

**Inducción de embriogénesis somática a partir  
de hojas cotiledonares de papaya  
(*Carica papaya* L.)**

**Jaime Arturo de León Nowell**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Inducción de embriogénesis somática a partir  
de hojas cotiledonares de papaya  
(*Carica papaya* L.)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agrónomo en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Jaime Arturo de León Nowell**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2018

## Inducción de embriogénesis somática a partir de hojas cotiledonares de papaya (*Carica papaya* L.)

Jaime Arturo De León Nowell

**Resumen.** La embriogénesis somática (ES) es una de las vías de regeneración de plantas que permite obtener gran cantidad de individuos genéticamente iguales. Los objetivos de este estudio fueron documentar el protocolo para la germinación e inducción a callogénesis de papaya *in vitro* y evaluar el efecto de fitohormonas y carbón activado (CA) en inducción a ES. Se utilizaron callos obtenidos de cotiledones en medio basal Murashige y Skoog (MS) suplementado con 12.5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D en total oscuridad durante 40 días, los cotiledones fueron obtenidos de semillas de papaya germinadas *in vitro* en medio MS. Los callos fueron transferidos a medio MS sin hormonas (1), MS + CA + clormecuat (2), MS + CCC (3) y MS + ácido naftaleneacético + kinetina (4); permanecieron en estos medios durante 40 días a 25°C, humedad relativa de 70%, 2000 lux con fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. El tratamiento con mayor cantidad de callo embriogénico fue el del medio 4, con alto potencial de formación de embriones somáticos. El tratamiento con mayor número de embriones somáticos fue el del medio 1, sin embargo, no presentaron diferencia significativa con los medios 3 y 4. El medio 2 induce rizogénesis. Se documentó un protocolo para germinación e inducción a callogénesis, y se obtuvieron embriones somáticos al día 50 a partir de callogénesis. Por lo que se recomienda utilizar primero el medio 4 y posteriormente cambiar los callos generados a medio sin hormonas.

**Palabras clave:** Callogénesis, clormecuat, cultivo *in vitro*, micropropagación, reguladores de crecimiento.

**Abstract.** Somatic embryogenesis (SE) is a process in which regeneration of plants allows to obtain a large number of individuals genetically the same. The objectives of this study were to document the protocol for germination and induction of papaya callogenesis *in vitro*, and to evaluate the effect of phytohormones and activated charcoal (AC) induction to SE. It was used callus tissues obtained from cotyledons in basal medium Murashige and Skoog (MS) supplemented with 12.5  $\mu\text{M}$  2,4-D kept in total darkness for 40 days, cotyledons were obtained from papaya seeds germinated *in vitro* on MS medium. The calluses tissues were transferred to MS medium without hormones (1), MS + AC + clormecuat (2), MS + CCC (3) and MS + naftaleneacetic acid + kinetin (4); were kept in these mediums for 40 days at 25°C, relative humidity of 70%, 2000 lux with photoperiod of 16 hours light/ 8 hours darkness. The treatment with the highest amount of embryogenic callus was on the medium 4, with high potential of somatic embryos formation. The treatment with the highest number of somatic embryos was in the medium 1, however, showed no significant difference with 3 and 4. Medium 2 induces rhizogenesis. It was documented a protocol for germination and induction to callogenesis, and obtained somatic embryos at day 50 from callogenesis. Therefore, it is recommended to first use the medium 4 and subsequently change the calluses generated in the mediums without hormones.

**Key words:** Callogenesis, chlormequat, growth regulators, *in vitro* culture, micropropagation.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexo.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>16</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>17</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>18</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>21</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXO

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para germinación de papaya ( <i>Carica papaya</i> L.).....	4
2. Porcentaje de callo embriogénico y friable formado en cotiledones de papaya en medio MS suplementado con reguladores de crecimiento y carbón activado.....	9
3. Porcentaje de callos con embriones somáticos de papaya en medio MS suplementado con reguladores de crecimiento y carbón activado.....	11

Figuras	Página
1. Material vegetal obtenido a partir de semillas de papaya germinadas <i>in vitro</i> .....	5
2. Escala para evaluación de callo embriogénico a partir de explantes cotiledonares de papaya.....	6
3. Escala presencia de embriones somáticos.....	6
4. Plántulas de papaya germinadas <i>in vitro</i> al día 30 de ser puestas en medio MS desprovisto de fitohormonas.....	8
5. Desarrollo de callo en hojas cotiledonares de papaya en medio MS con 2,4-D (12.5 $\mu$ M).....	9
6. Callo embriogénico y friable formado a partir de hojas cotiledonarias de papaya en medio basal MS sin hormonas a los 71 días de ser inducido a callo.....	10
7. Callos provenientes de hojas cotiledonarias de papaya en distintos medios de inducción a embriogénesis somática.....	11
8. Embriones somáticos en diferentes estadios provenientes de hojas cotiledonarias de papaya, a los 71 días de inducción a callogénesis en diferentes medios de inducción a embriogénesis somática.....	12
9. Callos obtenidos a partir de hojas cotiledonarias de papaya en medios de inducción a embriogénesis somática a los 30 días de ser refrescados en el medio..	13
10. Formación de raíces a partir de callo de hojas cotiledonarias de papaya en medio basal MS + carbón activado (15 g L <sup>-1</sup> ) + clormecuat (0.084 mL L <sup>-1</sup> ).....	13
11. Masa de embriones somáticos inmaduros, algunos en etapa globular en medio MS sin hormonas. Explante proveniente de cotiledones de papaya.....	14
12. Embriones somáticos de papaya ( <i>Carica papaya</i> L.) en las distintas etapas (globular, corazón, torpedo y cotiledonar).....	15

13. Masa de embriones somáticos asíncronos en las distintas etapas (globular, corazón, torpedo y cotiledonar) provenientes de callo embriogénico de hojas cotiledonares de papaya. 71 días a partir de inducción a callogénesis.....	15
--	----

Anexo	Página
-------	--------

1. Protocolo para germinación e inducción a callogénesis de cotiledones de papaya ( <i>Carica papaya</i> L.) <i>in vitro</i> .....	21
--	----

# 1. INTRODUCCIÓN

*Carica papaya* L. de la familia Caricaceae es un cultivo tropical polígamo, semi-leñoso y de semilla dicotiledónea, se cultiva a lo largo del trópico por su fruto. Este cultivo particularmente tiene tres diferentes formas de sexo basado en su composición floral, las cuales son masculinas, femeninas y hermafroditas (Jiménez *et al.* 2014). Dentro de los países productores de papaya encontramos en primer lugar a India con una producción de 5,699,000 toneladas de papaya, continuando con los países más productores de Latinoamérica: Brasil, México, Perú y Venezuela. Se estima una producción mundial de 13,050,749 toneladas (FAOSTAT Data 2016).

En papaya la micropropagación ha sido tomada con diversos tipos de explantes, como embriones cigóticos inmaduros (Fitch y Manshardt 1990), segmentos de tallos provenientes de vitroplantas (Colina *et al.* 2004), yemas apicales y meristemas apicales (Wu *et al.* 2012), cada tipo de tejido tiene sus ventajas y desventajas. Actualmente el sector productivo busca propagar plantas hermafroditas las cuales ofrecen un fruto con características deseables para el consumidor. Una de las principales ventajas de la propagación *in vitro* es la obtención de plantas libres de patógenos o eliminar enfermedades provenientes de campo en el laboratorio (Posada-Pérez *et al.* 2017).

La razón de propagar plantas previamente seleccionadas de papaya *in vitro* es debido a la creciente demanda mundial gracias a que es un fruto del cual se obtienen muchos beneficios, ya que es un producto alto en vitaminas A y C, usos medicinales y usos en la industria (Fuentes y Santamaría 2014). Mediante esta técnica obtenemos plantas más uniformes, mayor cantidad de plantas y una reducción de utilización de insumos al momento de la siembra, debido a que por postura tradicionalmente se trasplanta 2 o 3 plántulas (García 2010).

En la región de Latinoamérica y el Caribe recientemente ha aumentado la investigación para encontrar nuevos métodos y más eficientes de propagar este cultivo, estudios sobre callos o embriogénesis somática han sido descritos por: Yie y Liaw (1977); Arora y Singh (1978); Litz *et al.* (1983); Jordan y Velozo (1996); Rajeevan y Pandey (1983) y Anandan *et al.* (2012). Independientemente de los tejidos vegetales utilizados han obtenido resultados favorables.

El desarrollo de un protocolo a partir de semillas variedad Tainung germinadas *in vitro*, evaluando la respuesta en las etapas de inducción a embriogénesis y maduración de

embriones somáticos permiten abrir el paso para generar información para la producción *in vitro* de plantas de papaya.

La diversidad de compuestos en la actualidad como fitohormonas sintéticas y otros ingredientes permiten muchas vías para la regeneración de embriones, el uso de carbón activado, que actúa como un absorbente de compuestos polares como auxinas, citoquininas y fenoles (Thomas 2008) serán examinados en el estudio para comprobar capacidad de generar embriones somáticos a partir de tejido indiferenciado (callo).

Los objetivos de este estudio fueron:

- Documentar el protocolo para la germinación e inducción a callogénesis de papaya *in vitro*.
- Evaluar la inducción de embriogénesis somática a partir de cotiledones de papaya.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Localización del estudio.**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del departamento Ciencia y Producción Agropecuaria en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano ubicada en el departamento de Francisco Morazán, Honduras.

### **Fuente de material.**

Se obtuvieron semillas de papaya variedad Tainung para su germinación *in vitro* y de las germinadas se extrajo los cotiledones para la inducción de formación de callo y embriones somáticos.

### **Preparación y desinfección del material.**

El proceso de desinfección de las semillas inició con una limpieza de agentes contaminantes externos con un lavado de abundante agua y jabón suave. La desinfección se hizo a continuación con etanol al 70% durante 20 segundos, seguidamente de hipoclorito de sodio al 20%  $v/v$  (ingrediente activo 4.72%) y Tween<sup>®</sup> 80 (2 gotas/100 mL) durante 15 minutos en constante agitación.

### **Medio de cultivo para germinación de semillas de papaya.**

Para la germinación de semillas *in vitro* se utilizó las sales minerales de Murashige y Skoog (MS) (Cuadro 1) el pH se ajustó a 5.8 y se solidificó con Phytigel<sup>®</sup> (2.8 g L<sup>-1</sup>).

Cuadro 1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para germinación de papaya (*Carica papaya* L.).

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amonio	1650.000
	KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potasio	170.000
Microelementos	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico	6.200
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Etilendiaminotetraacético	50.000
		Inositol	100.000
Vitaminas		Tiamina	0.100
Carbohidratos		Sacarosa	30000.000

Fuente: (Teo y Chan 1994)

### Germinación *in vitro* de semillas de papaya.

En tubos de vidrio 150 × 25 mm con 10 mL de medio MS con sales completas, esterilizados durante 20 minutos a 121°C y 15 PSI, trabajando en cámara de flujo laminar se colocó una semilla por tubo, dejando la mitad de la semilla expuesta al medio y la otra mitad fuera del medio. Se incubaron durante 30 días a 25°C ± 0.5, humedad relativa de 65% y con fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad). A partir de estas semillas se obtuvieron las hojas cotiledonarias.

### Medio inducción (MI) a callogénesis.

Para la inducción a callogénesis se usó el medio basal MS (Cuadro 1) suplementado con ácido 2,4-diclorodifenoxiacético (2,4-D) (12.5 µM) el pH se ajustó a 5.7 y se solidificó con Phytigel® (1.8 g L<sup>-1</sup>).

### Subcultivo de hojas cotiledonarias en MI.

A los 30 días después de siembra, en cámara de flujo laminar se procedió a extraer las hojas cotiledonarias de cada plántula germinada. Los explantes se sembraron en platos Petri de 90 × 15 mm con 25 mL de MI y posteriormente fueron sellados con Parafilm®. Los explantes fueron incubados durante 30 días en total oscuridad a una temperatura de 27°C ± 0.5 y humedad relativa de 65% (Figura 1).

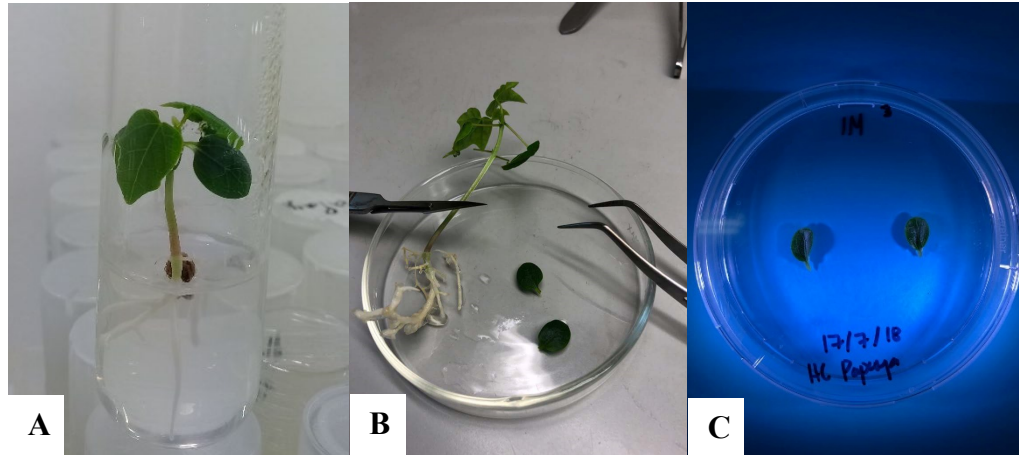


Figura 1. Material vegetal obtenido a partir de semillas de papaya germinadas *in vitro*. A. Plántula a los 30 días de siembra. B. Corte de hojas cotiledonarias bajo condiciones asépticas. C. Material vegetal en medio de inducción a callogénesis.

### Inducción de embriogénesis somática (ES).

**Subcultivo a callos en medios para inducción de ES.** La inducción a ES fue a partir de callos obtenidos de los explantes cotiledonares obtenidos del medio de inducción.

**Medios de cultivo.** Para la inducción de ES se utilizó el medio basal MS a 100% de sales suplementado con compuestos para determinar su efecto en la ES. Los tratamientos evaluados fueron:

1. Medio MS sin hormonas.
2. Medio MS + clormecuat (CCC) ( $0.084 \text{ mL L}^{-1}$ ) (Kochba *et al.* 1978).
3. Medio MS + carbón activado ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ) + CCC ( $0.084 \text{ mL L}^{-1}$ ) (Cipriano *et al.* 2018).
4. Medio MS + ácido naftalenacético (ANA) ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) + kinetina ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Chen *et al.* 1987).

Se utilizó Phytigel® ( $1.8 \text{ g L}^{-1}$ ) para solidificar los medios, se sirvieron aproximadamente 25 mL de medio por plato Petri y una vez colocados los callos se mantuvieron en el cuarto de crecimiento durante 30 días, a una temperatura de  $24^\circ\text{C} \pm 0.5$  y humedad relativa de 65%, con un fotoperiodo de 16 horas luz /8 horas oscuridad.

En cámara de flujo laminar se procedió a refrescar los medios a los 21 días en los cuales se encontraban los explantes, con la ayuda de pinzas estériles, se movieron a platos con medio fresco, esta actividad se realizó debido a que presentaban deshidratación y consecuentemente reducción de la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo (Utino *et al.* 2001).

### **Variables evaluadas.**

Se evaluó la formación de callo embriogénico y friable y la presencia de embriones somáticos en explantes utilizando escalas.

**Escalas.** Para la evaluación de los tratamientos descritos se creó una escala para medir el porcentaje de callo embriogénico en cada explante (Figura 2). Así mismo se creó una escala para determinar los explantes con embriones somáticos formados y los explantes que carecían de ellos (Figura 3).



Figura 2. Escala para evaluación de callo embriogénico a partir de explantes cotiledonares de papaya. A. 0% de formación de callo embriogénico (CEmb). B. 25% de formación de CEmb. C. 50% de formación de CEmb. D. 75% de formación de CEmb. E. 100% de formación de CEmb.

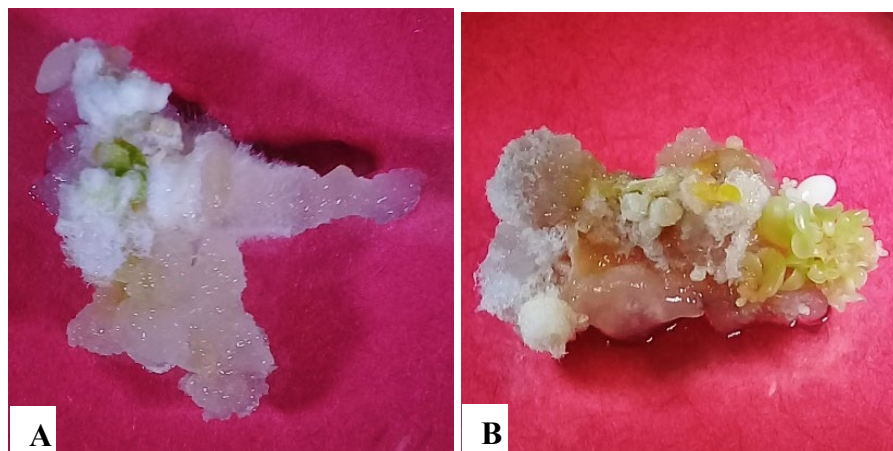


Figura 3. Escala presencia de embriones somáticos. A. Explante sin embriones somáticos. B. Explante con embriones somáticos.

**Diseño experimental.**

Se utilizó un diseño completo al azar. El experimento consistió en cuatro tratamientos con 11 platos Petri como repeticiones y cada plato constaba de 4 unidades observacionales, teniendo un total de 44 unidades observacionales por tratamiento.

**Análisis estadístico.**

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza, se realizó separación de medias con el método “LSD Fisher” con una probabilidad de ( $P < 0.05$ ). Se utilizó el programa “Statistix® 8.1.”

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Germinación de semillas de papaya.**

Al día 30 el 25% de las semillas germinaron (Figura 4), de estas se tomó las hojas cotiledonares para la generación de callo.

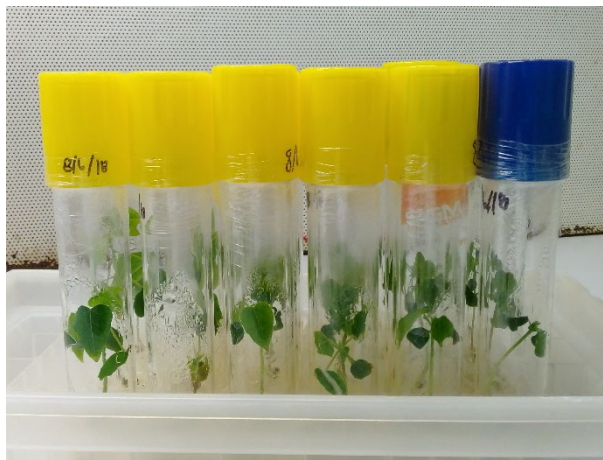


Figura 4. Plántulas de papaya germinadas *in vitro* al día 30 de ser puestas en medio MS desprovisto de fitohormonas.

#### **Inducción a formación de callo.**

A partir del día 10 de haber colocado los explantes en MI, las hojas comenzaron a tomar una textura arrugada y la formación de callo inició del peciolo, ésta es una zona de alto potencial de dediferenciación del tejido (Daquinta *et al.* 1997) posteriormente fue avanzando a la parte distal del explante. Para el día 14 todos los explantes ya tenían presencia de callo tanto embriogénico como friable (Figura 5). Al día 34 se observó un 97% de los explantes con callo. El tejido vegetal se mantuvo de color verde durante la etapa de callogénesis.

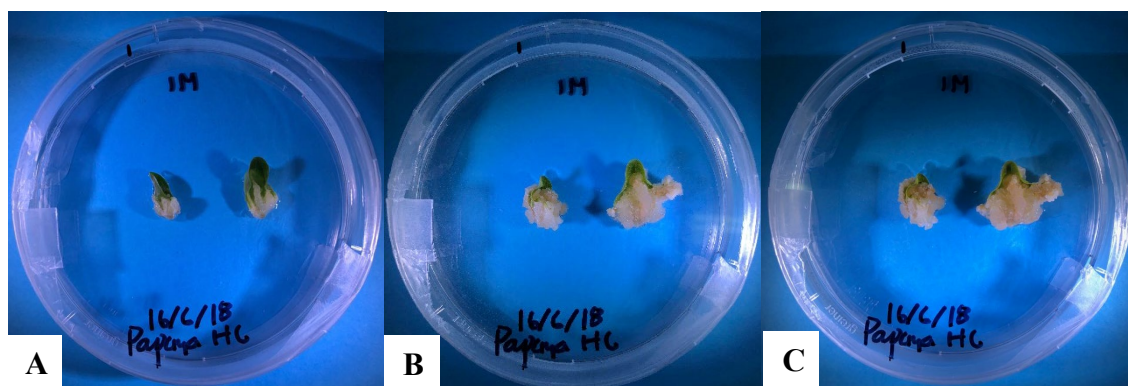


Figura 5. Desarrollo de callo en hojas cotiledonares de papaya en medio MS con 2,4-D (12.5  $\mu$ M). A. Día 14. B. Día 34. C. Día 40.

#### Inducción a embriogénesis somática.

Las hojas cotiledonares tienen alta capacidad de formación de callos con potencial embriogénico. Para la formación de embriones somáticos regularmente se utiliza ácido abscísico, una fitohormona producida naturalmente en las plantas (George *et al.* 2008), su uso en cultivo de tejidos es muy común para maduración de embriones somáticos (Cipriano *et al.* 2018), diversas fuentes indican que existen otros compuestos que se pueden utilizar para la formación de embriones somáticos (Kochba *et al.* 1978).

#### Evaluación de inducción a callo embriogénico.

El callo embriogénico es formado a partir del resultado del proceso de dediferenciar las células y de redireccionar estas para que formen embriones (George *et al.* 2008). En cuanto a la variable de porcentaje de callo embriogénico se observó que tanto el tratamiento de medio basal MS sin hormonas, medio MS + CCC y el medio MS + ANA + kinetina presentaron mejores resultados (Cuadro 2), por lo que el incremento de callo embriogénico no es dependiente de reguladores de crecimiento (Figura 6) previo a la inducción de ES.

Cuadro 2. Porcentaje de callo embriogénico y friable formado en cotiledones de papaya en medio MS suplementado con reguladores de crecimiento y carbón activado.

Tratamiento	Callo embriogénico (%)	Callo friable (%)
MS sin hormonas	59.09 ab	40.91 ab
MS + CA <sup>£</sup> (15 g L <sup>-1</sup> ) + CCC <sup>¥</sup> (0.084 mL L <sup>-1</sup> )	53.91 b	46.09 a
MS + CCC (0.084 mL L <sup>-1</sup> )	61.36 ab	38.77 ab
MS + ANA <sup>§</sup> (1 mg L <sup>-1</sup> ) + kinetina (0.5 mg L <sup>-1</sup> )	63.64 a	36.36 b

£= carbón activado. ¥= clormecuat. §= ácido naftalenacético.

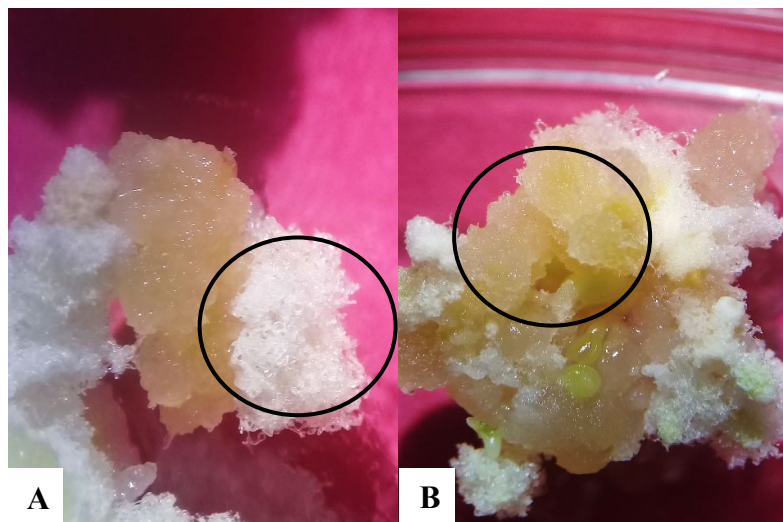


Figura 6. Callo embriogénico y friable formado a partir de hojas cotiledonarias de papaya en medio basal MS sin hormonas a los 71 días de ser inducido a callo. A. Callo friable. B. Callo embriogénico.

**Tratamiento basal MS sin hormonas.** Según George *et al.* (2008), al obtener callo previamente formado, se debe mover a un medio desprovisto de hormonas para que comience el proceso de maduración de embriones, el refrescar los explantes a este medio dio como resultado el mantenimiento de callo embriogénico, siendo una opción viable al momento de realizar el protocolo de inducción de embriogénesis somática.

**Tratamiento basal MS + carbón activado + CCC.** Este tratamiento fue el que menos callo embriogénico logró, obteniendo una diferencia significativa en relación al mejor tratamiento. Siendo el tratamiento con mayor número de explantes con menor porcentaje de callo embriogénico. El crecimiento de callo se detuvo y como consecuencia la formación de callo friable fue más notoria, además de la formación de órganos a partir del explante (Figura 7).

**Tratamiento medio basal MS + CCC.** La adición de un inhibidor de giberelinas para la maduración y formación de embriones somáticos dio resultados favorables, las masas de callo pre-embriogénicas se desarrollaron y el tejido embriogénico se mantuvo fresco durante el tiempo de evaluación.

**Tratamiento de medio basal MS + ANA + kinetina.** Para el análisis de medias se obtuvo que este fue el mejor medio para obtener mayor porcentaje de callo embriogénico a partir de cotiledones de papaya con una significancia  $P < 0.05$ . Este resultado concuerda con Chen *et al.* (1987) confirmado que la adición de una citoquinina a un medio con ANA aumentaba el crecimiento de callo (Figura 7).





Figura 7. Callos provenientes de hojas cotiledonarias de papaya en distintos medios de inducción a embriogénesis somática. A. Explante en medio MS + carbón activado ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ) + clormecuat ( $0.084 \text{ mL L}^{-1}$ ). B. Explante en medio MS + ácido naftalenácético ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) + kinetina ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ).

#### Evaluación de presencia de embriones somáticos.

A los 30 días de haber realizado el cambio de los callos a los tratamientos, se observaron embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo. En el medio MS sin hormonas se observó el mayor porcentaje de callos con embriones somáticos, y el medio MS+CA+CCC fue el que menor porcentaje obtuvo (Cuadro 3).

Cuadro 3: Porcentaje de callos con embriones somáticos de papaya en medio MS suplementado con reguladores de crecimiento y carbón activado.

Tratamiento	Presencia de embriones somáticos (%)
MS sin hormonas	23 a
MS + CA <sup>£</sup> ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ) + CCC <sup>¥</sup> ( $0.084 \text{ mL L}^{-1}$ )	7 b
MS + CCC ( $0.084 \text{ mL L}^{-1}$ )	21 ab
MS + ANA <sup>§</sup> ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) + kinetina ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ )	12 ab

£= carbón activado. ¥= clormecuat. §= ácido naftalenácético.

**Tratamiento MS sin reguladores de crecimiento.** Un mayor número de explantes con embriones somáticos se reportaron en el medio sin hormonas, con un 23% de explantes con embriones somáticos. Según George *et al.* (2008), pasar el callo embriogénico a medio desprovisto de hormonas propicia que se detenga la formación de callo y de paso a la formación de los embriones.

**Tratamiento MS + CA + CCC.** Dicho medio en comparación con el MS sin reguladores fue diferente, solamente tres explantes de 44 (7%) presentaron embriones somáticos y se inició la formación de órganos (principalmente raíces) a partir del callo.

**Tratamiento MS + CCC.** Según Kochba *et al.* (1978), una correcta adición de inhibidores de AG<sub>3</sub> indujo formación de ES en naranja. Para nuestro estudio con una dosis de 0.084 mL L<sup>-1</sup> se obtuvo una cantidad superior de embriones somáticos. Cabe resaltar que a los 20 días de haber movido los explantes al medio de inducción a embriogénesis somática se obtuvieron los primeros embriones somáticos. Confirmando que el clormecuat es una opción para inducir y madurar embriones, se necesita mejorar protocolos ya que se observó una respuesta positiva.

**Tratamiento MS + ANA + kinetina.** Según afirman George *et al.* (2008), un correcto balance de auxinas y citoquininas en el explante propicia la inducción de embriogénesis somática, este tratamiento fue el tercer tratamiento con menos callos con presencia de embriones.

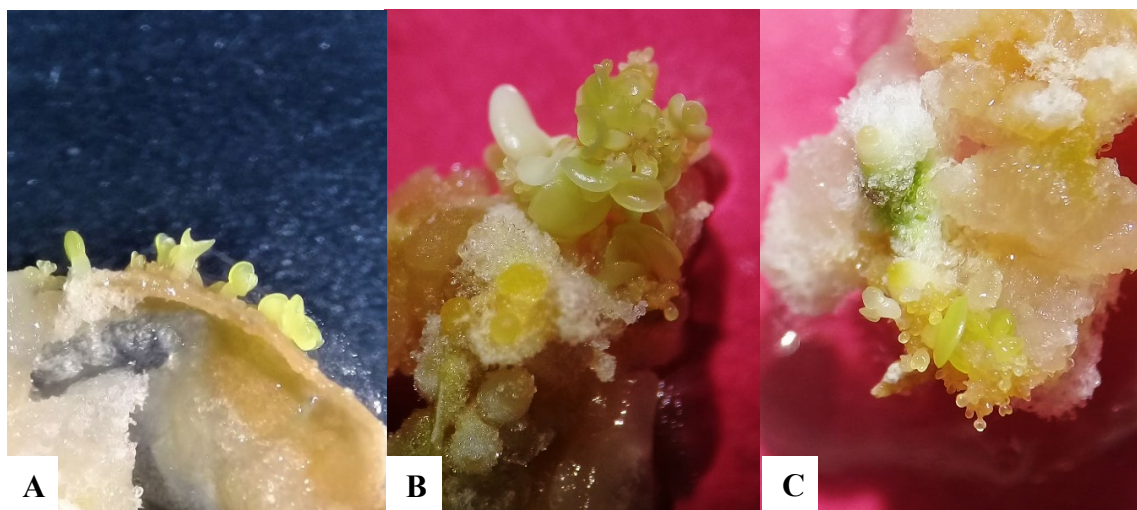


Figura 8: Embriones somáticos en diferentes estadios provenientes de hojas cotiledonarias de papaya, a los 71 días de inducción a callogénesis en diferentes medios de inducción a embriogénesis somática. A. Explante en medio basal MS sin hormonas. B. En medio basal MS suplementado con clormecuat (0.084 mL L<sup>-1</sup>). C. Explante en medio basal MS + ácido naftalenacético (1 mg L<sup>-1</sup>) + kinetina (0.5 mg L<sup>-1</sup>).

Durante el experimento se observó que los callos subcultivados en los medios y a los cuales se les fue removidas porciones de tejido no diferenciado no formaron embriones somáticos (Figura 9).

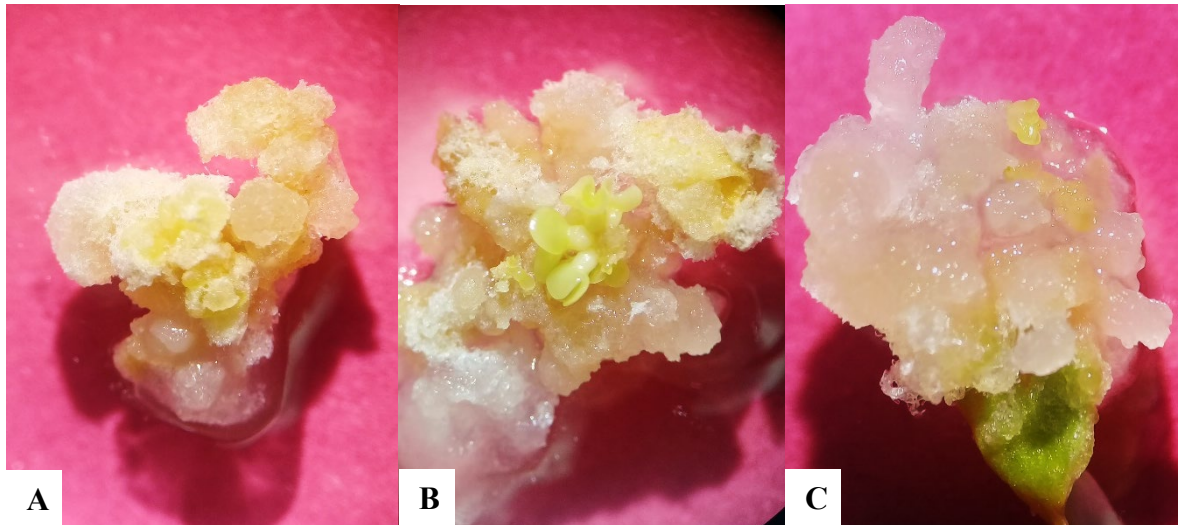


Figura 9. Callos obtenidos a partir de hojas cotiledonarias de papaya en medios de inducción a embriogénesis somática a los 30 días de ser refrescados en el medio. A. Callo sin porciones de tejido no diferenciado y sin embriones somáticos. B. Callo tejido vegetal amarillo y con embriones somáticos. C. Callo con tejido vegetal aún verde y con embriones somáticos.

Además, en los callos en el medio MS + CA + CCC a partir del día 11 después de moverse a los medios de inducción de embriogénesis somática, se comenzó a observar la formación de raíces. Esto se produjo debido a la adición de CA, que actúa como un absorbente de compuestos polares, removiendo las citoquininas endógenas del explante (Thomas 2008), estando el balance del lado de las auxinas en la relación: auxinas-citoquininas, en respuesta a esto se dio lugar a rizogénesis (Figura 10) estos resultados coinciden con los obtenidos por Drew *et al.* (1993).

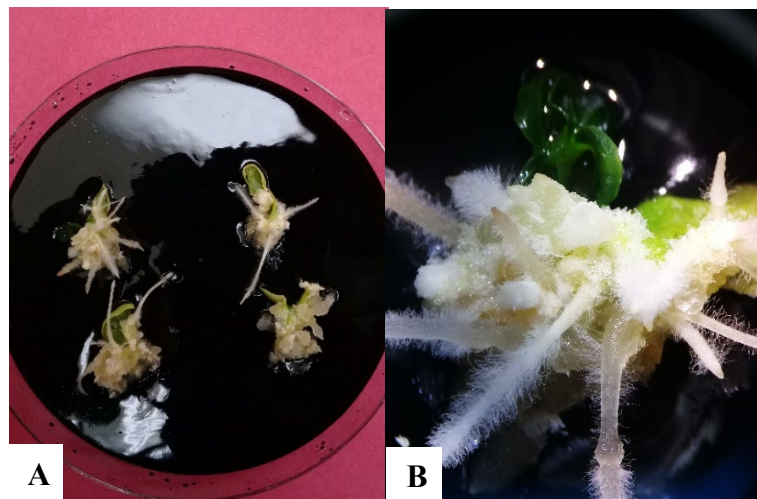


Figura 10: Formación de raíces a partir de callo de hojas cotiledonarias de papaya en medio basal MS + carbón activado ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ) + clormecuat ( $0.084 \text{ mL L}^{-1}$ ). A. Plato Petri con explantes de callo y formación de raíces. B. Alta formación de raíces en explante de callo.

Los medios de cultivo anteriormente descritos con excepción al medio MS + CA + CCC, son una vía favorable para la inducción a ES, todos los tratamientos presentaron formación de embriones somáticos (Figura 12), sin embargo, los tratamientos de medio MS + CCC y medio MS + ANA + Kinetina, presentaron una alta variabilidad en cuanto número de embriones por explante, se observaron callos con un embrión y callos con grupos de 50 o más embriones somáticos asíncronos (Figura 13). Es posible que los embriones se presentaron de manera asíncrona es decir iban desarrollándose en distintas etapas. Por razones como la disponibilidad de nutrientes, la facilidad de tomar nutrientes y la interacción de los embriones mismos según explica De Jong *et al.* (1992) sobre la asincrónica de embriones somáticos en zanahoria,



Figura 11. Masa de embriones somáticos inmaduros, algunos en etapa globular en medio MS sin hormonas. Explante proveniente de cotiledones de papaya. Barra = 2 mm.

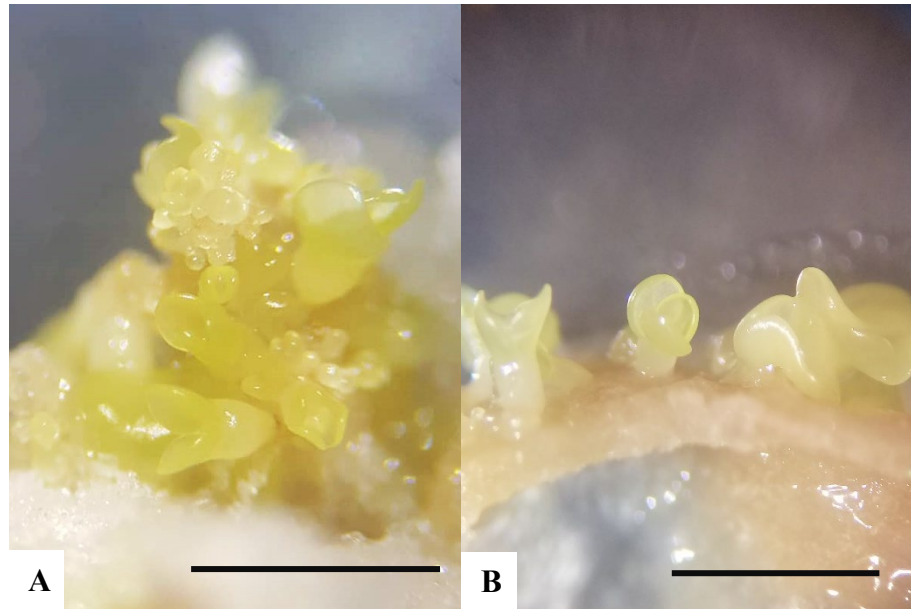


Figura 12. Embriones somáticos de papaya (*Carica papaya* L.) en las distintas etapas (globular, corazón, torpedo y cotiledonar). A. Masa de embriones somáticos asíncronos en medio MS + clormecuat ( $0.084 \text{ mL L}^{-1}$ ). B. Embriones somáticos en etapa cotiledonar en medio MS sin hormonas. Barra = 2 mm.

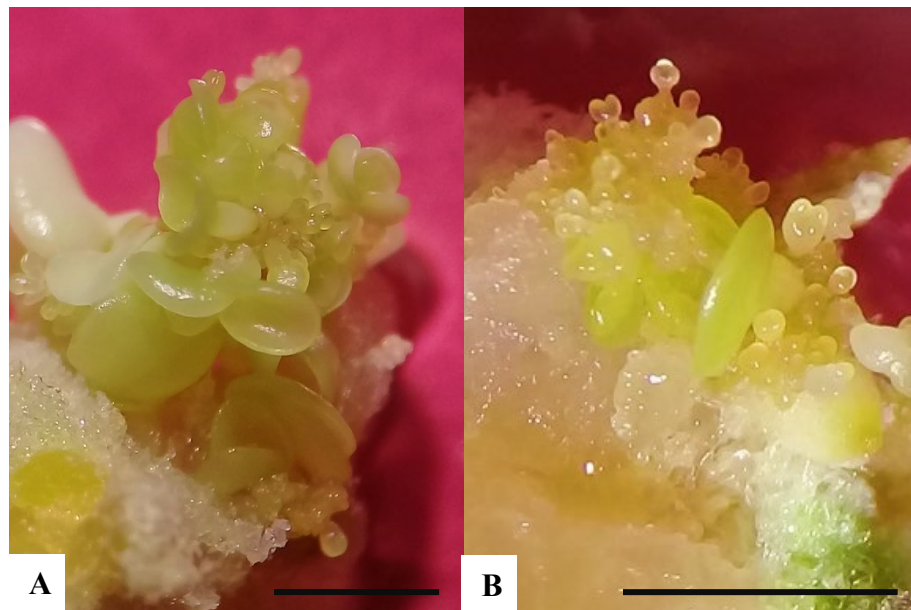


Figura 13. Masa de embriones somáticos asíncronos en las distintas etapas (globular, corazón, torpedo y cotiledonar) provenientes de callo embriogénico de hojas cotiledonares de papaya. 71 días a partir de inducción a calogénesis. A. Masa de embriones asíncronos en medio MS + clormecuat ( $0.084 \text{ mL L}^{-1}$ ). B. Masa de embriones somáticos asíncronos en medio MS + ácido naftalenacético ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) + kinetina ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Barra 5mm.

#### **4. CONCLUSIONES**

- Se logró documentar el protocolo para germinación e inducción a callogénesis de papaya *in vitro*.
- Se logró obtener embriones somáticos a partir de callos embriogénicos el medio MS basal sin fitohormonas y en los medios suplementados con CCC, ANA + kinetina.

## 5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el subcultivo del callo para incrementar su capacidad embriogénica y por lo tanto el número de embriones somáticos formados.
- Realizar pruebas para determinar el tiempo ideal en que los ES deben permanecer en el medio de inducción previo a su cambio a medio de maduración.
- Evaluar la germinación de embriones cigóticos inmaduros *in vitro* para obtener hojas cotiledonarias de papaya en menor tiempo.

## 6. LITERATURA CITADA

- Anandan R, Sudhakar D, Balasubramanian P, Gutiérrez-Mora A. 2012. *In vitro* somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. *Scientia Horticulturae*. 136:43–49. doi:10.1016/j.scienta.2012.01.003.
- Arora IK, Singh RN. 1978. Growth hormones and *in vitro* callus formation of papaya. *Scientia Horticulturae*. 8(4):357–361. doi:10.1016/0304-4238(78)90058-4.
- Chen MH, Wang PJ, Maeda E. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. *Plant Cell Rep*. 6(5):348–351. doi:10.1007/BF00269557.
- Cipriano JLD, Cruz ACF, Mancini KC, Schmildt ER, Lopes JC, Otoni WC, Alexandre RS. 2018. Somatic embryogenesis in *Carica papaya* as affected by auxins and explants, and morphoanatomical-related aspects. *An Acad Bras Cienc*. 90(1):385–400. doi:10.1590/0001-3765201820160252.
- Colina JG, Kosky RG, Fernández MT, Pérez LP, O'farril IH, Vega MR, Aguila LG, Seijo MF. 2004. 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). [consultado 2018 Jul 27]. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/429>.
- Daquinta MA, Cisneros A, Rodriguez Y, Escalona M, Pérez MC, Luna I, Borroto CG. 1997. Somatic embryogenesis in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Acta Horticulturae*.(425):251–258. doi:10.17660/ActaHortic.1997.425.28.
- De Jong AJ, Cordewener J, Lo Schiavo F, Terzi M, Vandekerckhove J, Van Kammen A, De Vries SC. 1992. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*. 4(4):425–433.
- Drew RA, McComb JA, Considine JA. 1993. Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya* L. *in vitro* in relation to auxin sensitive phases and use of riboflavin. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 33(1):1–7. doi:10.1007/BF01997591.



- FAOSTAT Data. 2016. FAOSTAT. [consultado 2018 Jun 27]. [Http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC](http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC).
- Fitch MMM, Manshardt RM. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell Reports*. 9(6):320–324. doi:10.1007/BF00232860.
- Fuentes G, Santamaría JM. 2014. Papaya (*Carica papaya* L.): Origin, Domestication, and Production. In: *Genetics and Genomics of Papaya*. Springer, New York, NY. (Plant Genetics and Genomics: Crops and Models). p. 3–15. [consultado 2018 Jul 27]. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-8087-7\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-8087-7_1).
- García M.. 2010. Guía Técnica del cultivo de la papaya [internet]. El Salvador: MAG CENTA FRUTALES. [consultado 2018 Jul 5]. <http://centa.gob.sv/docs/guias/frutales/GUIA%20CULTIVO%20PAPAYA.pdf>
- George EF, Hall MA, Klerk G-JD, editors. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*. 3rd ed. Springer Netherlands. [consultado 2018 Jul 27]. [//www.springer.com/la/book/9781402050046](http://www.springer.com/la/book/9781402050046).
- Jiménez VM, Mora-Newcomer E, Gutiérrez-Soto MV. 2014. Biology of the Papaya Plant. In: *Genetics and Genomics of Papaya*. Springer, New York, NY. (Plant Genetics and Genomics: Crops and Models). p. 17–33. [consultado 2018 Jul 27]. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-8087-7\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-8087-7_2).
- Jordan M, Velozo J. 1996. Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 44(3):189–194. doi:10.1007/BF00048523.
- Kochba J, Spiegel-Roy P, Neumann H, Saad S. 1978. Stimulation of embryogenesis in citrus ovular callus by ABA, ethephon, CCC and alar and its suppression by GA3. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 89(5):427–432. doi:10.1016/S0044-328X(78)80039-7.
- Litz RE, O’Hair SK, Conover RA. 1983. In vitro growth of *Carica papaya* L. cotyledons. *Scientia Horticulturae*. 19(3):287–293. doi:10.1016/0304-4238(83)90076-6.
- Posada-Pérez L, Montesinos YP, Guerra DG, Daniels D, Gómez-Kosky R. 2017. Complete germination of papaya (*Carica papaya* L. cv. ‘Maradol Roja’) somatic embryos using temporary immersion system type RITA® and phloroglucinol in semi-solid culture medium. *In Vitro CellDevBiol-Plant*. 53(5):505–513. doi:10.1007/s11627-017-9842-5.
- Rajeevan MS, Pandey RM. 1983. Propagation of papaya through tissue culture. *Acta Horticulturae*.(131):131–140. doi:10.17660/ActaHortic.1983.131.15.
- Teo CKH, Chan LK. 1994. The effects of agar content, nutrient concentration, genotype and light intensity on the in vitro rooting of papaya microcuttings. *Journal of Horticultural Science*. 69(2):267–273. doi:10.1080/14620316.1994.11516454.
- Thomas TD. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*. 26(6):618–631. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.08.003.
- Utino S, Carneiro IF, Chaves LJ. 2001. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa aab*) *in vitro*: iv. Concentrações de sais, ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 23(2):409–412. doi:10.1590/S0100-29452001000200042.

- Wu K, Zeng S, Chen Z, Duan J. 2012. *In vitro* mass propagation of hermaphroditic *Carica papaya* cv. Meizhonghong. :8.
- Yie S-T, Liaw SI. 1977. Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. *In Vitro*. 13(9):564–568. doi:10.1007/BF02627852.

## 7. ANEXO

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Laboratorio de Cultivo de Tejidos**

**Protocolo para germinación e inducción a callogénesis de cotiledones de papaya  
(*Carica papaya* L.) *in vitro***

**Elaborado por: Jaime Arturo De Leon Nowell**

### **Materiales**

- Semillas de papaya
- Etanol al 70%
- Cloro líquido comercial (4.72% de NaClO)
- Medio de Murashige y Skoog (MS) modificado para germinación de papaya. (Teo y Chan 1994).
- Beaker, gaza, probeta, agua destilada.

### **Procedimiento para germinación de semillas de papaya**

#### **Desinfección de semillas de papaya**

- Lavar las semillas en un beaker con abundante agua y jabón suave para remover partículas indeseadas.
- Colocar una gaza por encima del beaker para evitar el derrame de semillas.
- Agregar etanol al 70% al beaker con semillas y agitar por 20 segundos y remover
- Agregar una solución de hipoclorito de sodio al 20%  $v/v$  más Tween<sup>®</sup> 80 (2 gotas/100 mL), mantener en agitación durante 15 minutos (Figura 1) y remover dentro de la cámara de flujo laminar.
- Realizar un triple lavado con abundante agua destilada estéril previo a la siembra.

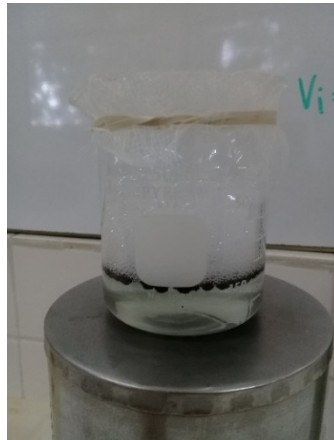


Figura 1. Semillas de papaya en solución de hipoclorito de sodio al 20% v/v.

### Medio para germinación de semillas

- Preparar medio basal de Murashige y Skoog modificado para germinación de papaya (Cuadro 1) sin hormonas.
- Ajustar el pH a 5.8 y solidificar el medio con Phytigel® (1.8 g L<sup>-1</sup>).
- En tubos de vidrio de 150 × 25 mm agregar 10 mL de medio y colocar el tapon.
- Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 15 PSI. Dejar enfriar.

Cuadro 2. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para germinación de papaya (*Carica papaya* L.).

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amonio	1650.000
	KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potasio	170.000
Microelementos	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico	6.200
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	Hierro	FeNa EDTA	Etilendiaminotetraacético
Inositol			100.000
Vitaminas		Tiamina	0.100
Carbohidratos		Sacarosa	30000.000

(Teo y Chan 1994)

### **Siembra en medio estéril**

- En cámara de flujo laminar proceder a colocar las semillas de papaya en los frascos con medio MS con pinzas estériles. Colocar la semilla dejando la mitad dentro del medio.
- Sellar con plástico e identificar (Figura 2).



Figura 2. Plántulas de papaya germinadas en frascos de vidrio con medio basal MS bajo condiciones de temperatura, humedad y luz controladas.

### **Condiciones de incubación**

- En cuarto de crecimiento a  $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ , humedad relativa de 65%, intensidad lumínica de 2,000 y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

### **Procedimiento inducción a callogénesis a partir de cotiledones de papaya.**

#### **Medio de inducción a callogénesis (MI)**

- Preparar medio basal MS (Cuadro 1) suplementado con  $2.76 \text{ mg L}^{-1}$  ( $12.5 \text{ } \mu\text{M}$ ) de 2,4-D.
- Ajustar el pH a 5.7 y solidificar el medio con Phytigel<sup>®</sup> ( $1.8 \text{ g L}^{-1}$ ).
- Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$  y 15 PSI en frascos Erlenmeyer, cuando el medio esté a temperatura entre  $60\text{-}70^{\circ}\text{C}$  servir en platos Petri de  $90 \times 15$  mm dentro de la cámara de flujo laminar y dejar enfriar.

### Subcultivo de cotiledones

- A los 30 días de la siembra en el medio para germinación, llevar las vitro plántulas a cámara de flujo laminar y con una pinza extraerlas de los tubos para cortar los cotiledones y sembrar cuatro hojas en cada plato Petri con MI.
- Sellar los platos con parafilm e identificarlos con el medio MI y fecha.

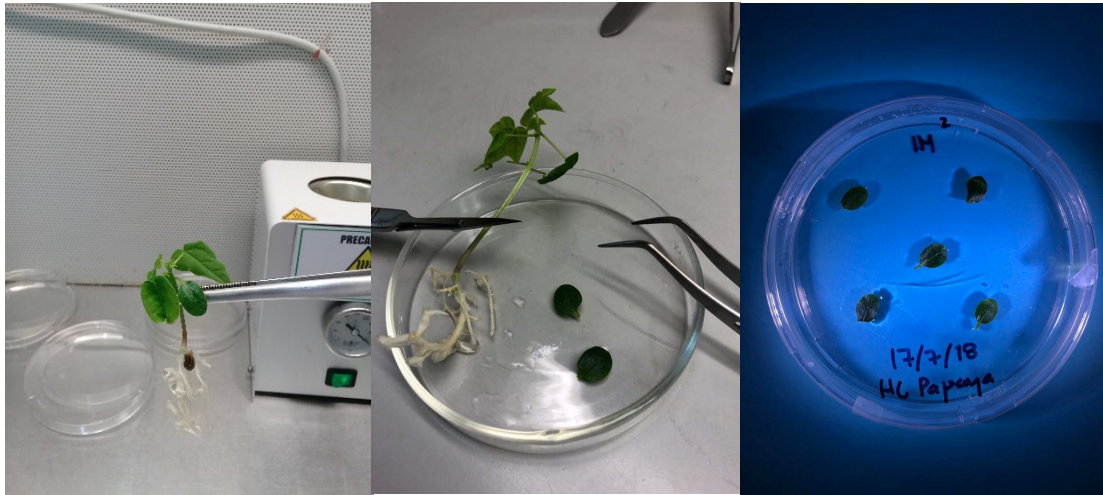


Figura 3. Proceso de subcultivo de cotiledones de papaya (*Carica papaya* L.) a medio de inducción a calogénesis suplementado con 2,4-D ( $12.5 \mu\text{M}$ ).

### Condiciones de crecimiento de callo

- Incubar durante 40 días en total oscuridad a  $27^\circ\text{C}$  y humedad de 65%.

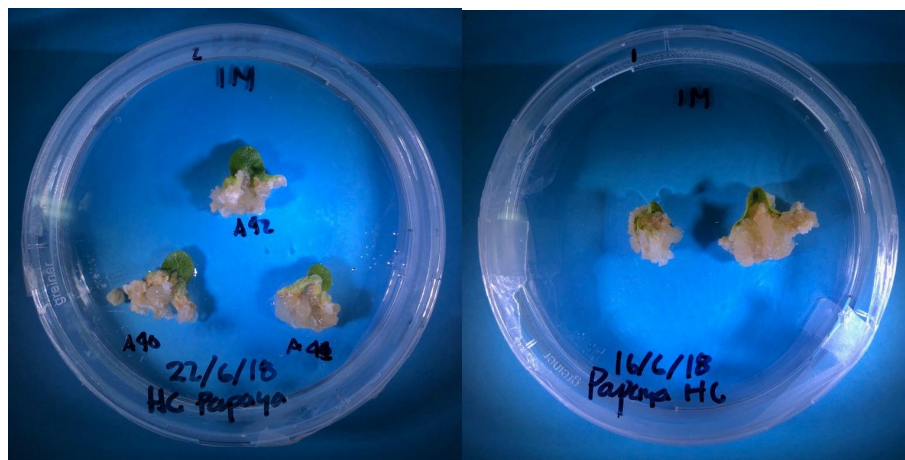


Figura 4. Formación de callo a partir de cotiledones de papaya en medio MS suplementado con 2,4-D ( $12.5 \mu\text{M}$ ).