

Empleo de secciones de tallo de plantas *in vitro* de papaya (híbrido IBP 42-99) para obtener callos con estructuras embriogénicas

Jorge Gallardo Colina*, Rafael Gómez Kosky, Marisol Tejeda Fernández, Laisyn Posada Pérez, Idalia Herrera O´farril, Maritza Reyes Vega, Leyanis García Aguila, 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: gallardo05@ibp.co.cu. o Jorge_gallardo2002@yahoo.es

RESUMEN

Dentro de las vías de propagación *in vitro* de plantas, la embriogénesis somática ofrece posibilidades de obtener volúmenes de producción superiores en un menor período de tiempo y a un costo más bajo, lo cual la convierte en un método potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis. En papaya se ha podido desarrollar la embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos y eje hipocótilos, sin embargo en el caso de los híbridos no se pueden emplear estos métodos y se hace necesario desarrollarla a partir de un tejido somático, sin vínculo con la reproducción sexual. Este trabajo persiguió como objetivo principal evaluar el uso de secciones de tallo de plantas *in vitro* del híbrido de *Carica papaya* IBP 42-99 para la formación de callos con estructuras embriogénicas. Se tomaron secciones de diferentes partes del tallo desde el meristemo apical hasta la base de las plantas *in vitro* y se utilizó el medio de cultivo propuesto por Nitsh y Nitsh suplementado con 1.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 1.5 mg.l⁻¹ de AIA. Se logró formar callos a partir de las secciones de tallo con el medio de cultivo empleado, sin embargo, en los tratamientos donde se utilizaron explantes de la sección del tallo que se encontraba dentro de 1.0 cm desde el ápice hacia abajo se lograron los mejores resultados. El uso de secciones de tallo de plantas *in vitro* como explantes para la formación de callos en esta especie vegetal abre nuevas posibilidades para su propagación *in vitro*, especialmente en el caso de híbridos resultantes de programas de mejoramiento genético.

Palabras clave: ápices, *Carica papaya*, callogénesis, embriogénesis somática

ABSTRACT

Inside *in vitro* propagation via, the somatic embryogenesis offers possibilities of obtaining top volumes of production in a minor period of time and a lower cost, which are a method potentially more efficient than the regeneration via organogenesis. In papaya the somatic embryogenesis could have developed from zygotic embryos and axis hipocótilos, nevertheless in case of the hybrids these methods cannot be used and it becomes necessary to develop it from a somatic fabric, without link with the sexual reproduction. This work chased as main objective Evaluated the use of *in vitro* plants stem sections of the *Carica papaya* IBP 42-99 hybrid for the formation of callus with embryogenic structures. As plant material were use *in vitro* plants of the papaya hybrid IBP 42-99. For it there took sections of different parts of the stem from the meristem up to the base of the *in vitro* plants, was use the culture medium Nitsh and Nitsh supplemented with 1.5 mg.l⁻¹ of 6-BAP and 1.5 mg.l⁻¹ of AIA. It was achieved to obtain callus from the stem sections with the culture medium used, nevertheless, in the treatments where used cylinders inside 1.0 cm from the apex down, the best results were achieved. The use of *in vitro* plants stem sections as explant for the formation of callus in this vegetable species it opens new possibilities for his *in vitro* propagation, specially in case of resultant hybrids of genetic improvement programs.

Key words: apexes, *Carica papaya*, callogenesis, somatic embryogenesis

INTRODUCCIÓN

En el transcurso del siglo XXI, la humanidad tendrá que enfrentar una serie extraordinaria de retos. Según se estima, en los próximos 30 años, dos mil millones de personas más dependerán de la agricultura para su subsistencia mientras los recursos naturales son cada vez más frágiles. A fin de enfrentar estos retos, será necesario disponer de nuevos conocimientos derivados del avance científico. La biotecnología puede acelerar los programas convencionales de propagación masiva de plantas y de mejoramiento genético y dar soluciones cuando los métodos convencionales fallan (FAO, 2004).

Dentro de las vías de propagación *in vitro* de plantas, la embriogénesis somática ofrece posibilidades de

obtener volúmenes de producción superiores en un menor período de tiempo y a un costo más bajo, lo cual la convierte en un método potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Villalobos y Torpe, 1991). El primer artículo publicado sobre la embriogénesis somática *in vitro* fue en 1958 en zanahoria (*Daucus carota* L.) (Steward *et al.*, 1958). Sin embargo, ya en 1978 este fenómeno se conocía para 88 especies en 33 familias de plantas. Este número en 1996 se había incrementado a 130 especies, que incluía angiospermas y gimnospermas (Lukse *et al.*, 1996). Para la formación de callos con estructuras embriogénicas los explantes más usados han sido cotiledones, eje hipocótilo, embriones cigóticos, etc. (Li y Huang, 1996; Abdelmalek y Francine, 1999; Cai *et al.*, 1999).

En papaya (*Carica papaya* L.) ha sido posible regenerar plantas *in vitro*, tanto vía organogénesis como embriogénesis somática (Hossain *et al.*, 1993; Posada, 1995). Para el desarrollo de la embriogénesis más específicamente, se ha logrado directamente a partir de embriones cigóticos (Posada, 1995; Del Sol *et al.*, 2001) y eje hipocotilo (Castillo *et al.*, 1998). Sin embargo, cuando se trata de híbridos estos explantes no pueden ser utilizados. En este caso la procedencia y tipo de explante tienen una importancia significativa.

Atendiendo a dicha problemática este trabajo persiguió como objetivo evaluar el uso de secciones de tallo de plantas *in vitro* del híbrido de *C. papaya* IBP 42-99 para la formación de callos con estructuras embriogénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se utilizaron plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99 las cuales se encontraban en el 5^{to} subcultivo de multiplicación. Se utilizaron como frascos de cultivo, tubos de ensayo (150 X 25 mm) a los cuales se les adicionaron 10 ml de medio de cultivo y fueron colocados en una cámara de luz solar con intensidad de 48 - 62.5 mol. m⁻²s⁻¹ y duración máxima y mínima del período luminoso de 13h, 34 minutos y 10h, 41 minutos respectivamente (Walter y Lieth, 1967) y temperatura de 27± 2 °C. Como gelificante del medio de cultivo se empleó Gelrite a razón de 2.5 g.l⁻¹ y el pH siempre fue ajustado a 5.8 previo a la esterilización.

Formación de callos

El tallo de las plantas *in vitro* se seccionó en fragmentos de aproximadamente 5 mm desde el ápice hasta la base (Figura 1). Para la formación de callos a partir de estos explantes se utilizó el medio de cultivo Nitsh y Nitsh (1969) suplementado con 1.5 mg.l⁻¹ de 6 Bencilaminopurina (6-BAP) y 1.5 mg.l⁻¹ de Acido indolacético (AIA).

Tratamientos:

1. A
2. B-Segmento 1
3. B-Segmento 2
4. B-Segmento 3

Este experimento tuvo tres repeticiones y se utilizaron 40 réplicas por tratamiento. Se evaluó a los 60 días la textura y el color de los callos, así como el grado de formación de los mismos según escala siguiente:

1. Callos muertos.
2. Callos vivos sin crecimiento.
3. Callos vivos con pequeñas zonas de crecimiento.
4. Callos vivos creciendo en un 50%.
5. Callos con crecimiento normal.

Los resultados fueron procesados en el paquete estadístico STATISTIX 2.0 donde se le realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

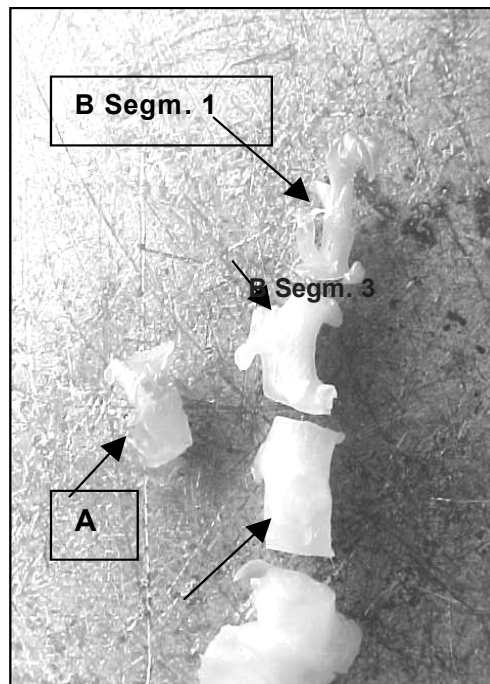


Figura 1. Forma en que se seccionaron las plantas *in vitro* de *Carica papaya* híbrido IBP 42-99, para tomar como explantes segmentos de su tallo. A- explante de 5.0 mm de longitud al que se le eliminó el meristemo apical (aprox. 2mm). B- Segmento 1: ápice de 5.0 mm de longitud. Segmento 2: 5.0 mm a partir del ápice. Segmento 3: 5.0 mm después del segmento 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró formar callos con estructuras embriogénicas en todos los tratamientos estudiados, sin embargo al utilizar como explantes segmentos de la zona del tallo comprendida dentro los segmentos A (explante de 5.0 mm de longitud al que se le eliminó el meristemo apical), Bs1 (ápice) y Bs2 (5mm a partir del ápice) se lograron los mejores resultados, con diferencia significativa con respecto al segmento Bs3 (5mm después del segmento 2) (Tabla 1). En este último segmento debe existir un mayor desarrollo de células diferenciadas que forman en muchos casos los tejidos conductores y en los segmentos anteriores ocurrió lo contrario pues son tejidos menos diferenciados. Freire (2001) también utilizó segmentos de plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Sacharum spp* híbrido) para formar callos embriogénicos y logró los mayores porcentajes con los tejidos más cercanos al meristemo y lo atribuyó al grado de diferenciación de los tejidos.

Por su parte Jordan y Velozo (1996) utilizaron para la formación de callos embriogénicos en *Carica pubescens*, secciones de brotes axilares de plantas cultivadas en invernadero los cuales se colocaron en medio de cultivo Nitsh y Nitsh (1969) suplementado con 6-BAP en combinación con ácido naftalenacético (ANA) y AIA y obtuvieron los mejores resultados con los explantes más jóvenes, coincidiendo con los resultados del presente trabajo.

Al tomar como explantes ápices completos (segmento 1) solo se formó callo en la parte basal del mismo (Figura 2-A), sin embargo en los demás tratamientos se originó callo en ambos extremos y posteriormente se extendió a la totalidad del explante (Figura 2-B). En los primeros 10 días ocurrió un engrosamiento del tejido epidérmico del explante (figura 2-C), lo cual debe estar dado, teniendo en cuenta que es una planta dicotiledónea, por la formación de nuevas células a partir del tejido del anillo de cambium el cual se encuentra en esta zona y está formado por células meristémicas. Rodríguez *et al.* (1995) plantearon que los tejidos vegetales forman un callo a partir de las heridas como una reacción defensiva natural y en particular en las dicotiledóneas a partir de las células del anillo de cambium. Posteriormente se observó una ruptura del tejido de protección formado en la zona del corte y comenzó el crecimiento del callo.

Según Parrot (1993) el tipo, estado fisiológico y los niveles de diferenciación y polarización de los tejidos utilizados como explantes iniciales son algunos de los factores que favorecen o interfieren la formación de callos. Hossain *et al.* (1993) obtuvieron callos a partir de pecíolos de hojas de papaya utilizando el 6-BAP combinado con ANA y lograron regenerar plantas de los mismos, señalando la formación de los callos a partir de los extremos del explante donde se les había realizado el corte, apoyando los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Tabla 1. Influencia de la zona del tallo de la planta *in vitro* para la formación de callos en el híbrido de papaya IBP 42-99.

Tratamientos	Grado de formación de callos*	
	Medias Reales	Medias de Rango
1 (A)	3.83	55.54 a
2 (B-segmento 1)	3.04	38.45 ab
3 (B-segmento 2)	3.75	53.09 a
4 (B-segmento 3)	2.04	25.02 b

* Según escala descrita en materiales y métodos. Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$, según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

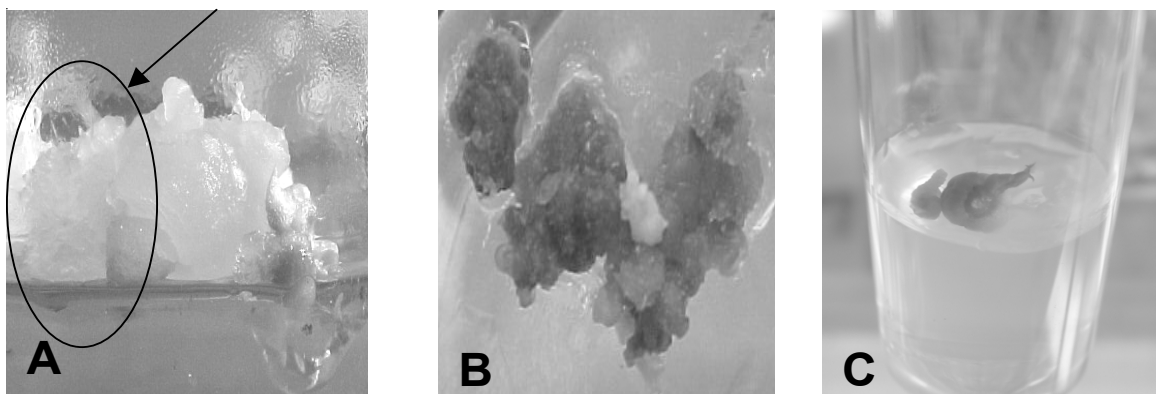


Figura 2. Formación de callos embriogénicos a partir de secciones de tallo del híbrido de *C. papaya* en medio de cultivo Nitsh y Nitsh suplementado con 1.5 mg.l^{-1} de 6-BAP y 1.5 mg.l^{-1} de AIA. A. Callo formado a partir de un ápice meristemático. B. Callo embriogénico formado a partir de secciones de tallo. C. Explante con 10 días en medio de cultivo de formación de callos con un ligero engrosamiento del tejido epidérmico.

CONCLUSIONES

Fue posible a partir de secciones de tallo de plantas *in vitro*, lograr la formación de callos con estructuras embriogénicas en el híbrido de papaya IBP 42-99. Los segmentos de la zona del tallo comprendida dentro de los segmentos A (explante de 5.0 mm de longitud al que se le eliminó el meristemo apical), Bs1 (ápice) y Bs2 (5mm a partir del ápice) mostraron los mejores resultados. El uso de secciones de tallo de plantas *in vitro* como explantes para la formación de callos en esta especie vegetal abre nuevas posibilidades para su propagación *in vitro*, especialmente en el caso de híbridos resultantes de programas de mejoramiento genético.

REFERENCIAS

- Abdelmalek, M y Francine M (1999) Effects of sealed and vented gaseous microenvironments on the maturation of somatic embryos of black spruce with a special emphasis on ethylene. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 56: 201-209
- Cai, W, Gonsalves C, Tennant P, Fermin G, Souza M, Sarindu N, Jan FJ, Zhu HY y Gonsalves D (1999) A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 35: 61-69
- Castillo, B, Smith M A L y Yadava UL (1998) Liquid system scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. *Journal of Horticultural Science y Biotechnology* 73 (3):307-311
- Del Sol, L, García M, Gálvez D, Rodríguez S, Torres Y, Medero V, López J, Ventura J, Cabrera M, Rodríguez S, Álvarez M, Bauta M y García J (2001) Efficient plant regeneration from somatic embryogenesis in papaya Cv. INIVIT -2000. *Biología vegetal y Agricultura sostenible Resúmenes evento*, 133 - 215
- 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
- Hossain, M, Rahman S M, Islam R y 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 y Velozo J (1996) Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 44: 189-194
- Khlifi, S y Tremblay FM (1995) Maturation of black spruce somatic embryos. Part I. Effect of L-glutamine on the number and germinability of somatic embryos. *Plant Cell. Tissue. Org. Cult.* 45: 23-32
- Li, XY y Huang FH (1996) Induction of somatic embriogénesis in loblolly pine (*Pinus toeda* L). *In vitro Cell. Dev. Boil-Plant* 32:129-135
- Lukse, E, Dinkova TD y Ramos M (1996) Aspectos bioquímico-moleculares de la embriogénesis somática en plantas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 27 (1-2-3): 13-16
- 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. INIBAP*
- Posada, L (1995) Desarrollo de la embriogénesis somática en la Fruta Bomba (*Carica papaya* L). Trabajo de Diploma. UCLV. Santa Clara. Cuba
- FAO, (2004) <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2004/41714/index.html>
- Steward, FC, Mapes MO y Smith J (1958) Growth and organized development of culture Cell. *American Journal of Botany* 45: 693-704
- Villalobos, V y Thorpe T (1991) Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca W.M., Mroginski L.A. (Eds) *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, pp. 127-141. CIAT, Colombia