

Efecto sinérgico del ácido indolacético, ácido giberélico y 6-bencilaminopurina en la propagación *in vitro* de “papaya” *Carica papaya* L. (Caricaceae)

Synergistic effect of indoleacetic acid, gibberellic acid and 6-benzylaminopurine in the *in vitro* propagation of “papaya” *Carica papaya* L. (Caricaceae)



Resumen

Los frutos de *Carica papaya* L. (Caricaceae) tienen una gran demanda en el mundo, motivo por el cual se han desarrollado una serie de investigaciones en cultivos de tejidos vegetales, generándose diversos protocolos para obtener plántulas vigorosas y libre de enfermedades, optimizándose su producción. El efecto sinérgico entre hormonas genera mejores efectos que de manera individual, pudiendo ser favorables o desfavorables para el crecimiento y desarrollo de un explante. Ante la necesidad de conocer y evaluar el efecto sinérgico de diferentes hormonas en la propagación *in vitro* de *C. papaya*, se tomó como objetivo determinar el efecto sinérgico. Para ello se seleccionaron entrenudos de "papaya" procedentes de invernadero, para ser transportados al Laboratorio de Biotecnología del Instituto de la "Papa" y Cultivos Andinos. Para su establecimiento *in vitro* se empleó el medio MS 1962 suplementado con diferentes concentraciones de ácido indolacético, 6-bencilaminopurina y ácido giberélico. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo T5 el que evidenció mayor altura y número de hojas. Se concluye que el medio de cultivo MS suplementado con 0,5 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de AIA y 0,5 de AG3 es óptimo para propagación *in vitro* de *C. papaya*.

Palabras clave: ácido indolacético, ácido giberélico, 6-bencilaminopurina, propagación *in vitro*, *Carica papaya*.

Abstract

The fruits of *Carica papaya* L. (Caricaceae) are in great demand in the world, for this reason there have been a series of researches in plant tissue cultures, giving rise to various protocols to obtain vigorous seedlings, free of diseases, optimizing the crop production. The synergistic effect between hormones generates better effects than individually, and they can be favorable or unfavorable for an explant. Because of the need to know the synergistic effect of different hormones in the *in vitro* propagation of *C. papaya*, we took this objective for this research. We selected papaya nodes from greenhouse, then they were transported to the Laboratory of Biotechnology, Institute of Potato and Andean Crops. For *in vitro* establishment, we used MS 1962 medium supplemented with different concentrations of indoleacetic acid, 6-benzylaminopurine and gibberellic acid. Statistically significant differences were found, and T5 showed greater height and number of leaves. It is concluded that the MS culture medium supplemented with 0.5 mg.L⁻¹ BAP + 0.5 mg.L⁻¹ IAA and 0.5 GA3 is optimal for *in vitro* propagation of *C. papaya*.

Keywords: Indoleacetic acid, gibberellic acid, 6-benzylaminopurine, *in vitro* propagation, *Carica papaya*.

Introducción

C. papaya L. es cultivada en la mayoría de países tropicales, su centro de origen son las áreas cálidas de norte y Centroamérica, entre el sur de México y Nicaragua. Perteneció a la familia Caricaceae, la cual consta de cinco géneros: *Carica*, *Jacaratia*, *Cylicomorpha*, *Jarilla* y *Horovitzia*. *C. papaya*, es una planta herbácea, arborescente, de crecimiento rápido y de vida corta. Su tallo es recto y cilíndrico pudiendo alcanzar alturas de 10 m. La raíz principal es alorhiza (=pivotante). Mientras que las hojas son grandes, palmadas, con lóbulos profundos y borde dentado. Las inflorescencias son axilares y las flores pueden ser unisexuales o hermafroditas. El fruto es una baya ovoide-oblonga, piriforme o casi cilíndrica, de color verde amarillento o anaranjado amarillo cuando madura. Actualmente, existe una mayor demanda de sus frutos en el mundo, debido a su agradable sabor, propiedades medicinales y nutricionales, pues contiene vitamina A, B y C. Por otro lado, la presencia de papaína le brinda un efecto favorable en la digestión y asimilación de los alimentos (IIFT, 2011; Alfonso, 2010; Guzmán, 1998).

Dentro del crecimiento y desarrollo de las plantas, las hormonas tienen función específica, actuando fisiológicamente en concentraciones muy bajas. Existen 5 grupos principales: Auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno. Tanto auxinas y citoquininas se ha demostrado desde hace mucho tiempo que pueden actuar de forma sinérgica o antagonista para el control de varios procesos de desarrollo, tales como la formación y mantenimiento de meristemo. Siendo las auxinas, las que tienen la función principal de promover el crecimiento y alargamiento celular. Entre las principales auxinas tenemos al: Ácido indol acético (AIA), ácido naftalenacético

(ANA), ácido indolbutírico (AIB), 2,4-D. Siendo el AIA la fitohormona más conocida, que naturalmente se produce en los ápices de los tallos, meristemos y/o hojas jóvenes, migrando al resto de la planta de forma basipétala (de arriba a abajo). Por otro lado, las giberelinas cumplen la función de promover el crecimiento en longitud de plantas intactas, siendo el AG3, la más común. Tanto auxinas como giberelinas son promotoras del crecimiento, pues estimulan el alargamiento de los tejidos. Mientras que las citoquininas actúan en los procesos posteriores a la replicación del DNA, pero previos a la mitosis promoviendo la división celular e incrementando la síntesis de proteínas. De manera natural, las citoquininas son producidas en las zonas de crecimiento como los meristemos de la punta de la raíz, siendo transportados vía acrópeta (de abajo hacia arriba). Las más conocidas son: Zeatina, kinetina y bencilaminopurina (Ortega, 2010; Rojas *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2011; Curtis *et al.*, 2008; Campbell, 2001; Gómez & García, 2006).

Existen diversas formas de propagar “papaya”. El uso de semilla es la más común, fácil y económica. Siendo su principal desventaja la desuniformidad en el cultivar, debido a que las semillas pueden proceder de árboles femeninos fecundados con papayos masculinos o semillas procedentes de árboles femeninos y hermafroditas. Otra técnica es la propagación por estacas, sin embargo, se corre el riesgo de estar diseminando virus. Siendo es un método laborioso y costoso. Una de las técnicas más utilizadas en la actualidad, es la reproducción asexual a través de cultivo de tejido celulares, pues permite obtener un 100% de plantas hermafroditas (Alfonso, 2010; PROMOSTA y DICTA, 2005). El concepto de cultivo de tejidos o propagación *in vitro* abarca tanto el cultivo

aséptico de tejidos como el de células y órganos. Básicamente, esta técnica consiste en sembrar un inóculo bajo condiciones asépticas provistas de un medio de cultivo con nutrientes y hormonas, llegándose a un punto en el que podemos ejercer control relativo de los procesos morfogénicos, fisiológicos y bioquímicos. La propagación *in vitro* se basa en la siembra de un pequeño fragmento (explante) de la planta madre bajo las condiciones descritas anteriormente, producirá pequeñas plántulas, réplicas de su progenitor. Las plantas obtenidas a través de esta tecnología existe una mayor probabilidad de que la carga viral sea menor o nula. Por ello, la biotecnología vegetal contribuye con el mejoramiento de los cultivos, obteniéndose germoplasma saneado (Kessel, 2008; Ábdelnour & Vincent, 1994; Beltrán & Roca, 1984; Curtis & Schnek, 2008). En la actualidad, se han realizado muchos ensayos de propagación *in vitro*, los cuales ha contribuido en la creación de diferentes protocolos

de propagación, utilizando diferentes fitohormonas. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto sinérgico de diferentes hormonas en la propagación *in vitro* de *C. papaya*.

Material y métodos

El presente trabajo, se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de la Papa y Cultivos Andinos de la Universidad Nacional de Trujillo. El material vegetal (entrenudos de "papayo"), procedieron del invernadero de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de Trujillo.

Preparación de medio de cultivo

Se preparó medio de cultivo MS-1962, suplementado con sacarosa al 3%, phyttagel al 0,8 % y diferentes concentraciones de fitohormonas, según su tratamiento correspondiente. Las cuales se detallan a continuación:

Tabla 1. Medio de cultivo MS 1962 suplementado con diferentes concentraciones de ácido indolacético, giberélico y 6-bencilaminopurina.

Tratamiento	Medio + Hormonas		
	BAP	AIA	AG3
T1	0	0	0.5
T2	0.5	0	0.5
T3	0.8	0	0.5
T4	0	0.5	0.5
T5	0.5	0.5	0.5
T6	0.8	0.5	0.5
T7	0	0.8	0.5
T8	0.5	0.8	0.5
T9	0.8	0.8	0.5

Una vez preparado los medios de cultivo, estos fueron esterilizados en autoclave a 1 atm por 30 minutos.

Desinfección de explantes

Después de ser colectados, los explantes fueron lavados con abundante agua y detergente comercial por 1 minuto, luego se sumergieron en legía al 1% por 20 minutos. Para que finalmente sean enjuagados 5 veces con agua destilada estéril. Luego los explantes fueron transportados a cámara de siembra, previa desinfección del área y encendido de los mecheros. Donde se sumergieron los explantes por 30 segundos en alcohol al 70° y enjuagados 3 veces. Finalmente, fueron sumergidos nuevamente en legía al 2% por 2 minutos, seguido de 3 enjuagues con agua destilada estéril.

Siembra de explantes

Con la ayuda de una pinza estéril, los explantes desinfectados fueron puestos en una placa de Petri estéril provista de papel filtro, con la finalidad de eliminar el exceso de humedad. Finalmente, se sembraron los explantes uno por uno dentro de los frascos que contenían el medio de cultivo previamente esterilizado. Una vez concluida esta actividad, los frascos fueron colocados en un cuarto de incubación a temperatura ambiente, con un fotoperiodo de 16-8 horas luz-oscuridad.

Análisis estadístico

El diseño fue en bloques al azar, estando constituido por 216 explantes. La toma de datos de altura de plántula y número de hojas fue a los 55 días después de la siembra, con los cuales se estimó el valor promedio. Además, de efectuarse su correspondiente Análisis de Varianza (ANOVA) y la Prueba de Múltiples Rangos (DUNCAN).

Resultados y discusión

Las evaluaciones a los 55 días después de la siembra, nos indica que el tratamiento T5 es el más óptimo, ya que los explantes presentan mayor número de hojas y mayor altura (Tabla 2 y Fig. 1). Investigaciones corroboran que la combinación de MS+ 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, AIA y AG3, son óptimas para el establecimiento *in vitro* de *C. papaya* (Solís *et al.*, 2011). Auxinas como el AIA reprimen el desarrollo de brotes laterales y mantienen la dominancia apical. Estudios indican que promueven el alargamiento de las células a ciertas concentraciones. Mientras que el BAP estimula la división de tejidos no meristemáticos. Siendo de gran importancia el equilibrio entre ambas. Pues su correcta interacción ejerce efecto en la desdiferenciación y división celular, rompiendo la latencia de yemas axilares (Rojas *et al.*, 2004; Curtis *et al.*, 2008; Campbell, 2001). La altura promedio del T5 fue relativamente pequeña (Tabla 2 y Fig. 1). Frente a otras investigaciones donde han adicionado ácido giberélico (AG3) en concentraciones entre 1- 5,0 mg.l⁻¹. Por otro lado, se evidencia un efecto similar al adicionar al medio de cultivo 100 mg / l de urea y 2,0 g / l de carbón activado al medio. Mientras que alturas superiores a 1,50 cm, se obtiene suplementando al medio de cultivo MS con 0,25 mg l⁻¹ BA y 40 mg l⁻¹ de sacarosa. Esto se debe a que citoquininas como la Bencialadenina (BA) promueven la división celular, acelerando la formación de brotes tiernos (Wu *et al.*, 2012; Cruz, 2012; Chirinos & Pérez, 1999; Banergee, 2002; Posada, 2005; Roy *et al.*, 2013; Anandan *et al.*, 2011). En los tratamientos T6, T8 y T9 se observó la presencia de ciertos callos. Investigaciones que tuvieron como objetivo evaluar la formación de callos a partir de secciones de tallo, empleando el medio de cultivo propuesto por Nitsh y Nitsh,

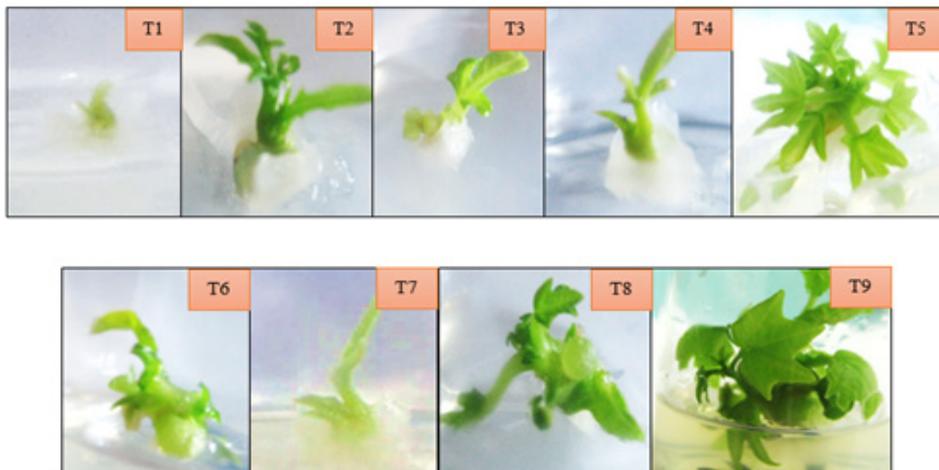
suplementado con mayores concentraciones de BAP Y AIA (1,5 mg.l⁻¹), lograron la formación de callos compactos, secos y grumosos con estructuras embriogénicas. Investigadores prefieren utilizar el 2,4-D y el ANA como auxinas, inductoras a la

formación de callos. Sin embargo, estudios han demostrado que el incremento de AIA y BAP, permite obtener callos de mayor consistencia y aspecto morfológico (Gallardo, 2005; Posada, 2005).

Tabla 2. Altura (mm) y n° de hojas promedio de plántulas de *C. papaya* a los 55 días de evaluación.

Tratamiento	Altura(mm)	N° de hojas
T1	1.16	0.36
T2	2.46	2.38
T3	1.87	1.42
T4	1.93	0.91
T5	4.03	4
T6	3.05	3.17
T7	1.83	0.95
T8	3.64	3.19
T9	3.79	3.05

Fig. 1. Plantulas de *C. papaya* L. a los 55 días de siembra en medio de cultivo MS 1962 suplementado con diferentes concentraciones de fitohormas.



Al realizar el análisis de varianza para las variables número de hojas y altura de plántulas (Tabla 2 y Fig. 1). El valor-P de la prueba-F fue menor que 0,05, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, con un nivel del 95,0% de confianza. Esto corrobora la existencia de diferentes respuestas de los explantes de *C. papaya* ante diferentes concentraciones de BAP, AIA Y AG3. Por otro lado, los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T7 presentaron los menores promedios en cuanto a las variables número de hojas y altura de plántulas, estos tratamientos no presentan diferencias significativas entre sí, según la prueba Duncan. Esto se debió a la ausencia ya sea de auxina (AIA) o citoquinina (BAP), pues cambios en el balance hormonal afectan el crecimiento, obteniéndose una diferente repuesta del explante. De ello, se infiere que la interacción citoquinina – auxina regula la formación de callos y la morfogénesis *in vitro*, y su efecto puede variar según la especie, tejido, entre otros. Esto se debe a que existen interacciones sinérgicas o antagonistas entre dos o más hormonas vegetales. Tal es el caso, que para ciertos cultivos, el combinar auxinas y citoquininas contribuye con la elongación, generándose un efecto aditivo entre ambas. Por otro lado, el correcto balance entre ambas hormonas se ve reflejado en el adecuado desarrollo de los explantes, como lo observado en el tratamiento T5 (Pérez & Cornejo, 2014; Castro *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 1996; Gómez & García, 2006).

Conclusión

El medio de cultivo MS suplementado con 0,5 mg.L⁻¹ de BAP +0,5 mg.L⁻¹ de AIA y 0,5 de AG3 ejerce efecto sinérgico positivo, siendo óptimo para propagación *in vitro* de *C. papaya*.

Literatura citada

- Ábdelnour, E. & E. Vincent. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Costa Rica: CATIE S. A.
- Alfonso, M. 2010. (en línea). Guía técnica del cultivo de la “papaya”. Centro nacional de tecnología agropecuaria y forestal “Enrique Álvarez Córdova”. Acceso 15/09/2016.
- Anandan, R.; S. Thirugnanakumar; D. Sudhakar & P. Balasubramanian. 2011. *In vitro* organogenesis and plantlet regeneration of (*Carica papaya* L.). Journal of Agricultural Technology 7(5): 1339-1348.
- Banergee, J. 2002. Tissue culture and transformation studies in indian cultivars of “papaya” (*Carica papaya* L.) Tesis de Doctorado en Fisiología botánica. Universidad de Pune. India
- Beltrán, J. & W. Roca. 1984. EL cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de “yuca” *in vitro*. Colombia: CIAT.
- Campbell, N.; L. Mitchel & J. Reece. 2001. Biología: Conceptos y relaciones. (3era ed.). México: Ed. Pearson Educación. 809 páginas.
- Castro, P.; C. Serciloto; M. Pereira; J. Rodríguez & G. Rossi. 2009. Agroquímicos de controle hormonal, fosfitos e potencial de aplicação dos aminoácidos na agricultura tropical. Universidad de Sao Paulo. 83 páginas.
- Chirinos, F. & E. Pérez. 1999. Biotecnología aplicada a la micropropagación de frutales: memorias. Venezuela: Edit. IICA Biblioteca. 115 páginas.
- Curtis, H.; N. Barnes; A. Schnek & A. Massarini. 2008. Biología. (7ma ed.). España: Ed. Médica Panamericana.
- Cruz, F. 2012. Cultivo de tejidos vegetales (Manual de prácticas). Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: file:///I:/papaya/cultivosdetejidosvegetales_manu al prac.pdf
- Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales. 2011. (en línea). Instructivo técnico para el cultivo del “papayo”. Acceso 15/09/2016.
- Guzmán, G. 1998. Guía para el cultivo de la “papaya” (*Carica papaya* L.). Ministerio de agricultura y ganadería. San José, Costa Rica. 74 pp.
- Kessel, A. 2008. Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales, una vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies. Cultivos Tropicales, 29(3): 27-37.

- Ortega, C. J.** 2000. Evaluación de fitohormonas y abonos foliares para mejorar el amarre de frutos de tomate en árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt) cultivar punto amarillo. Tababela-Pichincha. Tesis ingeniero agrónomo. Universidad central del Ecuador.
- Rojas, S.; J. García & M. Alarcón.** 2004. Propagación asexual de plantas. Colombia: Ed. Corpoica. 55 pp.
- Gallardo, J.; R. Gómez; M. Tejada; L. Posada; I. Herrera; M. Reyes; L. García & M. Freire.** 2005. Empleo de secciones de tallo de plantas *in vitro* de "papaya" (híbrido IBP 42-99) para obtener callos con estructuras embriogénicas. *Biotecnología Vegetal* 4(4): 213-216.
- Gómez, A. & P. García.** 2006. Fitohormonas: metabolismo y modo de acción. España. Ed: Publicaciones de la Universidad Jaume. 335 páginas. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=6MfjE2eQO4kC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Pérez, J. & M. Cornejo.** 2014. Cómo y por qué trabajamos con células vegetales. España. Ed: Universitat de València. 131 páginas. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=-uKBAQAQBAJ&dq=balance+citoquinina+auxina&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Posada, L.** 2005. Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la "papaya". *Biotecnología Vegetal* 5 (2): 67-79.
- Roy, P. K.; S. K. Roy & M. L. Hakim.** 2013. Propagation of "papaya" (*Carica papaya* L.) cv. Shahi through *in vitro* culture. *Bangladesh Journal of Botany* 41(2): 191-195.
- Solis, L.; S. Olivera; L. La Rosa & S. Rafael.** 2011. Propagación *in vitro* de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemas apicales. *Revista Peruana de Biología* 18(3): 343-348.
- Su, Y.; Y. Liu & X. Zhang.** 2011. Auxin-Cytokinin Interaction Regulates Meristem Development. *Molecular Plant* 4(4): 616-625.
- Yang, T.; J. Davies & J. B. Reid.** 1996. Genetic dissection of the relative roles of auxin and gibberellin in the regulation of stem elongation in intact light-grown peas. *Plant Physiology* 110: 1029-1034.
- Wu, K. L.; S. J. Zeng; Z. L. Chen & J. Duan.** 2012. *In vitro* mass propagation of hermaphroditic *Carica papaya* cv. 'Meizhonghong'. *Pakistan Journal of Botany* 44(5): 1.

ANEXO



Fig. *Carica candicans* A. Gray, A. Flor femenina; B. Frutos.

