

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



**“Inducción de Embriogénesis somática en tejidos foliares obtenidos de plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) *in vitro* 100% hermafroditas”**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
PRESENTA  
MARTHA CORNEJO RODRÍGUEZ**

**Las Agujas, Zapopan, Jal., Abril del 2009**



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología*

1409/ C. C. BIOLOGÍA

C. MARTHA CORNEJO RODRIGUEZ

PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes** opción **Tesis** con el título : **“Inducción de Embriogénesis somática en tejidos foliares obtenidos de plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) in vitro 100% hermafroditas”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo la **Dr. Jorge Santamaría Fernández** y como asesores a el **M.C. Rafael Soltero Quintana** y **M.C. Carlos Talavera May**.

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE

“PIENSA Y TRABAJA”

Las Agujas, Zapopan., 25 de noviembre del 2008.

DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLÓGIA

M en C. GLORIA PARADA BARRERA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

- M.C. Liberato Portillo Martínez.- Sinodal Titular
- Dr. Carlos Ramírez Serrano.-Sinodal Titular
- Dr. Alejandro Muñoz Urias.- Sinodal Titular
- M.C. Fernando Santacruz Ruvalcaba.- Sinodal Suplente

**PRESENTE.-**

Por medio de la presente comunicamos a usted que ha sido designado como **SINODAL**, para el trabajo de titulación: **"Inducción de Embriogénesis somática en tejidos foliares obtenidos de plántulas de papaya *in vitro* (*Carica papaya* L.) 100% hermafroditas "** elaborado por la alumna Martha Cornejo Rodríguez con la modalidad: Tesis e Informes opción: Tesis

Recuerde que como sinodal, se espera de usted aportaciones para mejorar el trabajo y le corresponde a usted evaluar y en su caso aprobar el presente proyecto, para lo cual le suplicamos no exceder de 8 días hábiles.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. 27 de octubre de 2008

**DR FCO. MARTÍN HUERTA MARTINEZ**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**M.C. GLORIA PARADA BARRERA**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

Recibi  
 Dr. Muñoz Urias  
 20v-2008

Recibi  
 Gilberto Parilla  
 13. nov. 2008  
 Helado Pozuelo

Recibi  
 13.01.08  
 Carlos Ramírez

Recibi  
 13.11.08

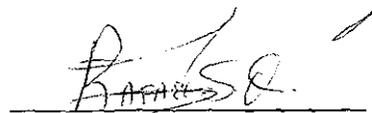
Dr. FCO. Martín Huerta Martínez,  
Presidente del Comité de Titulación.  
Licenciatura en Biología.  
CUCBA.  
Presente

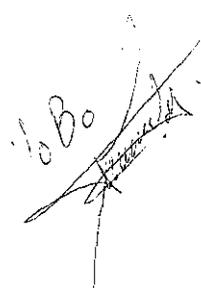
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **Tesis e informes**, opción **Tesis** con el título: **"Inducción de Embriogénesis somática en tejidos foliares obtenidos de plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) in vitro 100% hermafroditas"** que realizó la pasante **MARTHA CORNEJO RODRÍGUEZ** con número de código **301169009** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

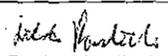
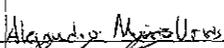
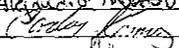
Atentamente  
Las Agujas, Zapopan, Jal., 03 de Abril de 2009

  
\_\_\_\_\_  
DIRECTOR  
DR. JORGE SANTAMARÍA  
FERNÁNDEZ

  
\_\_\_\_\_  
ASESOR  
M.C. RAFAEL SOLTERO QUINTANA



  
\_\_\_\_\_  
ASESOR  
M.C. CARLOS TALAVERA MAY

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
M.C. Liberato Portillo Martínez Presidente		03.04.09
Dr. Alejandro Muñoz Urias Secretario		03.04.09
Dr. Carlos Ramírez Serrano Vocal		03.04.09
M.C. Fernando Santacruz Ruvalcaba Suplente		3/04/09

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres Alfonso Cornejo Rosales y Martha H. Rodríguez Aguilar por su amor y apoyo incondicional y por impulsarme cada día a ser mejor.

A mis hermanos Erika y Alfonso por su apoyo y amor.

A Dios por su inmenso amor, por estar siempre a mi lado, por brindarme fuerza y por darme todo lo maravilloso que tengo como lo son mi familia y amigos.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., en la Unidad de Biotecnología, donde se llevó a cabo el presente trabajo haciendo uso de sus instalaciones y equipos.

Al Dr. Jorge Santamaría Fernández por su apoyo y asesoría para la realización de mi tesis.

Al M. C. Rafael Soltero Quintana por su apoyo, consejos, cariño y paciencia, no sólo en la realización de mi tesis sino en gran parte de mi carrera.

Al M.C. Carlos Talavera May y al M. C. Francisco Espadas y Gil por su asesoría, paciencia, apoyo y amistad durante mi tesis.

A Gerardo, Stephany, Katia, Julio, Yaye, Mariana y Ale por su amistad incondicional, apoyo, cariño y sobre todo por enseñarme que no debes ver atrás siempre adelante y a ser feliz.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE</b>	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	iii
<b>LISTA DE CUADROS</b>	iv
<b>ABREVIATURAS</b>	vi
<b>RESUMEN .</b>	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	5
2.1. Descripción botánica y otros aspectos de <i>Carica papaya</i> L.	5
2.2. Métodos para la propagación de plantas	6
2.2.1. Reproducción sexual	6
2.2.2. Reproducción asexual o vegetativa	7
2.3. Cultivo de tejidos vegetales	7
2.3.1. Auxinas	8
2.3.2. Citocininas	9
2.4. Factores que intervienen en la morfogénesis <i>in vitro</i>	12
2.4.1. Factores físicos	13
2.4.2. Factores químicos	13
2.5. Embriogénesis somática en papaya	14
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	18
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	19
<b>5. HIPÓTESIS</b>	20
<b>6. OBJETIVOS</b>	21
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
7.1. Lugar del experimento	22
7.2. Material vegetal	22

7.3. Descripción de experimentos	22
7.3.1. Fase de inducción de callos	22
7.3.2. Fase de inducción de embriones	23
7.3.3. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	24
7.3.4. Fase de maduración de embriones	25
7.3.5. Análisis estadístico	25
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>26</b>
8.1. Fase de inducción de callos	26
8.1.1. Experimento 1 (ANA y 6BAP)	26
8.1.2. Experimento 2 (Picloram y 6BAP)	27
8.1.3. Experimento 3 (2,4-D y 6BAP)	28
8.1.4. Experimento 4 (2,4,5-T y 6BAP)	29
8.2. Fase de inducción de embriones	31
8.2.1. Experimento 1 (ANA y 6BAP)	31
8.2.2. Experimento 2 (Picloram y 6BAP)	32
8.2.3. Experimento 3 (2,4-D y 6BAP)	32
8.2.4. Experimento 4 (2,4,5-T y 6BAP)	32
8.3. Microscopía Electrónica de Barrido	34
8.4. Fase de maduración de embriones	35
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>36</b>
<b>10. LITERATURA CITADA</b>	<b>37</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Flor hermafrodita y fruto tipo <i>elongata</i> de <i>Carica papaya</i> L.	3
<b>Figura 2.</b> Flor femenina y fruto redondo de <i>Carica papaya</i> L.	3
<b>Figura 3.</b> Diferencias en la respuesta entre los tratamientos de callogénesis con AÑA y 6BAP,	27
<b>Figura 4.</b> Efecto de las auxinas 2,4,5-T y 6BAP en la callogénesis	31
<b>Figura 5.</b> Microscopía electrónica de callos de <i>Carica papaya</i> L. provenientes del pretratamiento con 2,4,5-T.	34

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Características de los tipos florales en el cultivar Maradol (Tomado de Salazar, 1999).	2
<b>Cuadro 2.</b> Estudios realizados sobre embriogénesis somática en <i>Carica papaya</i> L.	16
<b>Cuadro 3.</b> Factorial para la inducción de callos en <i>Carica papaya</i> L.	23
<b>Cuadro 4.</b> Factorial para la inducción de embriogénesis somática en <i>Carica papaya</i> L.	24
<b>Cuadro 5.</b> Abundancia de callo en tejidos foliares de <i>Carica papaya</i> L. a los 45 d de cultivo con la citocinina 6BAP.	26
<b>Cuadro 6.</b> Abundancia de callo en tejidos foliares de <i>Carica papaya</i> L. a los 45 d de cultivo con la auxina ANA.	26
<b>Cuadro 7.</b> Abundancia de callo en tejidos foliares de <i>Carica papaya</i> L. a los 45 d de cultivo con la citocinina 6BAP en el experimento 2.	28
<b>Cuadro 8.</b> Abundancia de callo en tejidos foliares de <i>Carica papaya</i> L. a los 45 d de cultivo con la auxina Picloram.	28

<b>Cuadro 9.</b> Abundancia de callo en tejidos foliares de <i>Carica papaya</i> L. a los 45 d de cultivo con la citocinina 6BAP en el experimento 3.	29
<b>Cuadro 10.</b> Abundancia de callo en tejidos foliares de <i>Carica papaya</i> L. a los 45 d de cultivo con la auxina 2,4-D.	29
<b>Cuadro 11.</b> Abundancia de callo en tejidos foliares de <i>Carica papaya</i> L. a los 45 d de cultivo con la citocinina 6BAP en el experimento 4.	30
<b>Cuadro 12.</b> Abundancia de callo en tejidos foliares de <i>Carica papaya</i> L. a los 45 d de cultivo con la auxina 2,4,5-T.	30
<b>Cuadro 13.</b> Inducción de embriones en tejidos foliares de <i>Carica papaya</i> L. a las cuatro semanas de cultivo con la auxina 2,4,5-T.	33

## ABREVIATURAS

<b>6BAP</b>	6 Bencilaminopurina
<b>2,4-D</b>	Ácido 2, 4- diclofenoxiacético
<b>2,4,5-T</b>	Ácido 2, 4, 5- triclofenoxiacético
<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>CO<sup>2</sup></b>	Dióxido de carbono
<b>CPA</b>	Ácido clorofenoxiacético
<b>AIA</b>	Ácido indolacético
<b>ANA</b>	Ácido naftalenacético
<b>IEDS</b>	Células determinadas embriogénicamente inducidas
<b>PEDC</b>	Células determinadas pre-embriogénicas
<b>KIN</b>	Cinetina
<b>ES</b>	Embriogénesis somática
<b>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub></b>	Etileno
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>MEB</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>MS</b>	Murashige y Skoog
<b>O<sup>2</sup></b>	Oxígeno
<b>Pic</b>	Picloram
<b>TDZ</b>	Tidiazuron

## RESUMEN

La papaya (*Carica papaya* L.) es el miembro económicamente más importante de la familia *Caricaceae*. Se cultiva en más de 50 países tropicales y subtropicales, por ser una de las frutas con mayor demanda en el mercado internacional. En el presente trabajo se evaluaron cuatro auxinas (ANA; Picloram; 2,4-D y 2,4,5-T) en combinación con diferentes concentraciones de 6BAP (citocinina) para la inducción de callos, así como diferentes concentraciones de 2,4,5-T y TDZ (citocinina) para la inducción de embriones somáticos. Para la maduración se utilizó el medio de cultivo MS libre de reguladores de crecimiento a la mitad de su concentración, adicionando 0.1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 5.0 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 2.0 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol y 2 % de sacarosa. Se encontró que concentraciones entre 1 y 5 mg L<sup>-1</sup> de auxinas como ANA y 2,4,5-T combinadas con 1 y 2 mg L<sup>-1</sup> de 6BAP son las más adecuadas para la inducción de callos. Los cultivos pretratados con Picloram durante la fase de inducción de callos, muestran mayor eficiencia en la inducción de embriones a concentraciones de 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4,5-T, por lo que el pretratamiento influye en la inducción de embriones. En concentraciones de 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4,5-T en combinación con 2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, se obtuvo un 81% de inducción de embriones. No se observó desarrollo en los cultivos durante la fase de maduración. Al realizar la microscopía electrónica, observamos complejos proembriogénicos en algunas partes del callo, mayormente localizados en la periferia del callo y otros en la parte interna.

## 1. INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es el miembro económicamente más importante de la familia *Caricaceae* y la única especie dentro del género *Carica*. Aunque se continúa discutiendo su centro de origen, se acepta que éste se halla comprendido entre el Sur de México y Panamá. Posiblemente, en esta área ocurrió su domesticación por culturas nativas, de ahí se dispersó a la zona del Caribe y el Sureste Asiático en el siglo XVI, y posteriormente, a la India y África (Morton, 1987; Baldillo, 2002). Actualmente, la papaya se cultiva en más de 50 países tropicales y subtropicales, siendo una de las frutas con mayor demanda en el mercado internacional (FAO, 2005).

El fruto de la papaya es una buena fuente de calcio y excelente en vitaminas A y C, es considerada como una de las frutas más nutritivas. La papaya generalmente se consume en fresco como fruta, otras partes de la planta son también utilizadas (como las flores y las hojas) que son consumidas y el tallo puede servir para almacenar granos (OGTR, 2003). La variedad Maradol ha destacado en los últimos años por su sabor y valores nutricionales muy atractivos para el consumidor, sus excelentes cualidades de comercialización y por la rentabilidad que ofrece al productor (SAGARPA, 2005). La planta puede producir por más de 20 años, pero sólo da buenos rendimientos los tres primeros años. Para una alta producción de frutos deben administrarse abundantes nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo. Un fruto de papaya bien polinizado produce entre 300 y 700 semillas viables.

En la industria, la papaya se usa para la extracción de enzimas proteolíticas, principalmente papaína; se emplea además en la fabricación de cosméticos, shampoo, graduación de bebidas alcohólicas, gomas de mascar, en la elaboración de algunos fármacos y en la industria alimenticia; como ablandador de carnes, entre otros usos (Eno *et al.*, 2000).

A nivel mundial, la producción de papaya se ha mantenido relativamente estable en los últimos años. En 2004, según datos de la FAO, existían en todo el mundo 365,846 ha plantadas con este cultivo, de las cuales se obtuvo una producción de aproximadamente 6.5 millones de ton. En el año 2007, la superficie sembrada a nivel nacional fue de 22,623 ha y la producción se calculó alrededor de 919,425 ton, siendo los principales productores Veracruz, Chiapas, Yucatán, Oaxaca y Tabasco (SAGARPA, 2007). Brasil es el mayor productor mundial al aportar el 26% de la producción total, seguido de México con un 15%, Nigeria e India con un 12% y 11% respectivamente.

En una plantación es común observar plantas con flores femeninas, en ocasiones masculinas y hermafroditas, el mayor inconveniente está en que el sexo sólo puede determinarse cuando las flores brotan a partir de los tres meses de la siembra, esto provoca grandes pérdidas del cultivo (Cabrera-Ponce *et al.*, 2000). Además están reportados varios tipos de flores que se describen en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Características de los tipos florales en el cultivar Maradol (Tomado de Salazar, 1999).

Tipo floral	Características	Forma del fruto
<b>Hermafrodita <i>elongata</i></b>	Flor hermafrodita de 10 estambres, con los pétalos soldados en más de un tercio de su longitud. El ovario es alargado y es frecuente en más de un 70% en la variedad Maradol	Frutos uniformes alargados
<b>Femenina</b>	Flor pistilada que carece de estambres, que rara vez los tiene o muy rudimentarios. El ovario es grande de contorno circular liso.	Frutos redondos
<b>Hermafrodita estéril en verano</b>	Flor de 6 a 9 estambres; pétalos soldados a un tercio de su longitud. El ovario no desarrolla en épocas de temperaturas altas. Es poco frecuente en la variedad Maradol.	Frutos alargados y en ocasiones bananiformes

La forma alargada de la fruta está asociada a flores hermafroditas (Figura 1). De las diferentes flores hermafroditas, la de tipo *elongata* es la más importante para producir fruta desde el punto de vista comercial.



**Figura 1.** Flor hermafrodita y fruto tipo *elongata* de *Carica papaya* L.

En contraste, los frutos redondos provenientes de flores femeninas (Figura 2) no tienen un valor comercial de exportación pero son aceptados para consumo nacional.



**Figura 2.** Flor femenina y fruto redondo de *Carica papaya* L.

Se considera como **micropropagación**, la obtención de nuevas plantas a partir de semillas o de estructuras meristemáticas preexistentes bajo condiciones *in vitro*. En cambio, se considera **regeneración** a los métodos donde se obtienen nuevos individuos a partir de tejidos o células somáticas, o que se originan de las células gaméticas como granos de polen y óvulos.

La organogénesis es un sistema de regeneración donde se producen nuevos órganos adventicios a partir de tejido somático (directa) o de callos (indirecta). La embriogénesis somática (ES) es otro sistema de regeneración donde se producen nuevas estructuras bipolares o embriones a partir de tejido somático (directa) o de callos y cultivos de células en suspensión (indirecta).

Dentro de los procesos de propagación *in vitro*, la embriogénesis somática tiene un gran potencial tanto para la ciencia básica como para la ciencia aplicada. Para el caso de la ciencia básica, la ES resulta fundamental para establecer comparaciones con la embriogénesis cigótica y procesos de desarrollo, mientras que para la ciencia aplicada resulta de enorme utilidad en la propagación clonal. Hoy en día, a pesar de que existen una amplia variedad de especies sembradas con cultivos provenientes de ES, son escasos los éxitos relacionados con especies de hábitat tropical.

En la papaya la ES ha sido inducida de diferentes partes de la planta: óvulos, pecíolos, tallos, segmentos de raíces, embriones cigóticos, hipocotilos y del tegumento de la semilla (Litz y Conover, 1977).

Las plántulas obtenidas *in vitro* a través de organogénesis producen raíces tipo adventicias las cuales no son comparables con las raíces pivotantes provenientes de una planta obtenida por semilla, ya que la conexión vascular en las raíces adventicias normalmente es escasa dando cierta desventaja a la planta cuando es llevada a campo, aumentando en muchos casos el porcentaje de acame en contraste con las plantas obtenidas por semilla donde el anclaje es mayor por su raíz pivotante. Como alternativas se pueden producir plantas *in vitro* a partir de embriones somáticos que presentan una polaridad semejante a un embrión cigótico dando lugar a plántulas completas (tallo y raíz).

Actualmente la ES representa la mejor opción para la clonación masiva de plantas pues permite obtener estructuras bipolares en un solo paso, eliminando la inducción de la rizogénesis en la regeneración por organogénesis (Fuentes-Cerda, 2001). Dentro de los alcances de la ES, el uso de biorreactores ha mejorado significativamente la producción masiva de plantas, ya que en un medio líquido controlado se pueden cultivar miles de embriones somáticos, los cuales pueden ser germinados hasta la obtención de plántulas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Descripción botánica y otros aspectos de *Carica papaya* L.

**Forma:** Planta arborescente perennifolia, de 2 a 8 m (hasta 10 m) de altura con un diámetro a la altura del pecho de 6 a 15 cm (hasta 30 cm), con un olor acre distintivo.

**Copas/Hojas:** Copa abierta y redondeada. Hojas grandes de pecíolo largo, 0.7 a 1 m, con la lámina de 7 a 9 lóbulos, y éstos a su vez en lóbulos más pequeños, ligeramente gruesas y carnosas. Hojas superiores erectas y extendidas e inferiores colgantes.

**Tronco/Ramas:** El tronco es erguido, cilíndrico, hueco excepto en los nudos, más grueso en su base; con las características cicatrices que dejan las hojas al caer. Crecimiento monopódico cuando joven y al madurar se ramifica.

**Corteza:** Lisa, verde grisácea, con manchas pardas, oscuras, o bien raramente pardo pálidas, de forma irregular, lenticelas pequeñas o ausentes, cicatrices semicirculares a todo lo largo del tronco. Presenta un exudado blanco.

**Flores:** Pistiladas, estaminadas o bisexuales, con el cáliz tubular de 8 a 10 mm de largo, verdoso; corola tubular de 10 a 20 mm de largo, blancuzca o amarilla pálida, ovario súpero. Flores femeninas solitarias rara vez de 5 a 6 juntas en la base de una hoja, masculinas en panículas delgadas con 15 a 20 flores o llegando a tener hasta 100 por inflorescencia. Las flores femeninas son mucho más grandes que las masculinas.

**Fruto:** Apiñados alrededor del tronco. Bayas elipsoides o esféricas, tornándose de verdes a anaranjadas en la madurez, pulpa blanda, jugo lechoso. El fruto silvestre mide de 4 a 6 cm de largo y de 3 a 4.5 cm de ancho. Cada fruto conteniendo de 200 a 400 semillas. En plantas cultivadas de 10 a 50 cm de largo, dependiendo de la variedad y las condiciones del cultivo.

**Semilla:** Semillas de 3.7 a 4.5 mm de largo, 2 a 2.8 mm de ancho y de 2 a 2.5 mm de grueso, esféricas, cubiertas por una capa mucilaginosa (sarcotesta); endotesta pardo negruzca y arrugada. Endospermo presente.

**Raíz:** Sistema radical pivotante.

**Sexualidad:** Planta dioica (más comúnmente en la papaya silvestre); monoica, con flores hermafroditas, polígama. Ocurren cambios en la expresión sexual debido a diferentes condiciones ecológicas o a las condiciones del cultivo. El sexo de la planta no se puede determinar sino hasta la floración.

**Número cromosómico:**  $2n=18$

**Hábitat:** Puede crecer en lomeríos y cañadas. Prospera en toda la tierra caliente en un clima tropical o subtropical, desde el cálido más seco de los subhúmedos hasta la variante húmeda del clima subhúmedo. La humedad y el calor son condiciones esenciales para su buen desarrollo y fructificación (Linné, 1753).

## **2.2. Métodos para la propagación de plantas**

La propagación de plantas se refiere al conjunto de actividades técnicas que permiten multiplicar o reproducir los materiales genéticos contenidos en las plantas. Básicamente existen dos tipos de propagación: la sexual y la asexual. A la propagación de las plantas por medio de la semilla se le conoce como sexual, en tanto que a la propagación vegetativa a través de acodos, estacas, callos e injertos se le denomina asexual (Pierik, 1990).

### **2.2.1. Reproducción sexual**

En el caso de la reproducción sexual, se forman células reproductoras especializadas, llamadas gametos. La fusión de los gametos masculino y femenino lleva al desarrollo de un embrión y posteriormente a la formación de la semilla (Bewley y Black, 1985).

### **2.2.2. Propagación asexual o vegetativa**

En la reproducción asexual, las nuevas plantas se originan por medio de órganos vegetativos especializados, tales como tubérculos, rizomas, estolones, bulbos, etc.; pero además, se puede lograr por otros métodos de morfogénesis que abarca la formación de embriones somáticos (embriogénesis adventicia, apomixis, etc.), micropropagación y embriogénesis somática *in vitro* (Redenbaugh, 1993).

La embriogénesis somática *in vitro* es posible, ya que virtualmente cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y a la aplicación de reguladores del crecimiento. La primera demostración de que las plantas podían producir embriones somáticos *in vitro* fue publicada en 1958 (McKersie y Bowley, 1993).

Los métodos de propagación vegetativa son importantes para las actividades productivas del hombre, ya que nos permiten, a través de la multiplicación a gran escala:

- Producir plantas con características genéticas excepcionales.
- Obtener gran número de plantas a partir de pocos individuos y en un tiempo relativamente corto.
- Propagar individuos que no han alcanzado la madurez sexual y por tanto no han llegado a producir semillas.
- Propagar especies que presentan problemas de fertilidad o que no son capaces de producir semillas (Durán *et al.*, 1997).

### **2.3. Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de callos inicia cuando una porción de tejido se desdiferencia *in vitro*, originando un callo (Pierik, 1990). Hurtado y Merino (1987) definieron un callo como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular, presentando este una proliferación continua,

acelerada y de apariencia desorganizada que da origen a una masa amorfa de tejido.

Se llama inducción del callo al inicio de su formación, posteriormente los callos se cultivan en un medio diferente. En condiciones adecuadas (nutrientes, temperatura, luz, etc.) y a veces de forma espontánea se puede producir la regeneración de órganos adventicios y/o embriones a partir de callos (Pierik, 1990).

La característica más importante del callo es que las células que lo forman son indiferenciadas, por lo tanto más factibles de expresar la totipotencia, con un manejo adecuado de los nutrientes, reguladores del crecimiento vegetal y condiciones ambientales, tendrán la capacidad de desarrollar brotes, raíces, embriones, etc., los cuales pueden llegar a formar plantas completas.

Las fitohormonas o reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos o sintéticos diferentes de los nutrimentos que en pequeñas cantidades fomentan, inhiben o modifican de alguna forma cualquier proceso fisiológico vegetal (Weaver, 1990). Las hormonas vegetales se sintetizan en alguna parte de la planta y se traslocan a otra, en donde concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica, que promueve diferentes tipos de crecimiento, en la actualidad las auxinas, citocininas, giberelinas, inhibidores y retardadores del crecimiento, etileno, ácido acetilsalicílico, triacotanol, brasinoesteroides, turgorinas y poliaminas, son consideradas reguladores de crecimiento (Salisbury y Ross, 1994).

### **2.3.1 Auxinas**

El ácido indolacético (AIA) fue la primera auxina natural identificada y hoy es considerada la auxina principal en las plantas. Sin embargo, también existen auxinas sintéticas, tales como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalenacético (ANA), las cuales a pesar de ser sintéticas, en bioensayos inducen efectos similares a las auxinas naturales (Sitbon y Perrot-Rechenmann, 1997).

La auxina es la hormona vegetal que influye en numerosos aspectos de crecimiento y desarrollo (Chen *et al.*, 1998; Guilfoyle *et al.*, 1998), se incluye el desarrollo vascular, iniciación de raíces laterales, dominancia apical, fototropismo, gravitropismo, embriogénesis, maduración de frutos (Hobbie *et al.*, 1994; Davis, 1995), senescencia, abscisión, floración, elongación y división celular (Eckardt, 2001).

### **2.3.2 Citocininas**

Son sustancias casi todas derivadas de la adenina que en términos generales estimulan la división celular o citocinesis, sus principales funciones son: romper el efecto de la dominancia apical, intervienen en la morfogénesis, promueven la síntesis de proteínas (ES: maduración), pueden inhibir la formación de raíces, retraso de la senescencia de las hojas. La cinetina es una citocinina sintética, en concentraciones bajas es muy ampliamente utilizada (Minorsky, 2001).

La ES *in vitro* es un proceso bien establecido en más de 150 especies de importancia agronómica. Los embriones somáticos se pueden obtener de células vegetativas, de tejidos reproductivos, de embriones cigóticos o de callos producidos de cualquiera de los órganos o tejidos antes mencionados (Copeland y Mc Donald, 1995).

La ES *in vitro* es el proceso por el cual se forman embriones a partir de células vegetativas. Por lo tanto, los embriones somáticos se desarrollan sin la precedente fertilización, como ocurre en la formación de los embriones cigóticos (McKersie y Brown, 1993).

La ES presenta un sistema ideal para investigar los procesos complejos de diferenciación de plantas, así como los mecanismos de expresión de totipotencia de células vegetales, además tiene muchas ventajas comparado con la embriogénesis cigótica; por ejemplo, a) el proceso de embriogénesis es fácilmente monitoreado, b) el ambiente del embrión puede ser controlado y c) un gran número de embriones puede fácilmente ser obtenido (Nomura y Komamine, 1999).

Se pueden distinguir dos tipos de ES:

**Directa:** cuando el embrión se origina a partir de una célula de un tejido, sin que se produzca la formación previa de callo. Las células a partir de las cuales se originan los embriones reciben el nombre de células determinadas pre-embriogénicas (PEDC).

**Indirecta:** cuando primero se forma un callo, a partir del cual se forman los embriones. Las células a partir de las cuales se forman los embriones, reciben el nombre de células determinadas embriogénicas, y producen embriones cuando son inducidas a ello (células determinadas embriogénicamente inducidas IEDS). En este tipo de embriogénesis las células diferenciadas deben ser primero desdiferenciadas, para ser redeterminadas como células embriogénicas después de la división celular. Las auxinas (y a veces las citocininas) tienen gran importancia en este proceso. Con este método, en primer lugar se debe producir un rejuvenecimiento completo (Pierik, 1990).

Parrot (1993) y Gómez (1998), mencionan que el desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía ES incluye los siguientes pasos: inducción de los embriones somáticos, desarrollo de los embriones somáticos, proliferación, maduración, germinación y conversión a plantas.

Pérez *et al.* (1999) indican que la ES consta de las etapas de:

- a) Inducción. Proceso de conversión de una célula somática a una célula proembriogénica, para que este se presente son factores determinantes del genotipo, el grado de diferenciación de las células del explante, auxinas, el tipo de tejido, etc.
- b) Histodiferenciación. Las masas de células proembriogénicas se diferencian al formar embriones somáticos, mediante una división y diferenciación simultáneas. Se requiere la eliminación de las auxinas exógenas para que ocurra la diferenciación; en esta etapa los embriones somáticos pasan por una serie de estadios intermedios muy similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica. En las

dicotiledóneas estas son: globular, de corazón y torpedo. Y en monocotiledóneas son: globular, coleoptilar y escutelar.

- c) Maduración. Durante esta etapa ocurre una elongación celular sin división; Bewley y Black (1985) mencionan que la maduración es el periodo en la maduración del embrión somático en el cual ocurre la expansión de la célula y la acumulación de sustancias de reserva, para la mayoría de las especies se sabe que los estímulos que hacen posible la maduración de los embriones son la desecación y el ácido abscísico (ABA).
- d) Germinación. Proceso de elongación y reactivación metabólica de un embrión somático maduro para convertirse en plántula; los estímulos requeridos son tratamientos de frío, incubación en presencia de luz, o aplicación de ácido giberélico o citocininas.

De acuerdo con Lozoya (1990), los principales factores que intervienen en la embriogénesis somática son:

- a) Medios de cultivo. Se indica la adición de sustancias al medio para favorecer la embriogénesis entre ellas se incluyen la tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, glicina, myo-inositol, adenina y auxina.
- b) Luz y temperatura. En zanahoria y cítricos, especies en donde los estudios de embriogénesis han sido más profundos, se reporta que luz y temperatura son factores determinantes para que esta se presente, en general una intensidad lumínica de 1000 a 3000 lux y una temperatura de 25 a 28 °C son adecuadas.

Aunado a lo anterior, la embriogénesis somática es también afectada por el genotipo de la planta, el tipo y el estado fisiológico del explante, los reguladores de crecimiento y las condiciones de cultivo (Gómez, 1998).

Los embriones somáticos, tienen al igual que los cigóticos, la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia de que la embriogénesis somática es un proceso asexual, por lo que la nueva planta en teoría será exactamente igual a la donadora de la célula inicial. Aún no se conoce con exactitud el proceso de inducción de ésta, pero se sabe que implica un proceso drástico en los patrones de

expresión genética mediante el cual las células pasan del patrón normal a uno embriogénico. (Tisserat, 1991; Pérez, *et al.*, 1999). A los embriones somáticos les falta la testa y el endospermo, los cuales proveen protección y nutrición al embrión cigótico en las semillas naturales (McKersie, 1996).

La propagación de plantas, a través de la ES, representa el método más eficiente de multiplicación clonal de plantas que se ha desarrollado hasta la fecha (McKersie, 1996). Se puede emplear tanto en especies que se reproducen por semillas, como en aquellas de propagación vegetativa (Gray, 1997).

Los embriones somáticos son estructuras bipolares con eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno, estas estructuras bipolares deben ser también capaces de crecer y formar plantas normales y completas.

En la papaya la ES ha sido inducida de diferentes partes de la planta: óvulos, peciolas, tallos, segmentos de raíces, embriones cigóticos, hipocotilos y del tegumento de la semilla (Litz y Conover, 1977).

#### **2.4. Factores que intervienen en la morfogénesis *in vitro***

Abdeulnour y Vicent (1993) destacan algunos factores importantes que influyen en la inducción de la embriogénesis somática, estos son el genotipo, edad de la planta, estado fisiológico de la planta al momento de tomar el explante y condiciones del ambiente *in vitro* (factores físicos y químicos).

En un estudio en mora (*Morus alba* L.) se encontró que la callogénesis fue dependiente de la naturaleza del explante usado, el genotipo y los reguladores de crecimiento suplementados en el medio, las hojas fueron el mejor tipo de explante usado para inducción de callos (Bhau y Wakhulu, 2001).

La elección del explante (órgano, tejido, células etc.) adecuado, constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, éste variará de acuerdo con el objetivo perseguido. Se ha demostrado que la edad fisiológica es un

factor importante en la formación de órganos entre más joven y menos diferenciado sea el tejido, más fácil será su adaptación y respuesta al tejido *in vitro* (Halperin, 1996).

#### **2.4.1. Factores físicos**

**Intercambio gaseoso.** Los gases producidos por los cultivos *in vitro* más comunes son O<sub>2</sub> (oxígeno) CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) y C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (etileno). En recipientes de cultivo cerrados herméticamente se ha detectado acumulación de estos gases y otras sustancias como etanol y acetaldehído, que además de influir el crecimiento, también pueden afectar los procesos de diferenciación o morfogénesis (Righetti *et al.*, 1990).

**Humedad.** En condiciones *in vitro* la humedad dentro de los recipientes es de casi 100%. Por eso en general la planta *in vitro* no desarrolla eficientemente sistemas de regulación hídrica, tales como ceras, estomas, cutícula, etc. De ahí que se dificulte la aclimatación de las plantas micropropagadas a condiciones externas (Abdeulnour y Vicent, 1993).

**Luz.** En condiciones *in vitro* clásicas, la intensidad y calidad de luz es muy baja se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para tener diferentes longitudes de onda. El espectro útil para los vegetales es de 400 a 700 nm. Dos fenómenos importantes que dependen de la luz son: fotosíntesis y fotomorfogénesis (Abdeulnour y Vicent, 1993).

#### **2.4.2. Factores químicos**

El medio de cultivo consiste en una mezcla de sustancias dentro del cual crecen los explantes. Dicha mezcla es una combinación de sustancias inorgánicas y orgánicas que permiten a las plantas crecer y multiplicarse *in vitro* (López, 1990).

**pH.** El grado de acidez o alcalinidad del medio de cultivo, es importante y específico para cada tipo de planta, al igual que ocurre en el suelo, las especies vegetales responden de manera diferente, por lo que es necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio. Sin embargo el pH

adecuado en el medio de cultivo se encuentra en el rango de 4.5 a 7.0, para las plantas, un pH de 5.7 es el más utilizado (Abdeulnour y Vicent, 1993).

## **2.5. Embriogénesis somática en papaya**

Se han publicado casos de embriogénesis somática en *Carica papaya*; Chen *et al.* (1987) regeneraron plántulas por esta vía embriogénica a partir de callos de raíz de las variedades "Solo" y "Sunrise". La embriogénesis ocurrió a los tres meses de cultivo. Experimentaron con explantes de tallos, hojas, cotiledones y raíces que fueron cortados de plántulas germinadas *in vitro*, de cuatro a seis semanas de edad con tres hojas, y sembradas en un medio de cultivo constituido por la mitad de las sales de MS, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 1.0 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 5.0 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 2.0 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 1.0 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 160 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, 1.0 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA) y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina (KIN).

Fitch y Manshardt (1990) regeneraron plántulas a partir de embriones cigóticos inmaduros de cuatro cultivares: "Sunrise", "Sunset", "Waimanalo" y "Kapoho", sus fuentes de explante fueron nudos cotiledonares, ápices y meristemas radiculares después de cultivarlos por tres semanas en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con las sales diluidas a la mitad con 0.1 a 25 mg L<sup>-1</sup> de 2, 4-D, 400 mg L<sup>-1</sup> de glutamina y 6% de sacarosa. A partir de las seis semanas de cultivo, aproximadamente el 50% de los embriones cigóticos produjeron cientos de embriones somáticos que fueron madurados en un medio MS con las sales a la mitad de su concentración y luego germinados en otro medio MS, con 5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina; por último fueron cultivados en un medio MS para posteriormente transferirlos a invernadero.

Azpeitia (1996), indujo la embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros los cuales obtuvo de frutos provenientes de flores hermafroditas, sembrando éstos en cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de la auxina 2,4-D, usando el medio basal a la mitad de su concentración, las vitaminas MS, myo-inositol 100 mg L<sup>-1</sup>, glutamina 400 mg

L<sup>-1</sup>, sacarosa 60 g L<sup>-1</sup> y 5 g L<sup>-1</sup> de agargel y pH 5.8. Obteniendo mayor número de embriones con una concentración de 2.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D.

Salazar (1999) indujo embriogénesis somática a partir de tallo de plantas de papaya Maradol, estos explantes fueron sembrados en medio MS a la mitad de la concentración de las sales, vitaminas de SH (Schenk y Hildebrandt, 1972), myo-inositol 100 mg L<sup>-1</sup>, 2 mg L<sup>-1</sup> de cinetina y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA o ácido clorofenoxiacético (CPA) y un pH de 5.7.

Cabrera-Ponce *et al.* (2000), reporta este fenómeno a partir de semillas tomando embriones cigóticos; éstos son sembrados en medios que consisten en la mitad de la concentración de sales del medio MS, myo-inositol 2.5 mg L<sup>-1</sup>, glicina 0.1 g L<sup>-1</sup>, tiamina 0.005 mg L<sup>-1</sup>, glutamina 0.4 g L<sup>-1</sup>, ácido 2,4-D 10 mg L<sup>-1</sup>, sacarosa 6%, agar 0.8% y pH 5.8. Los embriones se formaron en un promedio de tres meses y posteriormente se empezaron a ver las primeras plántulas ya formadas.

En general, el desarrollo de callos embriogénicos a partir de diferentes explantes, condiciones y medios de cultivo, la alta frecuencia embriogénica en suspensiones celulares y la producción de plántulas por esta vía, confirman que la papaya responde bien a esta técnica biotecnológica (Monmarson *et al.*, 1995).

A continuación se enlista un resumen (Cuadro 2) de trabajos realizados en *Carica papaya* L. para la obtención de embriones somáticos:

**Cuadro 2.-** Estudios realizados sobre embriogénesis somática en *Carica papaya* L.

Autor	Explante	Variedad	Auxina	Citocinina	Otro compuesto	Resultados					
						Inducción de callos		Inducción de embriones somáticos		Maduración de embriones somáticos	
						Tiempo en semanas	Condición	Tiempo en semanas	%	Tiempo en semanas	%
Chen <i>et al.</i> , 1987	Apices, raíz, tallo, hoja y cotiledones	Solo Sunrise	1.0 mg L <sup>-1</sup> de ANA	0.5 mg L <sup>-1</sup> de cinetina		-	-	12	-	-	-
Fitch y Manshardt, 1990	Embriones cigóticos inmaduros	Sunrise Sunset Waimanalo Kapoho	0.1 a 25 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	5 mg L <sup>-1</sup> de cinetina		-	-	6	50.00	-	-
Fitch, 1993	Hipocotilo	Sunrise Sunset Waimanalo Kapoho	0.5 a 25 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D			10-14	oscuridad	8	-	8	-
Salazar, 1999	Tallo y raíz	Maradol	0.5 mg L <sup>-1</sup> de ANA	2 mg L <sup>-1</sup> de cinetina		-	-	-	60.00	-	-
Cabrera-Ponce <i>et al.</i> , 2000	Embriones cigóticos inmaduros	Maradol Sunrise Tropica Pacífico	10 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D			-	-	12	51.03 47.23 41.07 40.00	12	-
Bhattacharya, <i>et al.</i> , 2000	Embriones cigóticos inmaduros	Honey Dew CO2	3.0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4,5-T		0.1 mg L <sup>-1</sup> de ABA	-	-	3-6	-	-	71.33 59.33
Juliana <i>et al.</i> , 2001	Embriones cigóticos maduros	Sunrise Solo	2.0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D			2	oscuridad	6	-	-	-
Yang, 2001	Raíces <i>in vitro</i>	Tainung No. 2	1.0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	0.1 mg L <sup>-1</sup> de BAP		-	-	16	38.00	-	-
Bhattacharya <i>et al.</i> , 2002	Embriones cigóticos inmaduros	Honey Dew Washington	2.0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D			-	-	4-6	-	-	66.33 68.33

Continuación cuadro 2.- Estudios realizados sobre embriogénesis somática en *Carica papaya* L.

Autor	Explante	Variedad	Auxina	Citocinina	Otro compuesto	Resultados					
						Inducción de callos		Inducción de embriones somáticos		Maduración de embriones somáticos	
						Tiempo en semanas	Condición	Tiempo en semanas	%	Tiempo en semanas	%
Renukdas <i>et al.</i> , 2003	Embriones cigóticos inmaduros	Honey Dew	1.0 mg L <sup>-1</sup> de picloram		63 mg L <sup>-1</sup> de	-	-	6-8	96.67	-	-
			2 mg L <sup>-1</sup> de 2, 4-D					90.00			
Kanokwan y Boonthum, 2007	Embriones cigóticos inmaduros	Cultivar Khak-Dum	5.0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D		0.67 mg L <sup>-1</sup> de ABA	-	-	-	-	2	39.00
Ascencio <i>et al.</i> , 2008	Embriones cigóticos inmaduros	Maradol	0.02 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	0.2 mg L <sup>-1</sup> de cinetina	0.02 mg L <sup>-1</sup> de ABA	4	fotoperíodo	-	-	-	70.00

### 3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la embriogénesis somática representa la mejor opción para la propagación masiva del cultivo de papaya pues permite obtener un gran número de plantas en lapsos más breves que en los métodos tradicionales de micropropagación. Entre las ventajas que ofrece la producción de embriones somáticos están: la posibilidad de producir una gran cantidad de embriones (alta eficiencia de producción); la característica de bipolaridad que distingue a los embriones como plantas individuales; la similitud en diferentes niveles de organización (morfológico, fisiológico y bioquímico), con sus contrapartes sexuales y su capacidad para producir una planta nueva durante los procesos de germinación y conversión. Pero la característica más sobresaliente de los embriones somáticos es que se desarrollan de células somáticas y por lo tanto presentan la potencialidad de producir duplicados similares de un genotipo específico. En el cultivo de papaya, se encuentran plantas masculinas, femeninas y hermafroditas, para los productores lo ideal sería solo cultivar plantas hermafroditas, ya que cultivando dichas plantas se garantiza una alta producción y se evitan pérdidas eliminando plantas femeninas y masculinas, por lo tanto el cultivo es más rentable.

De lo anterior surgió el interés de estudiar la ES en *Carica papaya* L. una especie de gran valor comercial en el mercado internacional y para México en particular, por ser éste uno de los principales países productores y exportadores en el mundo, además de la gran demanda que presenta como cultivo frutal.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los problemas fundamentales a los que se enfrentan los productores de papaya es, en primera instancia, la complejidad en la identidad sexual de su floración, pues es común observar dentro del cultivo plantas con flores hermafroditas, femeninas o masculinas. Lo ideal sería cultivar solo plantas hermafroditas que den frutos de tipo *elongata*.

Una alternativa para lograr lo anterior es la embriogénesis somática para producir plantas 100% hermafroditas y así garantizar una alta producción y con esto evitar grandes pérdidas al tener que eliminar plantas no deseadas.

## 5. HIPÓTESIS

Al aplicar diferentes dosis y tipos de reguladores de crecimiento al cultivo de tejidos *in vitro* de plántulas de Papaya Maradol 100% hermafroditas, será posible promover la capacidad de regeneración de plantas por el proceso de embriogénesis somática.

## 6. OBJETIVOS

### **Objetivo General**

Desarrollar un protocolo eficiente de regeneración de plantas por medio de la embriogénesis somática en *Carica papaya* L., a partir de tejidos foliares de plántulas hermafroditas obtenidas *in vitro*.

### **Objetivos Particulares**

- Determinar las condiciones apropiadas para la inducción y cultivo de callos de tejidos foliares.
- Establecer el tipo, concentración y combinación de auxina/citocinina adecuados para la inducción de callos embriogénicos.
- Determinar las condiciones para la maduración de los embriones hasta la obtención de plántulas.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Lugar del experimento

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología Vegetal en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

### 7.2. Material vegetal

Se utilizaron tejidos foliares provenientes de plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) var. Maradol previamente establecidas *in vitro* 100% hermafroditas.

### 7.3. Descripción de experimentos

#### 7.3.1. Fase de inducción de callos

Se realizaron cuatro experimentos bifactoriales de acuerdo al siguiente arreglo (Cuadro 3). Cada experimento consistió en cuatro dosis de citocinina y cuatro dosis de auxina. En el primer experimento se probó ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (6BAP), en el segundo experimento la auxina Picloram y 6BAP, en el tercer experimento se utilizó ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6BAP y en el cuarto experimento ácido triclorofenoxiacético (2,4,5-T) y 6BAP. Cada experimento consistió de 16 tratamientos (combinaciones) con tres repeticiones cada uno, en total 48 frascos por experimento dosificados con 10 mL de medio en cada uno.

Los explantes fueron de tejido foliar de plántulas de papaya hermafroditas obtenidas *in vitro*. La hoja fue seccionada en tres partes: a) peciolo y base de la hoja b) centro de la hoja y c) ápice de la hoja; cada explante fue sembrado en un recipiente. Los frascos se incubaron en un cuarto de cultivo bajo condiciones controladas, a  $26 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) y con una intensidad lumínica de  $50 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

**Cuadro 3.** Factorial para la inducción de callos en *Carica papaya* L.

<b>Auxinas (mg L<sup>-1</sup>) ANA Picloram 2,4-D 2,4,5-T</b>	<b>0</b>	<b>1.0</b>	<b>5.0</b>	<b>10.0</b>
<b>Citocinina (mg L<sup>-1</sup>) 6BAP</b>				
<b>0</b>	T1	T2	T3	T4
<b>0.5</b>	T5	T6	T7	T8
<b>1.0</b>	T9	T10	T11	T12
<b>2.0</b>	T13	T14	T15	T16

El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 7 g L<sup>-1</sup> de agar a un pH de 5.7. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Se realizó un análisis cualitativo por tratamiento a los 45 d de cultivo observando la formación y abundancia de callo en los explantes, fueron otorgados de manera arbitraria los siguientes valores: ausencia de callo (1), callo poco abundante (2), callo moderadamente abundante (3) y callo abundante (4). Además se evaluó el color y la consistencia que presentaron los callos.

### **7.3.2. Fase de inducción de embriones**

Para la inducción de la embriogénesis somática se utilizó el material friable y café-crema obtenido en cada uno de los cuatro experimentos de la fase de inducción de callos. Se seleccionaron de forma visual en el estereoscopio los tratamientos de cada experimento que presentaron callogénesis, y se diseñó un nuevo experimento con base al siguiente bifactorial (Cuadro 4).

Los reguladores de crecimiento utilizados fueron 2,4,5-T y Tidiazuron (TDZ). El medio de inducción utilizado fue el MS a la mitad de su concentración con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 5.0 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 2.0 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol y 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que en la inducción de callos. Se

evaluaron por separado cada uno de los experimentos realizados en la fase de inducción de callos.

**Cuadro 4.** Factorial para la inducción de embriones en *Carica papaya* L.

<b>Auxina</b> (mg L <sup>-1</sup> ) 2,4,5-T  <b>Citocinina</b> (mg L <sup>-1</sup> ) TDZ	<b>0</b>	<b>1.0</b>
<b>0</b>	T1	T2
<b>2.0</b>	T3	T4

El medio de inducción utilizado fue el medio basal MS a la mitad de su concentración, adicionando 0.1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 5.0 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 2.0 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol y 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que en la inducción de callos.

Al final de la fase de inducción de embriones se procedió a observar los callos en el estereoscopio, se tomaron fotografías de las estructuras encontradas con el fin de identificar si dichas estructuras eran complejos proembrionarios. Para confirmar si las estructuras observadas eran embriones se usó Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

### 7.3.3. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Para poder observar las estructuras en el microscopio electrónico, las muestras fueron fijadas durante 48 h a 4°C con una solución compuesta de Formaldehído, Ácido acético y Alcohol (FAA) propuesta por Mistake en 1974. Se realizó una segunda fijación con un buffer a base de fosfatos 0.2 M a un pH de 7.3 por 24 h a 4°C, este buffer está compuesto por: 2.76 g de fosfato de sodio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O), 5.36 g de fosfato de sodio dibásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O) y 3.5 g de paraformaldehído por cada 100 mL de agua. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas con etanol de manera gradual al 30, 50, 70, 85, 96 y 100% v/v, durante 1h en cada concentración a

4°C. Una vez deshidratadas las muestras se procedió a realizar el secado en punto crítico en una cámara marca TOUSIMIS modelo Samdri-795.

Para finalizar el proceso, las muestras fueron metalizadas con oro en un pulverizador marca Sputter Denton Vacuum modelo Desk II. La capa de oro fue de 120 nm de espesor. Finalmente se observaron en el microscopio electrónico.

#### **7.3.4. Fase de maduración de embriones**

Para la maduración de embriones se utilizó el medio de cultivo MS libre de hormonas a la mitad de su concentración con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 5.0 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 2.0 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol y 2 % de sacarosa, durante seis semanas. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que para las fases de inducción de callos y de embriones.

#### **7.3.5. Análisis estadístico**

Para el análisis de datos obtenidos en los experimentos bifactoriales durante las fases de inducción de callos y de embriones, se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus 4.0<sup>®</sup>. Cada experimento se analizó de forma individual y en cada uno de ellos se realizó la prueba de ANVA (Análisis de Varianza) y la comparación múltiple de medias mediante la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa). La cuantificación de embriones fue expresada en número de embriones por gramo de tejido.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Fase de inducción de callos

#### 8.1.1. Experimento 1 (ANA y 6BAP)

Al transcurrir 45 d del establecimiento *in vitro* de los explantes, se encontraron diferencias altamente significativas para las dosis de 6BAP ( $p=0.0000$ ), y para las dosis de ANA ( $p=0.0007$ ). Al realizarse la comparación múltiple de medias mediante la prueba de DMS (Diferencia Mínima Significativa) se encontró que la mayor inducción de callos a los 45 d, fue cuando se adicionó 6BAP (Cuadro 5). Para el caso de ANA, al realizar la prueba de DMS se encontró que al adicionar 1 mg L<sup>-1</sup> se induce la mayor cantidad de callo (Cuadro 6).

**Cuadro 5.** Abundancia de callo en tejidos foliares de *Carica papaya* L. a los 45 d de cultivo con la citocinina 6BAP.

Concentración de 6BAP mg L <sup>-1</sup>	Abundancia de callo	Grupos DMS
0	1.00	a
1.0	1.33	ab
2.0	1.75	ab
0.5	2.33	b

Se utilizó la comparación múltiple de medias DMS  
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes  $\alpha=0.05$

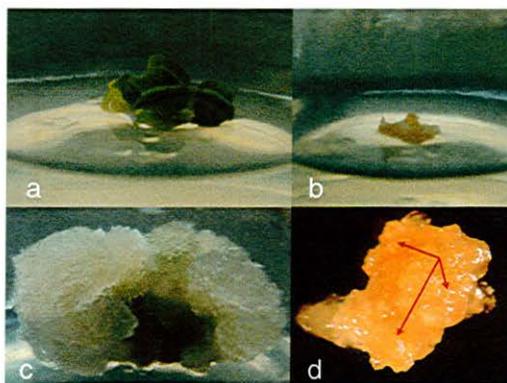
**Cuadro 6.** Abundancia de callo en tejidos foliares de *Carica papaya* L. a los 45 d de cultivo con la auxina ANA.

Concentración de ANA mg L <sup>-1</sup>	Abundancia de callo	Grupos DMS
10	1.00	a
5.0	1.25	a
0	1.41	a
1.0	2.75	b

Se utilizó la comparación múltiple de medias DMS  
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes  $\alpha=0.05$

La apariencia de los callos obtenidos a los 45 d de cultivo con ANA presentaron características de un callo embriogénico, de consistencia friable y aunado a esto el color café-crema, en dichos callos se observaron algunas estructuras proembriogénicas (Figura 3d). El color parece estar asociado con la embriogénesis, ya que la sacarosa presente en el medio estimula la formación de callos embriogénicos, además de alterar la pigmentación del callo, dando una apariencia de senescencia o necrosis; sin embargo no impide el proceso embriogénico lo cual concuerda con lo reportado por Nevenschwander y Bauman (1991).

Algunos tratamientos produjeron callos no embriogénicos de consistencia esponjosa y presentaron color blanco (Figura 3c). El tejido del control se mantuvo verde y no mostró cambios (Figura 3a), a diferencia de los otros tratamientos se presentó necrosis (Figura 3b).



**Figura 3.** Diferencias en la respuesta entre los tratamientos de callogénesis con ANA y 6BAP, a) explante sin respuesta (control), b) tejido necrosado, c) callo esponjoso y d) callo con estructuras proembriogénicas (flechas).

### 8.1.2. Experimento 2 (Picloram y 6BAP)

Se observaron diferencias altamente significativas para el regulador de crecimiento 6BAP ( $p=0.0001$ ), al realizar la comparación múltiple de medias con la prueba DMS, se encontró que dosis de 0.5, 1 y 2 mg L<sup>-1</sup> de 6BAP

fueron estadísticamente iguales (Cuadro 7). También se demostró que cualquiera de estas dosis puede inducir la formación de callos.

**Cuadro 7.** Abundancia de callo en tejidos foliares de *Carica papaya* L. a los 45 d de cultivo con la citocinina 6BAP en el experimento 2.

Concentración de 6BAP mg L <sup>-1</sup>	Abundancia de callo	Grupos DMS
0	1.00	a
0.5	1.41	b
2.0	1.58	b
1.0	1.66	b

Se utilizó la comparación múltiple de medias DMS  
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes  $\alpha=0.05$

Para el caso de Picloram, se encontraron diferencias altamente significativas ( $p=0.0003$ ), al realizar la comparación múltiple de medias con la prueba DMS, se encontró que al adicionar 5 mg L<sup>-1</sup> se produce mayor cantidad de callo (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Abundancia de callo en tejidos foliares de *Carica papaya* L. a los 45 d de cultivo con la auxina Picloram.

Concentración de Picloram mg L <sup>-1</sup>	Abundancia de callo	Grupos DMS
1.0	1.08	a
0	1.33	ab
10	1.41	b
5.0	1.83	c

Se utilizó la comparación múltiple de medias DMS  
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes  $\alpha=0.05$

A los 45 d se obtuvo poca producción de callo, pero el aspecto de ellos en la mayoría de los cultivos era similar al de callos embriogénicos, ya que presentaban el color café-crema y tenían consistencia friable.

### 8.1.3. Experimento 3 (2,4-D y 6BAP)

A los 45 d de cultivo, se encontraron diferencias altamente significativas para el factor 6BAP ( $p=0.0075$ ), al igual que para 2,4-D ( $p=0.0170$ ). Se observó al hacer la prueba de DMS que concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg L<sup>-1</sup> de 6BAP

fueron estadísticamente iguales (Cuadro 9), y que en concentraciones de 1 y 5 mg L<sup>-1</sup> de auxina la utilizada se induce la mayor cantidad de callo (Cuadro 10).

**Cuadro 9.** Abundancia de callo en tejidos foliares de *Carica papaya* L. a los 45 d de cultivo con la citocinina 6BAP en el experimento 3.

Concentración de 6BAP mg L <sup>-1</sup>	Abundancia de callo	Grupos DMS
0	1.00	a
0.5	2.16	b
1.0	2.33	b
2.0	2.33	b

Se utilizó la comparación múltiple de medias DMS  
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes  $\alpha=0.05$

**Cuadro 10.** Abundancia de callo en tejidos foliares de *Carica papaya* L. a los 45 d de cultivo con la auxina 2,4-D.

Concentración de 2,4-D mg L <sup>-1</sup>	Abundancia de callo	Grupos DMS
10	1.33	a
0	1.58	ab
1.0	2.41	bc
5.0	2.50	c

Se utilizó la comparación múltiple de medias DMS  
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes  $\alpha=0.05$

En los cultivos con 2,4-D se presentó callo abundante, pero la mayor parte era de consistencia esponjosa, tenían color blanco y en muy pocos de ellos se observaron células proembriogénicas.

#### 8.1.4. Experimento 4 (2,4,5-T y 6BAP)

Se encontraron diferencias altamente significativas en las dosis del regulador de crecimiento 6BAP ( $p=0.0003$ ), al realizar la comparación múltiple de medias con la prueba de DMS, se encontró que al adicionar 1 ó 2 mg L<sup>-1</sup> de 6BAP se produce la mayor cantidad de callo (Cuadro 11).

Para el caso de 2,4,5-T, se encontraron diferencias altamente significativas ( $p=0.0007$ ), al realizar la comparación múltiple de medias con la prueba de

DMS, se encontró que al agregar 1 mg L<sup>-1</sup> se produce mayor cantidad de callo (Cuadro 12).

**Cuadro 11.** Abundancia de callo en tejidos foliares de *Carica papaya* L. a los 45 d de cultivo con la citocinina 6BAP en el experimento 4.

Concentración de 6BAPmg L <sup>-1</sup>	Abundancia de callo	Grupos DMS
0	1.08	a
0.5	1.66	ab
2.0	2.33	bc
1.0	2.66	c

Se utilizó la comparación múltiple de medias DMS  
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes  $\alpha=0.05$

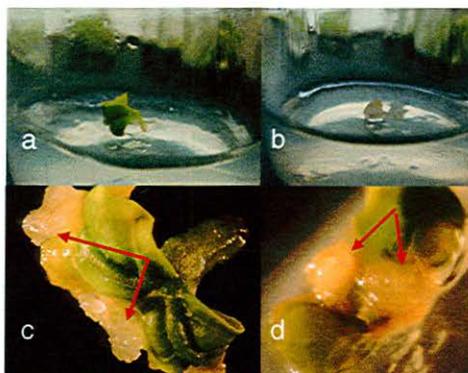
**Cuadro 12.** Abundancia de callo en tejidos foliares de *Carica papaya* L. a los 45 d de cultivo con la auxina 2,4,5-T.

Concentración de 2,4,5-T mg L <sup>-1</sup>	Abundancia de callo	Grupos DMS
10	1.16	a
5.0	1.75	ab
0	2.08	bc
1.0	2.75	c

Se utilizó la comparación múltiple de medias DMS  
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes  $\alpha=0.05$

En los callos obtenidos, se observaron estructuras proembriogénicas, algunas en la parte formada del peciolo, los callos tenían consistencia friable y algunos eran color café-crema y otros crema. Algunos presentaron necrosis y el control se mantuvo sin cambios (Figura 4).

En los experimentos 1, 2 y 4, las interacciones entre los factores auxina y citocinina resultaron altamente significativas, para el experimento 3 no se encontraron diferencias significativas en la interacción auxina-citocinina. La respuesta de cada auxina (ANA, Picloram, 2,4-D y 2,4,5-T) fue diferente al combinarse con 6BAP.



**Figura 4.** Efecto de las auxinas 2,4,5-T y 6BAP en la callogénesis a) tejido sin respuesta, b) tejido necrosado, c y d) explantes con poca respuesta a callogénesis mostrando estructuras proembrionarias (flechas).

Las concentraciones de auxina entre 1 y 5 mg L<sup>-1</sup> combinadas con concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg L<sup>-1</sup> de 6BAP son las más adecuadas para inducir la formación de callo, trabajos realizados por Chen, *et al.* (1987), Mondal *et al.* (1994), Salazar (1999) y Yang (2001) reportan dichas concentraciones.

En 1987, Chen *et al.* reportaron que el tejido foliar mostró dificultad para formar callo, en comparación con ápices y tallos que respondieron con mayor rapidez. En contraste, en el presente trabajo los explantes de tejido foliar comenzaron a formar callo dos semanas después de establecerse, lo que concuerda con Mondal *et al.* (1994) que reportaron la formación de callo en peciolo, hojas y tallos a los 10-15 d posteriores de cultivo, y mencionan que la respuesta a callogénesis depende en parte del tipo de explante utilizado.

## 8.2. Fase de inducción de embriones

### 8.2.1. Experimento 1 (ANA y 6BAP)

Con los resultados obtenidos en el experimento con 2,4,5-T y TDZ después de cuatro semanas de cultivo, se realizó un análisis de varianza evaluando el número de células proembriogénicas en un gramo de callo (peso fresco), en

donde se encontró que para el factor TDZ no hay diferencias significativas ( $p=0.7339$ ), y que el factor 2,4,5-T tampoco presenta diferencias significativas ( $p=0.8500$ ). Los cultivos pretratados con ANA durante la fase de inducción de callos dieron un promedio de 33 proembriones por 1 g de callo (peso fresco) con concentraciones de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4,5-T.

### **8.2.2. Experimento 2 (Picloram y 6BAP)**

Al cabo de 4 semanas de cultivo, los resultados obtenidos con 2,4,5-T y TDZ fueron no significativos para los factores 2,4,5-T ( $p=0.903$ ) y TDZ ( $p=0.4230$ ). Los cultivos pretratados con Picloram durante la fase de inducción de callos dieron un promedio de 64 proembriones por 1 g de callo (peso fresco).

### **8.2.3. Experimento 3 (2,4-D y 6BAP)**

En los resultados obtenidos con 2,4,5-T y TDZ, al realizar el análisis de varianza se encontró que los factores TDZ ( $p=0.7501$ ) y 2,4,5-T ( $p=0.6822$ ) no mostraron diferencias significativas. En concentraciones de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4,5-T, previamente tratados en la inducción de callos con 2,4-D se obtiene un promedio de 30 proembriones por 1 g de callo (peso fresco).

### **8.2.4. Experimento 4 (2,4,5-T y 6BAP)**

A los resultados obtenidos en el experimento con 2,4,5-T y TDZ a las cuatro semanas de cultivo, se les realizó un análisis de varianza, el cual reveló que para el factor 2,4,5-T hay diferencias altamente significativas ( $p=0.0087$ ). Al realizarse la comparación múltiple de medias con la prueba DMS, se encontró que con dosis de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4,5-T se obtiene el promedio más alto de células proembriogénicas en 1 g de callo (peso fresco), dicho promedio es de 23 (Cuadro 13). Para el factor TDZ no se encontraron diferencias significativas ( $p=0.3602$ ).

En ausencia de citocinina (TDZ) y de auxina (2,4,5-T) se obtuvo un 68% de inducción de embriones en los cultivos; con  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ en ausencia de 2,4,5-T la inducción fue de 67%; en concentraciones de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4,5-T y ausencia de TDZ, se obtuvo un porcentaje de inducción más alto que en

ausencia de 2,4,5-T, siendo este de 71%; cuando se emplearon concentraciones de 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4,5-T en combinación con 2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, se obtuvo el porcentaje de inducción de embriones más alto siendo del 81% al cabo de 4 semanas.

**Cuadro 13.** Inducción de embriones en tejidos foliares de *Carica papaya* L. a las cuatro semanas de cultivo con la auxina 2,4,5-T.

Concentración de 2,4,5-T mg L <sup>-1</sup>	Células proembriogénicas	Grupos DMS
0	4.92	a
1.0	23.30	b

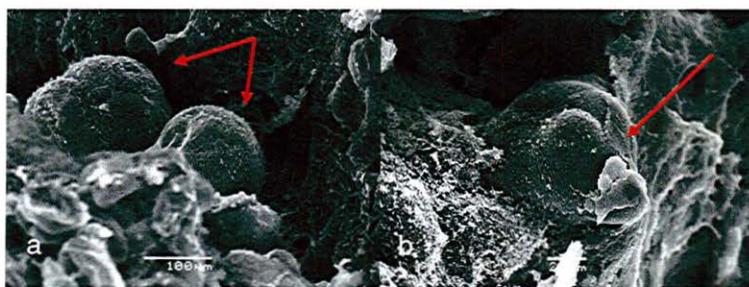
Se utilizó la comparación múltiple de medias DMS  
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes  $\alpha=0.05$

De acuerdo con Kanokwan y Boonthum (2007) los reguladores de crecimiento fueron el factor principal en la inducción de embriones. Además, se menciona que las concentraciones en la inducción son dependientes del genotipo y varían en las diferentes variedades de papaya. Salazar (1999) obtuvo el 60% de inducción de embriones con tallos de papaya en la variedad Maradol, el medio que utilizó fue el MS a la mitad de la concentración de las sales, vitaminas de SH, myo-inositol 100 mg L<sup>-1</sup>, 2 mg L<sup>-1</sup> de cinetina y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA o CPA y un pH de 5.7. Cabrera-Ponce *et al.* (2000) reportan 51% de inducción, dicho porcentaje se obtuvo a partir de embriones cigóticos inmaduros de papaya Maradol, el medio de cultivo utilizado fue el MS a la mitad de su concentración suplementado con myo-inositol 2.5 g L<sup>-1</sup>, glicina 0.1 g L<sup>-1</sup>, tiamina 0.005 mg L<sup>-1</sup>, glutamina 0.4 g L<sup>-1</sup>, ácido 2,4-D 10 mg L<sup>-1</sup>, sacarosa 6%, agar 0.8% y pH 5.8.

En el presente trabajo el porcentaje de inducción de embriones en la variedad Maradol fue más alto (81%) que el reportado por Salazar (1999) y Cabrera-Ponce *et al.* (2000), en variedades hawaianas el porcentaje de inducción fue más bajo entre 40 y 50% según lo reportado por Fitch y Manshardt (1990).

### 8.3. Microscopía Electrónica de Barrido

Al observar las muestras de callo tomadas de los pretratamientos con ANA, Picloram, 2,4-D y 2,4,5-T en el microscopio electrónico se observaron complejos proembriogénicos en algunas partes del callo, mayormente localizados en la periferia del callo y otros en la parte interna. Embriones somáticos de *Carica papaya* L. fueron originados de las células superficiales de los complejos proembriogénicos localizados en la periferia y en las regiones internas del callo. (Juliana *et al.*, 2001). También reportan que los embriones somáticos aparecieron asociados con el callo en tres maneras diferentes: a) embriones somáticos en número de uno, dos o más unidos por las bases de los complejos proembriogénicos, b) embriones somáticos aislados mostrando una estructura suspensora; c) embriones somáticos aislados con la porción basal ampliamente unida al callo (Juliana *et al.*, 2001). En el presente trabajo se observaron complejos proembriogénicos y estructuras proembriogénicas aisladas en el callo, lo que concuerda con lo mencionado anteriormente. Las estructuras proembriogénicas encontradas en el callo previamente tratado con 2,4,5-T eran de mayor tamaño que las células circundantes, presentaban forma globular (Figura 5a), protodermis y en algunas de ellas se observaban hendiduras (Figura 5b), tal vez dicha hendidura sea debido a que las estructuras se encontraban en desarrollo y estuvieran pasando del estado globular al estado de corazón.



**Figura 5.** Microscopía electrónica de callos de *Carica papaya* L. provenientes del pretratamiento con 2,4,5-T a) complejos proembriogénicos (flechas) b) estructura proembriogénica que presenta hendidura (flecha) (barra =20 µm).

#### **8.4. Fase de maduración de embriones**

Después de seis semanas de cultivo no se observaron cambios en los cultivos durante la fase de maduración, los callos con células proembriónicas se mantuvieron igual que en la fase de inducción de embriones. Probablemente necesitan más tiempo para desarrollarse y madurar, posiblemente la transferencia a nuevos medios de cultivo debe ser en lapsos de tiempo menores, cada tres semanas aproximadamente, y eliminar el callo no embriónico, además de cultivar solo el material biológico de calidad según lo reportado por (Cabrera-Ponce *et al.*, 2000). Sería conveniente la adición de reguladores de crecimiento como ABA, dar un choque osmótico o cambiar las condiciones de incubación a oscuridad como lo han reportado Fitch (1993) y Juliana *et al.* (2001), entre otros.

## 9. CONCLUSIONES

Las concentraciones de auxinas como ANA y 2,4,5-T entre 1 y 5 mg L<sup>-1</sup> combinadas con 0.5, 1 y 2 mg L<sup>-1</sup> de 6BAP son las más adecuadas para la inducción de callos, ya que con éstas se obtiene la mayor cantidad de callo.

Al adicionar el regulador de crecimiento 6BAP al medio de cultivo se favorece la inducción de callos.

El explante de tejido foliar responde a la inducción de callos.

El color café-crema del callo está asociado con la embriogénesis, aunque tiene un aspecto de senescencia o necrosis no impide el proceso embriogénico.

Los cultivos pretratados con Picloram durante la fase de inducción de callos, muestran mayor eficiencia en la inducción de embriones a concentraciones de 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4,5-T. En ausencia de TDZ y 2,4,5-T la respuesta se mantiene constante, por lo tanto, el pretratamiento influye en la inducción de embriones.

En concentraciones de 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4,5-T en combinación con 2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, se obtuvo un 81% de inducción de embriones.

Los complejos proembriogénicos se originan en su mayoría en la periferia y en la región interna del callo, observando lo anterior con Microscopía Electrónica de Barrido.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abdelnour, E.A. y E.J. Vicent. 1993. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Apuntes del curso de "Micropropagación vegetal de especies tropicales". Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIES). Turrialba, Costa Rica. pp. 25.
- Ascencio, C.A., P.H. Gutierrez, y G.B. Rodríguez. 2008. Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin, *Scientia Horticulturae* 118:155-160.
- Azpeitia, M. 1996. Embriogénesis somática en papaya a partir de embriones cigóticos inmaduros. Novena Reunión Científica Tecnológica. pp. 32-34.
- Baldillo, V.M. 2002. *Carica* L. vs *Vasconcella* St. Hill (Caricaceae) con la rehabilitación de éste último. *Ernstia* 10: 74-79
- Bewley, J.D. y M. Black. 1985. *Seeds: Physiology of development and germination*. Plenum Press. New York. 367 pp.
- Bhattacharya, J., S.S. Khuspe y N.N. Renukdas. 2000. 2,4,5-T induced somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Applied Horticulture* 2: 84-87.
- Bhattacharya, J., S.S. Khuspe, N.N. Renukdas y S.K. Rawal. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo explants of papaya cv. Washington and honey dew. *Indian Journal of Experimental Biology* 40: 624-627.
- Bhau, B.S. y A.K. Wakhulu. 2001. Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66 (1):25-29.
- Cabrera-Ponce, J.L., G. Sánchez, P. Tellez, M. Pons y L. Herrera. 2000. Embriogénesis somática en la papaya (*Carica papaya* L.): un método para la micropropagación y transformación genética. *Hort. Mex.* 8 (2): 164-174.
- Chen, M., Wang, y P.E. Maeda. 1987. Embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. *Plant Cell Reports* 6: 348-351.

- Chen, R., P. Hilson, J. Sedbrook y E. Rosen. 1998. The *Arabidopsis thaliana* AGRAVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Plant Biology 95 (25): 15112-15117.
- Copeland, L.O. y M.B. McDonald. 1995. Principles of seed science and technology. 3ª edición. Chapman & Hall, New York. 409 p
- Davis, P.J. 1995. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions, En: Plant Hormones: physiology, biochemistry, and molecular Biology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 1-5.
- Durán, R., M. Méndez y R. Orellana. 1997. Manual de propagación de plantas nativas de la península de Yucatán. CICY. México. pp. 13-25.
- Eckardt, N. A. 2001. New insights into auxin biosynthesis. Plant Cell Reports 13: 1-3.
- Eno A.E., O.I. Owo, E.H. Itam y R.S. Konya. 2000, Blood pressure depression by the fruit juice of *Carica papaya* (L.) in renal and DOCA-induced hypertension in the rat. Phytotherapy Research Journal 14 (4): 235-9
- FAO. 2004. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Disponible en: [www.fao.org](http://www.fao.org) Revisado: 24/Julio/08
- FAO. 2005. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Date base [www.fao.org](http://www.fao.org). Revisado: 24/Julio/08
- FAO. 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Date base [www.fao.org](http://www.fao.org). Revisado: 25/Julio/08
- Fitch, M.M.M, y R.M. Manshardt. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). Plant Cell Reports 9: 320-324
- Fitch, M.M.M. 1993. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 32: 205-212.
- Fuentes Cerda, C.F.J. 2001. Embriogénesis somática directa a partir de explantes foliares de plántulas cultivadas *in vitro* de *Coffea arabica* L.

- Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 70 p.
- Gómez, K.R. 1998. Embriogénesis somática, En: Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 57-79
- Gray, D.J. 1997. Synthetic seed for clonal production of crop plants. En: R.B. Taylorson (ed.) Recent Advances in the Development and Germination of Seeds. pp. 29-45.
- Guilfoyle, T., G. Hagen, T. Ullmasov y J. Murfett. 1998. How does auxin turn on genes? *Plant Physiology* 18: 341-347.
- Halperin, W. 1996. Alternative morphogenic events in cell suspensions. *American Journal of Botany* 53:443-453.
- Hobbie, L.C. Timpte y M. Estelle. 1994. Molecular genetics of auxin and cytokinin. *Plant Molecular Biology* 26: 1499- 1519.
- Hurtado, D. y M. Merino. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México. pp. 93-100.
- Juliana, A.F., M. Murilo, K.M. Marli y A. Beatriz. 2001. Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44 (3): 247-255.
- Kanokwan, R. y M. Boonthum. 2007. Revised protocols for high efficient transformation and regeneration of somatic embryos of papaya (*Carica papaya* L.), *Acta Horticulturae* 740: 147-152.
- Linné Von, C. 1753. Descripción original de la especie *Carica papaya*, *Species Plantarum*, 2: 1036.
- Litz y Conover, R.A. 1977. Tissue culture propagation of papaya. *Selected Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 90: 245-246.
- López, P.C. 1990. Medios de cultivo. En: Fundamentos Teórico-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Eds Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos A. FAO. Roma. pp 15-19
- Lozoya, S.H. 1990. Embriogénesis somática En: Fundamentos Teórico-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Eds. Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos A. FAO. Roma pp 33-36.
- McKersie, B.D. y D.C.W. Brown. 1996. Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. *Seed Science Research* 6: 109-126.

- McKersie, B.D. y S.R. Bowley. 1993. Synthetic seed of alfalfa. En: K. Redenbaugh (ed.) Synseeds: Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press. pp. 231-255.
- Minorsky, P.V. 2001. Tribute to Folke Skoog, *Plant Physiology* 125 (4): 1546-1547.
- Mondal, M., S. Gupta y B.M. Baran. 1994. Callus culture and plantlet production in *Carica papaya* (Var. Honey Dew), *Plant Cell Reports* 13: 390-393.
- Monmarson, S., M.N. Michaux-Ferrieri y C. Teisson. 1995. Production of high frequency embryogenic calli from integuments of immature seeds of *Carica papaya* L., *Japanese Society for Horticultural Science* 70: 57-64.
- Morton J. 1987. Papaya. En: *Fruits of warm climates*. Morton J., Ed Miami, EUA, 203-212.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiology* 15: 473-479.
- Nevenschwander, B. y Bauman. 1991. A novel type of somatic in *Coffea Arabica*. *Plant Cell Reports* 10: 608-612.
- Nomura, K. y A. Komamine. 1999. Physiological and morphological aspects of somatic embryogenesis Chapter 5 in *Morphogenesis in Plant Tissue Culture*. pp. 115-131.
- OGTR Office of the Gene Technology Regulator. 2003. The biology and ecology of papaya (paw paw), *Carica papaya* L., in Australia. OGTR. Australia. 18 p.
- Parrot, W. 1993. Cell culture techniques. En: *Biotechnology applications for banana and plantain improvement*. Reunión INIBAP (1992, San José Costa Rica). Proceedings. Montpellier, France. pp. 183-191.
- Pérez, M.B.E.M., M.R. Ramirez, P.H.G. Nuñez, y A.N. Ochoa. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. FOMES 97-1-5- pp. 51-69-
- Pierik R.L. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa. España. pp 209-215.

- Redenbaugh, K. 1993. Synseeds: Application of seeds to crop improvement. Boca Raton, Fla. CRC Press. 481 p.
- Renukdas, N.N., M.L. Mohan, S.S. Khuspe y S.K. Rawal. 2003. Influence of boron on somatic embryogenesis in papaya, *Biologia Plantarum* 47 (1): 129-132.
- Righetti, B., E. Magnanini, R. Infante y S. Pedreri. 1990. Ethylene, ethanol, acetaldehyde and carbon dioxide released by *Prunus avium* shoot cultures. *Plant Physiology* 78: 507-510.
- SAGARPA. 2005. Siembras y cosechas perennes 2004. Cultivo Papaya. Disponible en: [www.sagarpa.mx](http://www.sagarpa.mx) Revisado: 30/Julio/08
- SAGARPA. 2007. Siembras y cosechas perennes 2007. Cultivo Papaya. Disponible en: [www.sagarpa.mx](http://www.sagarpa.mx) Revisado: 30/Julio/08
- Salazar R.A. 1999. Establecimiento y cultivo *in vitro* del papayo (*Carica papaya L.*) cv. Maradol. Tesis. Instituto Tecnológico Agropecuario N°2 Conkal Yucatán. 48p
- Salisbury, F.B. y C.W. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamericana. pp. 293-317, 395-451.
- Schenk, R. y A. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneous and dicotyledoneous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
- Sitbon, F. y C. Perrot – Rechenmann. 1997. Expression of auxin- regulated genes. *Plant Physiology* 100: 443-455.
- Tisserat, B. 1991. Embryogenesis, organogènesis and plant regeneration. En: *Plant Cell Culture. A practical approach*. R. A. Dixon ed. Irl press. Oxford, England. pp. 79-105.
- Weaver, J.R. 1990. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Editorial Trillas. Séptima reimpresión. pp.9-40.
- Yang, J.S. 2001. Papaya somatic embryo induction from fruit-bearing field plants: effects of root supporting material and position of the root explants. Finland. *Acta Horticulturae* 560: 345-351. IV International symposium on *in vitro* culture and Horticultural breeding.