

## Propagación in vitro de babaco (*Vasconcellea x heilbornii*) del distrito de Luya, región Amazonas

### In vitro propagation of babaco (*Vasconcellea x heilbornii*) from Luya district, Amazonas region

Carlos E. Millones Chanamé<sup>1</sup>

#### RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de desarrollar un protocolo para el establecimiento y ensayos preliminares de propagación *in vitro* de babaco (*V. x heilbornii*) proveniente del distrito de Luya, región Amazonas. Se recolectaron secciones vegetativas de plantas de *V. x heilbornii*, evaluando desinfectantes como lejía comercial y cloruro de mercurio para el establecimiento de yemas axilares, posteriormente se evaluó diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento auxinas, giberelinas y citocininas en la propagación *in vitro* de *V. x heilbornii*. Los resultados mostraron que el empleo de una combinación de lejía comercial al 10% más cloruro de mercurio 0,1% fueron los adecuados para la asepsia de las secciones vegetativas de *V. x heilbornii*. En tanto, el empleo de AIA 0,5 mg/L más 2iP 1- 2 mg/L permitieron el crecimiento y desarrollo de yemas axilares, resultados que permitirán la propagación *in vitro* de esta especie silvestre de importancia económica.

**Palabras clave:** Babaco, *Vasconcellea x heilbornii*, propagación *in vitro*.

#### ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objective of developing a protocol for the establishment and preliminary tests of in vitro propagation of babaco (*V. x heilbornii*) from the district of Luya, Amazonas region. Vegetative sections were collected from plants of *V. x heilbornii*, evaluating disinfectants such as commercial bleach and mercury chloride for the establishment of axillary buds, subsequently different concentrations of auxin growth regulators, gibberellins and cytokinins were evaluated in the *in vitro* propagation of *V. x heilbornii*. The results showed that the use of a combination of 10% commercial bleach plus 0,1% mercury chloride were adequate for the asepsis of the vegetative sections of *V. x heilbornii*. While, the use of IAA 0,5 mg/L more 2iP 1-2 mg/L allowed the growth and development of axillary buds, results that will allow the *in vitro* propagation of this wild species of economic importance.

**Keywords:** Babaco, *Vasconcellea x heilbornii*, in vitro propagation.

<sup>1</sup>Dr. En Genética y Mejoramiento de Plantas, Profesor Principal, Departamento Académico de Biología y Química, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), e-mail: carlos.millones@hotmail.com.

## I. INTRODUCCIÓN

La familia Caricaceae posee una diversidad de especies de papayitas de altura que desarrollan en las zonas altoandinas de Sudamérica, agrupadas en el género *Vasconcellea*, cuyos frutos son consumidos en fresco, asados, jugos procesados, mermeladas, conserva, así como también en salsa, compotas y encurtidos (Scheldeman et al., 2011). En el género *Vasconcellea*, destacan especies como el babaco (*V. x heilbornii*) y papayuelo (*V. cundinamarcensis*), importantes por poseer frutos con buenas características organolépticas, fuente de látex con actividad proteolítica y lipolítica (*V. x heilbornii*) (Dhuique-Mayer et al., 2001). Otras especies como *V. cundinamarcensis* y *V. stipulata* son portadoras de genes que confieren resistencia a “papaya ringspot virus”, tolerancia al frío, buenas características organolépticas y como patrones de injerto en el babaco (*V. x heilbornii*) (Jordan et al., 2009, Vélez-Mora et al., 2015).

El babaco (*V. x heilbornii*) es conocido como papaya de altura, desarrolla en climas subtropicales, y es originario de la cordillera de los andes ecuatoriana. Es un híbrido natural derivado del cruzamiento entre *V. monoica* y *V. cundinamarcensis* (Vega de Rojas y Kitto, 1991; Scheldeman et al., 2011). Una de las principales dificultades de esta especie es ser un híbrido estéril (Kempner et al., 1993) cuya propagación sólo puede realizarse vegetativamente a través de estacas, trayendo consigo el riesgo de contaminarse con virus y otras enfermedades (Jordan et al., 2009). En razón de ello, una de las alternativas para la propagación adecuada es a través del cultivo in vitro de yemas axilares (Jordan, 2011; Vélez-Mora et al., 2015).

Varias especies del género *Vasconcellea* han sido propagadas empleando el cultivo in vitro de tejidos, reportándose respuestas morfogénicas in vitro en secciones nodales de *V. chilensis* (Jordan, 2011), formación de brotes a partir de yemas axilares en *V. stipulata* (Vélez-Mora et al., 2015). En la especie *V. x heilbornii* fueron reportados producción de callo a partir de óvulos (Vega de Rojas y Kitto, 1991).

El babaco es cultivado en las huertas familiares y campos de cultivo de las zonas altoandinas de la región Amazonas, cuyo fruto es aprovechado para la preparación de refresco y néctar. Actualmente los productores agropecuarios de la región Amazonas vienen teniendo dificultades en la propagación de esta especie, debido a que es un híbrido natural, cuyo fruto ha perdido la facultad de producir semilla sexual, siendo la única forma de propagación de esta

especie la vegetativa, a partir de estacas, trayendo como consecuencia, contaminación de la semilla, baja disponibilidad y uniformidad de la calidad de semilla. En un avance para la solución de esta problemática es importante identificar plantas que posean buena calidad de fruto y productividad e iniciar con la estandarización de un protocolo para el establecimiento y propagación in vitro de babaco que asegure la obtención de semilla vegetativa de buena calidad, libre de fitopatógenos y disponible durante todo el año. En tal sentido, la presente investigación tuvo como objetivo desarrollar un protocolo para el establecimiento y ensayos preliminares de propagación in vitro de babaco (*V. x heilbornii*) proveniente del distrito de Luya, región Amazonas.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectó secciones caulinares de plantas de babaco vigorosas, buena producción y con buena apariencia fitosanitaria, las cuales fueron transportados al Laboratorio de Biología, UNTRM para los ensayos correspondientes. En el establecimiento de yemas axilares de babaco in vitro se formuló el medio de cultivo de establecimiento, constituido por las sales inorgánicas y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), m-inositol, sacarosa 3%, ácido ascórbico 100 mg/L y phytigel 0,15%. La esterilización de todos los medios de cultivos se realizó en una autoclave vertical Marca Gemmy Industrial Corp-USA, empleando 1 atmosfera de presión y 121 °C por 15 minutos.

Las secciones de tallo de babaco fueron lavados con agua corriente, detergente antes de su ingreso al cuarto de siembra. En la cámara de flujo laminar las secciones de tallo de babaco se desinfectaron en alcohol 70° durante 1 minuto, luego con diferentes desinfectantes y tiempos de exposición; cloruro de mercurio 0,1% en 10, 15 y 20 minutos, lejía comercial al 10% (0,4% hipoclorito de sodio) por 15 y 20 minutos, y la combinación de lejía comercial al 10% más cloruro de mercurio 0,1% por 15 y 20 minutos, realizándose los enjuagues respectivos con agua destilada estéril. Las yemas fueron colocadas en los tubos que contenían el medio de cultivo de establecimiento, el cual posteriormente fue sellado para su posterior incubación.

Una vez establecidas las yemas axilares in vitro, se procedió a colocar secciones vegetativas en medios de cultivo de propagación a base de las sales y vitaminas MS, myo-inositol 100mg/L, Sacarosa 2,5%, y phytigel 0,15%, suplementado con diferentes concentraciones de auxinas, giberelinas y citocininas (Tabla 1, 2, 3 y 4). Los explantes fueron

incubados en temperatura diurna: 26 – 28 °C, temperatura nocturna: 24 – 26 °C, irradiancia: 20  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$  (lámparas fluorescentes 36W tipo luz fría) y fotoperiodo: 16/8 horas (día/noche).

### III. RESULTADOS

Los ensayos de establecimiento de secciones vegetativas de plantas de *V. x heilbornii* (Figura 1 a, b y c) empleando cloruro de mercurio 0,1% por periodos de 10, 15 y 20 minutos, se registró la mortandad en su totalidad de las yemas axilares. En tanto, el empleo de lejía comercial al 10% (0,4% de hipoclorito de sodio) por 15 minutos ha sido la adecuada para el establecimiento in vitro de las yemas axilares de *V. heilbornii*, alcanzando un 90% de asepsia y supervivencia de las yemas axilares (Figura 1 d y e).

Los reguladores de crecimiento auxinas ANA y AIA (0,25 y 0,5 mg/L) y citocinina BAP 1 mg/L, a los 30 días de cultivo in vitro, se logró obtener una escasa respuesta morfogénica en las yemas axilares de babaco, cuyos explantes posteriormente perdieron viabilidad (Figura 2a, b, c y d). Por otro lado, el empleo de reguladores de crecimiento como la auxina AIA, la citocinina BAP y la giberelina AG3, a los 30 días de cultivo in vitro, no se logró obtener respuesta morfogénica en las yemas axilares de *V. x heilbornii*, sólo se registró la presencia de un callo friable (T1: 0,2 mg/L de AIA + 0,5 mg/L de BAP y T4: 0,10 mg/L de AIA + 0,25 mg/L de BAP: ), y yema sin crecimiento y desarrollo (T5: 0,2 mg/L de AG3 + 0,2 mg/L de BAP) (Figura 3a, b y c). Todos los explantes posteriormente perdieron viabilidad. Los Tratamientos T2, T3, T6, T7, T8, T9 y T10 no prosperaron, perdiendo viabilidad a la segunda semana de cultivo in vitro. En tanto, el uso de reguladores de crecimiento citocininas BAP y KIN y la giberelina AG3, a los 28 días de cultivo in vitro, no se logró inducir respuesta organogénica en las yemas axilares de *V. heilbornii*. Los explantes progresivamente fueron desarrollando callo friable a los 14, 21 y 28 días de cultivo in vitro (Figura 4 a-j). Finalmente, el empleo de reguladores de crecimiento Auxina AIA (0,2 mg/L) y la citocinina 2iP (1 mg/L) a los 35 días de cultivo in vitro no se logró inducir respuesta organogénica en las yemas axilares de *V. x heilbornii*, registrando la formación de callo friable (Figura 5A). El empleo la auxina AIA (0,5 mg/L) y la citocinina 2iP (1 y 2 mg/L) a los 35 días de cultivo in vitro las yemas axilares no llegaron a formar callo friable, experimentando los explantes un ligero crecimiento y desarrollo de la yema axilar (Figura 5b y c).

### IV. DISCUSIÓN

El uso de lejía comercial al 10% (0,4% de hipoclorito de sodio) más cloruro de mercurio 0,1% por 15 minutos ha sido adecuado para el establecimiento in vitro de las yemas axilares de *V. heilbornii*, alcanzando un 90% de asepsia y supervivencia de los explantes. Similares resultados fueron registrados por Guerrero et al (2016) quienes emplearon mayor concentración de hipoclorito de sodio (1,5%) por 10 minutos, más el uso de antibióticos gentamicina 50 mg/L y estreptomycinina 25 mg/L en el medio de cultivo, para el establecimiento de brotes de *V. x heilbornii*. En la presente investigación, no fue necesario el uso de antibióticos en la asepsia de los explantes establecidos in vitro.

El empleo de reguladores de crecimiento auxinas ANA y AIA (0,25 y 0,5 mg/L) y citocinina BAP 1 mg/L, a los 30 días de cultivo in vitro, se logró obtener una escasa respuesta morfogénica en las yemas axilares de *V. x heilbornii*, cuyos explantes indujeron callo friable y posteriormente se fenolizaron y perdieron viabilidad (Figura 2a, b, c y d). Similares escasas respuestas morfogénicas en el género *Vasconcellea* fue obtenido por Jordan (2011), reportando la formación de múltiples brotes a partir de secciones nodales de *V. chilensis* utilizando Tidiazuron 3 mg/L más AIA 1 mg/L, los cuales posteriormente no prosperaron en el crecimiento y desarrollo; asimismo, los explantes de peciolo no mostraron una respuesta morfogénica, tornándose marrón en los tratamientos ensayados. En el presente trabajo, el empleo de auxinas, citocininas y giberelinas en segmentos nodales de tallo, indujeron escasos brotes, rodeados de callo friable (Figura 4a-j), los cuales posteriormente se tornaron marrón sin ninguna ruta de diferenciación hacia la formación de una plántula.

En la respuesta morfogénica in vitro del género *Vasconcellea* los reguladores de crecimiento utilizados han sido AIA 0,5 mg/L y AG3 0,1 mg/L en óvulos de *Carica pentagona* (*V. x heilbornii*) induciendo embriones somáticos (Vega de Rojas y Kitto, 1991), BAP 0, 0,5-1 mg/L y AIA 0,5-1 mg/L en secciones de pedúnculos foliares *Carica pentagona* (*V. x heilbornii*) induciendo brotes adventicios (Vega de Rojas et al., 1993), ANA 0,1 mg/L y BAP 2 mg/L en embriones cigóticos de *V. stipulata*, induciendo brotes adventicios (Vélez-Mora et al., 2015). En el presente trabajo, el empleo la auxina AIA (0,5 mg/L) y la citocinina 2iP (1 y 2 mg/L) a los 35 días de cultivo in vitro las yemas axilares de *V. x heilbornii* no llegaron a desarrollar callo friable, experimentando los explantes un ligero crecimiento y desarrollo de la

yema axilar (Figura 5b y c).

### V. CONCLUSIONES

Empleando lejía comercial al 10% (0,4% de hipoclorito de sodio) más cloruro de mercurio 0,1% por 15 minutos han sido los desinfectantes adecuados para el establecimiento *in vitro* de las yemas axilares de *V. heilbornii*, alcanzando un 90% de asepsia y supervivencia de los explantes.

La combinación de la auxina AIA 0,5 mg/L más la citocinina 2iP (1-2 mg/L) en el medio de cultivo basal MS, fueron las concentraciones adecuadas de reguladores de crecimiento para crecimiento y desarrollo de la yema axilar sin formación de callo friables a los 35 días de cultivo *in vitro*.

### VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dhuique-Mayer, C., Caro, Y., Pina, M., Ruales, J., Dornier, M. y Graille, J. (2001). Biocatalytic properties of lipase in crude latex from babaco fruit (*Carica pentagona*). *Biotechnology Letters*, 23(13): 1021-1024.
- Guerrero, M.J., Basantez, K., Gómez-Kosky, R., Bermúdez-Caraballosa, I. (2016). Establecimiento *in vitro* de brotes de *Vasconcellea x heilbornii* (Badillo) Badillo. *Biotecnología Vegetal*, 16(2): 67-72.
- Jordan, M. (2011). *In vitro* morphogenic responses of *Vasconcellea chilensis* Planch. Ex A. DC (Caricaceae). *Agronomía Colombiana*, 29(3): 481-485.
- Jordan, M., Vélez, D. y Armijos, R. (2009). Biotecnologías aplicables al desarrollo de algunas especies de Caricáceas cultivadas en la región Andina: avances y problemas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 3(1): 9-17.
- Kempler, C., Kabaluk, J.T. y Nelson, M. (1993). Greenhouse cultivation of babaco (*Carica x heilbornii* Badillo n.m. pentagona (Heilborn)): effect of media, container size, stem number, and plant density. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 21(1): 273-277.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia plantarum*, 15(3): 473-497.
- Scheldeman, X., Kyndt, T., D'Eeckenbrugge, G.C., Ming, R., Drew, R., Droogenbroeck, B.V., ... Moore, P.H. (2011). *Vasconcellea*. En Kole, C. (Ed.), *Wild crop relatives: genomic and breeding resources tropical and subtropical fruits* (213-249). Berlin, Alemania: Springer.
- Vega de Rojas, R.; Barberan, B.; Kitto, S.L. (1993). Shoot regeneration from peduncles and shoot-like regeneration from leaves of babaco, *Carica pentagona*. *Turrialba* 43(2): 93-99.
- Vega de Rojas, R. y Kitto, S.L. (1991). Regeneration of babaco (*Carica pentagona*) from ovular callus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116(4): 747-752.
- Vélez-Mora, D.P., Armijos, R. y Jordán, M. (2015). Enhancement of germination, hyperhydricity control and *in vitro* shoot formation of *Vasconcellea stipulata* Badillo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2): 16-21.

**Tabla 1.** Combinaciones de reguladores de crecimiento auxinas y citocinina en los ensayos de propagación *in vitro* de *V. heilbornii*.

Tratamientos	Auxinas		Citocininas
	ANA (mg/L)	AIA (mg/L)	BAP (mg/L)
T1	0,25	---	1,0
T2	0,50	---	1,0
T3	---	0,25	1,0
T4	---	0,50	1,0

**Tabla 2.** Combinaciones de reguladores de crecimiento auxinas, citocinina y giberelina en los ensayos de propagación *in vitro* de *V. heilbornii*.

Tratamiento	Auxina	Citocinina	Giberelina
	AIA (mg/L)	BAP (mg/L)	AG3 (mg/L)
T1	0,20	0,50	---
T2	0,20	0,25	---
T3	0,10	0,50	---
T4	0,10	0,25	---
T5	---	0,50	0,20
T6	---	0,25	0,20
T7	---	0,50	0,10
T8	---	0,25	0,10
T9	---	0,50	---
T10	---	0,25	---

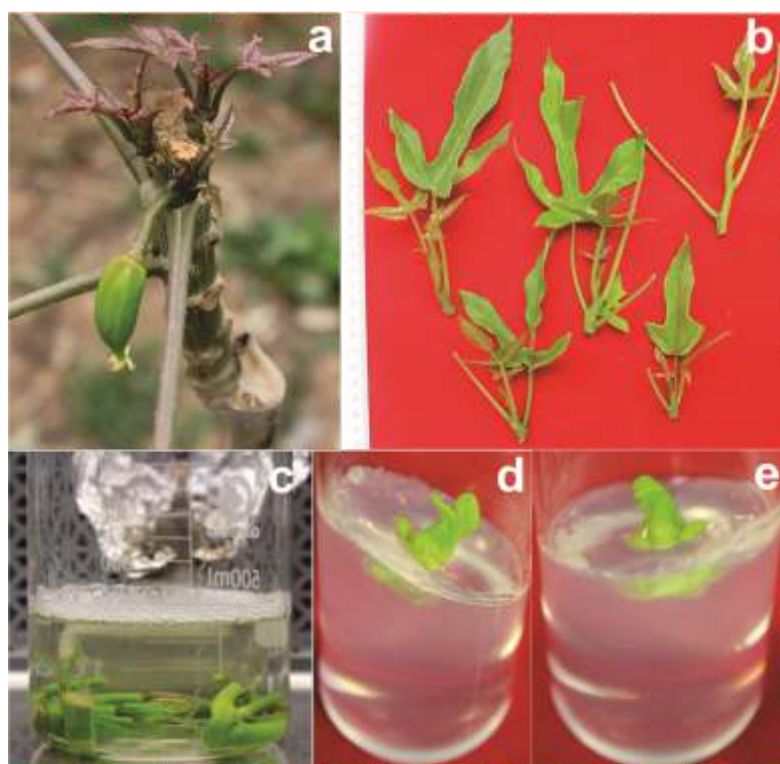
**Tabla 3.** Combinaciones de reguladores de crecimiento citocininas y giberelinas en los ensayos de propagación *in vitro* de *V. heilbornii*.

Tratamientos	Citocinina		Giberelina
	BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	AG3 (mg/L)
T1	0,05	---	0,1
T2	0,05	---	0,2
T3	0,05	---	0,4
T4	0,05	---	1,0
T5	---	0,05	1,0

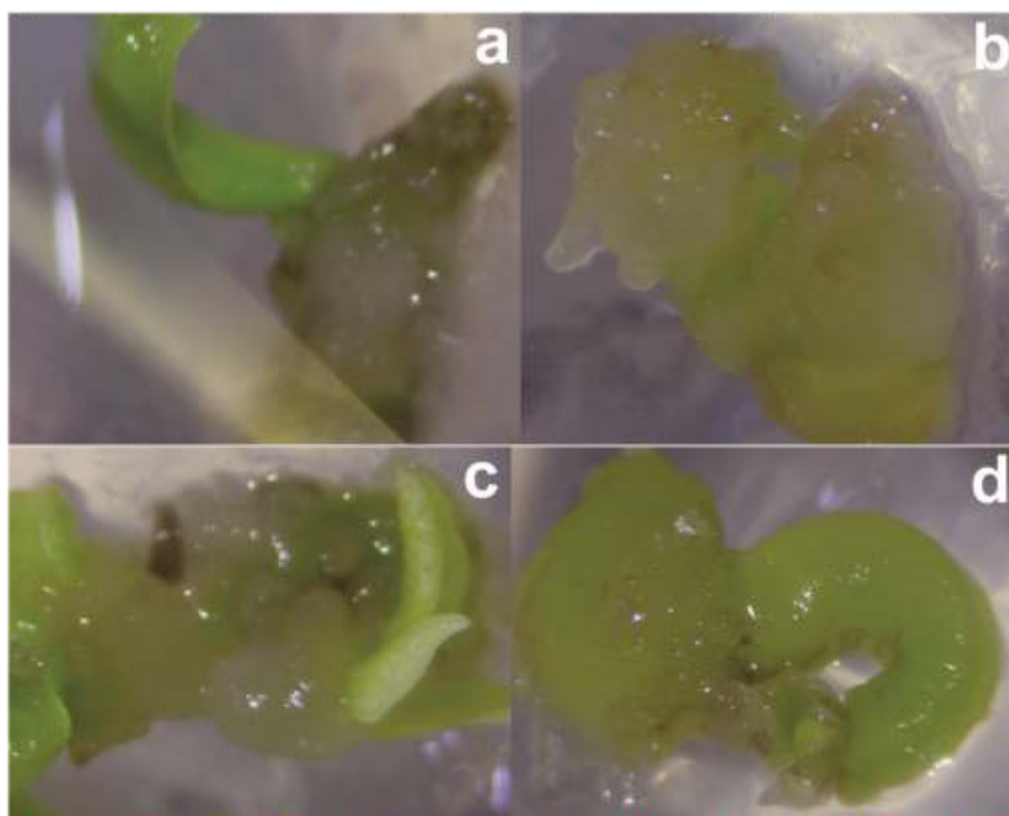
**Tabla 4.** Combinaciones de reguladores de crecimiento citocinina y auxina en los ensayos de propagación *in vitro* de *V. heilbornii*.

Tratamientos	Citocinina		Auxina
	BAP (mg/L)	2iP (mg/L)	AIA (mg/L)
T1	---	0,5	0,2
T2	---	1,0	0,2
T3	1,0	---	0,2
T4	2,0	---	0,2
T5	---	1,0	0,5
T6	---	2,0	0,5
T7	---	4,0	0,5
T8	---	8,0	0,5

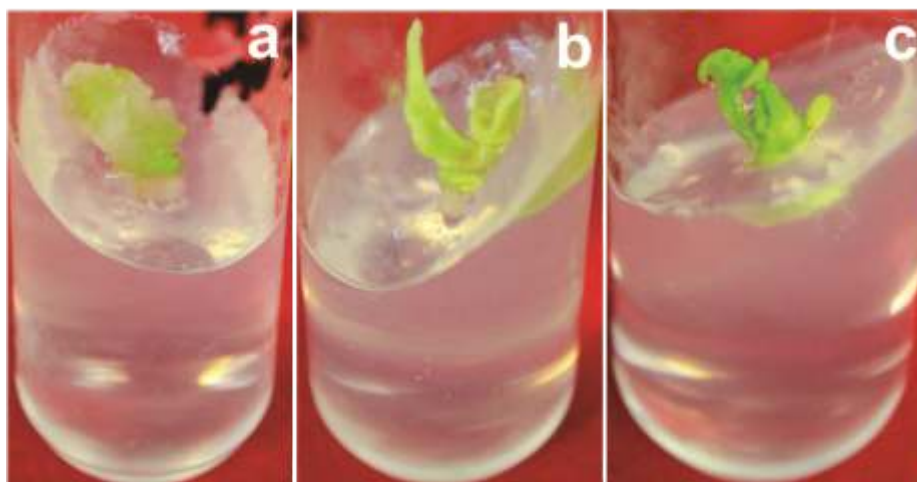




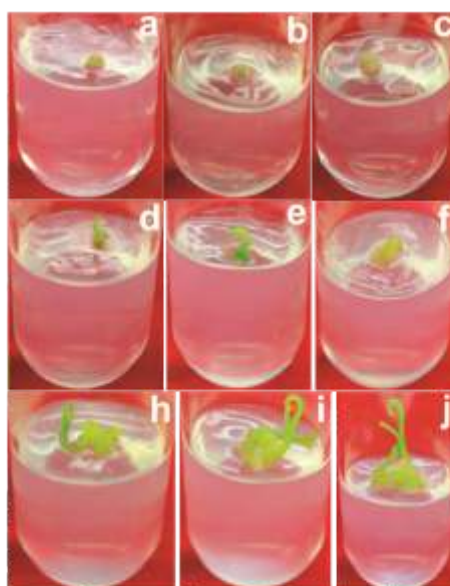
**Figura 1.** Establecimiento de yemas axilares de *V. x heilbornii*. a. Planta donadora de brotes. b. Secciones vegetativas de *V. x heilbornii*. c. Desinfección de secciones vegetativas. d y e. establecimiento in vitro de secciones vegetativas de *V. x heilbornii*.



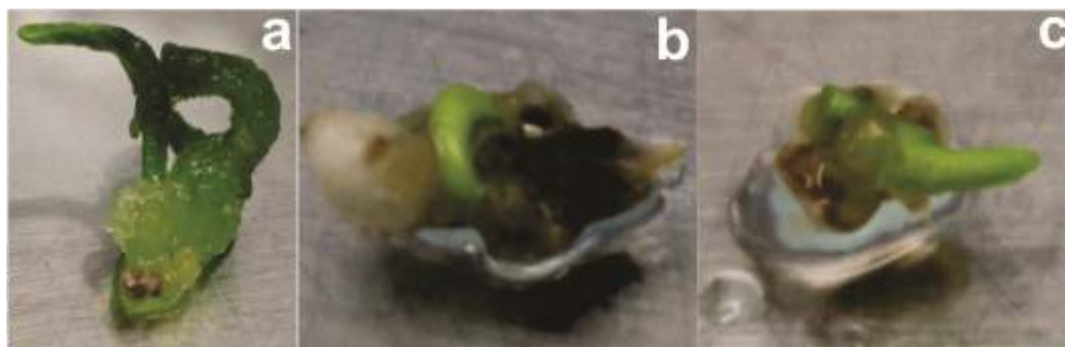
**Figura 2.** Ensayos de propagación in vitro de yemas axilares de *V. x heilbornii* empleando auxinas y citocininas. a. T1: 0,25 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BAP, b. T2: 0,50 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BAP, c. T3: 0,25 mg/L de AIA + 1,0 mg/L de BAP, d. T4: 0,50 mg/L de AIA + 1,0 mg/L de BAP.



**Figura 3.** Ensayos de propagación *in vitro* de yemas axilares de babaco empleando auxinas, citocininas y giberelinas. a. T1: 0,2 mg/L de AIA + 0,5 mg/L de BAP, b. T4: 0,10 mg/L de AIA + 0,25 mg/L de BAP, c. T5: 0,2 mg/L de AG3 + 0,2 mg/L de BAP.



**Figura 4.** Ensayos de propagación *in vitro* de yemas axilares de babaco empleando citocininas y giberelinas. a, b y c. T1: 0,03 mg/L de BAP + 0,1 mg/L de Ag3 (de izquierda a derecha: 14, 21 y 28 días de cultivo), d, e y f. T2: 0,03 mg/L de BAP + 0,2 mg/L de Ag3 (de izquierda a derecha: 14, 21 y 28 días de cultivo), g, h y i. T3: 0,05 mg/L de BAP + 0,4 mg/L de Ag3 (de izquierda a derecha: 14, 21 y 28 días de cultivo).



**Figura 5.** Ensayos de propagación *in vitro* de yemas axilares de babaco empleando auxinas y citocininas. a. T2: 0,2 mg/L de AIA + 1 mg/L de 2iP, b. T5: 0,5 mg/L de AIA + 1 mg/L de 2iP, c. T5: 0,5 mg/L de AIA + 2 mg/L de 2iP.