

Regeneración de plantas de un híbrido de papaya (IBP 42-99) a partir de callos obtenidos de ápices de plantas *in vitro*

Jorge Gallardo Colina*, Rafael Gómez Kosky, Idalia Herrera, Marisol Tejeda, Laisyn Posada Pérez, Borys Chong Pérez, Maritza Reyes Vega y Marisol Freire Seijo. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuani km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: gallardo@ibp.co.cu

RESUMEN

En Cuba se realizan innumerables esfuerzos para aumentar la producción de alimentos y especialmente con los frutales dentro de los cuales la papaya tiene gran importancia. En ese sentido se realizan estudios para obtener plantas resistentes a virus que requieren de herramientas que apoyen y aumenten los índices de obtención de líneas transgénicas en los eventos de transformación específicamente en híbridos de papaya. Este trabajo persiguió como objetivo desarrollar un protocolo para la regeneración de plantas de un híbrido de papaya a partir de callos obtenidos de ápices de plantas *in vitro*. Como material vegetal se emplearon plantas *in vitro* del híbrido IBP 42-99. En el medio de cultivo propuesto por Nitsh y Nitsh se evaluaron diferentes reguladores del crecimiento para obtener callos con estructuras embriogénicas y se ajustaron las concentraciones en las cuales estos eran más eficientes. Se estudió, además, la capacidad de formación de callos de diferentes partes del tallo de las plantas *in vitro*. Para la regeneración de plantas de papaya a partir de los callos se evaluaron diferentes medios de cultivo. Se logró obtener callos al combinar 6-BAP con ANA y AIA. Al utilizar segmentos de tallos de plantas *in vitro* de 1cm de longitud (desde el meristemo hacia abajo) se obtuvieron los mejores resultados. Al eliminar el meristemo en los ápices se aumentó la capacidad de formación de callos del explante. Se obtuvieron plantas a partir de los callos en el medio de cultivo MS suplementado con 0.09mg.l⁻¹ de AIA, 0.01mg.l⁻¹ de AG₃ y 2mg.l⁻¹ de zeatina y se logró el mayor porcentaje con los callos provenientes de los tratamientos con menor concentración de 6-BAP y AIA.

Palabras clave: medio de cultivo, micropropagación, organogénesis, segmentos

ABSTRACT

In Cuba there realizes innumerable efforts to increase the food production and especially the fruit trees Inside which the papaya has great importance. In this sense studies are realized to obtain plants resistant to virus that they need of tools that they support and increase the indexes of obtaining transgenic line in the events of transformation specifically in a papaya hybrid. As main objective was to develop a protocol for the regeneration of plants of papaya hybrid from callus obtained of *in vitro* plant apexes. plan to develop a tool that supports and increases the indexes of obtaining line transgenic in the events of transformation in a hybrid of papaya. *In vitro* plants of the hybrid IBP 42-99 were used as plant material. The culture medium Nitsh and Nitsh was used and the growth regulators that permitted the obtaining of the best callus with embryogenic structures were studied, and also, the concentrations in which they were more efficient were adjusted. The capacity of callus formation from different parts of the stem of the *in vitro* plants was studied. Different culture medium for the regeneration of papaya plants from the obtained callus was studied. It was possible to obtain callus by combining 6-BAP with ANA and AIA. The best results are obtained when segments from *in vitro* plants shoot, 1 cm length from the meristem, were used. Also, by eliminating the meristem in the apexes, an increase in the callus formation capacity of the explant was achieved. Plants were obtained from callus using the culture medium MS supplement with 0.09mg.l⁻¹ of AIA, 0.01mg.l⁻¹ of AG₃ and 2mg.l⁻¹ of Zeatin and the best percentage was achieved with the callus coming from the treatments with less concentration of 6-BAP and AIA.

Key words: culture medium, micropropagation, organogenesis, segments

INTRODUCCIÓN

En Cuba en los últimos años se ha incrementado el área de cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.) de 1 857 ha en 1998 a 2 300 ha en el 2002, sin embargo, la producción ha decrecido de 43 790 ton. en el 2000 a 40 000 ton. en el 2002, con un comportamiento similar en los rendimientos al disminuir de 20.6 t.ha⁻¹ en el 2000 a 17.3 t.ha⁻¹ en el 2002. Esto ha sido causado principalmente por las enfermedades virales

las cuales son capaces de disminuir en más de un 50% la producción de las plantaciones (Arocha *et al.*, 2002). A esto se adicionan las lesiones provocadas por hongos sobre los frutos post-cosecha, debido a la rápida maduración que presentan los mismos, lo cual limita su aceptación en el mercado.

Teniendo en cuenta esta problemática se realizan numerosos esfuerzos encaminados a obtener nuevas variedades con resistencia a los virus y con retardo

en la madurez de sus frutos y para ello se han tomado diferentes vías como es el cruzamiento genético tanto dentro de la misma especie (Posada *et al.*, 2003), como interespecífico. Este híbrido por su importancia y por ser seleccionado desde la F_1 no puede ser propagado a partir de sus semillas, y como se conoce la organogénesis presenta diversas desventajas con respecto a la embriogénesis y los protocolos de embriogénesis desarrollados en Cuba son a partir de semillas inmaduras (Posada, 1995). También, se han introducido técnicas más avanzadas para el mejoramiento genético como es el caso de la transformación genética y para ello se desarrollaron diferentes protocolos de transformación en la variedad de papaya Maradol roja a partir de embriones somáticos obtenidos de embriones cigóticos, con pistola de genes de alta y baja presión por Pons *et al.* (2002) y Más *et al.* (2003), respectivamente. Sin embargo, los mismos no pueden ser aplicados para genotipos híbridos.

Gallardo *et al.* (2003) desarrollaron un protocolo de transformación directa a partir de los ápices meristemáticos en un híbrido cubano con un 0.98% de eficiencia, sin embargo aunque los resultados son alentadores obtener un alto número de líneas para su posterior estudio en campo, resultaría engorroso con un porcentaje tan bajo. Por ello se requiere de protocolos que apoyen y aumenten los índices de obtención de líneas transgénicas en los eventos de transformación. Teniendo en cuenta esta problemática el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un

protocolo para la regeneración de plantas del híbrido de papaya IBP 42-99 a partir de callos obtenidos de ápices de plantas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99, que se encontraban en el quinto subcultivo en medio de cultivo MS (1962) suplementado con 0.45 mg.l⁻¹ de 6- Bencilaminopurina (6-BAP) y 0.1mg.l⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA).

Formación de callos

Influencia de reguladores del crecimiento

Para este experimento se tomaron ápices meristemáticos de plantas *in vitro* con 5 mm de longitud, donde se colocó uno por tubo de ensayo (25x150 mm), se utilizaron 40 explantes por tratamiento. A los tubos se les adicionaron 10 ml de medio de cultivo y se colocaron en cámara de luz solar con intensidad de 48 - 62.5 mol. m⁻²s⁻¹ y temperatura de 27± 2 °C.

En el medio de cultivo propuesto por Nitsh y Nitsh (1969) se evaluaron diferentes reguladores del crecimiento para obtener callos con estructuras embriogénicas. El mismo fue suplementado con combinaciones de 6-BAP y dos auxinas: ANA y ácido Indolacético (AIA) en varias concentraciones (Tabla 1).

Tabla 1. Combinaciones de 6-BAP con ANA y AIA en el medio de cultivo propuesto por Nitsh y Nitsh (1969) empleadas para la formación de callos a partir de ápices de plantas *in vitro* de papaya.

Tratamientos.	6-BAP (mg.l ⁻¹)	ANA (mg.l ⁻¹)	AIA (mg.l ⁻¹)
1	1.5	0.3	-
2	2.5	0.5	-
3	3.5	0.7	-
4	4.5	0.9	-
5	5.5	1.1	-
6	1.5	-	1.5
7	2.5	-	2.5
8	3.5	-	3.5
9	4.5	-	4.5
10	5.5	-	5.5

Este experimento se realizó tres veces como repetición y se utilizaron 40 réplicas por tratamiento. Las evaluaciones se realizaron a los 60 días donde se tuvo en cuenta el grado de formación de callo por explante, según la escala propuesta por Santana (1982), la textura y color de los mismos. Los resultados fueron procesados en el paquete estadístico STATISTIX 2.0 donde se le realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Regeneración de plantas

Medio de cultivo

Para la regeneración de plantas a partir de los callos formados, se utilizaron frascos de vidrio con capacidad de 250 ml, a los que se les adicionaron 30 ml de medio de cultivo y se colocaron cuatro explantes por frasco, luego se colocaron en la cámara de luz solar.

Se estudiaron diferentes medios de cultivo propuestos por:

1. Mauren *et al.* (1990) para la germinación de embriones somáticos obtenidos de embriones cigóticos inmaduros de papaya (medio de cultivo MS suplementado con 5 mg.l⁻¹ de Kinetina).
2. Posada (1995) para la germinación de embriones somáticos obtenidos de embriones cigóticos inmaduros de papaya (medio de cultivo MS suplementado con 0.5mg.l⁻¹ de 6-BAP y BIOBRAS – DAA-6 10 µl).
3. Hossain *et al.* (1993) para la regeneración de plantas de papaya a partir de callos originados de pecíolos (medio de cultivo MS suplementado con caseína hidrolizada (CH) (100 mg.l⁻¹), 6-BAP (0.45 mg.l⁻¹), ANA (0.02 mg.l⁻¹).
4. Veitía *et al.* (1999) para la regeneración de plantas de papa a partir de callos (medio de cultivo MS suplementado con AIA (0.7mg.l⁻¹), ácido gibérellico (AG₃) (0.02 mg.l⁻¹), y Zeatina (2 mg.l⁻¹).

El experimento se realizó tres veces como repetición y se utilizaron 40 réplicas por tratamientos y se evaluó a los 40 días donde se tuvo en cuenta el porcentaje de callos que regeneró plantas. Los resultados fueron procesados en el paquete estadístico STATISTIX 2.0 donde se le realizó una prueba de proporción.

Las plantas regeneradas a partir de los callos se colocaron en medio de cultivo de multiplicación de híbrido propuesto por Gallardo *et al.* (2002) y se aclimatizaron en una casa de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Formación de callos

Influencia de reguladores del crecimiento

Se logró formar callos a partir de ápices de plantas *in vitro*, al combinar 6-BAP con ambas auxinas (Tabla 2). En los tratamientos donde se utilizó menor concentración de los reguladores del crecimiento, se obtuvieron los mejores resultados sin diferencias significativas entre ellos, pero significativamente superiores al resto. Como se puede observar con las concentraciones más bajas de los reguladores del crecimiento se lograron los callos más desarrollados, aunque cuando se utilizó como auxina el ANA, los callos fueron menos compactos con una consistencia esponjosa y mayor contenido de agua en sus tejidos. En ensayos preliminares se usaron concentraciones menores de los reguladores del crecimiento, sin embargo, no se logró obtener callos verdaderos, solo un engrosamiento en la base de los explantes.

Aunque se mantuvo la relación Auxina/Citoquinina estable y solo se aumentaron las concentraciones de estos reguladores del crecimiento, disminuyó la capacidad de formación de callos de los ápices,

lo cual debe estar dado por una inhibición de la acción de las auxinas debido a que un exceso de su concentración puede conducir a su propia degradación. Según Torres y Vázquez (1995) cuando se realizan aplicaciones de estos reguladores a los tejidos meristemáticos aumenta también la reacción de la oxidasa lo cual indica que estos ácidos son capaces de inducir su propia destrucción, es decir, que estimula el alargamiento celular, pero a la vez influye bajo determinadas concentraciones en una reacción que conduce a su autodestrucción. Esta condición que se presenta en este fenómeno biológico sustenta el proceso de autorregulación del crecimiento en los vegetales verdes.

Hossain *et al.* (1993) utilizaron pecíolos de papaya para la formación de callos y regeneración de plantas directamente con concentraciones de ANA desde 0.1 a 2 mg.l⁻¹ y obtuvieron los mejores resultados con las concentraciones más bajas de ANA, similares a los del presente trabajo.

Por su parte, Jordan y Velozo (1996) tomaron brotes axilares para obtener callos en *Carica pubescens* (Lenné et Koch) y para ello estudiaron diferentes reguladores del crecimiento como ANA y AIA combinados con 6 BAP, Zeatina, TDZ y Kinetina y en su caso lograron los mejores callos al combinar AIA y ANA con 6 BAP.

Regeneración de plantas

Influencia del medio de cultivo

Se regeneraron plantas de papaya solamente en los callos colocados en el medio de cultivo propuesto por Veitía *et al.* (1999). A los 45 días se logró regenerar plantas bien formadas a partir de los callos, no todos los explantes que provenían de los tratamientos del experimento anterior regeneraron plantas. Sin embargo, mostraron los mejores resultados sin diferencias significativas entre ellos los explantes provenientes de los tratamientos 3, 6 y 7, aunque significativamente superiores al resto (Tabla 4). Los demás aunque se mantuvieron por un período de 60 días, solo tomaron un color verde intenso pero no se formaron plantas a partir de los mismos.

Como se puede observar con el uso del AIA en la etapa de formación de callos se lograron los mejores porcentajes de callos con plantas, lo cual debe estar dado por que en el medio de cultivo propuesto por Veitía *et al.* (1999) está incluida esta auxina y al mantener este regulador del crecimiento en ambos medios de cultivo facilita su asimilación por los tejidos del híbrido, teniendo en cuenta su origen natural y que las enzimas encargadas de conjugarse con estas auxinas se encuentran predeterminadas desde la etapa anterior, se conoce que aunque realizan funciones similares su estructura y puntos de unión no son en los mismos sitios, ni la misma cantidad (Torres y Vázquez, 1995).

Hossain *et al.* (1993) para la regeneración de plantas de papaya directamente de callos utilizaron 6-BAP, ANA y CH y obtuvieron un 26% de callos con plantas, sin embargo, en el presente trabajo se obtuvo hasta un 40% al utilizar AIA, AG₃ y Zeatina.

Tabla 2. Influencia de la combinación de 6-BAP con ANA y AIA en la formación de callos de papaya a partir de ápices de plantas *in vitro*.

Tratamientos (mg.l ⁻¹)	Grado de formación de callos*	
	Medias Reales	Medias de Rango
1 - (6-BAP 1.5 + ANA 0.3)	3.83	88.75 a
2 - (6-BAP 2.5 + ANA 0.5)	1.16	39.8 c
3 - (6-BAP 3.5 + ANA 0.7)	2.33	61.0 abc
4 - (6-BAP 4.5 + ANA 0.9)	1.75	50.33 bc
5 - (6-BAP 5.5 + ANA 1.1)	2.16	58.0 bc
6 - (6-BAP 1.5 + AIA 1.5)	3.25	78.58 ab
7 - (6-BAP 2.5 + AIA 2.5)	3.16	76.0 ab
8 - (6-BAP 3.5 + AIA 3.5)	2.41	62.25 abc
9 - (6-BAP 4.5 + AIA 4.5)	2.0	54.33 bc
10 - (6-BAP 5.5 + AIA 5.5)	1.0	35.91 c

*según escala de Santana (1982). Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$, según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Tabla 4. Influencia de los reguladores del crecimiento utilizados en la etapa de formación de callos en la regeneración de plantas en el medio de cultivo propuesto por Veitía *et al.* (1999).

Tratamientos (Callos que provenían del tratamiento del mismo número del experimento anterior)	% de callos con plantas
1	0
2	0
3	32 ab
4	15 b
5	0
6	38 a
7	40 a
8	10 bc
9	0
10	0

* Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$, según prueba de proporción, STATISTIX 2.0.

CONCLUSIONES

Se logró la regeneración de plantas del híbrido de papaya a partir de ápices de plantas *in vitro*, en el medio de cultivo propuesto por Veitía *et al.* (1999) en los callos que provenían de la combinación del 6-BAP (2.5 mg.l⁻¹) con el AIA (2.5 mg.l⁻¹).

REFERENCIAS

Arocha, Y, Horta D, Roque A (2002) Detección de diferentes patógenos en plantas de papaya con sintomatología compleja en Cuba. I Simposio Internacional sobre Vigilancia

Fitosanitaria y su relación con la protección del entorno. Palacio de las Convenciones, La Habana. Cuba

Freire, M (2001) Nueva metodología de la embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var 87-51.) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis de Doctorado. IBP. UCLV. Santa Clara. Cuba

Gallardo, J, Posada L, Gómez R, Más L, Reyes M, Herrera I (2002) Micropropagación del híbrido Cubano de papaya (*Carica papaya* L) IBP 42-99. Biotecnología Vegetal 2 (4): 211- 215

Gallardo, J (2003) Expresión transitoria de la β -glucuronidasa en ápices del híbrido de papaya IBP 42-99. BIOVEG 2003. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila

- Hossain, M, Rahman S M, Islam R, Joarder O I (1993) High efficiency plant regeneration from petiole explant of *Carica papaya* L through organogenesis. Plant Cell Report 13: 99-102
- Jordan, M, Velozo J (1996) Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. Plant Cell Tissue and Organ Culture 44: 189-194
- 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. pp 15-18. La Habana
- Maureen, M, Fith M, Manshardt R M (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L). Plant Cell Report 9: 320-324
- Nitsch, J P y Nitsch C (1969) Haploid plant from pollen grains. Science 169: 85-93
- Parrot, T W (1993) Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP. San José, Costa Rica. Proceedings. pp :183-191. INIBAP. Montpellier
- Posada, L (1995) Desarrollo de la embriogénesis somática en la Fruta Bomba (*Carica papaya* L). Trabajo de Diploma. UCLV. Santa Clara. Cuba
- Posada, L (2001) Obtención e implantación *in vitro* de un nuevo híbrido de papaya (*Carica papaya* L). Tesis presentada en opción al título académico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. UCLV, Santa Clara. Cuba
- Santana, N (1982) Determinación de un medio de cultivo adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Sacharum* sp. híbrido) *in vitro*. Cultivos Tropicales 4 (3): 45 - 51
- Torres, S y Vázquez, E (1995) Fisiología Vegetal. Ed. Pueblo y Educación, Ciudad de La Habana
- Veitía, N, Urrea A I, Gómez R (1999) Desarrollo de diferentes medios de cultivo para la formación de callos de papa. Centro Agrícola 3: 87-92