

## INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN «PAPAYO» (*CARICA PAPAYA* LINNAEUS)

*Antonietta Gutiérrez-Rosati<sup>1</sup>*  
*Consuelo Jiménez*  
*Jean Yépez Maraví*

### RESUMEN

El objetivo principal del presente estudio es desarrollar un sistema de regeneración eficiente de plantas de papayo del cultivar PT-101-B, a través de embriogénesis somática.

Se utilizaron embriones de semillas de frutos de papayo. Los embriones cigóticos fueron sembrados en medio basal Murashige-Skoog a mitad de concentración, suplementado con sucrosa al 3% y gelrite al 0,3%. Se ensayaron concentraciones de 2, 5, 10 y 15 mg.l<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. El pH del medio fue ajustado a 5,8. Las placas permanecieron en oscuridad. Los callos embriogénicos fueron trasladados a medio basal Murashige-Skoog suplementado con 0,15 y 0,2 mg.l<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina más 0; 0,15 y 0,2 mg.l<sup>-1</sup> de Kinetina. El material experimental fue expuesto a una intensidad lumínica de 2500 a 3000 lux y un fotoperíodo de 12 horas luz.

Se comprobó que el medio de cultivo con 10 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-diclorofenoxiacético presenta la concentración apropiada para inducir la formación de callos embriogénicos, llegando a presentar un 90% de formación de callos embriogénicos. El medio de cultivo con 0,15 mg.l<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina fue suficiente para promover la germinación, el desarrollo y enraizamiento de los embriones somáticos.

**Palabras claves:** *Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 6-benzilaminopurina, callo embriogénico, cultivo de tejido, fitohormona.*

### SUMMARY

The primary target of this work is to develop a system of efficient regeneration of papaya plants of cultivar PT-101-B, through somatic embryogenesis. Embryos of seeds of papaya fruits were used. The zygotic embryos were placed on half concentration basal Murashige-Skoog media, supplemented with 3% sucrosa and 0.3% gelrite and concentrations of 2, 5, 10 and 15 mg.l<sup>-1</sup> of 2,4-diclorofenoxiacetic acid. The plates with the embryos were placed in the dark.

After the embryogenic callus were growth they were transferred to a basal Murashige-Skoog media supplemented with 0.15 and 0.2 mg.l<sup>-1</sup> of 6-benzilaminopurina and 0; 0,15 and 0.2 mg.l<sup>-1</sup> of Kinetina.

During all experiments the explants were growth at 2500 to 3000 lux and photoperiod of 12 hours light. It was verified that the culture media with 10 mg.l<sup>-1</sup> of 2,4-diclorofenoxiacetic acid was the appropriate media to induce the formation of embryogeni callus, obtaining 90% of embryogenic callus formation. The culture media with 0.15 mg.l<sup>-1</sup> of 6-benzilaminopurina were sufficient to promote the germination, development and rooting of the somatic embryos.

**Key words:** *2,4-diclorofenoxiacetic Acid, Embryogenic callus, tissue culture, phytohormone.*

#### Abreviaciones:

*BA : 6-benzilaminopurina, 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, IBA: ácido indolbutírico, MS:Medio Murashige-Skoog (BA : 6-benzilaminopurina, 2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético ácido, IBA: indolbutírico ácido, MS: Murashige-Skoog Media)*

<sup>1</sup> Universidad Nacional Agraria La Molina. P.O.Box 456 La Molina, Lima 12- Perú.  
E-mail: antonietta@lamolina.edu.pe

## INTRODUCCIÓN

El papayo, es un frutal semiperenne que empieza la producción de frutos al año de su siembra y mantiene la producción anualmente por ocho o diez años consecutivos, es debido a esta característica que lo convierte en un frutal de aceptación por los agricultores ya que permite un rápido retorno del capital. Pese a ser un cultivo adaptado y óptimo para el desarrollo de la agroindustria, en el Perú, su expansión se ve limitada por la falta de semilla mejorada que brinde alta producción y productividad. Adicionalmente otros factores como deficiencias en la fertilización del cultivo, falta de una adecuada política de comercialización y presencia de plagas y enfermedades, tales como el virus del mosaico del papayo (PMV) y el virus de la mancha anillada del papayo (PRV), se convierten en factores detrimentales de su óptima producción y productividad. El PRV ataca a las plantas de papayo que se encuentran en edad de producción no llegando éstas al segundo año de vida. Muchos de los países afectados por este virus, han emprendido campañas para la identificación de genotipos resistentes a este virus sin resultados positivos, por ello se han visto en la necesidad de incorporar a sus programas de mejoramiento la tecnología de transformación genética, habiendo logrado desarrollar plantas transgénicas de papayo resistentes al virus PRV. El éxito de esta tecnología consiste en tener a disposición una eficiente metodología de regeneración que asegure un buen número de plantas transformadas.

## MATERIALES Y METODOS

### Material vegetal

El presente estudio fue desarrollado utilizando semillas inmaduras de papayo de la variedad PT-101-B, variedad obtenida por el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), en su Centro de Investigación localizado en Tingo María, quienes proporcionaron el material vegetal.

## INTRODUCCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL A CONDICIONES *IN VITRO*

Se abrieron los frutos y se extrajeron las semillas inmaduras, las cuales fueron esterilizadas con una solución de hipoclorito

de sodio, se extrajeron el integumento interno y el endospermo, para luego proceder a la extracción y siembra de los embriones inmaduros.

### Inducción y desarrollo embriogénico.

Los embriones inmaduros extraídos, fueron sembrados en un medio de inducción embriogénica, el cual estuvo compuesto por: Medio MS básico a media concentración suplementado con 0, 4 mg. l de tiamina-HCl, 0,5 mg. l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,5 mg. l<sup>-1</sup> ácido nicotínico, 2,0 mg. l<sup>-1</sup> glicina, 0,4 mg.l<sup>-1</sup> glutamina, 3% sucrosa y 0,3% de gelrite como agente gelificante. Se ajustó el pH del medio a 5,8 previo al autoclavado. Luego de esterilizado el medio y cuando este alcanza una temperatura aproximada de 60°C se adicionó al medio de cultivo ácido 2,4-diclorofenoxiacético esterilizado por filtración. Se analizaron cuatro diferentes concentraciones de 2,4 -D (0, 2, 5, 10, 15 ppm), constituyéndose en los tratamientos para la inducción embriogénica. Los embriones así sembrados, se cultivaron en condiciones de oscuridad a 25°C, haciendo cambios mensuales del medio. Los callos en formación se observaron diariamente, y los datos de evaluación se registraron mensualmente a partir de la fecha de siembra.

### Crecimiento (germinación) de los embriones somáticos

Los embriones formados, se transfirieron a nuevos medios que permitiesen su crecimiento, para ello se analizaron diferentes medios, estando estos constituidos por: Medio MS básico suplementado con 0, 4 mg. l de tiamina-HCl, 0,5 mg. l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,5 mg. l<sup>-1</sup> ácido nicotínico, 2,0 mg. l<sup>-1</sup> glicina, 0,4 mg.l<sup>-1</sup> glutamina, BAP (0,15mg.l<sup>-1</sup> y 0,2 mg.l<sup>-1</sup>), kinetina (0,05 mg.l<sup>-1</sup> y 0,1 mg.l<sup>-1</sup>), se ajustó el pH del medio a 5,8 previo al autoclavado.. El material sembrado fue cultivado en cuarto aclimatado a una temperatura de 25°C, 12 horas de luz como fotoperíodo, siendo mantenidos en este medio hasta observarse la presencia de embriones en el material sembrado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Introducción del material vegetal a condiciones *in vitro*

De los diferentes tratamientos con concentraciones y tiempos de exposición a la solución esterilizadora de hipoclorito de

sodio, se encontró que el tratamiento de 25 minutos con una solución al 1 % resulta eficiente.

(El protocolo de desinfección de semillas de papayo de Litz y Conover es eficiente. Los embriones cigóticos de la variedad estudiada responden muy bien a esta técnica.)

Se observó que luego de ser extraídos los embriones de las coberturas seminales, deben ser estos sembrados de inmediato a fin de evitar su deshidratación y contaminación.

### Inducción y desarrollo embriogénico.

De los tratamientos estudiados en la fase inductiva, se encontró que el medio control (sin presencia de auxinas) favoreció la germinación de los embriones inmaduros sembrados y en el lapso de una semana se convirtieron éstos en plántulas.

Conforme el explante permanece en el medio inductor, se va formando el callo embriogénico, el cual empieza a proliferar a partir de los meristemos apical y radicular del embrión. Los callos embriogénicos se observan como células isodiamétricas de coloración amarilla y de consistencia frágil (Fotografía 1) que exudan un líquido claro y denso.



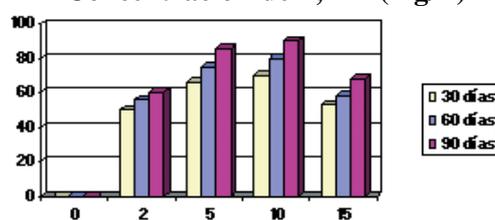
Foto 1 : Callo embriogénico

La cantidad de callo embriogénico se incrementa en el explante conforme este es transferido a medios frescos con la presencia de auxina, de esta forma se inducen a sucesivas fases embriogénicas (embriogenesis secundaria), así se pudo observar que al cabo de tres meses algunos de los tratamientos alcanzaron hasta un 80 u 85% de callos embriogénicos. Igualmente se observó que los callos embriogénicos inducidos durante la primera etapa de exposición a la auxina logran desarrollar hasta embriones maduros en la etapa en la cual la auxina desciende en su

concentración en el medio debido a consumo o pérdida de efectividad de la misma por el tiempo que esta se encuentra en el medio. De los tratamientos utilizados, se observó que el tratamiento con (10 ppm) de 2,4-D mostraba el nivel más alto de formación de callos embriogénicos así como embriones somáticos, por lo que se seleccionó a este tratamiento como el más eficiente a ser utilizado en futuros experimentos.

### Porcentaje de formación de callo embriogénico

Concentración de 2,4-D (mg/L)



Crecimiento (germinación) de embriones somáticos y análisis del proceso embriogénico.

De los tratamientos realizados a fin de observar el efecto de la Kinetina y el BAP en el crecimiento de los embriones somáticos encontramos que estos no prosperan cuando son seccionados individualmente para ser sembrados en los medios de crecimiento, pero si respondían a estos cuando eran trasladados conjuntamente con la masa de callo. Se pudo observar igualmente que la desecación del embrión antes de ser éste sembrado en el medio favorecía su crecimiento, mientras que aquellos no desecados se vitrificaban con facilidad. Otro aspecto observado en el estudio es la ocurrencia de abortos embrionarios en el estadio de torpedo, fusión de embrioides, formación de callos en la estructura embrionaria o embriones con cotiledones supernumerarios, hecho reportado también por Litz (Litz et al., 1982).

Los embriones somáticos fueron sembrados en los tratamientos, observándose el mayor porcentaje de germinación en el tratamiento que contiene 0.2 mg.l<sup>-1</sup> BAP (Foto 2). A medida que la concentración de BAP y kinetina aumentan, se incrementa la frecuencia de formación de plántulas con raíces callosas, y tallos con base callosas.



Foto 2: Embriones somáticos, explante tratado con 0.2 mg.l<sup>-1</sup> BAP

### Efecto del IBA y la Riboflavina en el enraizamiento de brotes

Los embrioides germinados y brotes formados fueron trasladados a medios de inducción de raíces conteniendo: medio básico MS (1962), suplementado con ácido indolbutírico y riboflavina (vitamina B2), 3% de sucrosa (tabla 3), ajustando a un pH de 5,8; los explantes fueron cultivados durante un mes a condiciones controladas de fotoperíodo y temperatura para inducir la formación de raíces. La riboflavina descompone el IBA en presencia de luz, evitando que la prolongada exposición al regulador induzca la formación de callos en la base de los tallos (Drew et al., 1993)

Los resultados del experimento de enraizamiento usando IBA y riboflavina mostraron que en realidad no existe una diferencia significativa entre ambos tratamientos. Las raíces formadas generalmente fueron de apariencia gruesas (Foto 3).



Foto 3:  
Desarrollo  
de plántulas

### LITERATURA CITADA

- CABRERA-PONCE JL, VEGAS-GARCÍA A y HERRERA-ESTRELLA L 1995. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports*. 15: 1-7.
- DANDEKAR, A.M. 1992. Biotechnology of Perennial Fruit Crops. *C.A.B. International* pp. 141-168.
- 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, Tissue and Organ Culture*. 33: 1-7.
- FITCH, M.M. 1993. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 205-212.
- FRANCIOSI, R. 1992. *El Cultivo del papayo en el Perú*. Manual. Fundación para el Desarrollo del Agro ( Fundeagro ). Lima, Perú.
- JIMENEZ, C. 1999. Inducción de Embriogénesis Somática en Papaya (*Carica papaya* L.) cv. PT-101-B. Tesis de la Universidad Nacional Agraria La Molina Lima-Perú.
- LITZ R E y CONOVER R A 1982. High frequency somatic embryogenesis from *Carica* cell suspension cultures. *Annals of Botany*. London. 51: 683-686
- LITZ, R.E. 1986 . *Papaya.: Handbook of Plant Cell Culture*. Evans, D. E. , W.R. Sharp, P. V. Ammirato. 3: 349-368. Macmillan Publishing Company, New York.
- MERKLE S A, PARROTT W A y FLINN B S 1995. Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. In *In vitro Embryogenesis in Plants* 155-203 pp. Thorpe Trevor A. (ed). Netherlands.
- MONMARSON, S., MICHAUX-FERRIERE, N. y TEISSON, C. 1995. Production of high- frequency embryogenic calli from integuments of immature seeds of *Carica papaya*, L. *Journal of Horticultural Science* 70 (1) 57-64.
- MURASHIGE T y SKOOG F 1962. A revised medium for growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture. *Physiology Plant*. 15: 431-497.
- OLIVEIRA, M. 1996. Transformation studies in woody fruit species. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. June 1996. 2 (2)
- PANG, S.Z. y SANFORD, J.C. 1988. *Agrobacterium*-mediated Gene Transfer in Papaya. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113(2):287-291.
- PICKARDT, T.; MEIXNER, M.; SCHADE, V. y SCHIEDER, O. 1991 Transformation of *Vicia narborensis* via *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Reports*. 9: 535-538.
- SUKSA-ARD, P.; KATAOKA, I.; y FUJIME, Y. 1997. Effect of temperature, growth retardants and osmotic potential on growth papaya shoots conserved *in vitro*. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*. 41(1): 7-13.