

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN PAPAYA CULTIVAR `MARADOL ROJA´: UNA ALTERNATIVA PARA LA PROPAGACIÓN Y EL MEJORAMIENTO GENÉTICO

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Cuba. CP 54830

AUTORES PRINCIPALES: Laisyn Posada Pérez (i), Rafael Gómez Kosky (i), Yenny Padrón Montesinos (i), Justo González Olmedo (ii), Romelio Rodríguez Sánchez (ii)

OTRAS ENTIDADES PARTICIPANTES:

(i) Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

(ii) Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila. Cuba

COLABORADORES: Maritza Reyes Vega, Alexis Rodríguez Concepción, Ortelio Hurtado Ribalta, Raúl Barbón Rodríguez, Luis Rojas Martínez, Milady León Quintana. Instituto de Biotecnología de las Plantas de la UCLV, Rene Carlos Rodríguez Escriba. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila Osvaldo Norman Montenegro. Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la UCLV Diosdada Gálvez Guerra. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT)

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Laisyn Tatiana Posada Pérez

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu", Villa Clara, Cuba. CP 54830

Teléfono: 053- 42281257 ext. 125

Fax: 053-42281329

E-mail: laisyn@ibp.co.cu

RESUMEN

En papaya la alta tasa de mortalidad de las plantas *in vitro* durante la aclimatización *ex vitro*, ocasionado por la baja capacidad de enraizamiento de las mismas, ha limitado la explotación de este sistema de regeneración de plantas en el cultivar elite `Maradol Roja´. Los estudios desarrollados no solo permiten disponer de una metodología de regeneración de plantas, vía embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos

inmaduros, sino que se logra una elevada supervivencia y una alta homogeneidad genética de las plantas regeneradas determinada por AFLP. Se demostró la expresión de los genes que codifican para el transporte polar de la auxina *AUX/LAX* y *PIN* en las diferentes etapas de la embriogénesis somática aspecto novedoso para este cultivo. Se informan además los primeros estudios del cultivo en condiciones fotoautotróficas en una fase que se considera crítica del cultivo *in vitro* de papaya, el enraizamiento. El empleo de los reguladores del crecimiento Pectimorf[®] y Floroglucinol, utilizando la zeolita como soporte, frascos de cultivo con incremento de la ventilación para el enraizamiento y la aclimatización *in vitro* y su efecto en la aclimatización *ex vitro* resultan novedosos y prometedores para hacer más eficientes los sistemas de regeneración *in vitro*. La incorporación de los sistemas de inmersión temporal tipo RITA[®] a la metodología desarrollada, garantizan la elevada eficiencia del sistema de embriogénesis somática establecido. Aunque en el mundo existen numerosos grupos investigando en esta problemática hasta la fecha no se han informado similares resultados en papaya y menos en este cultivar de tanto interés comercial.

COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO

La papaya (*Carica papaya* L.) es una planta con amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo y una de las principales frutas que se consumen a nivel mundial. El cultivar cubano `Maradol Roja` es altamente apreciado por sus atributos, que lo distinguen de otros cultivares de esta especie que se comercializan en el mundo. El uso de técnicas de cultivo *in vitro* constituye una alternativa esencial en esta especie, ya sea para producir un gran número de plantas (material vegetal de siembra de alta calidad), como para apoyar los programas de mejoramiento genético y la introducción a escala comercial de nuevos cultivares o híbridos. Establecer plantaciones de papaya uniformes, con 100% de plantas hermafroditas es un propósito de los productores de este importante frutal.

Metodología de regeneración de plantas 100% hermafroditas por embriogénesis somática en el cultivar cubano `Maradol Roja`

La alta tasa de mortalidad de las plantas *in vitro* durante la aclimatización *ex vitro*, ocasionado por el difícil enraizamiento de las mismas, ha limitado en el mundo la propagación de plantas tanto por organogénesis como embriogénesis somática (ES). En este trabajo se describe el desarrollo de una metodología de regeneración de plantas vía ES a partir de embriones cigóticos inmaduros, donde se logró una elevada supervivencia *ex vitro* y una alta homogeneidad genética de las plantas regeneradas. Son varios los trabajos que refieren la formación de callo en otros cultivares de papaya, previo a la formación de los embriones somáticos, a pesar de utilizar un tejido (embrión cigótico) con células predeterminadas embriogénicamente, como explante inicial, lo cual aumenta los riesgos de variabilidad genética en las plantas regeneradas. Por demás son muy escasos los informes

de obtención de multiplicación secundaria de los embriones somáticos primarios, como una fase clave, de la ES para obtener altos números de plantas. Además la germinación de los embriones somáticos es afectada por la hiperhidricidad y formación de callo en el sitio de formación de la radícula, lo que provoca que la germinación sea de forma parcial. La metodología desarrollada tiene como sustento estudios histológicos y de microscopía electrónica. La determinación del sexo en las plantas *in vitro* constituye una herramienta valiosa para incrementar la eficiencia del proceso de propagación. La incorporación de los sistemas de inmersión temporal tipo RITA[®] para la germinación de los embriones somáticos en la metodología desarrollada, garantizan una elevada eficiencia del sistema de ES establecido. Se demostró la expresión de los genes que codifican para el transporte polar de la auxina *AUX/LAX* y *PIN* en los embriones somáticos de papaya no informado hasta el momento en la literatura nacional e internacional. El estudio aportó información sobre el papel de los transportadores de auxinas involucrados en el desarrollo de los embriones somáticos en todas las etapas de la histodiferenciación del embrión somático. Se determinó que existe una menor o mayor expresión de la familia de los genes *PIN* y expresión de los *AUX/LAX* excepto el *LAX3* en los embriones somáticos en etapa globular. (**Biotecnología Vegetal 2015, 15 (1): 47-51; Biotecnología Vegetal 2009, 9 (1): 33-40; Biotecnología Vegetal 2009, 9 (2): 91-97; Biotecnología Vegetal 2007, 7 (3): 131-138**)

Micropropagación fotoautotrófica para el enraizamiento e incrementar los porcentajes de supervivencia en condiciones *ex vitro*

El uso de la micropropagación fotoautotrófica y la aclimatización *in vitro* se comenzó a desarrollar a nivel mundial en los primeros años del presente siglo. El cultivo fotoautotrófico presenta varias ventajas entre las que se destacan la estimulación del crecimiento y la fotosíntesis, altos porcentajes de supervivencia durante la transición *in vitro-ex vitro*, elimina los desórdenes fisiológicos y morfológicos de las plantas, evita la formación de callo en la base del explante incrementando el enraizamiento y poca pérdida por contaminación microbiana. En este trabajo se presentan los resultados en el cultivo *in vitro* de brotes de papaya, los cuales permitieron resolver las pérdidas de plantas durante la aclimatización *ex vitro* a partir de la implementación combinada del incremento de la ventilación en los frascos de cultivo empleando una lámina de papel de aluminio como tapa y la apertura de dos orificios en la misma, lo cual redujo la HR a 68-72% dentro del frasco de cultivo. Se incrementó la DFFF (48.0 y 62.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con el empleo de cámaras de cultivo con luz solar. Se aumentó dentro del frasco de cultivo la concentración de CO₂ a niveles normales del aire (350 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Todo esto unido al uso de la zeolita como soporte de las plantas *in vitro*, permitió acrecentar los niveles de fotosíntesis, eliminar los desórdenes morfo-fisiológicos, eliminar la formación del callo basal y lograr altos porcentajes de enraizamiento en combinación con la auxina (AIB) en el medio de cultivo. En la ES en específico, no se ha informado ningún resultado al respecto con el empleo del mineral zeolita como soporte de brotes *in vitro* y el uso de frasco de cultivo con incremento de la ventilación de la forma realizada en el presente

trabajo. Todo lo anterior permitió mejorar la calidad de las plantas obtenidas, lográndolo la aclimatización *in vitro* y aumentando los porcentajes de supervivencia en condiciones de aclimatización *ex vitro*. Se informan los primeros estudios del cultivo en condiciones fotoautotróficas en el país. (***African Journal of Biotechnology* 2015, 14 (35): 2622-2635**)

Nuevos reguladores del crecimiento (Pectimorf[®] y Floroglucinol) para incrementar el enraizamiento y lograr altos porcentajes de supervivencia

Se demostró el efecto positivo de ambos reguladores del crecimiento, actuando de forma sinérgica con la auxina AIB, en el medio de cultivo de enraizamiento empleando condiciones fotoautotróficas de cultivo. Para el caso del Pectimorf[®] (9 mg L⁻¹) combinado con 9.8 µM de AIB se alcanzó un enraizamiento del 84.2% a los 37 días de cultivo y un 76.2% de supervivencia *ex vitro*. Para el Floroglucinol la concentración de 79 µM más 9.8µM de AIB permitió obtener un 100% de enraizamiento en solo 27 días de cultivo y un alto porcentaje de supervivencia 96.5% en condiciones de aclimatización *ex vitro*. También este regulador del crecimiento mejoró los parámetros morfo-fisiológicos de las plantas obtenidas. Siendo los primeros informes del uso de estos nuevos reguladores del crecimiento en el cultivo *in vitro* de la papaya en la fase más crítica (enraizamiento). (***In Vitro Cell. Develop. Biol-Plant* 2016, 52 (2): 196-203; *Cultivos Tropicales* 2016, 37 (3):50-59**).

Novedad científica: Se logró una metodología de regeneración de plantas, vía ES en el cultivar cubano de papaya `Maradol Roja`, la caracterización morfo-anatómica de los embriones somáticos en las diferentes etapas de desarrollo ontogénico y una alta supervivencia en condiciones *ex vitro* de las plantas obtenidas. Además del empleo de la técnica de PCR para la determinación del sexo a partir de fragmentos de hojas de plantas *in vitro*, garantizando que sean plantadas en campo un 100% de plantas hermafroditas. Los estudios moleculares demuestran por primera vez la expresión de los genes que codifican para el transporte polar de auxinas *AUX/LAX* y *PIN* en las diferentes etapas de los embriones somáticos. Se informan los primeros estudios del cultivo en condiciones fotoautotróficas en el país, además del empleo de los reguladores del crecimiento (Pectimorf[®] y Floroglucinol) combinado con la zeolita como soporte, para el enraizamiento y la aclimatización *in vitro* y su efecto en la aclimatización *ex vitro*. Estos resultados no han sido descritos hasta el momento en la literatura nacional e internacional para este cultivar y especie.

Beneficios alcanzados: La formación de un callo en la base del embrión somático que impide el desarrollo de las raíces, provoca que los brotes *in vitro* tengan que ser llevados a un medio de cultivo de enraizamiento, donde al igual que en la organogénesis, se presentan bajos porcentajes de formación de raíces que provoca una alta mortalidad de las plantas durante la aclimatización *ex vitro*. El desarrollo de una metodología de regeneración de plantas vía ES como alternativa para el mejoramiento genético y la propagación de plantas que garantiza plantas 100% hermafroditas con una alta

supervivencia en las condiciones *ex vitro*, permitirá al productor contar con una semilla de alta calidad genética y fitosanitaria, además de reducir el número a plantar en el campo, a partir de la determinación del sexo en fase temprana. El descarte en el campo de las plantas de sexo no deseado trae como consecuencia un aumento en los costos de producción, se requiere una mayor cantidad de semillas (3 por punto de siembra), así como de insumos para el mantenimiento de las plantas hasta el momento de ser eliminadas. Por tanto reducir los costos, al facilitar la plantación de plantas hermafroditas constituye un aporte fundamental desde el punto de vista práctico. Además la sustitución del agar por la zeolita en la fase de enraizamiento, donde el gelificante representa entre 85-90% del costo del medio de cultivo. Si se tiene en cuenta que 1 kg de agar (Duchefa, Holanda) tiene un costo de 206.50 CUC contra 1 kg de zeolita (Tasajera, Villa Clara) por un costo de solo 0.02 CUC, constituye un ahorro de divisas y sustitución de importaciones. Lo anterior, unido con el no uso de sacarosa en el medio de cultivo, reduce también costos y además minimiza las pérdidas del proceso por la no contaminación microbiana. La introducción de sustancias biológicamente activas de producción nacional, como el Pectimorf® en la metodología de regeneración *in vitro* de plantas de papaya, constituye una alternativa para mejorar el enraizamiento *in vitro*, además de sustituir importaciones. Estos resultados pueden constituir una tecnología a utilizar en los laboratorios comerciales (Biofábricas) en Cuba y en el extranjero. Todos estos resultados tendrán un impacto a corto plazo sobre la propagación de esta importante especie para nuestro país y se establecen pautas para investigaciones futuras que permitan un conocimiento de los genes relacionados con el proceso de embriogénesis somática en papaya.

Publicaciones realizadas que guardan relación con el presente trabajo:

- 1.- **Posada-Pérez L**, Padrón YM, González JO, Barbón RR, Rodríguez RS, Norman OM, Rodríguez RCE, Daniels D, Gómez-Kosky R (2016) Effect of phloroglucinol on rooting and *in vitro* acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja). **In Vitro Cell. Develop. Biol-Plant** 52 (2): 196-203. **Factor de Impacto: 1.152**
- 2.- **Posada-Pérez L**, Padrón YM, González JO, Barbón RR, Rodríguez RS, Norman OM, Rodríguez RCE, Daniels D, Gómez-Kosky R (2016) Efecto del Pectimorf en el enraizamiento y la aclimatización *in vitro* de brotes de papaya (*Carica papaya* L.) cultivar Maradol Roja. **Cultivos Tropicales** 37 (3): 50-59
- 3.- **Posada-Pérez L**, Padrón YM, González JO, Barbón RR, Hurtado OR, Rodríguez RS, Norman OM, Rodríguez RCE, Daniels D, Gómez-Kosky R (2015) Effects of different culture conditions (photoautotrophic, photomixotrophic) and the auxin indole-butyric acid on the *in vitro* acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Red Maradol) plants using zeolite as support. **African Journal of Biotechnology** 14 (35): 2622-2635. **Factor de Impacto: 0.573**
- 4.- **Posada-Pérez L**, Gómez-Kosky R, León MR, Rojas LS, Padrón YM (2015) Identificación mediante PCR del sexo de plantas de *Carica papaya* L. variedad 'Maradol Roja' obtenidas vía embriogénesis somática. **Biología Vegetal** 15 (1): 47-51.
- 5.- **Posada-Pérez L**, Rodríguez AG, Gómez-Kosky R, Reyes VM, Tejeda MR (2009)

Influencia de la época del año y el tipo de frasco en la embriogénesis somática en papaya var. `Maradol roja`. **Biología Vegetal** 9 (1): 33-40. Grupo II

6.-Rodríguez AG, **Posada-Pérez L**, Gómez-Kosky R, Reyes VM, Tejeda MR (2009) Aclimatización de plantas de papaya var. `Maradol roja` obtenidas por embriogénesis somática. **Biología Vegetal** 9 (2): 91-97. Grupo II

7.-Posada-Pérez L, Gómez-Kosky R, Reyes VM (2007) Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. var. `Maradol Roja`. **Biología Vegetal** 7 (3): 131-138. Grupo II