

Establecimiento *in vitro* de brotes de *Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo

Mónica Jadán Guerrero^{1,2}, Karem Basantez³, Rafael Gómez-Kosky², Idalmis Bermúdez-Carabaloso²

¹Departamento de Ciencias de la Vida, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Ave Gral Rumiñahui. Sangolquí. Quito. Ecuador. PO BOX 171-5-31B.
e-mail: mbjadan@espe.edu.ec, monica@ibp.co.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54830

³Universidad de las Américas. Ave de los Granados y Colimes esq Quito. Quito. Ecuador

RESUMEN

El babaco [*Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo] es una especie de importancia comercial en Ecuador. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer *in vitro* de brotes de yemas axilares a partir de plantas madre de babaco mantenidas en casa de cultivo. A las plantas se les aplicó Carbendazim y el bioestimulante (GERMO-TB01). Para la desinfección de los explantes se evaluaron tres concentraciones de Hipoclorito de Sodio (1, 1.5 y 2%) durante dos tiempos (5 y 10 minutos). Además, se determinó el efecto del uso de Gentamicina 50 mg l⁻¹ y Estreptomycin 25 mg l⁻¹ en el medio de cultivo. Los mejores resultados se alcanzaron al utilizar el Hipoclorito de Sodio al 1.5% durante 10 minutos y la inmersión en una solución con los dos antibióticos por 3 horas. Se logró un 68.5% de establecimiento *in vitro* de los brotes a los 21 días de cultivo. Los resultados contribuirán a la propagación masiva *in vitro* de este híbrido.

Palabras clave: babaco, desinfección, mezcla de antibióticos, micropropagación

In vitro establishment of *Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo shoots

ABSTRACT

Babaco [*Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo] is a specie of commercial importance in Ecuador. The present work aimed to establish *in vitro* shoots of axillary buds from mother plants of babaco kept in greenhouse. Carbendazim and the biostimulant (GERMO-TB01) were applied to the plants. For the disinfection of the explants, three concentrations of Sodium Hypochlorite (1, 1.5 and 2%) were evaluated during two times (5 and 10 minutes). In addition, the effect of the use of Gentamicin 50 mg l⁻¹ and Streptomycin 25 mg l⁻¹ in the culture medium was determined. The best results were achieved by using 1.5% Sodium Hypochlorite for 10 minutes and immersion in a solution with both antibiotics for 3 hours. A 68.5% *in vitro* establishment of the shoots was achieved at 21 days of culture. The results will contribute to *in vitro* mass propagation of this hybrid.

Key words: antibiotic mixture, babaco, disinfection, micropropagation

INTRODUCCION

El babaco [*Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo] ha sido considerada como híbrido natural proveniente del cruce de las especies *V. pubescens* (chamburo) y *V. stipulata* (toronche) (Lim, 2012).

El babaco ha sido introducido en países como Nueva Zelanda, Australia, Italia, España, Francia, Sur de África, Suiza, Canadá y Países

Bajos en ensayos de invernadero (Scheldemanet *al.*, 2003). Sin embargo, el principal problema en el cultivo, producción y comercialización del babaco es su forma de reproducción que se limita a la siembra de estacas. Esta vía de propagación tiene, entre otras dificultades, la baja capacidad de enraizamiento del material vegetal (AAIC, 2003). Además, hasta el momento, no existe un protocolo para la obtención de plantas libres de patógenos y su propagación a gran escala.

Por tal motivo, la propagación *in vitro* de este híbrido ha sido presentado como un método alternativo para su propagación masiva.

Solo dos informes se han realizado hasta la fecha sobre la micropropagación de esta especie a partir del cultivo de ápices (Cohen y Cooper, 1982) y de yemas axilares (Cossio, 1988) sin embargo muestran pocos detalles del proceso realizado.

En el babaco, al igual que en papaya (*Carica papaya* L.), uno de los principales problemas en la fase de establecimiento del cultivo *in vitro*, cuando se emplean plantas adultas cultivadas en campo, es el alto porcentaje de contaminación microbiana. Esto no ha permitido el desarrollo del explante *in vitro* para su propagación (Quillay, 2011).

En la familia *Caricaceae*, la contaminación microbiana, sobre todo por bacterias, es uno de los problemas críticos. Sin embargo, Posada *et al.* (2004), alcanzaron un 68.5% de brotes establecidos a partir de plantas de campo, en un híbrido obtenido por cruzamiento tradicional con el uso de antibióticos.

En base a esta problemática se desarrolló la presente investigación con el objetivo de establecer *in vitro* brotes de yemas axilares a partir de plantas madre de babaco mantenidas en casa de cultivo.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Plantas madre de cinco meses de cultivo bajo condiciones semicontroladas (casa de cultivo), crecidas en bolsas de polietileno de 15 x 10 cm con capacidad para 1 kg de sustrato formado por suelo de la zona (franco arenoso arcilloso), humus de lombriz y pomina en proporción 3:1:1 (Cevallos y Ramos, 1990), desinfectado con anterioridad. Se realizaron riegos dos veces por semana, la temperatura osciló entre 15-23°C, con una humedad relativa de 40-50% y la intensidad de luz se controló con el uso de una malla sombra (50%) o sarán. Además, se realizaron aplicaciones del fungicida Carbendazim 0.5% (v/v) (Nufarm, EUA) y el bioestimulante GERMO-TB01 (GermoplantaCia. Ltda, Quito,

Ecuador) 1.0 ml l⁻¹. Las aplicaciones se realizaron por aspersión en el área foliar cada 2 días.

Desinfección

Se seleccionaron brotes de yemas axilares con un tamaño aproximado de tres a cinco centímetros que se cortaron con la ayuda de una tijera de podar previamente desinfectada con etanol al 70%.

En condiciones de laboratorio se realizaron los diferentes pasos del procedimiento de desinfección. Primero, lavado con agua común bajo el grifo durante dos horas. Después, lavado en una solución jabonosa (Jabón Protex) 3.0 ml l⁻¹ durante 15 minutos en agitación a 90 rpm con un agitador orbital SHO-1D (Wisd Laboratory Instruments, Alemania). Inmediatamente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. A continuación fueron sumergidos en una solución del fungicida DORBAQ (LONZA Inc., EUA) 6.0 ml l⁻¹ por 30 minutos en agitación a igual velocidad y en equipo anteriormente referido. Se realizó un lavado con agua destilada estéril, para seguir con los diferentes tratamientos de desinfección.

Efecto del hipoclorito de sodio

Este experimento tuvo como objetivo determinar el efecto de diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio (NaClO) en la desinfección de los brotes. Se evaluaron tres concentraciones 1.0, 1.5 y 2.0% (v/v) de NaClO, durante dos tiempos de exposición 5 y 10 min. Los explantes se mantuvieron en agitación como se describió anteriormente. A todos los tratamientos se le adicionaron de dos a cinco gotas de Tween 20.

Efecto de antibióticos

Este experimento tuvo como objetivo determinar el efecto la aplicación de antibióticos en la desinfección de los brotes. A partir de los resultados del experimento anterior y de acuerdo con los resultados alcanzados por Posada *et al.* (2004), en el establecimiento *in vitro* de un híbrido de papaya, después de la desinfección se sumergieron los explantes en una solución acuosa que contenía los antibióticos Sulfato de Gentamicina (50 mg l⁻¹) y Estreptomycin (25 mg l⁻¹) (Sigma-Aldrich,

EUA) por 3 horas. Como control se siguió el mismo procedimiento sin la mezcla de antibióticos.

En ambos experimentos, dentro de la cámara de flujo laminar, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y los brotes fueron reducidos a un tamaño de 2.0 cm. Se utilizaron 20 brotes por tratamiento como repetición, los cuales se colocaron en tubos de ensayo (145.0 x 25.0 mm) con 10 ml de medio de cultivo semisólido compuesto por las sales de Cohen y Cooper (1982), a las que se le adicionaron 2.0 mg l⁻¹ de 6-bencil aminopurina (6-BAP) y 0.1 mg l⁻¹ de ácido naftalen-acético (ANA), maltosa 2.0 g l⁻¹ y fue solidificado con 7.5 g l⁻¹ de BACTO™ AGAR (Becton y Dickinson Co, EUA). El pH del medio de cultivo fue 5.8 previo a la esterilización por autoclave. Se cuantificó el número de explantes contaminados por bacterias y hongos filamentosos y se calculó el porcentaje de contaminación microbiana a las 72 horas. Además, a los 21 días después del establecimiento *in vitro* se cuantificó el número de brotes con necrosis y los explantes viables y se calculó el porcentaje.

Condiciones de cultivo

Los explantes fueron colocados en cámara de cultivo a 20±2°C, estantes con tubos fluorescentes de luz blanca con un fotoperiodo de 12 horas luz, con una densidad de flujo de

fotones fotosintéticos de 16.8 μmol m⁻² s⁻¹. La humedad relativa en el cuarto de cultivo fue 50%.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos en las variables expresadas en porcentaje se utilizó el paquete estadístico STATISTICA versión 12.0 y se determinó la diferencia entre los valores mediante la prueba de comparación de proporciones para dos muestras. En todos los casos las diferencias se establecieron para p<0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los resultados alcanzados en este experimento se pudo constatar que la contaminación bacteriana resultó un punto crítico en el establecimiento *in vitro* de brotes de babaco. Con la concentración de hipoclorito de sodio de 1.5%, durante un tiempo de exposición de 10 minutos, se redujo en un 55% la contaminación por bacterias y 3.0% por hongos, lo cual demuestra la efectividad de este tratamiento, a pasar de que se observó un 10% de ápices necrosados (Tabla 1). Cabe señalar el efecto positivo del pretratamiento a las plantas madre con el fungicida Carbendazim, dos semanas previas a la toma de los ápices en el proceso de desinfección con solución del fungicida DORBAQ. Sin embargo, aún 45% de brotes establecidos, requiere continuar mejorando los procedimientos para proponer una metodología para la desinfección y el establecimiento *in vitro* más eficiente.

Tabla 1. Efecto del empleo de Hipoclorito de Sodio en la desinfección de brotes del híbrido babaco [*Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo] para su establecimiento *in vitro*.

Solución NaClO (%) (v/v)	Tiempo (min)	Explantes contaminados (%)		Explantes necrosados (%)	Explantes Viables (%)
		Bacterias	Hongos		
1.0	5	70	12.1	2.2	15.7 c
1.0	10	60	5.3	4.0	30.7 bc
1.5	5	65	5.0	9.4	20.6 c
1.5	10	45	3.0	10.0	45.0 a
2.0	5	55	4.5	14.5	36.0 b
2.0	10	46	0.0	18.4	35.6 b

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente según la Prueba de proporciones para p<0.05 n=20

En el establecimiento *in vitro* de plantas, el hipoclorito de sodio es una de las soluciones más utilizadas para la desinfección de los explantes. Autores como Rebolledo *et al.* (2006) y Hernández y González (2010) utilizaron hipoclorito de sodio para la desinfección de explantes de plantas leñosas y frutales, obtuvieron bajos porcentajes de contaminación microbiana y no se observó un grado importante de oxidación del explante. No obstante, es necesario tener en cuenta que a medida que se aumentaron las concentraciones de hipoclorito de sodio al igual que el tiempo de exposición, los explantes comenzaron a presentar necrosis, sobre todo en los sitios en donde los tejidos son más sensibles (hojas) y donde se realizaron los cortes con el bisturí, esto se traduce en un futuro necrosamiento y muerte celular.

En igual sentido, Landázuri y Tigrero (2009) en *Stevia rebaudiana* Bertoni, refirieron que las altas concentraciones de las soluciones desinfectantes influyeron en la supervivencia de los explantes. Aquellos que se afectaron tuvieron una menor respuesta en el medio de cultivo, inicialmente mostraron necrosis y posteriormente murieron.

Por otra parte, Jordan (2011) en la especie *Vasconcellea chilensis* Planch. ex A. DC informó del uso de hipoclorito de sodio a 0.25% (v/v) durante 5 minutos para la desinfección de explantes de secciones nodales de plantas adultas. Previamente realizó varios pasos del proceso que incluyeron dos tipos de fungicidas (Triadimefon y Captan) pero no refiere los porcentajes de viabilidad alcanzados.

Más recientemente, Vélez-Mora *et al.* (2015) para lograr la germinación de semillas de *Vasconcellea stipulata* Badillo, después de los tratamientos con sustancias que estimularan la germinación, emplearon para el proceso de

desinfección hipoclorito de sodio al 1.0% (v/v) durante 5 minutos. Estos autores alcanzaron un 53% de semillas establecidas en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) a los seis meses de cultivo.

El uso de antibióticos para la desinfección de brotes del híbrido de babaco el porcentaje de establecimiento. La contaminación bacteriana se redujo a solo 14.8% y alcanzó una viabilidad del 68.5% (Tabla 2).

En los explantes tratados con antibióticos, al igual que Posada *et al.* (2004) en el híbrido IBP 42-99 de papaya (*Carica papaya* L.), no se evidenciaron síntomas de fitotoxicidad. Sin embargo, cuando el explante permaneció por un período de tiempo prolongado en hipoclorito de sodio, éste causó mayor daño al tejido. También las concentraciones de antibióticos sugeridas por estos autores, fueron adecuadas para disminuir los porcentajes de contaminación bacteriana en los explantes del híbrido babaco, con resultados muy similares en el presente trabajo.

También, Wu *et al.* (2012) emplearon antibióticos (Rifampicina o gentamicina) o la combinación de ambos, para eliminar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de explantes provenientes de plantas hermafroditas de papaya y alcanzaron valores altos de establecimiento (78%).

El uso de antibióticos en babaco, no sólo se limita al cultivo *in vitro*, sino que se utiliza a nivel de campo para el control de enfermedades causadas por bacterias del género *Agrobacterium*, como es el caso de la enfermedad llamada 'pata de elefante' o coliflor, la cual se presenta como un sobrecrecimiento de la base del tallo o en sus secciones (Fabara *et al.*, 1985; AAIC, 2003).

Tabla 2. Efecto del empleo de antibióticos en el establecimiento *in vitro* de brotes del híbrido babaco [*Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo].

Tratamiento	Contaminación bacteriana (%)	Contaminación fúngica (%)	Explantes necrosados (%)	Explantes viables (%)
Con antibióticos	14.8 b	3.6 a	27.7 a	68.5 a
Control	61.1 a	3.7 a	25.6 a	29.6 b

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente según la Prueba de proporciones para $p < 0.05$ $n=20$



Figura 1. Brote *in vitro* del híbrido babaco [*Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo] en tubo de ensayo en medio de cultivo Cohen y Cooper (1982) a los 21 días de cultivo.

El establecimiento de plantas leñosas o semileñosas en el cultivo *in vitro* es un paso difícil. Sin embargo, en el presente trabajo fue posible alcanzar resultados positivos con el proceso de desinfección y el uso de antibióticos. La desinfección de los explantes es un paso esencial para el éxito del cultivo *in vitro*. La contaminación microbiana puede originarse por microorganismos que vienen adheridos a la superficie del explante o por fallas en los procedimientos de trabajo en el laboratorio. El mantenimiento de plantas donadoras bajo condiciones de invernadero o vivero y pretratamiento con sustancias antimicrobianas disminuyen los procesos de infección. Ello permite lograr el establecimiento de cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación *in vitro*. La superficie de los tejidos de las plantas constituyen un hábitat para los microorganismos, estos pueden alojarse en estomas, lenticelas o cualquier otra abertura natural, lo cual dificulta en extremo su eliminación. Los problemas más frecuentes son: infecciones debido a la superficie pilosa, bacterias endógenas y el daño a los explantes debido a la oxidación fenólica (Battistini y De Paoli, 2007).

A los 21 días de establecidos los brotes presentaron buen crecimiento y formación de varias hojas, con los cual estaban listos para pasar a la fase de multiplicación *in vitro* (Figura 1).

CONCLUSIONES

Las investigaciones realizadas en este trabajo permitieron lograr un 68.5% de establecimiento *in vitro* de brotes del híbrido babaco. Esto se logró a través de una técnica reproducible, con el empleo de brotes de yemas axilares de plantas madre crecidas en casa de cultivo. Los resultados contribuirán a la propagación masiva de este híbrido.

REFERENCIAS

- AAIC (2003) El cultivo de babaco en invernadero (*Carica pentagona*). Abya Yala, Quito
- Battistini A, De Paoli G (2002) Large-scale micropropagation of several peach rootstocks. Acta Horticulturae 592:29-33
- Cohen D, Cooper PA (1982) Micropropagation of babaco a *Carica* hybrid from Ecuador. En: Fujiwara A (ed) 5th Intl Congr Plant Tissue and Cell Culture Japan, pp. 743-744. Tokyo

- Coppens DG, Drew R, Kyndt T, Scheldeman X (2014) Genetics and genomics of papaya. En: Ming R, Moore P H (eds) Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 10, pp. 47-79. Springer, New York
- CORPEI (2006) Babaco. Disponible en: http://www.sierraexportadora.gob.pe/datasix/dctos/estudios_mercado/Babaco_2006.pdf. Consultado 21/07/2015
- Corteza J (2013) Información sobre el Babaco. Disponible en: <http://rifruco.blogspot.com/p/informacion-de-la-fruta.html>. Consultado 25/07/2015
- Cossio F (1988) Ilbabaco. Edagricole, Bologna
- Fabara J, Bermeo N, Berberán C (1985) Manual del Cultivo del Babaco. Grupo Esquina editores – diseñadores SA Impresión Cia Ltda, Ambato
- Hernández H, Dallos M (2012) Establecimiento de un protocolo de propagación de Gulupa (*Passiflora edulis* SIMS) a partir de embriones cigóticos y yemas axilares. Agron 20 (2):53- 64
- Hernández Y, González ME (2010) Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultivos Tropicales 31(4): 1-5
- Jordan M (2011) *In vitro* morphogenic responses of *Vasconcellea chilensis* Planch. ex A. DC (*Caricaceae*) Agronomía Colombiana 29 (3): 481-485
- Kitto SL (1997) Commercial micropropagation. Hort Science 32(6):310-325
- Landázuri PA, Tigreiro JO (2009) *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. ESPE, Sangolquí
- Lim TK (2012) Edible Medicinal and Non-Medicinal Plant. Springer, New York; ISBN 9048186617
- Muñoz C (1986) Propagación del babaco (*Carica x heilbonii* Badillo nm *pentagona* (Heilborni Badillo) Mediante estacas apicales herbáceas. Agricultura Técnica 46 (4): 513-514
- Murashige T, Skoog FM (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-479
- Posada L, Gómez R, Gallardo J, Reyes M, Herrera I (2004) Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas de campo del híbrido cubano de Papaya IBP 42-99. Biotecnología Vegetal 4 (3): 153-158
- Pro-Agro E (2007) Fitoquímica y Agroindustrialización de dos genotipos de *Vasconcellea*, chamburo (*Vasconcellea cundinamarzensis* V. Badillo) y toronche (*Vasconcellea stipulata* V. Badillo). Sangolquí, Quito
- Quillay N (2011) Determinación de la capacidad embriogénica de babaco (*Vasconcellea x heilbonii*) a partir de óvulos y hojas multiplicados *in vitro* vía embriogénesis somática. Tesis presentada para la obtención del Grado Académico de Magister en Gestión de la Producción de Flores y Frutas Andinas para Exportación, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador
- Rebolledo V, Aparicio A, Cruz H (2006) Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. Foresta Veracruzana 8(2): 27-32
- Scheldeman X, Romero J, Van Damme V, Heyens V, Van Damme P (2003) Potencial de papayas de altura (*Vasconcellea* spp.) en el sur del Ecuador. Lyonia 5(1): 73-80
- Soria N, Viteri P (1999) Guía para el cultivo de babaco en el Ecuador. Revista del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias 33(9): 35-38
- Vélez-Mora DP, Armijos GR, Jordán MZ (2015) Enhancement of germination, hyperhydricity control and *in vitro* shoot formation of *Vasconcellea stipulata* Badillo. Revista Colombiana de Biotecnología XVII (2):16-21
- Wu K, Zeng S, Chen Z, Duan J (2012) *In vitro* mass propagation of hermaphroditic *Carica papaya* cv. Meizhonghong. Pak J Bot 44(5):1669-1676

Recibido: 08-12-2015

Aceptado: 25-02-2016