos	Altura de la vitroplanta principal (cm)	# de yemas laterales formadas
1	1.57 b	3.08 b
2	1.85 a	3.93 a
3	1.73 ab	3.70 a
4	1.65 b	2.75 b
5	1.24 c	2.85 b
6	1.38 c	3.01 b
T	1.61 b	3.67 b
± EE	0.16	0.41

\* Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para  $p < 0.05$ , según Duncan para número yemas laterales y Dunett's C para altura de las plantas

**Tratamientos:**

1. ANA (0.14 mg.l<sup>-1</sup>) + 6 BAP (0.23 mg.l<sup>-1</sup>)
2. ANA (0.14 mg.l<sup>-1</sup>) + 6BAP (0.45 mg.l<sup>-1</sup>)
3. ANA (0.14 mg.l<sup>-1</sup>) + 6 BAP (0.90 mg.l<sup>-1</sup>)
4. ANA (0.28 mg.l<sup>-1</sup>) + 6 BAP (0.23 mg.l<sup>-1</sup>)
5. ANA (0.28 mg.l<sup>-1</sup>) + 6 BAP (0.45 mg.l<sup>-1</sup>)
6. ANA (0.28 mg.l<sup>-1</sup>) + 6 BAP (0.90 mg.l<sup>-1</sup>)
- T. Kinetina (0.11 mg.l<sup>-1</sup>) + 6 BAP (0.22 mg.l<sup>-1</sup>)

**Experimento 2**

Al estudiar el tiempo de subcultivo (24 y 30 días) utilizando el medio de cultivo con los mejores resultados del experimento anterior 0.45 mg.l<sup>-1</sup> de 6 BAP con 0.14 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, se comprobó que con el incremento en días del tiempo de subcultivo en el híbrido estudiado no se aumentó significativamente el número de brotes axilares, la altura de las vitroplantas, ni el vigor de las mismas, lo cual puede estar dado por un agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo a partir de los 24 días.

Tabla 3. Resultados alcanzados al comparar dos medios de cultivo para el enraizamiento de las vitroplantas del híbrido de papaya IBP 42-99.

Tratamientos	Plantas enraizadas
Medio de cultivo propuesto por Drew (1988)	40%
Medio de cultivo propuesto por Posada (1995)	68%

**Experimento 2**

Al evaluar los resultados obtenidos, trascurridas tres semanas después de colocados los explantes en el medio de cultivo sin auxinas, se comprobó que aunque el número de hojas fue mayor estadísticamente en el tratamiento de menor tiempo

**Fase de enraizamiento****Experimento 1**

Al comparar los medios de cultivo y realizar el análisis de los resultados de los tratamientos estudiados, se determinó que en contraposición con los demás aspectos evaluados, solo se obtuvo diferencia significativa en los porcentajes de plantas enraizadas (Tabla 3). Se alcanzaron los mejores resultados en el medio de cultivo propuesto por Posada (1995) con un 68% de plantas enraizadas, similares a los obtenidos por la autora, comparados con un 40% logrado en el medio de cultivo propuesto por Drew (1988), lo que indicó que con bajas concentraciones de la auxina no se logra un desarrollo homogéneo del sistema radicular en las vitroplantas de este híbrido de papaya. De forma general con la utilización en el medio de cultivo de 5.0 mg.l<sup>-1</sup> de AIB se incrementó el porcentaje de plantas enraizadas.

de permanencia (siete días), el porcentaje de enraizamiento solo alcanzó un 36% y se observó un menor desarrollo del sistema radicular (Tabla 4). Esto debe estar dado porque en este tiempo las vitroplantas no absorben la cantidad de A I B necesarias para la inducción de un sistema radicular adecuado.

Tabla 4. Efecto sobre las vitroplantas del híbrido de papaya IBP 42-99 del tiempo de permanencia en medio de cultivo con AIB (5mg.l<sup>-1</sup>).

Tratamientos	Número de hojas	Largo de la raíz ( cm)	Plantas enraizadas (%)
7 Días	4.44 a	2.92 b	36
10 Días	3.36 b	3.84 a	68.6
± EE	0.34	0.77	-

\*Medias con letras desiguales en la misma columna difieren según Duncan para  $p < 0.05$ .

En la literatura científica consultada no se encontraron datos que refieran el tiempo de permanencia más adecuado de las plantas de papaya en el medio de cultivo con reguladores del crecimiento para propiciar un mayor enraizamiento; no obstante al ser este mayor de 10 días ocurre una caída casi total de las hojas.

**Fase de aclimatización****Experimento 1**

Se logró la aclimatización de las vitroplantas del híbrido de papaya con un 34% de supervivencia a los 60 días, en el tratamiento uno donde al colocarles los frascos

de cristal encima a las vitroplantas, se mantuvo de esta forma un alto porcentaje de humedad relativa, muy parecidos a los existentes en la fase anterior (Tabla 5). Sin embargo, se observó que el mayor número de pérdidas fue debido a una necrosis en la parte aérea de las plantas, provocado por el exceso de humedad en las mismas, ya que, luego del riego quedaban pequeñas gotas de agua en las hojas y los frascos al mantener la humedad relativa próximo al 100% evitó la evaporación de las mismas.

La supervivencia de las plantas, entre otros factores también la atribuimos a la textura y estructura del sustrato, lo que proporcionó un buen drenaje y aireación.

Tabla 5. Total de vitroplantas del híbrido de papaya IBP 42-99 obtenidas a los 60 días de plantadas en los contenedores.

Tratamientos	Número de plantas sembradas	Número de plantas vivas	Supervivencia %
Vitroplantas cubiertas con los frascos de cristal	105	75	34.2
Vitroplantas sin cubrir	105	7	6

## Experimento 2

Se logró mejorar el porcentaje de supervivencia hasta un 71% manteniendo los frascos durante los períodos de riego. En la papaya resulta fundamental y merece mayor atención mantener una alta humedad relativa (cámara húmeda) para lograr mayor éxito en la adaptación a las condiciones ambientales, en este estudio con la utilización de los frascos logra que solo se humedezca el sustrato y de esta forma aumentar los porcentajes de plantas aclimatizadas. Chen (1991) logró un 72% de supervivencia de las plántulas obtenidas de embriones somáticos, similares a los del presente trabajo y en su caso utilizó un vaso de precipitado invertido sobre cada planta, para mantener la humedad relativa alta.

Las plántulas a los 60 días en los contenedores de poliespuma alcanzaron una altura de 10-12 cm y emitieron de 5-7 hojas, estando listas para el trasplante a condiciones de campo según Posada (1995) quien utilizó como vía de propagación la embriogénesis somática y certificó las plantas listas para su traslado a campo con características similares. Las plantas respondieron muy bien a la aplicación de la fertilización con urea de forma foliar, tomando una consistencia vigorosa y mostrando hojas de color verde intenso.

## CONCLUSIONES

Se estableció para la multiplicación del híbrido de papaya IBP 42-99 el medio de cultivo MS (1962) suplementado con 6-BAP (0.45 mg.l<sup>-1</sup>) y ANA (0.14 mg.l<sup>-1</sup>) y para la fase de enraizamiento emplear el medio de cultivo MS (1962), la mitad de las sales, suplementadas con AIB (5mg.l<sup>-1</sup>) y manteniendo las plantas en el medio de cultivo con esta auxina durante 10 días.

Se logró la aclimatización de las vitroplantas del híbrido hasta un 71% con el empleo de los frascos de cristal de 250 ml de capacidad como campana individual de las vitroplantas y mantenidos durante el riego.

## REFERENCIAS

- Brar, DS, Khush, GS (1994) Cell and tissue culture for plant improvement, En: Basra, A (ed) Mechanisms of plant growth and improved productivity: Modern approaches New York: Marcel Dekker pp 229-278
- Chen, MH (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* x *Carica cauliflora* cultured *in vitro*. Can.J. Bot. vol 69 pp. 1913 – 1918
- Días Oliva, HM (1984) Calidad interna y contenido en latex de los frutos de *Carica papaya* L. Boletín de reseñas. Cítricos y otros frutales (La Habana – Cuba). 15: 26 – 34
- Drew, RA (1988) Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field growth trees. Horticulture Science. (Cleveland Australia) 23 (3): 609 – 611
- Drew, RA, Manshardt RM (1997) Biotechnology of Papaya. Proceedings of In. Symp. Biotechnology of Tropical and Subtropical species. R.A.Drew (ed).Queensland, Australia. 29 september –3 october. pp 514
- Lima, H (1991) Resultados obtenidos en las investigaciones de la estación nacional de frutales. Laboratorio de Cultivo *in vitro* y Diagnóstico del Instituto de Investigaciones de Cítricos y otros Frutales. Informe para presentar al Ministerio de la Agricultura. La Habana. pp: 15 – 18
- Murashige, T y Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture Phisiol Plant. 15: 473 – 497
- Pedroso, AF (1990) Estudio de algunas fases de la micropropagación de la fruta bomba ( *Carica papaya* L.). Trabajo de Diploma. UCLV. Ciencias Agropecuarias
- Posada, L (1995) Desarrollo de la embriogénesis somática en la fruta bomba (*Carica papaya* L.). Trabajo de diploma. UCLV. Ciencias Agropecuarias
- Posada, L, Gomes, R, García, L (2000) Establecimiento *in vitro* de 2 nuevos híbridos Cubanos de papaya (*Carica papaya* L.). V Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. UCLV
- Wilson, JP (1996) Multiplication rates *in vitro* and by stem cutting propagation, and clonal development from *Eucalyptus globulus* seeding. Forest Science. 42: 415 – 418