

CULTIVO *in vitro* DE YEMAS AXIARES DE PAPAYA (*Carica papaya* L.). III. EFECTO DE CONCENTRACIÓN DE SACAROSA, ÁCIDO INDOLBUTIRICO Y ÁCIDO NAFTALENACÉTICO SOBRE EL ENRAIZAMIENTO DE TALLOS CULTIVADOS *in vitro*¹

*Griselda Arrieta*², *Erc Guevara*³, *Guillermo Sancho*⁴

RESUMEN

Cultivo *in vitro* de yemas axilares de papaya (*Carica papaya* L.). III. Efecto de concentraciones de sacarosa, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético sobre el enraizamiento de tallos cultivados *in vitro*. Se estudió el enraizamiento de tallos de papaya provenientes de plantas adultas y cultivados *in vitro* a través del efecto de concentraciones de sacarosa (1 y 2%), AIB (0,2; 0,5 mg/D, ANA (0,2; 0,5; 1,0 mg/l) y carbón activado (0,2%). El enraizamiento se realizó en dos etapas: 1/ el cultivo de los tallos sobre un medio MS con la mitad de la concentración de los macroelementos y conteniendo 1 o 2% de sacarosa y una auxina; y 2/ la transferencia de los tallos ocho días después a un medio MS neutro conteniendo o no carbón activado y concentraciones variables de sacarosa. Dosis altas de auxina y en particular de ANA promovieron en general la defoliación severa de los tallos. Una concentración de 1% de sacarosa en el medio promovió un mejor enraizamiento. El tratamiento con ANA estimuló el desarrollo de callo en la base de los tallos con o sin carbón activado. El mejor enraizamiento y desarrollo de raíces se observó con el uso de AIB 0,2 mg/l y 1% de sacarosa, seguido por una transferencia a un medio MS con 1% de sacarosa y 0,2% de carbón activado.

Abreviaciones: AIB= ácido indolbutírico, ANA= ácido naftalenacético.

ABSTRACT

In vitro culture of axillary buds of papaya (*Carica papaya* L.). III. Effect of sucrose, indolbutyric acid and naphthalene-acetic acid on rooting of adult and *in vitro* cultivated stalks. The effect of concentrations of sucrose (1 and 2%), IBA (0.2 and 0.5 mg/D, NAA (0.2, 0.5 and 1.0 mg/l) and activated charcoal was studied on rooting of adult and *in vitro* cultivated papaya stalks. The rooting was conducted in two stages: 1- the cultivation of stalks on a MS medium with half the concentration of macro-elements and containing 1 or 2 % of sucrose and one auxin, and 2- the transfer of the stalks eight days later to a neutral MS medium containing, or not, activated charcoal and variable concentrations of sucrose. In general, high doses of auxins and particularly NAA caused a severe stalk defoliation. A 1 % sucrose concentration in the medium promoted a better rooting. The treatment with NAA stimulated to form a callus at the base of the stalks, with or without the activated charcoal. The best rooting and root growth was observed with the use of IBA 0.2 mg/l and 1 % sucrose, followed by a transfer to a MS medium with 1 % sucrose and 0.2 % of activated charcoal.

Keywords: vegetative propagation, *in vitro* culture, buds, *Carica papaya*, plant growth substances, sucrose, IBA, NAA, rooting.

¹ Esta investigación contó para su realización con recursos de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. (Proyecto VI-736-89-032).

² CIGRAS, Universidad de Costa Rica.

³ Miembro del Programa de Apoyo Financiero a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

⁴ Ing. Agr. Estación Experimental Fabio Baudrit M., Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

Palabras clave: propagación vegetativa, cultivo *in vitro*, yema (planta), canca papaya, sustancias de crecimiento vegetal, sacarosa, ácido indolbutírico, ácido naftilacético, enraizamiento.



INTRODUCCIÓN

El enraizamiento determina en gran medida el éxito de la propagación donal de una especie. De él depende en parte la capacidad de las plantas para adaptarse al medio externo.

La propagación de tallos por cultivo *in vitro* de la papaya, a partir de yemas axilares de material adulto fue previamente descrita (Sancho y Guevara 1991; Arrieta *et al.* 1995). Sin embargo, una de las mayores dificultades encontradas ha sido el inducir y desarrollar raíces en los tallos regenerados en material previamente establecido y multiplicado *in vitro*. Aunque en la literatura ya existen varios trabajos previos sobre el enraizamiento *in vitro* de tallos de papaya (Drew, 1988; De Winnar, 1988; Reuveni *et al.*, 1990), su aplicación en nuestras condiciones ha llevado a la formación principalmente de callo en la base de los tallos, y cuando se ha observado la aparición de raíces, estas emergen del callo, desprendiéndose con facilidad del mismo, siendo no funcionales.

Por este motivo, se procedió a estudiar con más detalle aquellos factores que influyen en la formación *in vitro* de raíces en tallos de papaya, provenientes de material adulto.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo *in vitro* del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas de la Universidad de Costa Rica.

El material vegetal consistió de tallos provenientes de la fase de multiplicación *in vitro* (medio MS + 0,3 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP)) ,los cuales se originaron a partir de yemas axilares de material adulto, resultados previamente descritos por Arrieta *et al.* (1995). Estos tallos, de un tamaño aproximado de 1,5-2,0 cm, tenían un promedio de siete hojas por tallo, con brotes laterales inferiores a 2 mm de largo.

El medio de cultivo consistió de las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (MS)0962 con la mitad de la concentración de los macroelementos. Se utilizaron los siguientes componentes orgánicos: 0,5 mg/l de ácido nicotínico; 0,5 mg/l de piridoxina; 0,1 mg/l de tiamina HCl; 2 mg/l de glicina y 100 mg/l de mio inositol. A este medio se le ajustó el pH a 5,8 y posteriormente se solidificó con agar a razón de 10 g/l y se vertió en frascos de 225 ml del tipo utilizado para comida de bebés (20 cc por frasco). Estos fueron luego esterilizados en una autoclave a 120°C y 15 atm. de presión durante 20 minutos.

El proceso de enraizamiento se dividió en dos etapas. La primera consistió en la aplicación de tratamientos inductivos durante ocho días: se estudió el efecto de dos auxinas: el ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0,2; 0,5 y 1,0 mg/l; y el ácido indolbutírico (AIB) en concentraciones de 0,2 y 0,5 mg/l. Además, se estudió la combinación de estos reguladores con dos concentraciones de sacarosa: 1% y 2%. Cuando fueron utilizadas, todas estas sustancias fueron añadidas al medio previo al ajuste del pH y su esterilización. Se utilizaron 10 tallos por

tratamiento. Durante la inoculación, así como en las transferencias realizadas, se eliminó de los tallos cualquier formación de callo presente en la base de los mismos.

La segunda etapa consistió en la transferencia de la mitad de los tallos, de cada tratamiento anterior, a un medio neutro (desprovisto de reguladores) con carbón activado al 0,2% y la otra mitad a uno sin él. Las dosis de sacarosa y nutrientes previamente utilizadas se mantuvieron en esta etapa.

RESULTADOS

Caracterización de los tallos durante el tratamiento inductor de enraizamiento

Durante los ocho días en que los tallos permanecieron en los medios conteniendo auxinas, se observó una fuerte abscisión de hojas en los mismos. El grado de defoliación y de clorosis, formación de callo y contaminación observados se presentan en los Cuadros 1 y 2.

Cuadro 1. Caracterización del comportamiento de los tallos cultivos en medios de enraizamiento con sacarosa al 2% después de 8 días.

Auxina	Tratamiento mg/l	Clorosis (%)	Tallos con defoliación (%)*			Callo %	Cont. %
			Leve	Moderada	Severa		
AIB	0,20	50	40	0	0	0	
	0,5	30	40	60	0	0	0
ANA	0,2	10	20	50	20	0	10
	0,5	10	0	50	40	0	10
	1,0	0	0	50	50	0	0

* leve: 1-2 hojas; moderada: 3-4 hojas; severa: 5 o más hojas.

Cuadro 2. Caracterización del comportamiento de los tallos cultivos en medios de enraizamiento con sacarosa al 1% después de 8 días.

Auxina	Tratamiento mg/l	Clorosis (%)	Tallos con defoliación (%)*			Callo %	Cont. %
			Leve	Moderada	Severa		
AIB	0,2	0	20	20	0	0	0
	0,5	60	20	30	30	60	0
ANA	0,2	0	20	50	30	0	0
	0,5	0	20	30	50	0	0
	1,0	400	30	60	0	10	

* leve: 1-2 hojas; moderada: 3-4 hojas; severa: 5 o más hojas.

En presencia de sacarosa al 2% y de AIB, el grado de defoliación de los tallos es en la mayoría de los casos de leve a moderado. Por el contrario en presencia de ANA, la mayoría de los explantes presenta una defoliación de moderada a severa, que se incrementa con la concentración del regulador. No se observa en ninguno de los tratamientos la formación de callo.

La disminución de sacarosa en el medio (Cuadro 2) redujo la defoliación, especialmente con 0,2 mg/l de AIB, aunque con dosis mayores se nota una defoliación severa en 30% de los tallos, lo mismo que un alto porcentaje de clorosis (30%) y de formación de callo (60%). En presencia de ANA, todas las dosis incrementan la defoliación severa en presencia de sacarosa al 1%. Se observa además un gran número de tallos cloróticos (40%) con dosis de 1 mg/l de ANA.

La transferencia de los explantes a medio neutro redujo considerablemente los porcentajes de defoliación moderada a severa y de clorosis, como se observa en el Cuadro 3. En presencia de concentraciones altas de sacarosa (2%) y con niveles bajos de auxinas (0,2 mg/l AIB y 0,2 mg/l ANA) la defoliación y clorosis fueron mayores en

comparación con lo observado al emplearse sacarosa 1%. En esta última concentración la defoliación fue mayor con niveles altos de ANA, mientras que con AIB se mantuvo igual al observado con sacarosa 2%.

Formación de raíces

En presencia de sacarosa al 2%, la incorporación de carbón activado al medio neutro (Cuadro 4) estimuló ligeramente, y en forma general, un mayor porcentaje de tallos enraizados. Para ambos tipos de auxinas, el enraizamiento tiende a disminuir conforme aumenta la dosis empleada. Sin embargo, el principal efecto del carbón activado fue el disminuir el porcentaje de formación de callo, especialmente con el uso de AIB. En el caso del ANA, la disminución en la formación de callo por parte del carbón activado sólo fue observado con dosis bajas (0,2 mg/l) ya que en dosis altas no se observó más bien un estímulo en el crecimiento del mismo. En general para ambas auxinas la dosis más baja empleada (0,2 mg/l) fue la que produjo el desarrollo de raíces morfológicamente normales y además el mayor porcentaje de enraizamiento.

Cuadro 3. Comportamiento de los tallos de papaya previamente cultivados en un medio conteniendo auxinas y luego transferidos a un medio neutro.

Tratamiento previo (mg/l)	Clorosis (%)	Sacarosa 2%			Clorosis (%)	Sacarosa 1%		
		Tallos con defoliación (%)*				Tallos con defoliación (%)*		
		Leve	Moderada	Severa		Leve	Moderada	Severa
AIB 0,2	20	50	0	0	0	50	0	0
AIB 0,5	0	30	0	0	0	0	0	0
ANA 0,2	10	10	30	0	0	0	0	0
ANA 0,5	0	0	0	0	0	40	0	0
ANA 1,0	0	0	0	0	20	10	0	0

* leve: 1-2 hojas; moderada: 3-4 hojas; severa: 5 o más hojas.

Cuadro 4. Enraizamiento de tallos de *Carica papaya* después de 4 semanas de cultivo en medio neutro conteniendo o no carbón activado en presencia de 2% de sacarosa.

Tratamiento mg/l	Enraizamiento (%)		Formación de callo (%)	
	(+) C.A.	(-) C.A.	(+) C.A.	(-) C.A.
0,2 AIB	60	60	0	20
0,5 AIB	40	0	0	0
0,2 ANA	60	60	0	40
0,5 ANA	40	20	20	20
1,0 ANA	60	40	60	40

La disminución de la concentración de sacarosa en el medio a 1%, en presencia de carbón activado, incrementó el enraizamiento de tallos cultivados previamente en un medio con AIB, especialmente en dosis bajas (0,2 mg/l) (Cuadro 5). Estos resultados son mejores que los obtenidos en presencia de 2% de sacarosa (Cuadro 4). En el caso del ANA, se observó un efecto similar, únicamente con las dosis inferiores o iguales a 0,5 mg/l. Dosis mayores tuvieron un efecto detrimental. La ausencia de carbón activado en el medio con menos contenido de sacarosa tuvo un efecto negativo sobre el enraizamiento, en particular con el uso previo de concentraciones elevadas de ambas auxinas. Sin embargo, el uso de sacarosa al 1%

estimuló fuertemente la formación de callo, tanto cuando el tratamiento previo fue con AIB como con ANA, pero únicamente con las dosis más altas. Este efecto se observó tanto en ausencia como en presencia de carbón activado, aunque con este último el efecto fue mayor, inclusive en el caso de AIB, con el cual no se había observado la presencia de callo con anterioridad (Cuadro 4).

DISCUSION

La defoliación observada en el medio inductor conteniendo auxinas, afectó de manera importante la capacidad de enraizamiento de los tallos. Este

Cuadro 5. Enraizamiento de tallos de *Carica papaya* después de 4 semanas de cultivo en medio neutro conteniendo o no carbón activado en presencia de 1% de sacarosa.

Tratamiento mg/l	Enraizamiento (%)		Formación de callo (%)	
	(+) C.A.	(-) C.A.	(+) C.A.	(-) C.A.
0,2 AIB	80	40	0	0
0,5 AIB	60	0	40	25
0,2 ANA	40	60	0	60
0,5 ANA	80	60	20	20
1,0 ANA	25	20	75	20

efecto, así como la clorosis causada por las auxinas, han sido observados en otras plantas cultivadas *in vitro* (Guevara 1985) y la causa principal se atribuye a la inducción de la síntesis de etileno por parte de la auxina (Douglas 1981; Moore 1989). Esta observación explica la mayor defoliación observada conforme se incrementó la dosis de auxina. Sin embargo, existen diferencias importantes en cuanto al efecto de ambas auxinas, de las cuales el ANA es el mayor promotor de la defoliación. La interconversión entre AIB y AIA ha sido demostrada (Van der Krieken *et al.* 1993) y por lo tanto es de suponer que su metabolización sea más rápida. Por su parte el ANA, siendo una molécula sintética, se ve menos afectada por las auxino-oxidasas del metabolismo degradativo de los vegetales (Bangerth 1995, Institut für Obst-, Gemüse and Weinbau, Universität Hohenheim, Stuttgart, Alemania, comunicación personal) teniendo entonces una metabolización más lenta que la del AIB, por lo que se puede suponer que estimula por un tiempo mayor la liberación del etileno en la planta, causando una mayor defoliación. Esto explicaría la mayor formación de callo simultáneamente observada en presencia de este compuesto en el medio de cultivo.

Uno de los mayores problemas del cultivo *in vitro* lo constituye el enraizamiento de los explantes y posteriormente su transferencia a condiciones de invernadero y de campo. Con mucha frecuencia se ha observado (Guevara 1985), que si bien las auxinas inducen la formación de las raíces, inhiben su elongación, por lo que una permanencia prolongada en el medio inductor produce raíces flácidas, gruesas y callosas, con poco desarrollo de pelos radicales. La transferencia de plantas con este tipo de raíces a condiciones de invernadero tiene generalmente por resultado que estas raíces se pudran o mueran, siendo necesario a la planta el desarrollo de una nueva generación de raíces antes de su transferencia a condiciones de campo. Esto representa un inconveniente, por cuanto se alarga la estadía en condiciones de invernadero y las primeras raíces que se pudren representan un factor potencial de entrada de patógenos y por lo tanto la pérdida de las plantas.

Gaspar *et al.* (1994) han demostrado que el proceso general de inducción de raíces en las plantas, en presencia de auxinas, ocurre en los primeros días de incubación de los explantes en el medio inductor, siendo en la mayoría de los casos un período de 4 a 10 días. En el caso de la papaya, la transferencia de las plantas a un medio neutro permitió el desarrollo de raíces fibrosas y funcionales, libres de la influencia continua de la auxina en el medio. La presencia de carbón activado en el medio neutro estimuló un mayor enraizamiento de tallos, pero sobre todo contribuyó a obtener una mejor calidad en las raíces producidas. Este resultado es similar al obtenido por Drew (1988) al utilizar 0,1% de carbón activado.

Los niveles de AIB, que permitieron el desarrollo radical, son inferiores a los utilizados por Reuveni *et al.* (1990). Por su parte Drew *et al.* (1993) obtuvieron resultados de enraizamiento satisfactorios, pero con una concentración de AIB de 20 mg/l, o sea 100 veces superior a la del presente trabajo. Sin embargo, el porcentaje de callo en la base del tallo observado por esos autores fue mucho más elevado y sólo fue posible reducido mediante la adición de riboflavina al medio, la cual acelera la degradación de la auxina del medio. En el presente trabajo, se logró obtener el desarrollo de plantas enraizadas, sin formación alguna de callo, mediante la transferencia a un medio neutro conteniendo carbón activado. Los niveles de AIB utilizados en el presente trabajo permitieron obtener tallos prácticamente libres de callo en la base, haciendo innecesario la adición de riboflavina al medio. Los mejores resultados se observaron además con el uso de sacarosa al 1 %, cuando Drew (1988) recomienda 2%.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la utilización de dos etapas: la primera en un medio conteniendo 0,2 mg/l de AIB y 1% de sacarosa; y la segunda en un medio con carbón activado al 0,2% y 1% de sacarosa, permitió la obtención de plantas completas de papaya a partir de material vegetal adulto con características conocidas de producción. Esta investigación completa la anteriormente realizada para el establecimiento de

un protocolo de crecimiento y multiplicación realizado en condiciones locales (Arrieta *et al.* 1995). Se dispone así de un protocolo y un procedimiento para el cultivo *in vitro* de la papaya en condiciones locales, el cual abre las puertas a trabajos de mejoramiento genético de esa especie y la creación de un banco de germoplasma *in vitro*.

LITERATURA CITADA

- ARRIETA, G.; GUEVARA, E.; SANCHO, G. 1995. El cultivo *in vitro* de yemas axilares de papaya (*Carica papaya* L.). n. Determinación de las condiciones para la regeneración y multiplicación de tallos. Boletín Técnico Estación. Experimental Fabio Baudrit M. (C.R.). 28(2): 13-27.
- DE WINNAR, W. 1988. Clonal propagation of papaya *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 12:305-310.
- DOUGALL, D.K. 1981. Media factors affecting growth. Environmental and Exptl. Botany 21 (3/4):277-280.
- DREW, RA. 1988. Rapid donal propagation of papaya *in vitro* from field - grown trees HortScience 23(3):609-611.
- DREW, RA.; McCOMB; J.A.; CONSIDINE, J.A. 1993. Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya* L. *in vitro* in relation to auxin sensitive phases and use of riboflavin. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture 33:1-7.
- GASPAR, TH.; KEVERS, Cl.; HAUSMAN, J, Fr.; RIPETTI, V. 1994. Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. In: Physiology, Growth and Developments of Plants in Culture. Ed. by Lumsden, P.J.; Nicholas, J.R.; Davies, WJ. Kluwer Academic Publ. Dordrecht, Holanda, p. 289-298.
- GUEVARA, E. 1985. Croissance et morphogenese du pêcher-amandier (*Prunus persica* x *amygdalus*) ev. GF-677 cultivé *in vitro*, puis en conditions phytotroniques diverses. Tesis Ph.D., Université de Clermont n, Clermont-Ferrand, Francia. 300 p.
- UTZ, R.E.; CONNOVER, R.A. 1978. *in vitro* propagation of papaya. HortScience 13(3):241-242.
- MOORE, T. 1989. Biochemistry and physiology of Plant Hormones. 2nd. Ed. Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania. 170 p.
- REUVENI, O.; SHLESINGER, D.R; LAVI, V. 1990. *In vitro* donal propagation of dioecious *Carica papaya*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 20:41-46.
- SANCHO, G.; GUEVARA, E. 1991. El cultivo *in vitro* de yemas axilares de papaya (*Carica papaya* L.).I. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la contaminación inicial de los explantes. Boletín Téc. Estación Exptl. Fabio Baudrit M. (C.R.) 24(1): 14-26.
- VAN der KRIEKEN, W.M.; BRETELER, H.; VISSER, M.H.M.; MAVRIDOU, D. 1993. The role of the conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: induction of a test system. Plant Cell Reports 12:203-209.