

Conservación *in vitro* a corto plazo de ápices de plantas del híbrido de papaya IBP 42-99

Karel Acosta Pérez^{1*}, Leyanis García Aguila². *Autor para correspondencia.

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias. Centro Universitario de Las Tunas. Ave. Carlos J Finlay, s/n. Las Tunas. Cuba CP 10 700. e-mail: karel0978@yahoo.es

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani. km.5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba CP 54 830.

RESUMEN

El desarrollo de técnicas para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales proporcionó nuevas alternativas para la conservación de germoplasma de papaya (*Carica papaya* Lineo). Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de la concentración de sales MS y manitol, en la conservación *in vitro* a corto plazo de ápices de plantas *in vitro* del híbrido de papaya, IBP 42-99. Se emplearon dos concentraciones de sales MS (50 y 100%) en medio de cultivo semisólido suplementado con manitol a razón de 10, 20, 30 y 40 g.l⁻¹. Los mejores resultados en cuanto a supervivencia se obtuvieron con el empleo de sales MS al 100% y 10 g.l⁻¹ de manitol en el medio de cultivo. Este último provocó disminución del crecimiento en los ápices y permitió la conservación a corto plazo hasta seis meses.

Palabras clave: manitol, crecimiento, supervivencia, *Carica papaya*

ABSTRACT

The development of techniques for *in vitro* culture of vegetable tissues brought about new alternatives for the conservation from germplasm of papaya (*Carica papaya* Lineo). These work was carried out with objective of determining the effect MS salts and manitol concentration, on the *in vitro* conservation at short-term of shoot tips *in vitro* plants from the hybrid papaya IBP 42-99. Two concentrations of salts in semisolid culture medium 50 and 100%, supplemented with manitol 10, 20, 30 and 40 g.l⁻¹ were used. The best results of survival were obtained with the use of MS salts 100%, supplemented with manitol 10 g.l⁻¹. The manitol caused growth decrease in shoot tips and allowed conservation at short-term up to six months with the employment of 10 g.l⁻¹ of concentrations.

Key words: manitol, growth, survival, *Carica papaya*

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la fruta bomba (*Carica papaya* L.) está ampliamente difundido en el mundo y en Cuba. Por ello, se hace necesaria la búsqueda de nuevos genotipos (incluyendo híbridos) para incrementar los rendimientos, la resistencia a enfermedades ocasionadas por virus; así como mejorar la calidad de los frutos que se hace cada vez más exigente en el mercado en cuanto a tamaño y Brix. La conservación de estos nuevos recursos fitogenéticos es muy importante para su posterior utilización en programas de mejora genética de plantas e incorporación a la propagación masiva.

Cuando se quiere utilizar el cultivo *in vitro* como un sistema de conservación de germoplasma se puede actuar sobre dos factores: las condiciones ambientales de la cámara de cultivo y la composición del medio de cultivo (Veramendi *et al.*, 2000). Los sistemas de conservación a mediano plazo tienen en común el empleo de bajas temperaturas (6-15 °C) y bajo

flujo de fotones fotosintéticos (menores de 30 mol. m⁻².s⁻¹). Otras características comunes son el uso de retardadores de crecimiento como ácido abscísico, manitol y ancimidol (Veramendi *et al.*, 2000).

La técnica de crecimiento mínimo ha sido empleada en la práctica para la conservación de germoplasma, existen varios ejemplos de su aplicación con la creación de bancos *in vitro* de *Saccharum officinarum* (Taylor y Dukin, 1993), *Manihot esculenta* (Roca *et al.*, 1994), *Carica papaya* (Suksa *et al.*, 1997) y *Solanum tuberosum* (Toledo y Golmirzaie, 1998), entre otros.

En el IBP se ha obtenido un híbrido mejorado (IBP 42-99) que presenta frutos más pequeños y un Brix alto (Posada, 1999) que se requiere conservar. Por lo anteriormente planteado el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la concentración de sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y manitol, en la conservación *in vitro* a corto plazo de ápices de plantas *in vitro* del híbrido papaya IBP 42-99.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Ápices de plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99. La desinfección, establecimiento y multiplicación *in vitro* se realizó siguiendo la metodología propuesta por Posada (1999).

Efecto de la concentración de sales MS y el manitol

Este experimento consistió en evaluar el efecto de la concentración de sales MS y manitol en la conservación *in vitro* de ápices de papaya de una longitud entre 0.5 – 1.0 cm. Se empleó el medio de cultivo basal (MS) y vitaminas MS; suplementado con 6-bencilaminopurina (6-BAP) 0.10 mg.l⁻¹, ácido naftalenacético (ANA) 0.10 mg.l⁻¹; riboflavina (Vitamina B₂) 0.10 mg.l⁻¹; Mio-inositol 100 mg.l⁻¹ y sacarosa 30 g.l⁻¹. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 y fue gelificado con Gelrite a 2.5 g.l⁻¹. Se utilizó un explante por cada tubo de ensayo (25x150 mm) con 10 ml de medio de cultivo semisólido y 25 explantes por cada tratamiento. Se empleó un diseño completamente al azar y los tratamientos empleados se describen en la tabla 1.

Los explantes de cada tratamiento se colocaron en cámaras de crecimiento con luz solar con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) 50-62.5 μmol m⁻².s⁻¹ de 50-62.5 μ mol.m⁻¹.s⁻¹, una temperatura de 25±2 °C y humedad relativa de 70±10 %.

Se evaluaron las siguientes variables: número de explantes vivos (expresados en %), altura de los ápices (cm) a los 20, 50, 80, 110, 140 y 170 días.

Los porcentajes de supervivencia se transformaron por la fórmula $2 \arcsen \sqrt{p}$ donde P es el porcentaje en fracción, se realizó un análisis de varianza simple y como prueba de comparación de medias se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan para un 5% de significación. Se empleó el paquete Estadística versión 2.0 (Instituto de Ciencia Animal, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la concentración de sales MS y el manitol

Al analizar el porcentaje de supervivencia (Tabla 2) se aprecia que a partir de la primera evaluación a los 20 días, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos hasta después de los 110 días. Los porcentajes de supervivencia de los ápices durante este período de conservación fueron del 100%.

A partir de los 140 días y hasta los 170 días comenzó a disminuir el porcentaje de supervivencia en los tratamientos donde se empleó el 50% de sales MS excepto en el tratamiento 3 (50% de sales MS + manitol 30 g.l⁻¹) que se mantuvo con un 94.4%, con diferencias con el control.

Por otra parte, los tratamientos que contenían el 100% de las sales MS a los 140 días presentaron porcentajes de supervivencia altos comparados con los anteriores que incluían el 50% de las sales MS, excepto el tratamiento 8 (100% sales MS + 40 g.l⁻¹ de manitol) sin diferencias con el control, que disminuyeron. Los mejores resultados en la supervivencia de los ápices conservados *in vitro* se encontraron asociados a la concentración de sales en el medio de cultivo, o sea a la disponibilidad de nutrientes.

Cuando se empleó manitol en el medio de cultivo se pudo observar que la supervivencia del material vegetal conservado disminuyó a medida que aumentó la concentración del mismo. A partir de los 140 días de conservación las plantas *in vitro* comenzaron a tornarse amarillas, con abundante caída de las hojas y la pérdida en algunos casos de la parte apical, seguida del oscurecimiento y posterior muerte de ellos. Esto ocurrió de forma más acentuada cuando se utilizaron 40.0 g.l⁻¹ de manitol, donde se observaron; además, plantas con crecimiento anormal, hiperhídricas y con más de un brote. Estos resultados indicaron un efecto fitotóxico del manitol sobre las plantas *in vitro* del híbrido de papaya, lo cual puede atribuirse a que las altas concentraciones de esta sustancia disminuyen el potencial hídrico del medio de cultivo, conllevando al desarrollo de células de pared celular rígidas, gruesas y anormales en plantas hiperhídricas. Esto se corrobora con lo planteado por Suksa *et al.* (1997), que informaron una severa suculencia de los ápices de papaya conservados en medio de cultivo que contenía manitol.

Nodarse *et al.* (1998), al conservar domos meristemáticos de caña de azúcar durante 12 meses con la utilización 30.0 g.l⁻¹ de manitol, obtuvieron resultados satisfactorios en la supervivencia, sin cambios apreciables en el material vegetal conservado.

Cuando se analizó el comportamiento de la altura en las plantas *in vitro* (Tabla 3) se observó que a partir de los 20 días, el control mantuvo con los mayores valores con respecto a los diferentes tratamientos debido al efecto de la presencia de agentes osmóticos en el medio de cultivo en este caso el manitol; que disminuye o retarda el crecimiento de los ápices aún en condiciones normales de temperatura e iluminación solar.

Tabla 1. Diferentes concentraciones de sales MS y manitol empleadas para la conservación *in vitro* a corto plazo de ápices de plantas *in vitro* del híbrido papaya IBP 42-99.

Tratamientos	Concentración de sales MS (%).	Concentración de manitol (g.l ⁻¹).
1	50	10
2	50	20
3	50	30
4	50	40
5	100	10
6	100	20
7	100	30
8	100	40
Control	100	-

Tabla 2. Comportamiento del porcentaje de supervivencia en ápices de plantas *in vitro* del híbrido IBP 42-99 en diferentes concentraciones de sales MS y manitol.

Tratamientos	Porcentaje de supervivencia (%).					
	20 días	50 días	80 días	110 días	140 días	170 días
Sales MS 50 % + manitol 10 g. l ⁻¹	100.0	100.0	100.0	100.0	85.71 ab	65.07 ab
Sales MS 50 % + manitol 20 g. l ⁻¹	100.0	100.0	100.0	100.0	65.07 a	45.23 a
Sales MS 50 % + manitol 30 g. l ⁻¹	100.0	100.0	100.0	100.0	94.44 b	65.07 ab
Sales MS 50 % + manitol 40 g. l ⁻¹	100.0	100.0	100.0	100.0	70.63 a	30.95 a
Sales MS 100 % + manitol 10 g. l ⁻¹	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 b	100.0 cd
Sales MS 100 % + manitol 20 g. l ⁻¹	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 b	90.47 cd
Sales MS 100 % + manitol 30 g. l ⁻¹	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 b	80.94 bc
Sales MS 100 % + manitol 40 g. l ⁻¹	100.0	100.0	100.0	100.0	61.90 a	51.58 a
Control: Sales MS 100 %	100.0	100.0	100.0	100.0	50.0 a	0.0 a
ESx	-	-	-	-	0.2474	0.2369
CV (%)	-	-	-	-	16.20	19.00

Medias con letras diferentes difieren significativamente para $P < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Tabla 3. Comportamiento de la altura de ápices de plantas *in vitro* del híbrido de papaya, IBP 42-99 en diferentes concentraciones de sales MS y manitol.

Tratamientos	Altura de las plantas <i>in vitro</i> (cm).					
	20 días	50 días	80 días	110 días	140 días	170 días
Sales MS 50 % + manitol 10 g. l ⁻¹	1.02 c	1.28 cd	1.42 bc	1.50 bcd	1.50 bc	1.51 b
Sales MS 50 % + manitol 20 g. l ⁻¹	0.69 a	0.93 a	1.12 a	1.16 a	1.16 a	1.21 a
Sales MS 50 % + manitol 30 g. l ⁻¹	0.83 b	1.29 cd	1.36 b	1.39 b	1.39 b	1.40 b
Sales MS 50 % + manitol 40 g. l ⁻¹	0.83 b	1.06 ab	1.10 a	1.08 a	1.08 a	1.17 a
Sales MS 100 % + manitol 10 g. l ⁻¹	0.98 c	1.33 cd	1.41 bc	1.53 bde	1.53 cd	1.53bc
Sales MS 100 % + manitol 20 g. l ⁻¹	0.98 c	1.37 d	1.42 bc	1.65 e	1.65 d	1.65 cd
Sales MS 100 % + manitol 30 g. l ⁻¹	1.03 c	1.39 d	1.56 cd	1.64 e	1.64 d	1.66 d
Sales MS 100 % + manitol 40 g. l ⁻¹	0.99 c	1.19 bc	1.29 b	1.39 bc	1.39 b	1.45 b
Control: Sales MS 100 %	1.30 d	1.56 e	1.67 d	1.91 f	1.97 e	-
ESx	0.0393	0.0538	0.0541	0.0464	0.0455	0.0438
CV (%)	18.25	18.96	17.62	14.07	13.74	13.01

Medias con letras diferentes difieren significativamente, $P < 0.05$ según según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Las concentraciones de manitol estudiadas disminuyeron la altura de los explantes, sin embargo esta variable tuvo una tendencia a incrementarse en la medida que aumentaba la concentración mineral del medio de cultivo.

Jarret y Gawell (1991) lograron disminuir el crecimiento de brotes apicales de boniato (*Ipomoea batatas* L.) con el uso de 30.0 g.l⁻¹ de manitol.

Rayas *et al.* (2002) plantearon que el manitol redujo el crecimiento de las plantas *in vitro* de yuca (*Manihot esculenta*), aunque observaron una afectación en la recuperación del material vegetal conservado. También el uso de reguladores osmóticos, como el sorbitol (4 g.l⁻¹) ha sido señalado en la conservación de 4 225 accesiones de papa, por favorecer la reducción del crecimiento y prolongar el período entre subcultivos (Toledo y Golmirzaie, 1998).

CONCLUSIONES

Las plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99 pudieron ser conservadas durante 170 días a una temperatura de 25 °C. El crecimiento se redujo con el empleo de sales MS y el incremento de las concentraciones de manitol. La mayor supervivencia se alcanzó con las sales MS 100% y una concentración de 10 g.l⁻¹ de manitol a la vez se logró disminuir el crecimiento de los ápices.

REFERENCIAS

- Borges, M, González LM, Aguilera N, Malaurie B, Vázquez J, Infante Z, Fonseca M (2001) Aplicación de la estadística multivariada al estudio de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata* L. Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov". Bayamo. Cuba. [en línea] 2002. Disponible en: <http://www.jdimitrov.edu.cu/>. [Consulta 30 de septiembre del 2005]
- Jarret, RL, Gawel N (1991) Chemical and environmental growth regulation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam) *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25: 153-159
- Lemos, EE, Baker D (1998) Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. Plant Growth Regulation 25: 105-112
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473 – 497
- Nodarse, O, Santana I, Cornides MT, Figueredo Y, Héctor E y Rodríguez R (1998) Comparación de probaciones de caña de azúcar conservadas *in vitro* e *in situ*. Libro de resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana
- Posada, L (1999) Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas adultas de dos híbridos cubanos de Papaya (*Carica papaya* L.). Tesis en opción al grado científico de master en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Santa Clara. Cuba
- Rayas, A, Mederos V, García M, López J, Cabrera M, Ventura J, Martínez Marilín, Valentina Gutiérrez, Álvarez M, Maricel Bauta (2002) Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca. Biotecnología Vegetal 2(4): 249-251
- Roca, WM, Escobar R, Mafla G (1994) Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. p 8-12. CIAT, Cali
- Suksa, PA, Kataoka I, Fujime Y, Subhadrabandhu S (1997) Effect of temperature, growth retardants and osmotic potencial of growth of Papaya Shoots Conservred *in vitro*. Tropical Agriculture 41(1): 7-13
- Taylor, PWJ, Dukin S (1993) Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum* ssp. hybrid germplasm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34: 217-222
- Toledo, J, Golmirzaie A (1998) Conservación *in vitro* de *Solanum* ssp bajo condiciones de estrés osmótico y ambiental. Centro Internacional de la papa, Lima, Perú. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 98. Junio/ 1-5. Palacio de Convenciones. La Habana. Cuba
- Veramendi, J, Arregui LM (2000) La conservación *in vitro* de recursos fitogenéticos de patata. Departamento de producción Agraria. Universidad Pública de Navarra [en línea] 2000. Disponible en: <http://www.eumedia.es/>. [Consulta 30 de Octubre del 2004]