

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE AGRONOMIA

Departamento Académico de Ciencias Agrarias



“INDUCCIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS DE SEMILLAS

INMADURAS DE PAPAYO (*Carica papaya* L.)”.

TESIS

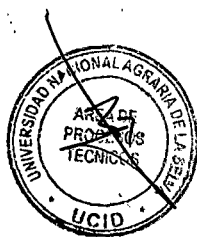
Para optar al título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

CABRERA MEZA, Percy

Tingo María - Perú

2013



F30

C13

Cabrera Meza, Percy

Inducción de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (*Carica papaya* L.). - Tingo María, 2013

76 páginas.; 21 cuadros; 06 figuras.; 29 ref.; 30 cm.

Tesis (Ingeniero Agrónomo) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Agronomía.

1. CALLOS

2. TRATAMIENTO

3. INDUCCIÓN

4. EMBRIOGÉNICOS

5. PAPAYO

6. SEMILLAS

DEDICATORIA

A Dios, porque siempre está conmigo, y me da aliento en momentos de dificultad.

A mi madre Felicia Meza de Cabrera que es el motivo de mi vida.

A mi padre Eloy T. Cabrera Barrios (QPD), porque desde el cielo, aún sigue velando por mí.

A mis hermanos, Jaime, Carlos, Ana, Darío, Roberto y Mercedes; y mi sobrino Joseph, por todo el apoyo que me dan.

AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en especial a la Facultad de Agronomía que contribuyo en mi formación profesional.
- Al Blgo Julio Chía Wong por su valiosa colaboración y supervisión en el desarrollo de la Tesis.
- A los miembros del Jurado de Tesis, Ing. Carlos Carbajal Toribio, Ing. Luis García Carrión e Ing. Luz Elita Balcázar Terrones, por su colaboración en el presente trabajo.
- A mi amiga Marycielo Córdova Santisteban, por brindarme su ayuda en la ejecución de la presente Tesis.
- A Linda Liz Lino Ferrer por sus palabras de aliento, consejos y enseñanzas.
- A Geraldine Sánchez Carbajal, por brindarme su comprensión, cariño incondicional y su compañía en momentos de soledad.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. REVISIÓN DE LITERATURA	12
2.1. Generalidades del cultivo del papayo.....	12
2.1.1. Origen	12
2.1.2. Clasificación taxonómica.....	13
2.1.3. Descripción botánica.....	13
2.1.4. La semilla.....	14
2.2. Biotecnología.....	16
2.2.1. El cultivo de tejidos	17
2.2.2. Factores que influyen en la adquisición de capacidad embriogénica.....	21
2.2.3. Aplicaciones de la embriogénesis somática.....	23
2.2.4. Células proembriogénicas.....	24
2.3. Antecedentes.....	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Lugar de ejecución	28
3.2. Materiales y equipos.....	28
3.2.1. Material vegetativo.....	28
3.2.2. Equipos	28
3.2.3. Reactivos	29
3.2.4. Insumos.....	29

3.3. Metodología.....	30
3.3.1. Obtención del material vegetativo.....	30
3.3.2. Preparación del medio de cultivo.....	30
3.3.3. Transferencia (subcultivos) de los callos (Segunda etapa)....	32
3.4. Efecto del 2,4-D en la formación de callos embriogénicos en semillas inmaduras de papayo de dos edades (ensayo 1)	33
3.4.1. Primera etapa.....	33
3.4.2. Segunda etapa.....	36
3.5. Efecto de la combinación del 2,-D y AIA en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (Ensayo 2)	37
3.5.1. Factores en estudio en el ensayo 2	37
3.5.2. Diseño experimental para el ensayo 2.....	37
3.5.3. Descripción del ensayo 2	37
3.6. Efecto de la combinación del 2,4-D y KIN en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (Ensayo 3)	38
3.6.1. Factores en estudio en el ensayo 3	38
3.6.2. Diseño experimental para el ensayo 3.....	38
3.6.3. Descripción del ensayo 3.....	38
3.7. Cálculos para el medio Murashige y Skoog (1962).....	39
3.8. Parámetros a evaluar en los ensayos.....	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1. Efecto del 2,4-D en la formación de callos pembrigenicos en semillas inmaduras de papayo de dos edades (Ensayo 1).....	42
4.1.1. Primera etapa.....	42

4.1.2. Segunda etapa.....	59
4.2. Efecto de la combinación del 2,4-D y AIA en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (Ensayo 2)	64
4.3. Efecto de la combinación del 2,4-D y KIN en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (Ensayo 3)	65
V. CONCLUSIONES.....	67
VI. RECOMENDACIONES.....	68
VII. RESUMEN.....	69
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	71
IX. ANEXO	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Composición del medio MS basal	31
2. Reactivos y volúmenes para la preparación de medio de cultivo ½ MS del ensayo 1, 2 y 3.....	39
3. Porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos en el tubo de ensayo.....	41
4. Análisis de variancia para el tiempo de formación de callos	42
5. Resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el tiempo de formación de callos	43
6. Resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales, en el tiempo de formación de callos.....	45
7. Análisis de variancia para los efectos simples en el tiempo de formación de callos	46
8. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (A en b_1 y b_2) en el tiempo de formación de callos.....	47
9. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (B en a_1 y a_2) en el tiempo de formación de callos.....	48
10. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (B en a_3 y a_4) en el tiempo de formación de callos.....	49
11. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (B en a_5 y a_6) en el tiempo de formación de callos.....	49

12.	Análisis de variancia para el porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos.....	50
13.	Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos.....	51
14.	Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el efecto principal, del porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos	53
15.	Análisis de variancia para los efectos simples del porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos.....	54
16.	Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (A en b_1 y b_2) del porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos.....	55
17.	Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (B en a_5 y a_6) del porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos.....	55
18.	Análisis de variancia para el tiempo de aparición de las estructuras proembrionarias	59
19.	Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el tiempo de aparición de estructuras proembrionarias	60
20.	Análisis de variancia para el numero de estructuras proembrionarias .	62
21.	Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el numero de estructuras proembrionarias	63
22.	Presencia de callos por tratamiento en el ensayo 1	77
23.	Presencia de organogénesis por tratamiento en el ensayo 1.....	78
24.	Contaminación por tratamiento en el ensayo 1	78

INCIDE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos T ₁₀ (a) y T ₁₂ (b).....	52
2. Presencia de organogénesis en los tratamientos en estudio	56
3. Organogénesis en los tratamientos T ₁ (a), T ₂ (b) y T ₄ (c).....	56
4. Presencia de contaminación en los tratamientos en estudio.....	58
5. Contaminación en los tratamientos en estudio.....	59
6. Estructuras proembrionarias de los tratamientos T ₄ y T ₅	64
7. Presencia de callos por tratamientos en el ensayo 1	77

I. INTRODUCCIÓN

El papayo (*Carica papaya L.*) por su alto consumo en el mercado nacional, es un cultivo de buena aceptación para los agricultores, ya que les permite obtener ganancias. En los últimos años su cultivo en nuestra región se ha visto limitada, sobre todo por la falta de tolerancia a plagas y enfermedades, tal es el caso del virus de “la mancha anillada de la papaya” (PRSV), cuya presencia produjo muchas pérdidas económicas y casi la desaparición o no uso de este cultivo por parte de los agricultores.

Debido a estas circunstancias se han emprendido trabajos para la búsqueda de variedades tolerantes al virus, tal es el caso que al realizar el cruce de *Carica papaya* (susceptible a PRSV) con una variedad tolerante como *Vasconcellea stipulata*, que son sexualmente incompatibles, se puede obtener embriones que se desarrollan por 1 ó 3 meses después de la polinización, abortando generalmente a este tiempo, debido a que el endosperma no se desarrolla (GUTIERREZ, 2008).

Viendo estos problemas, la embriogénesis somática, es una buena alternativa, ya que representa un método eficiente para la regeneración masiva de plantas con características favorables, para una mejor producción. Actualmente, la embriogénesis ha sido reportada en muchas variedades de cultivos, debida a la dificultad que existe para regenerar explantes de tejidos por otras vías, como la organogénesis, por el alto contenido de compuestos fenolicos.

El desarrollar un protocolo eficiente de regeneración de cultivos celulares de variedades de papayo vía embriogénesis abre la posibilidad de poder resolver con mayor rapidez y eficacia algunos de los problemas de éste cultivos. Además, traería beneficios indirectos como el poder realizar rescate de embriones, para especies cuyas semillas demoran mucho tiempo en producirse o de aquellos cruces de especies cuyo embriones no se desarrollan, para la conservación de especies en riesgo de erosión genética, para producir semillas artificiales con características de buena producción en el menor área y tolerantes a enfermedades y plagas etc.

Lo antes expuesto, nos permite plantear la hipótesis de que es factible establecer el proceso de embriogénesis en nuestras condiciones con el uso de auxinas. Para cumplir con este trabajo se tuvo como meta principal el de desarrollar el proceso de inducción de callos embriogénicos en semillas inmaduras de papayo, utilizando un balance hormonal (fitoreguladores), teniendo como objetivos:

- Determinar la mejor respuesta de los reguladores 2,4-D (ácido 2,4 dicloro fenoxiacético), AIA (Ácido indol acetico) y KIN (Kinetina) en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cultivo del papayo

2.1.1. Origen

El papayo (*Carica papaya L.*) es originario de América tropical; sin embargo, el centro del origen botánico de la especie cultivada no ha sido establecido con exactitud. Algunos autores consideran a las Antillas como su centro de origen y otros a México, América central y aún a Perú, como lugares de donde proviene la esta especie (CARBAJAL, 1993). Esta afirmación es ratificada por los reportes de INFOAGRO (2001), quienes mencionan que este fruto es nativo de América tropical, aunque no se han encontrado en este ámbito formas silvestres de esta especie, en cambio, se han hallado formas primitivas de otras especies de Caricáceas en las regiones tropical y subtropical de Centroamérica, como de Sudamérica.

Publicaciones más antiguas como la de Ibar (1979) citado por CARBAJAL (1993), en sus estudios sobre el centro de origen de muchas plantas, sitúan al Perú como la cuna del papayo, gracias a informaciones orales de colonos de la selva central del Perú, quienes observaron que las tribus nativas ya conocían y cultivaban el papayo junto con otras plantas. En la actualidad, el papayo se cultiva en forma comercial no solo en las regiones de América, sino también en África, Asia, Australia, Filipinas, y en Estados Unidos (Hawái y Florida) (CAÑAS, 2001).

2.1.2. Clasificación taxonómica

Ibar (1979), citado por CARBAJAL (1993), señala que el papayo tiene la siguiente clasificación:

Reino	:	Vegetal
División	:	Angiosperma
Clase	:	Dicotiledónea
Orden	:	Parietales
Familia	:	Caricáceas
Género	:	Carica
Especie	:	<i>Carica papaya</i> L.

2.1.3. Descripción botánica

La especie *Carica papaya*, es una planta siempre verde de crecimiento muy rápido el tallo es herbáceo fistulado y con un látex lechoso (FRANCIOSI, 1992; Ibar (1979), citado por CARBAJAL, 1993). El sistema radicular es pivotante con una raíz principal bastante desarrollada y profunda. La mayor concentración de raíces se encuentra en los primeros 30 cm del suelo; el desarrollo lateral de las raíces del papayo es muy vigoroso por lo que se debe tener bastante cuidado al momento de fertilizar o cultivar el suelo (INFOAGRO, 2001).

Las hojas son grandes, simples, alternas, largamente pecioladas palmitilobadas (con 7, 9 u 11 lóbulos) y con nervaduras prominentes. Tanto el peciolo como las nervaduras principales son fistulados. Las hojas se distribuyen a lo largo del tallo en forma alternada, las más tiernas se

encuentran en la parte terminal y tienen un color verde claro característico. Las hojas adultas se localizan en un plano inferior y en la parte más baja de él se observa hojas inactivas, viejas y secas (OIRSA, 2002).

Las flores masculinas se unen en inflorescencia compuesta racimosa; las femeninas forman inflorescencias en dicario, unas y otras se originan en la axila de las hojas (PESTANO, 2001).

El fruto es una baya ovoide forma esférica o esférico-periforme, la pulpa es de color amarillo anaranjado o rojizo succulento, aromático dulce o ligeramente insípida. En su interior presenta una cavidad circular o estrellada que alberga gran número de semillas pequeñas, ovaladas o esférica de unos dos milímetros de diámetro y de color negro o gris oscuro, rodeadas por un arilo jugoso. El color de la pulpa varía de amarillo oro hasta rojo salmón (FRANCIOSI, 1992 y PESTANO, 2001).

2.1.4. La semilla

La semilla es el producto del óvulo fertilizado, que en las angiospermas se forma dentro del ovario, y es el resultado de la reproducción sexual. La forma de las semillas está determinada por el tipo de óvulo del que se han originado y su posición dentro del fruto. El tamaño está determinado por la posición que guardan las semillas dentro del fruto y por la cantidad de nutrimentos que reciban durante su ontogenia. El hilo es una cicatriz que queda en la semilla cuando ésta se desprende del funículo. El micrópilo es una perforación a manera de canal que comunica a la semilla con el exterior y es el

lugar por donde penetra el tubo polínico hacia el saco embrionario. El rafe es la costura longitudinal de la semilla formada en la parte en que el funículo se unía al rudimento seminal. El funículo es el filamento que une el rudimento seminal con la placenta, formado principalmente por tejido vascular y que sirve de puente para el paso de agua y nutrientes de la planta madre a la semilla durante su desarrollo (BECERRA y CHAPARRO, 1999).

Las semillas de las angiospermas pueden dividirse en tres partes, de origen genéticamente diferente: la cubierta seminal o testa, el endospermo y el embrión. La cubierta seminal es la estructura que rodea y protege a las partes internas de la semilla de daños físicos y bióticos procedentes del exterior (GIL y MIRANDA, 2005).

El endospermo es un tejido de almacenamiento que se origina a partir de la fusión de uno de los núcleos espermáticos del tubo polínico con dos o más núcleos polares del saco embrionario, dando como resultado un tejido triploide o poliploide. El embrión de las angiospermas consta de un breve eje que lleva uno o dos cotiledones u hojas embrionales (BECERRA y CHAPARRO, 1999). La polaridad del embrión define un eje sobre el cual se elabora el cuerpo de la planta. Una compartimentación temprana parece involucrar la creación de tres dominios espaciales a lo largo del eje longitudinal del embrión: el dominio apical, compuesto por los cotiledones, el eje embrionario y el epicótilo; el dominio central, que incluye a la mayoría del hipocótilo, y el dominio basal, que consiste principalmente en la radícula (GIL y MIRANDA, 2005).

a. Germinación y emergencia

Dependiendo de las condiciones ambientales y de la calidad de la semilla, la germinación ocurre entre los 5 y 8 días de la siembra, y las plántulas emergen entre los 15 y 20 días después, momento en el cual pueden presentar dos hojas verdaderas. Treinta días después logran una altura de 15 a 20 cm a partir de su base. En esta etapa de desarrollo se realiza el trasplante al sitio definitivo (PESTANO, 2001).

2.2. Biotecnología

Para BROWN y THORPE (1995), el término biotecnología se utilizó y utiliza ampliamente, sobre todo enfocado en mayor medida a las técnicas moleculares usadas para modificar la composición genética de una planta. También, se ha descrito como el uso de organismos vivos o procesos biológicos para producir sustancias o procesos útiles para el hombre.

La biotecnología agrícola permite tener un gran potencial para el desarrollo de prácticas agrícolas más sustentables, como: plantas que puedan expresar proteínas con un efecto insecticida, reduciendo sustancialmente el uso de insecticidas comerciales. Además la biotecnología permite el uso de la ingeniería genética en plantas, que puede ser una importante herramienta para producir variedades, que expresen uno o más genes de resistencia a diferentes factores como: climas, tolerancia a sales y pH bajos, ataque de plagas y enfermedades etc., y de esta manera incrementar al abasto mundial de alimentos (HARLANDER, 2002).

2.2.1. El cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos dentro de la biotecnología, se define como el cultivo de todo tipo de órganos, tejidos, células, embriones y protoplastos bajo condiciones aseptia adecuada (CONICYT, 2007). El cultivo de tejidos comprende una gama de técnicas, métodos y estrategias in vitro que son parte del grupo de tecnologías llamadas biotecnología de plantas. El cultivo de tejido ha sido utilizado para crear variabilidad genética, mejorar la sanidad y para incrementar el germoplasma disponible. Actualmente, los protocolos de cultivo de tejidos están disponibles para la mayoría de las especies aunque continua optimizándose. Las técnicas de cultivos de tejidos en combinación con técnicas moleculares han sido utilizadas para incorporar características a las plantas a través de la transformación genética. Las técnicas in vitro para el cultivo de protoplastos, anteras, microesporas, óvulos y embriones han sido utilizadas para crear una mayor variabilidad genética y generalmente para la producción de haploides. El cultivo de tejidos de plantas tiene un importante rol en estudios básicos y aplicados, incluyendo el mejoramiento genético y son una herramienta que, junto con otros métodos biotecnológicos, permiten modificar y mejorar las plantas cultivadas (BROWN y THORPE, 1995). Dentro de las técnicas de cultivo de tejidos se encuentran:

a. Cultivo de embriones

Es una de las primeras técnicas de cultivo de tejidos aplicadas al mejoramiento de plantas, consiste en extraer el embrión de una semilla y posteriormente desarrollarlo bajo condiciones asépticas e in vitro hasta que desarrolle una planta completa para poder trasplantarlo. El principal

propósito del cultivo de embriones, es el de recuperar plantas (embriones) durante pruebas de hibridación sexual entre plantas de variedades cultivadas y especies distantes entre sí (HARLANDER, 2002).

b. Embriogénesis Somática

En varias especies de plantas, en complemento con la formación de embriones sexuales (embriogénesis cigótica), existe otra alternativa posible. La formación de embriones a partir de células somáticas (embriogénesis somática). Varios tipos de embriogénesis han sido definidos:

- Androgénesis: embriones originados de microsporas;
- Partenogénesis: embriones originados de células sexuales femeninas no fecundadas;
- Ginogénesis: embriones originados de óvulos fecundados (solo estimulación) pero cuyo cromosoma no se ha unido (SHARP *et al.*, 1982).

La embriogénesis *in vitro* tiene gran potencial en estudios experimentales y es ampliamente usada en la investigación cuando se necesita resolver problemas genéticos de plantas, ingeniería genética, prácticas de mejoramiento, para estudiar la modulación de la expresión de los genes requeridos en el desarrollo de embriones en estado temprano para investigar los procesos de diferenciación que se dan en la formación de plantas completas a partir de una célula (FEHER *et al.*, 2003). La embriogénesis somática *in vitro* también se ha considerado como un avance en las técnicas de micropropagación, aunque todavía presenta problemas en la reconversión a planta comparada con la organogénesis (CONICYT, 2007).

La embriogénesis somática fue descrita por primera vez en plantas de zanahoria ((FREIRE, 2003), cuando se observó el desarrollo de estructuras embriogénicas *in vitro*. Comenzando con el desarrollo globular de embriones somáticos, que después se transformaron en embriones en estado de corazón, posteriormente estado de torpedo y finalmente germinaron produciendo plantas fértiles. Los factores que afectan esta frecuencia de eventos fueron estudiados en detalles y optimizados, resultando protocolos con alta producción de embriones bien desarrollados. Debido a la perfección del protocolo, el cultivo en suspensión de células somáticas de zanahoria se usó como el modelo favorito en el estudio de mecanismos embriogénicos (FEHER *et al.*, 2003).

- **Morfología de la embriogénesis somática.** En el caso de las dicotiledóneas, un embrión somático es morfológicamente similar a un embrión cigótico, sobre todo en su desarrollo evolutivo desde proembrión, fase globular, corazón, torpedo y fase cotiledonal o embrión maduro (LITZ *et al.*, 1998). En los estados iniciales, el suspensor está en menor desarrollo en embriones somáticos (puede ser quizás un reflejo de inutilidad bajo condiciones *in vitro*). Otra diferencia importante es que el embrión cigótico forma un eje embrional con el meristemo apical, preparándose para la dormancia. Mientras que el embrión somático no sufre desecación ni dormancia, así la embriogénesis somática se dirige a formar de una célula, una planta sin interrupción (MERCKLE *et al.*, 1990).
- **Embriones Somáticos.** Son estructuras bipolares que cuentan con un eje radical y otro apical, cotiledones, no poseen conexión vascular con el

tejido materno y presentan bandas procambiales entre los ápices (FREIRE, 2003). Su desarrollo es nutrido por células vecinas a través de conexiones protoplasmáticas. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales, debido a la naturaleza bipolar del embrión, es posible la alta velocidad de multiplicación (SHARP *et al.*, 1982).

- c. **Embriogénesis somática directa.** Especialmente en ausencia de auxinas exógenas, está asociada con un período relativamente corto entre el tiempo de la iniciación cotiledonal y el comienzo de la maduración de los embriones. Durante este tiempo, en el explante aparece una clonación directa, desarrollándose así células embriogénicas en un estado temprano. Del amplio espectro de aplicaciones y condiciones asociadas con la embriogénesis, se busca enfatizar más, en sistemas basados en embriones cigóticos o explantes con embriogénesis somática directa. Este proceso es conocido como clonación embrionaria. Se supone que estos explantes están compuestos principalmente de células que requieren una menor epigenética para programar la expresión al estado embriogénico. (MERKLE *et al.*, 1990). Dentro de los factores que limitan la embriogénesis directa se encuentra la plasmólisis de las células explantadas. Este factor se cree que afecta el estado epigénico de las células y puede ser explicado por su capacidad de interrumpir las interacciones célula-célula requerida para mantener coordinados los patrones de desarrollo (FLORES y ABDELNOUR, 2000).

- **Embriogénesis somática secundaria.** El poder de las técnicas de clonación de embriones y su explotación para: propagación, producción de metabolitos, ó transformación genética tienen como base la embriogénesis recurrente ó también llamada repetitiva, accesoria, proliferante ó secundaria. Esta ocurre cuando embriones somáticos primarios fallan, para madurar normalmente hasta plántulas y en lugar de eso dan origen a ciclos sucesivos de embriones somáticos, que provienen comúnmente de células superficiales de los cotiledones ó hipocotilo (MERKLE *et al.*, 1990).

- **Fases de la embriogénesis somática**
 - Inducción de embriogénesis somática
 - Proliferación y mantenimiento de embriones somáticos
 - Maduración de embriones somáticos
 - Germinación de embriones somáticos

2.2.2. Factores que influyen en la adquisición de capacidad embriogénica

La adquisición de capacidad embriogénica en plantas mayores se debe a varios factores intra y extracelular (ROCA y MROGINSKI, 1991). Se conocen diferentes factores químicos y ambientales que influyen en la embriogénesis somática.

- **Tipo de explante.** La Embriogénesis somática ha sido inducida a partir de una gran variedad de explantes de plantas, generalmente de embriones

cigóticos, semillas germinadas, embriones inmaduros, cotiledones, brotes meristemáticos, inflorescencias inmaduras, óvulos, microesporas, hojas, estigma, estilo, células de raíz, embriones somáticos inmaduros y en algunas especies a partir de Nucelas.

- **Hormonas.** La adquisición de totipotencia es el paso más crítico en la embriogénesis somática y el factor más importante que la afecta, es la aplicación de hormonas endógenas, debido a que el uso de auxinas a altas concentraciones es necesario para causar la desdiferenciación y la estimulación de la totipotencia, varias auxinas han sido usadas para este propósito: la auxina natural Acido indol acético (AIA) y otras sintéticas como el ácido naphthalenacetico (ANA), plicoram, ácido picolínico y cinetina. El ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) no es considerada químicamente una axina, pero tiene un comportamiento auxinico (LITZ *et al.*, 1998). El 2,4 -D es la auxina más eficiente y la más comúnmente usada para la promoción de embriogénesis somática ya que:
 - Estimulan una rápida división celular.
 - Estimulan una división celular sincronizada que da como resultado células proembriogénicas.
 - Estimulan la proliferación de células proembriogénicas (LITZ, 1986).

- **Genotipo y tipo de tejido.** El genotipo, tipo de tejido y estado de desarrollo pueden ser factores determinantes en la habilidad de respuesta comparativa a las auxinas o citocininas (MERKLE *et al.*, 1990). ENDEMANN Y WILHELM (1999), describieron que el estado de desarrollo

del explante, así como la influencia de la estacionalidad, debe de ser considerados como factores importantes en la inducción de embriogénesis somática.

- **Otros factores.** Por otra parte, la densidad celular es también otro factor importante, que afecta le embriogénesis somática al igual que las concentraciones de oxígeno (MERKLE *et al.*, 1990).

2.2.3. Aplicaciones de la embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un modelo que nos permite estudiar y entender las bases moleculares y celulares de plantas, así como estudiar la capacidad embriogénica de células somáticas. En los últimos años se ha utilizado para estudiar la capacidad embriogénicas de células somáticas utilizando como modelo embriogénesis de mutantes de *Arabidopsis* (HARLANDER, 2002). Ahora la manipulación genética de células tiene un alcance tal que el alto nivel de refinamiento de las técnicas regeneración de plantas a partir de cultivos celulares es extremadamente importante (LITZ *et al.*, 1998). En este respecto, la embriogénesis somática tiene muchas ventajas sobre la organogénesis debido a:

- Embriones a diferencia de brotes se originan de una célula individual.
- Los cultivos embriogénicos pueden ser sincronizados y purificados.
- Se pueden tener cultivos de material homogéneo.

Los cultivos embriogénicos de especies tropicales y subtropicales han sido utilizados para propagación, selección *in vitro* a factores bióticos y

abióticos, aislamiento y cultivo de protoplastos, transformación genética y para estudios de conservación de germoplasma. Actualmente se está implementando el uso de bioreactores de inmersión temporal, en especies leñosas, los cuales representan una alternativa para la producción de semillas artificiales (LITZ *et al.*, 1998).

2.2.4. Células proembriogénicas

Un tejido explantado *in vitro* consiste de varios tipos de células. Los explantes al ser tratados con reguladores de crecimiento sus células comienzan a desdiferenciarse y proliferar. Para la inducción del estado embriogénico los explantes requieren de extensos ciclos de células proliferando desorganizadamente, la muerte o pérdida de explantes celulares circundantes, y/o altos niveles de auxina sintética. En presencia de auxinas endógenas, después de varios días (a veces semanas) una población de pequeñas células compactas emerge. Esas pequeñas y compactas células divididas en forma asimétrica y sus células hermanas junto con ellas, se amontonan como un típico grupo de células acumuladas, las cuales se conocen como: masas proembriogénicas o agrupamiento embriogénico. Sobre estas masas se desarrollan los embriones somáticos (FREIRE, 2003).

a. Obtención de embriones somáticos

En los embriones somáticos en estado temprano, un alejamiento o disminución de la concentración de auxinas en el medio de cultivo puede romper el ciclo de continua proliferación de masas proembriogénicas y permitir a los embriones el desarrollo y maduración. Debido

a que este alejamiento de auxinas ejerce un efecto de disminuir la friabilidad aumentando los contactos célula-célula y permitiendo un incremento en la polaridad dentro del grupo de células embriogénicas (MERKLE *et al.*, 1990).

2.3. Antecedentes

GUTIERREZ *et al.*, (2008), realizaron la embriogénesis somática en papayo (*Carica papaya L.*) en las instalaciones de la Universidad Nacional Agraria la Molina, utilizando el medio de cultivo MS básico a media fuerza, suplementado con cuatro concentraciones diferentes de 2,4-D, que se constituyeron en los tratamientos. Las evaluaciones se realizaron diariamente, en los cuales se encontró que el medio de cultivo con ausencia de auxinas favorece la germinación de los embriones inmaduros sembrados y en lapso de una semana se convierten estos en plántulas. En el resto de los tratamientos se observó que al cabo de tres meses estos tenían un 80 a 85 % de callos embriogénicos. Igualmente, se observó que los callos embriogénicos expuestos a la auxina se desarrollan hasta embriones maduros durante el periodo en que esta hormona está presente en el medio, ya que la auxina descende su concentración con el paso del tiempo por su consumo o la pérdida de efectividad. De los tratamientos utilizados, se observó que el tratamiento con 10 mg/L de 2,4-D mostraba el nivel más alto de la formación de callos embriogénicos así como embriones somáticos, por lo que se seleccionó para posteriores experimentos.

POSADA et al. (2007), menciona que la variedad más importante de papaya en Cuba es la Maradol rojo, sin embargo, es susceptible a las principales enfermedades virales que atacan al cultivo. Por esta razón se planteó el objetivo de obtener embriones somáticos de papaya Maradol Rojo a partir de embriones cigóticos, estableciendo un método de regeneración de plantas vía embriogénesis somática que sirva de base al desarrollo de un protocolo de transformación genética para obtener plantas resistentes. Para ello, se evaluó el efecto de diferentes factores en la morfogénesis y la regeneración de plantas a partir de embriones cigóticos inmaduros. Los embriones somáticos se obtuvieron en un medio de cultivo MS con 5 mg/L de 2,4-D. Además, el empleo de 2 mg/L de este regulador del crecimiento tuvo un efecto positivo en la multiplicación secundaria de los embriones somáticos. La adición de 5 mg/L de AIB promovió el enraizamiento de los brotes en un 78.0%, pero su longitud fue inferior a 1.85 cm. El cultivo de los brotes en medio líquido de elongación permitió que estos alcanzaran un promedio de 3.05 cm de longitud y 4.50 hojas, lo cual propició su adecuada supervivencia en la fase de aclimatización.

MANZANILLA (2004), realizó la "inducción de embriogénesis somática de tejido nucelar de tres variedades de mango (*Mangifera indica L.*)" en las instalaciones de la Universidad de Colima en Colombia, donde probó la respuesta a la formación de callos embriogénicos de tres variedades de mango (Ataulfo, Haden y Tommy Atkins) en tres estados de desarrollo cada uno, cultivadas en el medio MS complementado con 400 mg/l de glutamina (Sigma),

4.5 mg/l de 2,4-D (Sigma), 60 g/L de sacarosa (Sigma) y 8 g/L de agar-agar usando como explante las nucelas de las semillas. Encontrando a las 4 primeras semanas la presencia de callos blancos en las variedades Haden y Tommy Atkins, que después de unos días se tornó café oscuro, y a partir del cual se desarrollaron embriones somáticos en las 4 a 5 semanas posteriores.

GALLARDO (2010), en su trabajo de práctica pre profesional, realizo un análisis de los factores foliares y hormonales para la inducción de callos de café robusta (*Coffea canephora Pierre*). En este trabajo utilizo balances hormonales las cuales consistían en combinaciones de 2,4-D con AIA (ácido indol acético), AIB (ácido indol butírico) ANA (ácido naphthalenacético), en diferentes niveles. Encontrando un gran porcentaje de contaminación en la totalidad de sus tratamientos, por parte de hongos fitopatógenos, debido a una mala manipulación de los materiales, a muchos errores humanos en cuanto a la siembra de los explantes pero sobre todo a la mala realización de la desinfección, paso que es muy indispensable para la realización de este tipo de trabajos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación in vitro de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), ubicada en el Km 1,5 carretera Tingo María-Huánuco, distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, cuyas coordenadas geográficas son:

Longitud : 75° 57' 00''

Latitud sur : 09° 09' 08''

Altitud : 670 m.s.n.m.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Material vegetativo

Se utilizó semillas inmaduras de frutos verdes y sanos, proveniente de flores femeninas de un solo planta de papayo (variedad PTM-331) de aproximadamente 60 y 90 días desde el inicio de la diferenciación del fruto, cosechado tres día anterior a la siembra in vitro, con dimensiones de 4 x 8 y 6 x 12 cm respectivamente y conservadas a temperatura bajas (refrigeradora). La semilla inmadura tiene como característica principal el color blanco, no tiene el arilo que protege a la semilla madura, y además, es más blando y suave que una semilla desarrollada completamente (madura).

3.2.2. Equipos

- Cámara de flujo laminar.
- Balanza analítica.
- Refrigerador.
- Autoclave, destilador de agua etc.

3.2.3. Reactivos

- 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético).
- AIA (ácido indol acetico).
- KIN (kinetina).
- Medio basal Murashige y Skoog (1962) (MS).
- Agentes desinfectantes: Alcohol medicinal, hipoclorito de sodio.

3.2.4. Insumos

- Hojas de bisturí N° 10.
- Mechero de alcohol.
- Frascos y marcadores de vidrio.
- Cinta de sellado Parafim.
- Gradillas inclinadas.
- Tubos de ensayo (25x150mm).
- Tapas de tubos (25mm. diámetro).
- Algodón, guantes etc.

3.3. Metodología

3.3.1. Obtención del material vegetativo

- Se cosecharon los frutos verdes de papayo de 60 y 90 días aproximadamente, la superficie de los frutos se desinfectó durante 30 minutos con una solución de 20 a 30% (v/v) de hipoclorito de sodio de uso doméstico (lejía), después se enjuagó con agua destilada.
- Se removieron con pinzas esterilizadas las semillas inmaduras de los frutos verdes de papayo de 60 y 90 días aproximadamente, haciendo un corte longitudinal con un cuchillo previamente esterilizado.
- Las semillas inmaduras se esterilizaron con alcohol (96% puro) por 3 minutos, luego en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, por 10 minutos, se enjuago 3 veces con agua destilada estéril, para luego quitarle la testa blanquecina que lo envuelve.
- Se sembraron las semillas inmaduras sin testa en los tubos de ensayos y se incubaron a 25°C en condiciones de oscuridad.

3.3.2. Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio Murashige y Skoog (1962) suplementado solo con 2,4-D para el ensayo 1 y con una combinación de 2,4-D y AIA para el ensayo 2 y 2,4-D más Kinetina para el ensayo 3. Se utilizó la formulación estándar designado en el laboratorio. En el cuadro 1 se muestran los reactivos y volúmenes utilizados en la preparación del medio de cultivo MS para un Litro.

Cuadro 1. Composición del medio MS basal.

Medio	MS
NH ₄ NO ₃	1.65 g/L
KNO ₃	1.90 g/L
KH ₂ PO ₄	0.17 g/L
CaCl ₂ .3H ₂ O	0.33 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.37 g/L
NaH ₂ PO ₄ .4H ₂ O	-
KI	0.83 mg/L
H ₃ BO ₃	6.20 mg/L
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60 mg/L
Na ₂ MgO ₄ .2H ₂ O	0.25 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025 mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80 mg/L
Na ₂ EDTA	37.30 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025 mg/L
Glicina	4 ml
Tiamina-HCL	0.2 ml
Piridoxina-HCL	1 ml
Acido nicotínico	1 ml
Mioinositol	5 ml
Sacarosa	30 g
pH	5.7

Murashige y Skoog (1962), citado por LITZ (1986).

a. Procedimiento (primera etapa)

- Obtenidas las concentraciones requeridas para la preparación de medio de cultivo MS, para los tres ensayos se procedió a agregar las concentraciones de 2,4-D (ensayo 1), 2,4-D y AIA (ensayo 2) y 2,4-D más KIN (ensayo 3) que se constituyeron en los tratamientos para la inducción de los callos embriogénicos, luego se enrazó a volumen requerido con agua destilada.
- Se agregó y disolvió agar en cada frasco de los respectivos ensayos, se ajustó el pH a 5.8 previo al autoclavado y se sellaron con papel aluminio.
- Se llevaron los frascos con los tratamientos a una cámara de flujo laminar encendida y se dispensó el medio de cultivo en tubos de ensayos en la cantidad de repeticiones necesaria.
- Se esterilizaron los tubos de ensayo en una autoclave a 15 libras de presión por 15 a 20 minutos y una temperatura de 121 °C.
- Después de 24 horas, se realizó la siembra de las semillas inmaduras de papayo en una cámara de flujo laminar con todos los procedimientos de asepsia, luego se sellaron con cinta parafilm.

3.3.3. Transferencia (subcultivos) de los callos (segunda etapa)

Después de transcurridos 3 meses en el proceso de inducción de callos embriogénicos, se realizó la transferencia o subcultivo a un segundo medio de cultivo, de los callos obtenidos, si estos no demostraban la formación de la estructuras proembrionarias deseadas, con el proceso que se describe a continuación:

- Se subcultivaron los callos más desarrollados obtenidos en los mejores tratamientos, a tubos de ensayo con 5 ml del medio, conteniendo medio Murashige y Skoog (MS) a media fuerza en la composición salina.
- Asimismo, este medio contenía las hormonas respectivas de cada ensayo previo, a media concentración, es decir se utilizó la mitad de la concentración inicial de las hormonas aplicadas en los mejores tratamientos de los tres ensayos respectivamente.
- Se incubaron los nuevos tratamientos en oscuridad a una temperatura de 25°C durante 30 a 60 días, haciendo evaluaciones semanales en la etapa final de la formación de estructuras proembrionarias.

3.4. Efecto del 2,4-D en la formación de callos embriogénicos en semillas inmaduras de papayo de dos edades (Ensayo 1)

3.4.1. Primera etapa

a. Factores en estudio

- **Factor A:** Concentración de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético).
 - $a_1 = 0$ mg/L 2,4-D
 - $a_2 = 2$ mg/L 2,4-D
 - $a_3 = 4$ mg/L 2,4-D
 - $a_4 = 6$ mg/L 2,4-D
 - $a_5 = 8$ mg/L 2,4-D
 - $a_6 = 10$ mg/L 2,4-D

- **Factor B:** Estado de desarrollo de semillas inmaduras de papayo.
 - $b_1 = 60$ días de desarrollo
 - $b_2 = 90$ días de desarrollo

b. Diseño experimental

Para el análisis estadístico se usará la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) con diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 6×2 , con 12 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento.

El modelo aditivo lineal del presente experimento será:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

- Y_{ij} = Reacción del semilla inmaduro en la k -ésima repetición sujeto a la aplicación de j -ésimo nivel del factor α en el j -ésimo estado de desarrollo del factor β .
- μ = Efecto de la media general.
- α_i = Efecto de i -ésimo nivel del factor α .
- β_j = Efecto del j -ésimo estado de desarrollo del factor β .
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = Es el efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel del factor α y el j -ésimo estado de desarrollo del factor β .
- ε_{ijk} = Efecto aleatorio del error experimental obtenido en la k -ésima repetición sujeto a la aplicación de i -ésimo nivel del factor α con el j -ésimo estado de desarrollo del factor β .

Para: $i = 1,2,\dots,6$ nivel del factor α .
 $j = 1,2$ estado de desarrollo del factor β .
 $K = 1,2,\dots,10$ repetición

c. Descripción de la primera etapa

Se utilizaron dos estados de desarrollo de la semilla inmadura de papaya (60 y 90 días de edad) en perfectas condiciones, sembradas en 12 tratamientos, con un medio de cultivo base igual para todos (MS/2), con 10 repeticiones. Los tratamientos están de acuerdo a la siguiente denominación:

1. $a_1b_1 = 0$ mg/L 2,4-D + semilla de 60 días
2. $a_1b_2 = 0$ mg/L 2,4-D + semilla de 90 días
3. $a_2b_1 = 2$ mg/L 2,4-D + semilla de 60 días
4. $a_2b_2 = 2$ mg/L 2,4-D + semilla de 90 días
5. $a_3b_1 = 4$ mg/L 2,4-D + semilla de 60 días
6. $a_3b_2 = 4$ mg/L 2,4-D + semilla de 90 días
7. $a_4b_1 = 6$ mg/L 2,4-D + semilla de 60 días
8. $a_4b_2 = 6$ mg/L 2,4-D + semilla de 90 días
9. $a_5b_1 = 8$ mg/L 2,4-D + semilla de 60 días
10. $a_5b_2 = 8$ mg/L 2,4-D + semilla de 90 días
11. $a_6b_1 = 10$ mg/L 2,4-D + semilla de 60 días
12. $a_6b_2 = 10$ mg/L 2,4-D + semilla de 90 días

3.4.2. Segunda etapa

a. Factores en estudio

- Callos embriogénicos del estado de desarrollo de la semilla inmadura de papayo con mejor respuesta en el ensayo 1.
- Concentración de 2,4 – D adicional

b. Diseño experimental para la segunda etapa

Para el análisis estadístico se usó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) con diseño completamente al azar (DCA), con 6 tratamientos ($T_0, T_1, T_2, T_3, T_4, T_5$) y 10 repeticiones.

c. Descripción de la segunda etapa

Se utilizó los callos embriogénicos obtenidos en el estado de desarrollo de la semilla inmadura de papayo con mejor respuesta en el ensayo 1, sembrado en un medio MS/2 suplementados con la mitad del niveles de 2,4 – D de donde proviene el callo. Los tratamientos están de acuerdo a la siguiente denominación:

1. $T_0 = a_1b_2$ (0 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días) + 0 mg/L 2,4-D
2. $T_1 = a_2b_2$ (2 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días) + 1 mg/L 2,4-D
3. $T_2 = a_3b_2$ (4 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días) + 2 mg/L 2,4-D
4. $T_3 = a_4b_2$ (6 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días) + 3 mg/L 2,4-D
5. $T_4 = a_5b_2$ (8 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días) + 4 mg/L 2,4-D
6. $T_5 = a_6b_2$ (10 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días) + 5 mg/L 2,4-D

3.5. Efecto de la combinación del 2,4-D y AIA en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (ensayo 2)

3.5.1. Factores en estudio en el ensayo 2

- Estado de desarrollo de la semilla inmaduro de papayo con mejor respuesta en el ensayo 1.
- Tratamiento con mejor respuesta (T_m) en el ensayo 1 (concentración de 2,4 -D con mejores resultados).
- Concentración de AIA (ácido indol acético).

3.5.2. Diseño experimental para el ensayo 2

Para el análisis estadístico se usó la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$) con diseño DCA, con 5 tratamientos (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 y T_4) y 10 repeticiones.

3.5.3. Descripción del Ensayo 2

Se utilizó el tratamiento con mejor resultado ($T_m = 10$ mg/L 2,4-D + semilla de 90 días) en la formación de callos embriogénicos del ensayo 1, combinada o suplementado con 5 niveles de AIA, con sus respectivos 10 repeticiones. Los tratamientos están de acuerdo a la siguiente denominación:

1. $T_0 = T_m + 0$ mg/L AIA
2. $T_1 = T_m + 0.5$ mg/L AIA
3. $T_2 = T_m + 1$ mg/L AIA
4. $T_3 = T_m + 2$ mg/L AIA
5. $T_4 = T_m + 4$ mg/L AIA

3.6. Efecto de la combinación del 2,4-D y KIN en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (ensayo 3)

3.6.1. Factores en estudio en el ensayo 3

- Estado de desarrollo del embrión inmaduro de papayo con mejor respuesta en el ensayo 1.
- Tratamiento con mejor respuesta (T_m) en el ensayo 1
- Concentración de KIN (kinetina).

3.6.2. Diseño experimental para el ensayo 3

Para el análisis estadístico se usó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) con diseño completamente al azar (DCA), con 5 tratamientos (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 y T_4) y 10 repeticiones.

3.6.3. Descripción del Ensayo 3

Se utilizó el tratamiento con mejor resultado ($T_m = 10$ mg/L 2,4-D + semilla de 90 días) en la formación de callos embriogénicos del ensayo 1, combinada o suplementado con 5 niveles de KIN, con sus respectivos 10 repeticiones. Los tratamientos están de acuerdo a la siguiente denominación:

1. $T_0 = T_m + 0$ mg/L KIN
2. $T_1 = T_m + 0.5$ mg/L KIN
3. $T_2 = T_m + 1$ mg/L KIN
4. $T_3 = T_m + 2$ mg/L KIN
5. $T_4 = T_m + 4$ mg/L KIN

3.7. Formulación para el medio Murashige y Skoog (1962)

Para la preparación del medio Murashige y Skoog (1962) (MS) a media fuerza, suplementado con 2,4-D usado en el ensayo 1, se realizó 6 tratamiento con 10 repeticiones para 2 estados de desarrollo de la semilla inmadura de papayo, haciendo un total de 120 tubos de ensayo (12 Tratamientos), cada tubo con 5 ml de medio, obteniendo 600 ml en total de medio MS tal como lo muestra el Cuadro 2.

Cuadro 2. Reactivos y volúmenes para la preparación de medio de cultivo ½ MS del ensayo 1, 2 y 3.

Reactivo	600 ml *	250 ml **
Macronutrientes	30 ml	12.5 ml
Micronutrientes	3 ml	1.25 ml
Fe-EDTA	0.6 ml	0.25 ml
Mioinositol	3 ml	1.25 ml
Ácido Nicotínico	0.6 ml	2.5 ml
Piridoxina	0.6 ml	2.5 ml
Tiamina	0.12 ml	0.05 ml
Glicina	2.4 ml	1.0 ml
Sacarosa	18 g	7.5 ml
Agar	9 g	3.75 ml
pH	5.8	5.8

* Ensayo 1

** Ensayo 2 y 3

En el ensayo 2 y 3, para la preparación del medio Murashige y Skoog (MS) a media fuerza, suplementado con el nivel de 2,4-D con mejor respuesta en el ensayo 1 y AIA para el ensayo 2 y KIN para el ensayo 3, se realizó 5 tratamiento con 10 repeticiones, para el mejor estado de desarrollo de la semilla inmadura de papayo, haciendo un total de 50 tubos de ensayo, cada uno con 5 ml de medio, obteniendo 250 ml total de medio MS a media fuerza para cada tratamiento (Cuadro 2).

3.8. Parámetros a evaluar en los ensayos

- **Tiempo de aparición callos embriogénicos:** Se evaluó el tiempo que demoró la aparición de callos funcionales con la capacidad de formar embriones en cada tratamiento, contabilizándolos por días.
- **Porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos en el tubo de ensayo:** Se evaluó mediante la designación porcentual diseñada en el Cuadro 3 (5 intervalos de 20%), para este fin se consideró el espacio ocupado por el callo formado, considerando la superficie del medio de cultivo en el tubos de ensayo como medida (diámetro 2.3 cm). El tamaño variaba en el intervalo que va desde aquel callo que abarcaba toda la superficie, considerándolo 100% y el que no tuvo la formación de callo 0%. Este parámetro se utilizó, ya que no se pudo extraer los callos para realizar las medidas de tamaño o dimensión por motivos de una posible contaminación fuera del tubo de ensayo.

Cuadro 3. Porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos en el tubo de ensayo.

Referencia de comparación					
Porcentaje	0 – 20%	20 – 40%	40 – 60%	60 – 80%	80 – 100%

- **Presencia de organogénesis:** Se evaluó la posible presencia de brotes o raíces en algunos tratamientos, debido a respuestas propias de las semillas inmaduras de papayo, realizando un conteo en tiempo (días) y forma (caracterización).
- **Presencia de germinación:** Se evaluó la posible presencia de germinación de las semillas inmaduras de papayo en algunos tratamientos, debido a respuestas propias de éstos, contabilizándolos en tiempo (días), forma (caracterización).
- **Tiempo de aparición de las estructuras proembrionarias:** Se evaluó el tiempo que demoró la aparición de estructuras proembrionarias en cada tratamiento, contabilizándolos por días.
- **Cantidad de estructuras proembrionarias:** Se contabilizó la presencia y cantidad de estas estructuras en los callos producidos en los diferentes tratamientos, haciendo un conteo en número (unidad) y realizando una descripción de todo el proceso de aparición de estas estructuras.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto del 2,4-D en la formación de callos embriogénicos en semillas inmaduras de papayo de dos edades (Ensayo 1)

4.1.1. Primera etapa

Comenzó en el momento de la siembra de las semillas inmaduras de papayo en el medio de cultivo suplementado con los niveles de 2,4-D, culminado en la formación de los callos en aproximadamente 3 meses.

a. Tiempo de aparición de callos embriogénicos

Para la cantidad de días que tomó a cada tratamiento en formar los callos, el Cuadro 4 muestra que existe diferencia estadística significativa, tanto para los tratamientos como para los factores al igual que la interacción de ellos, además muestra un coeficiente de variabilidad de 0.66%, indicando que existe un excelente homogeneidad en la respuesta de los semillas inmaduras al efecto de los seis niveles del 2,4-D.

Cuadro 4. Análisis de variancia para el tiempo de formación de callos.

F. de Variación	GL	SC	CM	
Tratamientos	11	15964.23	1451.29	*
A	5	11372.46	2274.49	*
B	1	4335.61	4335.61	*
A x B	5	256.16	51.23	*
Error Experimental	108	1954.84	18.10	
Total	119	17919.07		
CV:	0.66%			

Al realizar la comparación de medias (prueba de Tukey) para el tiempo transcurrido hasta la formación de callos, podemos ver en el Cuadro 5 que los tratamientos T_{12} (a_6b_2) y T_{10} (a_5b_2) mostraron ser los que formaron callos en el menor tiempo, con promedios de 33.76 y 39.13 días respectivamente, sin tener diferencia estadística significativa con los tratamientos T_8 (a_4b_2) y T_6 (a_3b_2), a los que solo los superan numéricamente. Por otra parte, los tratamientos T_1 (a_1b_1) y T_3 (a_2b_1) demostraron ser superiores a los demás tratamientos, encontrando diferencia estadística significativa con el resto de tratamientos a excepción del tratamiento T_2 (a_1b_2), indicando que estos tratamientos fueron los que demoraron más en formar callos.

Cuadro 5. Resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el tiempo de formación de callos.

Clave	Tratamiento (Aplicación)	Tiempo (días)	Sig.
T_1 (a_1b_1)	0 mg/L 2,4-D + semilla de 60 días	73.00	a
T_3 (a_2b_1)	2 mg/L 2,4-D + semilla de 60 días	72.00	a
T_2 (a_1b_2)	0 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días	63.31	a b
T_4 (a_2b_2)	2 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días	58.00	b
T_5 (a_3b_1)	4 mg/L 2,4-D + semilla de 60 días	58.00	b
T_7 (a_4b_1)	6 mg/L 2,4-D + semilla de 60 días	53.00	b c
T_9 (a_5b_1)	8 mg/L 2,4-D + semilla de 60 días	51.31	c
T_{11} (a_6b_1)	10 mg/L 2,4-D + semilla de 60 días	50.20	c
T_8 (a_4b_2)	6 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días	45.68	c d
T_6 (a_3b_2)	4 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días	45.50	c d
T_{10} (a_5b_2)	8 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días	39.13	d
T_{12} (a_6b_2)	10 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días	33.76	d

Para la inducción de embriogénesis somática de papayo, se utilizaron semillas inmaduras de la variedad PTM-331 de 60 y 90 días de edad aproximadamente. GUTIERREZ *et al.* (2008), utilizaron embriones inmaduros de la variedad PT-101 B, variedad obtenida por el Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana (IIAP) – Tingo María, de similar edad a lo probado, con la diferencia de que para este experimento se sembró la semilla con el endosperma, y no el embrión solo. POSADA *et al.* (2007), empleó frutos inmaduros (obtenidos de flores hermafroditas) de plantas de papayo var. Maradol Rojo que fueron colectados entre 90 - 120 días, observando la presencia de callos proembrionarias a las 6 semanas (42 días). LITZ (1986), probó edades del fruto (semillas) que van desde los 60 - 70 días, obteniendo resultados en la formación de callos a partir de segundo mes, llegando a casi a una totalidad recién al cuarto mes, resultados lejanos a los obtenidos en el experimento (33.76 días), con la gran diferencia de que la totalidad de callos se obtuvo al segundo mes y medio (73.00 días). El menor tiempo de callogénesis obtenida en esta investigación, posiblemente se debió a que se usaron semillas no tan inmaduras como las antes mencionadas, lo que podría generar respuesta más rápida en la formación de callos, aunque si bien es cierto que no existen reportes sobre este aspecto, que consoliden esta presunción.

Según LITZ *et al.* (1998), realizar un pequeño corte a la semilla promovería la formación de callos, debido a que las células de la parte lastimada iniciarían una función de reconstrucción y protección, que mas el efecto de las hormonas promovería la formación de callos. Esta

recomendación se puso en práctica en la presente investigación, ya que se utilizaron semillas inmaduras a los que se quitó el tegumento realizando cortes con el bisturí.

Podemos observar en el Cuadro 6, el efecto principal de los factores A (nivel de 2,4-D) y B (estado de desarrollo de semillas inmaduras de papayo), según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). En estos resultados, el nivel a_6 (10 mg/L de 2,4-D) con 41.98 días transcurrido hasta la formación de callos, fue la que mostró diferencia significativa con los demás niveles a excepción del nivel a_5 (8 mg/L de 2,4-D) con sus 45.22 días, del que solo es menor numéricamente. En cuanto al factor B, fue el estado b_2 (90 días de desarrollo) la que mostró una mejor respuesta con 47.56 días en promedio en cuanto al tiempo de formación de callos, encontrándose diferencia estadística significativa con el estado b_1 (60 días de desarrollo) ya que éste en promedio, demora 59.59 días en la formación de callos.

Cuadro 6. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos principales, en el tiempo de formación de callos.

Factor A			Factor B		
Nivel	Tiempo (días)	Sig.	Niveles	Tiempo (días)	Sig.
a_1	68.16	a	b_1	59.59	a
a_2	65.00	a	b_2	47.56	b
a_3	51.75	b			
a_4	49.34	b			
a_5	45.22	b c			
a_6	41.98	c			

Para observar los efectos simples de cada factor en el tiempo de formación de callos, el Cuadro 7 muestra que en el análisis de variancia existe significancia estadística, es decir, que al menos el efecto de unos de los factores demostró ser superior a los otros.

Cuadro 7. Análisis de variancia para los efectos simples en el tiempo de formación de callos.

F. de Variación	GL	SC	CM	
A en b ₁	5	5365.23	1073.05	*
A en b ₂	5	6263.39	1252.68	*
B en a ₁	1	980.00	980.00	*
B en a ₂	1	781.25	781.25	*
B en a ₃	1	267.91	267.91	*
B en a ₄	1	741.76	741.76	*
B en a ₅	1	1351.37	1351.37	*
B en a ₆	1	469.48	469.48	*
Error Experimental	108	1954.84	18.10	

En la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) que se muestra en el Cuadro 8 para el factor A en b₁, el tratamiento a₆b₁ mostró tener un mejor efecto en la formación de callos, ya que fue el que tuvo un menor tiempo (50.20 días), aunque estadísticamente no existe diferencia con el tratamiento a₅b₁ (51.31 días) ya que éste es solo menor numéricamente, pero si mostró tener diferencias estadísticas significativas con todos los demás tratamientos donde influye el

estado de desarrollo b_1 . Para A en b_2 , los tratamientos a_6b_2 y a_5b_2 son los que demostraron tener un mejor efecto en la formación de callos, ya que fueron éstos los que obtuvieron menores tiempos, con 33.76 y 39.13 días indicando que el efecto del Factor A se manifiesta mejor en el estado de desarrollo b_2 del factor B, aunque no hay diferencia estadística entre estos dos tratamientos, pero sí pudo encontrar diferencia estadística significativa con todos los demás tratamientos evaluados.

Cuadro 8. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (A en b_1 y b_2) en el tiempo de formación de callos.

A en b_1			A en b_2		
Trat	Tiempo (días)	Sig.	Trat.	Tiempo (días)	Sig.
a_1b_1	73.00	a	a_1b_2	63.31	a
a_2b_1	72.00	a	a_2b_2	58.00	b
a_3b_1	58.00	b	a_4b_2	45.68	c
a_4b_1	53.00	b	a_3b_2	45.50	c
a_5b_1	51.31	b c	a_5b_2	39.13	d
a_6b_1	50.20	c	a_6b_2	33.76	d

Según BANERJEE (2002), para obtener embriones somáticos de papayo se emplean concentraciones de 2,4-D desde 2 hasta 25 mg/L e informa que a partir de 15 mg/L existe una disminución significativa en cuanto a la formación de callos. Para PARROT (2002), cuando las concentraciones de auxina exógena se elevan a un determinado nivel, se detiene la formación de callos,

en el experimento se pudo observar que a las mayores concentración de 2,4-D (8 y 10 mg/L), los callos proembriogénicos se obtienes en menor tiempo, aunque no se pudo comprobar lo manifestado por BANERJEE (2002), ya que no se llegó a niveles de 15 mg/L de 2,4-D. Se podría decir que las máximas concentraciones probadas en el experimento son adecuadas para la formación de callos proembriogenicos.

Para poder observar el efecto simple en el tiempo de formación de callos del factor B en los seis niveles del factor A, los Cuadros 9, 10 y 11, muestran en forma general que el factor B, con su segundo estado de desarrollo de la semilla (b_2), tuvo mejores respuestas en el todos los niveles del factor A (a_1 , a_2 , a_3 , a_4 , a_5 y a_6). Se resaltan los tratamientos con mejor respuesta (Cuadro 11): a_5b_2 (39.13 días) y a_6b_2 , (33.76 días), que muestran diferencias estadísticas significativas con su par a_5b_1 y a_6b_1 respectivamente, y una diferencias numéricas muy marcada (51.31 y 50.20 días, respectivamente).

Cuadro 9. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (B en a_1 y a_2) en el tiempo de formación de callos.

B en a_1			B en a_2		
Trat	Tiempo (días)	Sig.	Trat	Tiempo (días)	Sig.
a_1b_1	73.00	a	a_2b_1	72.00	a
a_1b_2	63.31	b	a_2b_2	58.00	b

Cuadro 10. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (B en a_3 y a_4) en el tiempo de formación de callos.

B en a_3			B en a_4		
Trat	Tiempo (días)	Sig.	Trat.	Tiempo (días)	Sig.
a_3b_1	58.00	a	a_4b_1	53.00	a
a_3b_2	45.50	b	a_4b_2	45.68	a

Cuadro 11. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (B en a_5 y a_6) en el tiempo de formación de callos.

B en a_5			B en a_6		
Trat	Tiempo (días)	Sig.	Trat.	Tiempo (días)	Sig.
a_5b_1	51.31	a	a_6b_1	50.20	a
a_5b_2	39.13	b	a_6b_2	33.76	b

Según PARROT (2002), el tipo, estado fisiológico; y los niveles de diferenciación y polarización de los tejidos utilizados como explantes iniciales, son algunos de los factores que favorecen o interfieren en la formación de callos. Para la investigación, el estado de desarrollo (edad) de la semilla, fue uno de los factores determinantes en la formación de callos, ya que las semillas inmaduras de 90 días (b_2), en la totalidad de tratamientos, mostraron mejores respuestas en cuanto al menor tiempo en la aparición de callos proembriogénicos, en comparación con semillas inmaduras de 60 días (b_1). Este fenómeno, según POSADA *et al.* (2007), se debe a que al igual que una hoja u otro explante, las semillas deben tener un estado de desarrollo (edad) adecuado, la cual no es ni tan tierna ni tan madura.

b. Porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos en el tubo de ensayo

Para el porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupada por los callos, se tomó en cuenta valores preestablecidos (porcentaje), los cuales se encuentran en el Cuadro 3. El Cuadro 12 muestra que existen diferencias estadísticas significativas tanto para los tratamientos, los factores así como para la interacción de ellos; además muestra un coeficiente de variabilidad de 2.0%, indicando que existe homogeneidad en la respuesta de los semillas inmaduras al efecto de las diferentes niveles del 2,4-D.

Cuadro 12. Análisis de variancia para el porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos.

F. de Variación	GL	SC	CM	
Tratamientos	11	40341.42	3667.40	*
A	5	26355.86	5271.17	*
B	1	6817.67	6817.67	*
A x B	5	7167.89	1433.58	*
Error Experimental	108	8338.52	77.21	
Total	119	48679.95		
C.V.:	2.0%			

Al realizar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el porcentaje de la superficie ocupado por los callos embriogénicos (%), podemos observar en el Cuadro 13 que los tratamientos T_{12} (a_6b_2) y T_{10} (a_5b_2), mostraron ser los que obtuvieron los callos embriogénicos más grandes con 75.0% y 71.5% respectivamente, indicando con esto, que existe diferencias estadísticas significativas con los tratamientos.

Cuadro 13. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos.

Clave	Tratamiento (Aplicación)	Porcentaje de la superficie	Sig.
T ₁₂ (a ₆ b ₂)	10 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días	75.0	a
T ₁₀ (a ₅ b ₂)	8 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días	71.5	a
T ₉ (a ₅ b ₁)	8 mg/L 2,4-D + semilla de 60 días	46.9	b
T ₈ (a ₄ b ₂)	6 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días	43.4	b
T ₁₁ (a ₆ b ₁)	10 mg/L 2,4-D + semilla de 60 días	32.0	c
T ₅ (a ₃ b ₁)	4 mg/L 2,4-D + semilla de 60 días	30.0	c
T ₆ (a ₃ b ₂)	4 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días	30.0	c
T ₇ (a ₄ b ₁)	6 mg/L 2,4-D + semilla de 60 días	25.5	c d
T ₄ (a ₂ b ₂)	2 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días	25.0	d
T ₃ (a ₂ b ₁)	2 mg/L 2,4-D + semilla de 60 días	20.0	d
T ₂ (a ₁ b ₂)	0 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días	20.0	d
T ₁ (a ₁ b ₁)	0 mg/L 2,4-D + semilla de 60 días	20.0	d

Según POSADA *et al.* (2007) la utilización del 2,4-D en el medio del cultivo en diferentes concentraciones, permite el desarrollo de callos a partir de embriones de la variedad de papayo "Maradol Rojo" de 90 - 120 días, con el uso de 5 y 8 mg/L de 2,4-D se logró los mayores porcentajes de superficie de callos, con 98% y 100% respectivamente, sin mostrar diferencias estadísticas significativas entre ellos, pero significativamente superiores a cuando se utilizan

2 mg/L. En el experimento, fueron las semillas inmaduras de 90 días con las concentraciones de 10 mg/L y 8 mg/L (a_6b_2 y a_5b_2), los que mostraron mayores porcentajes de áreas ocupada por el callos con 75.0 y 71.5% respectivamente, tal como se ve en la Figura 1, existiendo diferencia estadística significativa con el resto de los tratamiento, coincidiendo con el autor que concluye que a mayor nivel de 2,4-D, mayor es la respuesta en el tamaño de los callos, llegando estos niveles a un tope aun no establecido para las diferentes variedades de papayo.

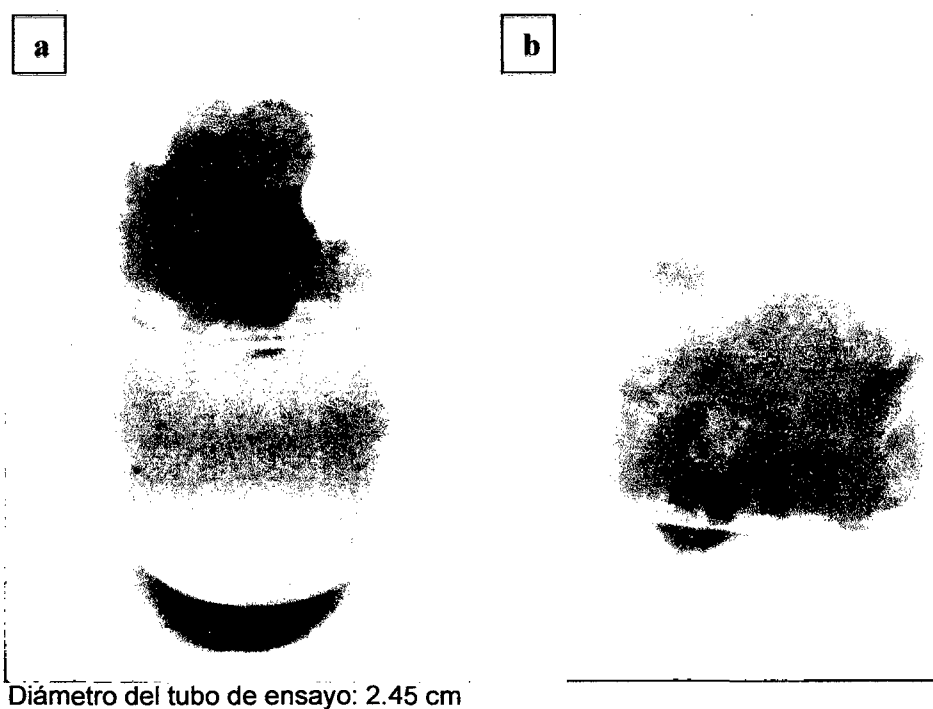


Figura 1. Porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos en el T_{10} (a) y T_{12} (b).

Podemos observar en el Cuadro 14, el efecto principal de los factores A (nivel de 2,4-D) y B (estado de desarrollo de semillas inmaduras de papayo) según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). En estos resultados, el nivel a_5 (8 mg/L de 2,4-D) con 59.18%, en la superficie del callos, fue la que mostró diferencia

significativa con los demás tratamientos a excepción de los niveles a_6 (10 mg/L de 2,4-D) con 53.50% y a_4 (6 mg/L de 2,4-D) con 34.45%, de los que solo es superior numéricamente. En cuanto al factor B, fue el estado b_2 (90 días de desarrollo) la que mostró una mejor respuesta con 44.14% en promedio de la superficie del medio ocupada por el del callos, encontrándose diferencia estadística significativa con el estado b_1 (60 días de desarrollo).

Cuadro 14. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el efecto principal, del porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos.

Factor A			Factor B		
Nivel	% de superficie	Sig.	Niveles	% de superficie	Sig.
a_5	59.18	a	b_2	44.14	a
a_6	53.50	a	b_1	29.07	b
a_4	34.45	a b			
a_3	30.00	b			
a_2	22.50	c			
a_1	20.00	c			

En el Cuadro 15 se presenta el análisis de variancia para el efecto simple de los factores en el porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupada por el callos, donde resultó que existe diferencia estadística significativa para A en b_1 y A en b_2 . En el caso del factor B, la diferencia estadística solo se dio en B en a_4 , B en a_5 y B en a_6 mientras que para B en a_1 , B en a_2 y B en a_3 no existió diferencia estadística significativa, es decir que el efecto simple del factor B en estos niveles del factor A se comportaron en forma similar.

Cuadro 15. Análisis de variancia para los efectos simples del porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos.

F. de Variación	GL	SC	CM	
A en b ₁	5	5046.33	1009.27	*
A en b ₂	5	28477.42	5695.48	*
B en a ₁	1	0.00	0.00	NS
B en a ₂	1	125.00	125.00	NS
B en a ₃	1	0.00	0.00	NS
B en a ₄	1	1602.05	1602.05	*
B en a ₅	1	3013.51	3013.51	*
B en a ₆	1	9245.00	9245.00	*
Error Experimental	108	8338.52	77.21	

El Cuadro 16 muestra la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), donde para el factor A en b₁, el tratamiento a₅b₁ mostró tener un mejor efecto en el porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupada por el callos, ya que fue el que obtuvo 46.90%, mostrando que existe diferencia estadística significativa con todo los demás tratamientos en las que influye el nivel b₁. Para A en b₂ son los tratamientos a₆b₂ y a₅b₂ los que demostraron tener un mejor efecto en la superficie del medio de cultivo ocupada por el callos con 75.0% y 71.45%, indicando que el efecto del Factor A se manifiesta mejor en el estado de desarrollos b₂ del factor B, aunque no hay diferencia estadística entre estos dos tratamientos, pero si se pueden encontrar diferencia estadística significativa con todos los demás tratamientos.

Cuadro 16. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (A en b_1 y b_2) del porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos.

A en b_1			A en b_2		
Trat.	(%)	Sig.	Trat.	(%)	Sig.
a_5b_1	46.90	a	a_6b_2	75.00	a
a_6b_1	32.00	b	a_5b_2	71.45	a
a_3b_1	30.00	b	a_3b_2	43.40	b
a_4b_1	25.50	b c	a_4b_2	30.00	c
a_2b_1	20.00	c	a_2b_2	25.00	c d
a_1b_1	20.00	c	a_1b_2	20.00	d

Para poder observar el efecto simple del factor B en los niveles del factor A en la superficie ocupada por el callos, el Cuadro 17 muestra que el factor B, con su segundo estado de desarrollo de la semilla (b_2), tuvo mejores respuestas en los niveles del factor A (a_5 y a_6), resaltando los tratamientos con mejor respuesta: a_5b_2 (71.45%) y a_6b_2 , (75.0%), que muestran diferencia estadística significativa con su comparaciones (a_5b_1 y a_6b_1 , respectivamente).

Cuadro 17. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples (B en a_5 y a_6) del porcentaje de la superficie del medio de cultivo ocupado por los callos.

B en a_5			B en a_6		
Trat	(%)	Sig.	Trat.	(%)	Sig.
a_5b_2	71.45	a	a_6b_2	75.00	a
a_5b_1	46.90	b	a_6b_1	32.00	b

c. Presencia de organogénesis

Dentro de los efectos de los parametros en estudio, se evaluó la presencia o formación de órganos como raíces, tallos u hojas (organogénesis), la Figura 2 muestra que fueron los tratamientos a_1b_2 (90%) y a_2b_2 (60%) (Figuras 3), los que alcanzaron mayores porcentajes, mientras que los tratamientos a_6b_2 , a_6b_1 , a_5b_1 , a_5b_2 y a_4b_1 no presentaron estos efectos.

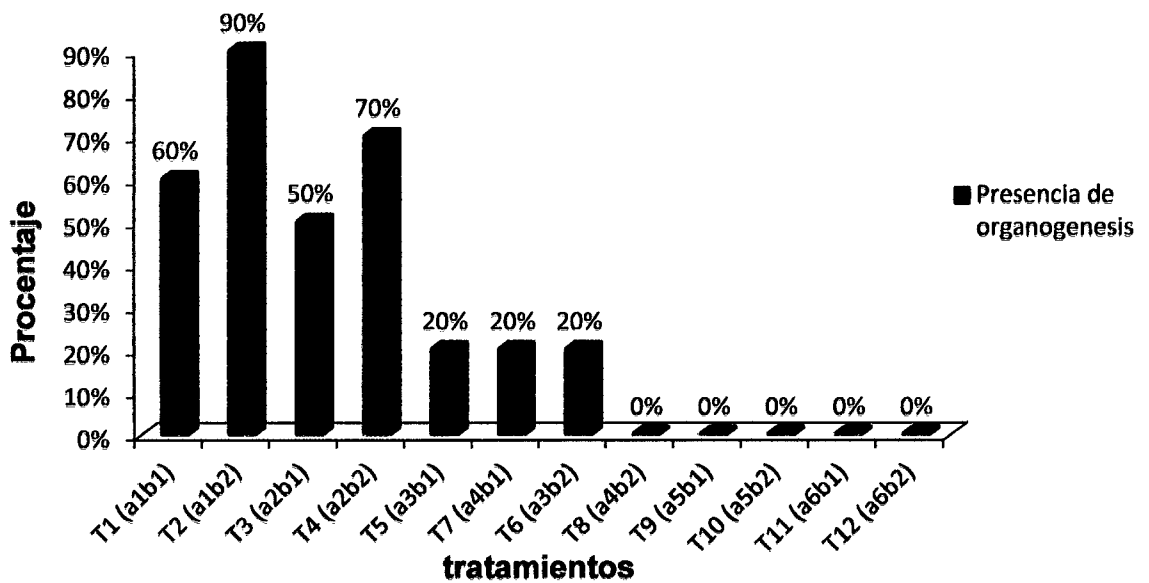


Figura 2. Presencia de organogénesis en los tratamientos en estudio.

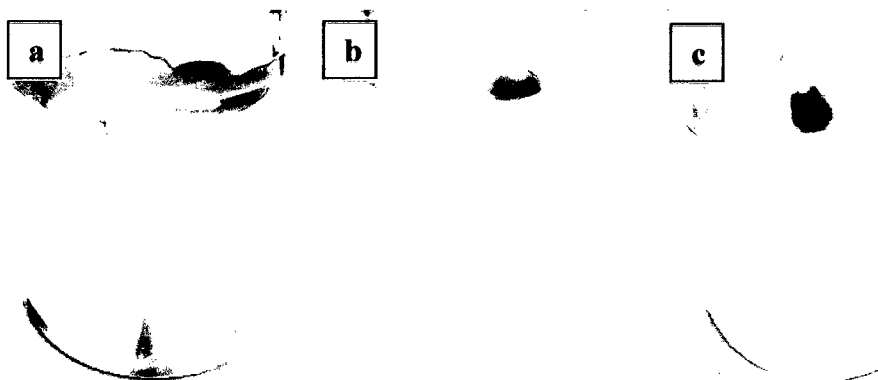


Figura 3. Organogénesis en los tratamientos T_1 (a), T_2 (b) y T_4 (c).

GUTIÉRREZ *et al.* (2008) encontró dentro de los tratamientos estudiados en la fase inductiva, que el medio control (sin presencia de auxinas) favorece la germinación de los embriones inmaduros sembrados y en el lapso de unas semanas se convirtieron en plántulas.

Según PARROT (2002), los tejidos embriogénicos son capaces de formar embriones globulares aun cuando los niveles de auxina exógena disminuyen hasta cierto umbral, pero en ausencia de ésta, la organogénesis ocurre normalmente, en la Figuras 3 se mostró claramente que son los tratamientos a_1b_1 y a_1b_2 (sin 2,4-D) los que muestran los mayores porcentajes de organogénesis, confirmando así lo mencionado por GUTIÉRREZ *et al.* (2008).

Además, también se puede ver que en los tratamientos con niveles bajos de 2,4-D, el porcentaje de organogénesis en los tratamientos también es relativamente alto, caso similar a lo encontrado por POSADA (2005) quien menciona que con el empleo de 2 mg/L de 2,4-D, existe un mayor porcentaje de diferenciación de los embriones somáticos y se observan embriones con tendencia a germinar, pues toman una coloración verde en su extremo superior, esto se debe según DEL SOLAR *et al.* (2001) a un rápido agotamiento del regulador de crecimiento en el medio de cultivo, y al estar la auxina en más baja concentración promueve la organogénesis de los embriones inmaduros, tal como se dio en el experimento realizado.

d. Contaminación

Uno de los problemas más grandes para el cultivo de tejido in vitro en la agricultura es la contaminación (ROCA y MROGINSKI, 1991). En la Figura 4 se muestra el porcentaje de contaminación que se tuvo en cada uno de los tratamientos, donde fue el tratamiento a₅b₂ el más contaminado con 30%. Entre las causas de esta contaminación, FLORES y ABDELNOUR (2000) mencionan que a pesar de seguir un protocolo adecuado para la desinfección. La contaminación siempre se da en los trabajos in vitro (Figura 5), y más si se cometen algunos errores en la manipulación del instrumental y del material vegetal, además menciona que esta contaminación depende del tejido que se desea trabajar.

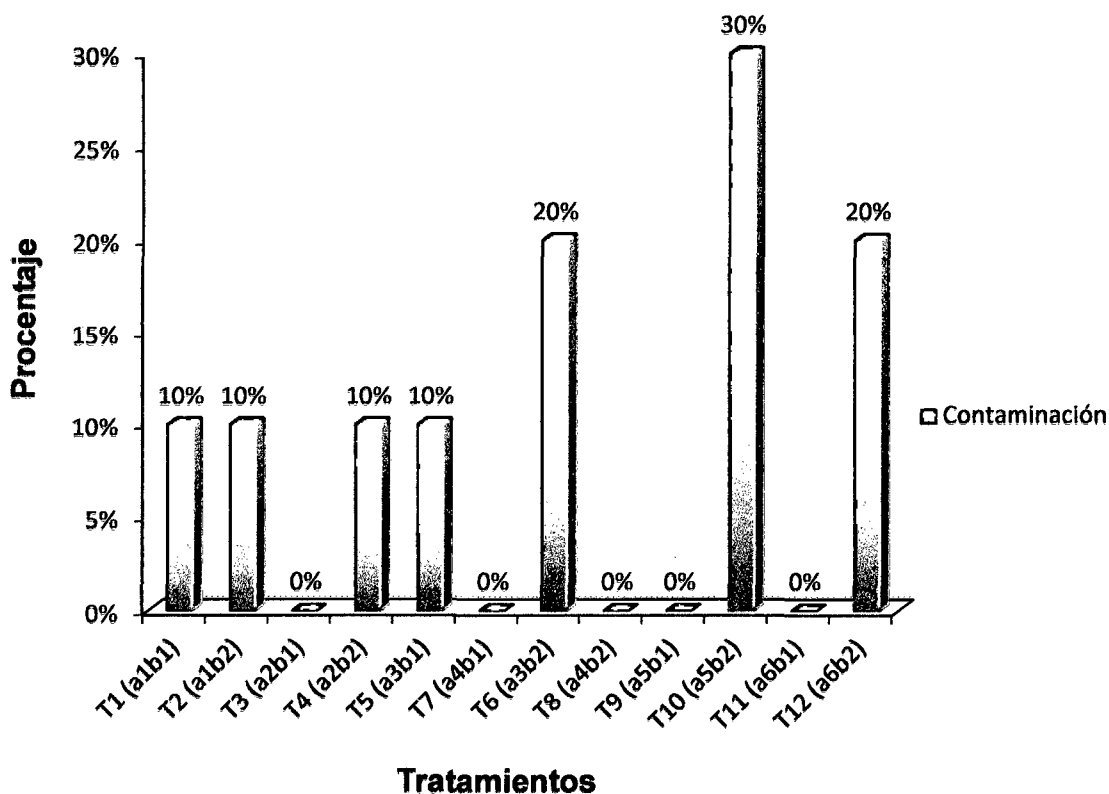


Figura 4. Porcentaje de contaminación en los tratamientos en estudio.

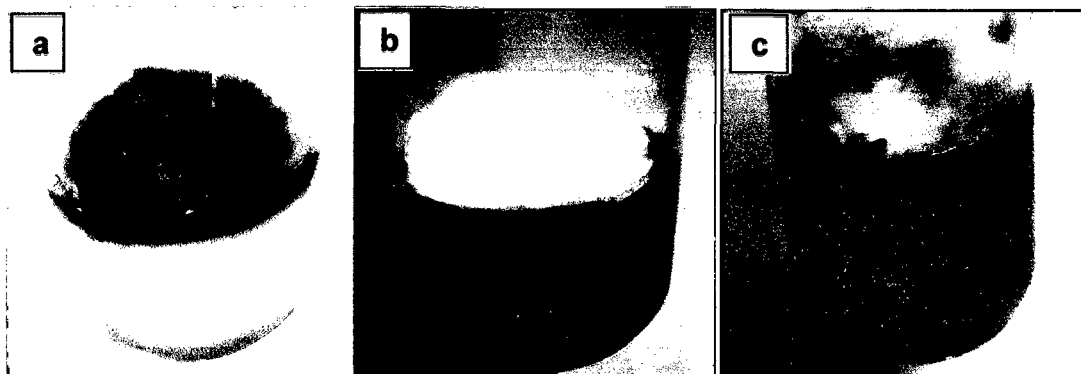


Figura 5. Contaminación en los tratamientos T₆ (a), T₁₀ (b) y T₁₂ (c)

4.1.2. Segunda etapa

a. Tiempo de aparición de las estructuras proembrionarias

En el Cuadro 18 podemos ver el análisis de variancia para el tiempo que tomó la aparición de las estructuras proembrionarias en los callos sub cultivados de la primera etapa, existiendo diferencia estadística significativa para los tratamientos en estudio, es decir, que al menos uno de los tratamientos resultó diferente que el resto. También podemos ver que el coeficiente de variación es de 1.51%, indicándonos que la respuesta de los callos fue homogénea en la aparición de estructuras proembrionarias.

Cuadro 18. Análisis de variancia para el tiempo de aparición de las estructuras proembrionarias.

F. de Variación	GL	SC	CM	
Tratamientos	5	2207.53	441.51	*
Error Experimental	44	428.40	9.74	
Total	49	2635.93		
C.V.	1.51%			

Al realizar la comparación de medias de los tratamientos (niveles de 2,4-D) mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), en el Cuadro 19 podemos ver que los Tratamientos T_5 (a_6b_2) y T_4 (a_5b_2) mostraron tener los tiempos más cortos en la formación de estructuras proembrionarias, indicando que no existe diferencias estadísticas entre ellos, pero si mostraron tener significancia estadística con los demás tratamientos.

Cuadro 19. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el tiempo de aparición de estructuras proembrionarias.

Clave	Tratamiento (Aplicación)	Tiempo (días)	Sig.
T_1	$a_2b_2 + 1$ mg/L 2,4-D	41.4	a
T_0	$a_1b_2 + 0$ mg/L 2,4-D	40.2	a
T_3	$a_4b_2 + 3$ mg/L 2,4-D	37.0	a
T_2	$a_3b_2 + 2$ mg/L 2,4-D	34.4	a
T_4	$a_5b_2 + 4$ mg/L 2,4-D	28.8	b
T_5	$a_6b_2 + 5$ mg/L 2,4-D	24.4	b

Según PARROT (2002) los embriones cigóticos son capaces de formar estructuras proembrionarias y luego embriones somáticos aun cuando los niveles de auxina exógena disminuyen hasta cierto umbral, con niveles más bajos se detienen la formación de estas estructuras en estos tejidos. Para el experimento, transcurridos tres meses en la primera etapa se notó la disminución de la presencia de 2,4-D, es decir que se llegó al umbral

mencionado por el autor. Este hecho motivo la realización de una segunda etapa donde al utilizar concentraciones más bajas de 2,4-D (mitad de la concentración inicial de los tratamientos respectivos) con la que se reactivó la formación de estas estructuras, obteniendo, que fueron los tratamientos T₅ (a₆b₂ + 5 mg/L 2,4-D) y T₄ (a₅b₂ + 4 mg/L 2,4-D) los que tuvieron una mejor respuesta, formando estructuras proembrionarias a los 24.4 y 28.8 días promedio respectivamente (después de los 3 meses de la primera etapa). Se mostraron resultados casi similares a los obtenidos por GUTIERREZ *et al.* (2008) quienes encontraron estructuras proembrionarias a partir de los tres meses (en el experimento fue 4 meses: primera etapa más segunda etapa), esta pequeña diferencia se debió a que estos investigadores utilizaron filtros microbiológicos para la esterilización del 2,4-D, caso que no se pudo realizar en el experimento. Al comparar los resultado obtenidos con lo que reportan POSADA *et al.* (2007), se vio una diferencia mayor, ya que este autor encontró que los embriones cigóticos cultivados en medios con 15 mg/L de 2,4-D formaron callos a las 6 semanas, estos tomaron una coloración pardo claro y a las 2 semanas siguientes observaron la presencia de los embriones somáticos. Si bien es cierto, que los casi 4 meses (primera y segunda etapa) que demoró la formación de las estructuras embriogénicas en el experimento, es mayor que los 2 meses (8 semanas) que demoraron estos autores, una posible explicación a esta diferencia es la respuesta de las semillas inmaduras de las variedades utilizadas (Maradol rojo), y la concentración de 2,4-D (15 mg/L) más elevada desde el inicio, a la que se utilizó en el experimento (10 mg/L de 2,4-D), además de la realización de este ensayo en dos etapas.

DEL SOL *et al.* (2001) en papayo variedad INIVIT 2000 a partir de embriones cigóticos, obtuvo mejores resultados con concentraciones de 4.7 mg/L de 2,4-D. Por otra parte, BANERJEE (2002) para obtener embriones somáticos de papayo utilizó concentraciones de 2,4-D desde 2 hasta 25 mg/L, informando que a partir de 15 mg/L existió una disminución significativa en cuanto al número de embriones y el porcentaje de callos con embriones somáticos, mientras Fitch y Manshardt (1990), citado por GUTIERREZ *et al.* (2008) alcanzaron los mejores resultados con una concentración de 10 y 15 mg/L en cuatro variedades de papayo Hawaii, en cuanto al parámetro de evaluación, "tiempo de formación de embriones".

b. Cantidad de estructuras proembrionarias

Para el número de estructuras proembrionarias, el Cuadro 20 muestra que existe diferencia estadística significativa para los tratamientos, además muestra un coeficiente de variabilidad de 5.82%, indicando que existe un homogeneidad en la respuesta de los semillas inmaduras al efecto de los diferentes niveles del 2,4-D.

Cuadro 20. Análisis de variancia para el numero de estructuras proembrionarias.

F. de Variación	GL	SC	CM	
Tratamientos	5	738.88	147.78	*
Error Experimental	44	95.30	2.166	
Total	49	834.18		
C.V.		5.82%		

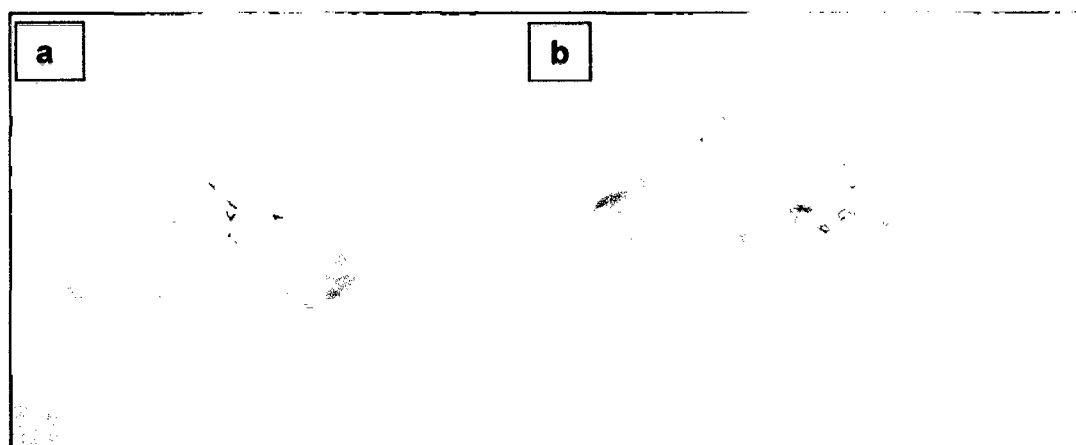
En la comparación de medias, mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), en el Cuadro 21 podemos ver que los tratamientos T_4 ($a_5b_2 + 4$ mg/L 2,4-D) y T_5 ($a_6b_2 + 5$ mg/L 2,4-D) mostraron tener las mayores cantidades de estructuras proembrionarias, no habiendo estadísticamente diferencia entre ellos, pero si mostraron tener diferencia estadística significativa con los otros tratamientos (T_2 , T_3 , T_1 y T_0), es decir que la respuesta fue superior a la obtenida en los demás tratamientos probados en el experimento.

Cuadro 21. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el número de estructuras proembrionarias.

Clave	Tratamiento (Aplicación)	Unidad	Sig.
T_4	$a_5b_2 + 4$ mg/L 2,4-D	9.4	a
T_5	$a_6b_2 + 5$ mg/L 2,4-D	8.7	a
T_2	$a_3b_2 + 3$ mg/L 2,4-D	2.7	b
T_3	$a_4b_2 + 2$ mg/L 2,4-D	2.5	b
T_1	$a_2b_2 + 0$ mg/L 2,4-D	1.7	b c
T_0	$a_1b_2 + 1$ mg/L 2,4-D	0.5	c

Para DEL SOL *et al.* (2001) la cantidad de estructuras proembrionarias en callos es relativo, debido a las diferentes respuestas de los tejidos ante las mismas o diferentes concentraciones de 2,4-D. POSADA *et al.* (2007) manifiesta que en todos los tratamientos independientemente de la concentración de 2,4-D se formaron embriones somáticos, sin embargo, se observaron diferencias significativas en cuanto al número de embriones

obtenidos en cada tratamiento. En el experimento podemos ver que los tratamientos T₄ (a₅b₂ + 4 mg/L 2,4-D) y T₅ (a₆b₂ + 5 mg/L 2,4-D) con 9.4 y 8.7 en promedio respectivamente (Figuras 6), fueron los que obtuvieron la mayor cantidad de embriones, indicando que las concentraciones de 2,4-D más altas generaron mayores estructuras proembrionarias, pero el número de estructuras no es un cantidad constante que se va formar siempre en tratamientos similares, es decir, no siempre en un mismo tratamiento se va formar la misma cantidad de estructuras proembrionarias.



Diámetro de tubo de ensayo 2.45 cm

Figuras 6. Estructuras proembrionarias de los tratamientos T₄ (a) y T₅ (b).

4.2. Efecto de la combinación del 2,4-D y AIA en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (Ensayo 2)

En la búsqueda de acelerar e incrementar la formación de estructuras proembrionarias se utilizó balances hormonales de 2,4-D y AIA (Ácido indol acético), donde se obtuvo que los tratamientos no mostraran respuesta durante el periodo de evaluación (3 meses). Para POSADA (2005) la mayoría de los

investigadores tanto en papayo como en otras especies no emplean AIA para formar callos u obtener embriones somáticos, las auxinas más utilizadas son 2,4-D y ANA. En otra variante en la que es empleada el AIA es el enraizamiento ex vitro, tal como lo encontró Raghuvanshi y Srivastava (1995), citado por MANZANILLA (2004), quienes para la formulación reguladora optima en la formación de brotes múltiples a partir de callo de hoja, utilizaron el medio MS que contenía 1 mg/L de AIA mostrando las mejores respuestas. Una de las posibilidades para la falta de respuesta en el ensayo 2, es que el AIA (y otras auxinas naturales) no se acumulan en grandes cantidades en las células, debido a que existen procesos naturales de eliminación desarrollado por las plantas, estos procesos son menos eficientes para las auxinas sintéticas, lo que permite acumularse y tener un periodo activo relativamente largo al aplicarlas exógenamente, por lo que es utilizada más como enraizador que como formador de callos (ROCA y MROGINSKI, 1991). Esto explicaría porque el ensayo 1, con solo 2,4-D (considerada una auxina sintética) se observaron respuestas positivas, mientras que al adicionarle el AIA fue todo lo contrario. Para FREIRE (2003) el exceso de auxina (en este caso, 2,4-D y AIA) posiblemente pueda suprimir la división celular, impidiendo la formación de callos y embriones.

4.3. Efecto de la combinación del 2,4-D y KIN en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (Ensayo 3)

En este ensayo se probó el balance hormonal de 2,4-D y KIN (kinetina), no obteniendo respuesta en ninguno de los aspectos evaluados. CABRERA *et*

al. (1996) indica que a concentraciones elevadas (1-10 mg/L) la kinetina pueden inducir a la formación de vástagos en piña, haciendo referencia a que las citoquininas (kinetina) se utilizan frecuentemente para estimular principalmente la división celular, el crecimiento y desarrollo, sobre todo si van acompañados de una auxina y no para la formación de callos; Por tanto el balance auxina-citoquinina es un factor muy importante en la regulación del alargamiento o división celular (FREIRE, 2003), Esto explicaría en parte, por qué en el ensayo 3 los tratamientos no respondieron en la formación de callos y embriones, contradiciendo a POSADA *et al.* (2007) quien en todos los tratamientos donde se utilizó kinetina en el medio de cultivo, se obtuvo respuesta positivas en la formación de callos y estructuras proembrionarias, incluso llegando a un elevado porcentaje de germinación de embriones.

V. CONCLUSIONES

1. El proceso de inducción de callos embriogénicos desarrollado en el experimento mostraron resultados positivos, encontrando respuestas en las semillas de 90 días sometidas al efecto de los seis niveles de 2,4-D.
2. En el efecto principal, el estado de la semilla inmadura de papayo con mejor respuesta fue el que tuvo 90 días de desarrollo, obteniendo callos a los 47.56 días promedio, con una superficie del medio de cultivo ocupada por el callos de 44.14%, por lo que se subcultivo en una segunda etapa.
3. En el efecto principal, la concentración de 2,4-D con mejor respuesta en el tiempo de aparición de callos fue a_6 (10 mg/L de 2,4-D) con 41.98 días promedio, mientras que en la superficie del medio de cultivo ocupada por el callos, la mejor concentración fue a_5 (8 mg/L de 2,4-D) con 59.18%.
4. El tratamiento (efecto combinado) con mejor respuesta en el tiempo de aparición y superficie del medio de cultivo ocupada por el callos fue el a_6b_2 (10 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días) con 33.76 días y 75.0%.
5. En la segunda etapa del ensayo 1, el tratamiento con menor tiempo en la aparición de estructura proembrionarias fue el T_5 (a_6b_2 + 5 mg/L 2,4-D) con 24.4 días promedio, mientras que en la cantidad de estructuras proembrionarias el tratamiento con mayor respuesta fue el T_4 (a_5b_2 + 4 mg/L 2,4-D) con 9.4 estructuras proembrionarias promedio.

VI. RECOMENDACIONES

1. Seguir el protocolo usado en el experimento para obtener resultados positivos en el proceso de inducción de callos embriogénicos, sobre todo en la parte de desinfección de los materiales.
2. Usar semillas inmaduras de papayo de 90 días de desarrollo en medio de cultivo con concentraciones de 8 y 10 mg/L de 2,4-D para la inducción de callos embriogénicos y subcultivar estos callos a medios de cultivos con 4 y 5 mg/L de 2,4-D adicionales.
3. Probar concentraciones superiores a los 10 mg/L de 2,4-D para observar la inducción de callos y estructuras proembrionarias sin la necesidad de realizar un subcultivo en medios de cultivo con concentraciones adicionales de 2,4-D.
4. Probar los balances hormonales de 2,4-D/AIA y 2,4-D/KIN en otros ensayos para ratificar o rechazar los resultados negativos obtenidos en el experimento.
5. Realizar estudios con 4 o más edades de frutos, Incluyendo el tipo de flor del que proviene, para determinar el efecto que tienen estos en la formación de callos.

VII. RESUMEN

Con la necesidad de encontrar un protocolo adecuado para la inducción de callos embriogénicos en el presente trabajo de tesis se planteó el objetivo general de desarrollar el proceso de Inducción de callos embriogénicos en semillas inmaduras de papayo de la variedad PTM-331, proveniente de flores femeninas de una sola planta, utilizando un balance hormonal. Iniciando el proceso con la recolección de los frutos inmaduros del semillero ubicado en el sector de Tulumayo, estos fueron llevados a un lavado y desinfección en los ambientes del laboratorio de Micropopagación, luego se almacenara a temperatura baja. Días siguientes se procedió a preparar los medios utilizados en los diferentes ensayos para lo cual se utilizaron las hormonas 2,4-D, AIA y KIN, en diferentes concentraciones. Con los medios preparados y suplementados con sus dosis de hormonas, se procedió a la siembra de las semillas inmaduras, a la cual se le desprendió de la testa, en condiciones de completa asepsia, una vez retirada esta estructura las semillas se sembraron en tubos de ensayos que contenían el medio de cultivo, para luego ser sellados y llevados a la cámara oscura. Las evaluaciones se realizaron interdiarias con la finalidad de ver la contaminación, para luego hacerlas semanales. En una primera etapa se encontró callos embriogénicos bien desarrollados en los tratamientos de T₁₂ (10 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días) con 75.0% y T₁₀ (8 mg/L 2,4-D + semilla de 90 días) con 71.5% en un tiempo de 33.76 y 39.13 días en promedio respectivamente. Estos tratamientos (con semilla de 90 días) se llevaron a una segunda etapa donde se utilizó la mitad de la concentración

inicial de 2,4-D, obtenido que estos mismos tratamientos con su denominación (T₅ y T₄) formaron estructuras proembrionarias a los 24.4 y 28.8 días en promedio, con una cantidad de estructuras de 8.7 y 9.4 en promedio respectivamente. En los ensayos 2 y 3 donde se utilizaron AIA y KIN no se encontró respuesta para ninguno de los tratamientos por lo que no se continuo con la evaluación. Concluyendo que el estado de la semilla inmadura de papayo con mejor respuesta fue el que tuvo 90 días de desarrollo sembradas en medios con 10 mg/L y 8 mg/L de 2,4-D, recomendando al final seguir el protocolo usado en el experimento para obtener resultados positivos en el proceso de embriogénesis y probar concentraciones superiores a los 10 mg/L de 2,4-D para observar la inducción de callos y estructuras proembrionarias sin la necesidad de realizar un subcultivo.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. BANERJEE, J. 2002. Tissue culture and transformation studies in indian cultivars of papaya (*Carica papaya* L.). Tesis presentada en opción del grado científico de doctor de Fisiología botánica. Universidad de Pune. India. 148 p.
2. BECERRA, N. y CHAPARRO, M. 1999. Morfología y anatomía vegetal. Primera edición. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
3. BROWN, D. C. y THORPE, T. A. 1995. Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11: 409-415.
4. CABRERA, P. J. L., VEGAS, G. A. y HERRERA, E. L. 1996. Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. 32: 86-90
5. CAÑAS, P, G. 2001. El cultivo de papayo (*Carica papaya* L.), Buenas prácticas agrícola en papaya. C.A. Centro nacional de tecnología agropecuaria. El Salvador, 158 p.
6. CARBAJAL, T. 1993. Cultivo de papaya. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú. 23 p.

7. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA – CHILE. 2007. La biotecnología vegetal en Chile: Capacidades de investigación y áreas de desarrollo científico-tecnológico. [En Línea]: CONICYT. (www.conicyt.cl/documentos/dri/ue/Biotec_Biotech_.pdf Doc. 15 de Jul. 2012).
8. DEL SOL, L., GARCÍA, M., GÁLVEZ, D., RODRÍGUEZ, S., TORRES, Y., MEDERO, V., LÓPEZ, J., VENTURA, J., CABRERA, M. 2001. Somatic embryogenesis in papaya cv. INIVIT-2000. Biotecnología Vegetal y Agricultura Sostenible. Resúmenes evento. Pp. 133 – 215.
9. ENDEMANN, M., y WILHELM, E. 1999. Factors influencing the induction and viability of somatic embryos of *Quercus robur* L. *Biologia plantarum*. 42(3): 499-504.
10. FEHER, A., PASTERNAK, T. P. y DUDITS, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue And Organ Culture*. 74(3): 201-228.
11. FLORES, D Y ABDELNOUR, A. 2000. Manual de laboratorio de cultivo de tejidos II. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de biología. 50 p.

12. FRANCIOSI, R. 2002. El cultivo de papaya en el Perú. Ed. FUNDEAGRO. Lima, Perú. Pp. 19.
13. FREIRE, S. M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de biotecnología de las plantas. Biotecnología vegetal. 3 (4): 195 - 209.
14. GALLARDO J. 2010. Análisis preliminar de los factores foliar y hormonal para la inducción de callos de café robusta (*Coffea Canephora*). Practica Pre Profesional, Bachiller en ciencias Agrarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva Tingo María – Perú 89 p.
15. GIL, I. A. y MIRANDA, D. 2005. Morfología de la flor y de la semilla de papaya (*Carica papaya* L.): variedad Maradol e híbrido Tainung-1. Agronomía Colombiana 23(2): 217-222.
16. GUTIERREZ, A., JIMÉNEZ, C. y YEPEZ, J. 2008. Embriogénesis somática en papaya (*Carica papaya* L.) variedad PT-101-B. Universidad Nacional Agraria la Molina. Perú. Boletín SN. 6 p.
17. HARLANDER, K. 2002. La evolución de la agricultura moderna y el futuro de la biotecnología. Revista: colegio americano de nutrición. 21(3): 161- 165.

18. INFOAGRO. 2001. Agro en información. Cultivo de papaya [En línea]; INFOAGRO (http://www.infoagro.com/frutas_tropicales/papaya.htm Doc. 15. Nov. 2011).
19. LITZ, R. E. 1986. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension cultures. *J. Amer. Soc. Hort.* 111(6): 969-972.
20. LITZ, R. E., CHAVEZ, V. M. y MOON, P. A. 1998. Induction of embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination. *Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and management.* 111(5): 232-243
21. MANZANILLA R. M. 2004. Inducción de embriogénesis somática de tejido nucelar de tres variedades de mango (*Mangifera indica* L.). Tesis M. Sc. en Biotecnología. Universidad de Colima. Colombia. 117 p.
22. MERKLE, S. A., SOTAK, R. J., WIECKO, A. T. y SOMMER, H. E. 1990. Optimización del sistema embrigenetico del álamo amarillo. Conferencia de mejoramiento forestal pp. 183-186.
23. OIRSA. 2002. Cultivo de papaya en Honduras [En línea]: OIRSA (<http://nsl.oirsa.org.sv/Publicacion/VIFINEX/Manual/Hondura/202.Papaya-Honduras-03.htm>. Documento 21 Sep. 2011).

24. PARROT, W. 2002. La embriogénesis somática en las angiospermas. Resúmenes. VI Simposio Internacional en Biotecnología Vegetal. IBP. Santa Clara. 14 (7): 284-293.
25. PESTANO, B. 2001. El cultivo de papayo. Grupo de Apoyo a las Cooperativas Independientes de Cuba [En línea]; (http://www.proyectorural.org/gaci_cuba/Pestano.htm) Doc. 17 Sep. 2012).
26. POSADA, P. L. 2005. Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la papaya. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Biotecnología Vegetal 5 (3): 67-79.
27. POSADA P. L., KOSKY, G. R. y REYES, M. 2007. Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. var. Maradol rojo. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Biotecnología Vegetal 7 (3): 131-138.
28. ROCA, W. y MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura (Fundamento y aplicación). Ed. XYZ. CIAT. Cali - Colombia. 969 p.
29. SHARP, W. R., EVANS, D. A. y SONDAHL, M. R. 1982. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: Plant Tissue Culture 1982. Fujiwara, A. (Ed). Jpn. Assoc. Plant Tissue Culture, Pp. 759-762.

IX. ANEXO

Cuadro 22. Presencia de callos por tratamiento en el ensayo 1.

T	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Σ	\bar{x}
T ₁	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2.0	0.2
T ₂	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3.0	0.3
T ₃	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	3.0	0.3
T ₄	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	4.0	0.4
T ₅	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2.0	0.2
T ₆	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	4.0	0.4
T ₇	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	4.0	0.4
T ₈	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	6.0	0.6
T ₉	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	3.0	0.3
T ₁₀	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	7.0	0.7
T ₁₁	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	5.0	0.5
T ₁₂	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	8.0	0.8

0 = Sin presencia
1 = con Presencia

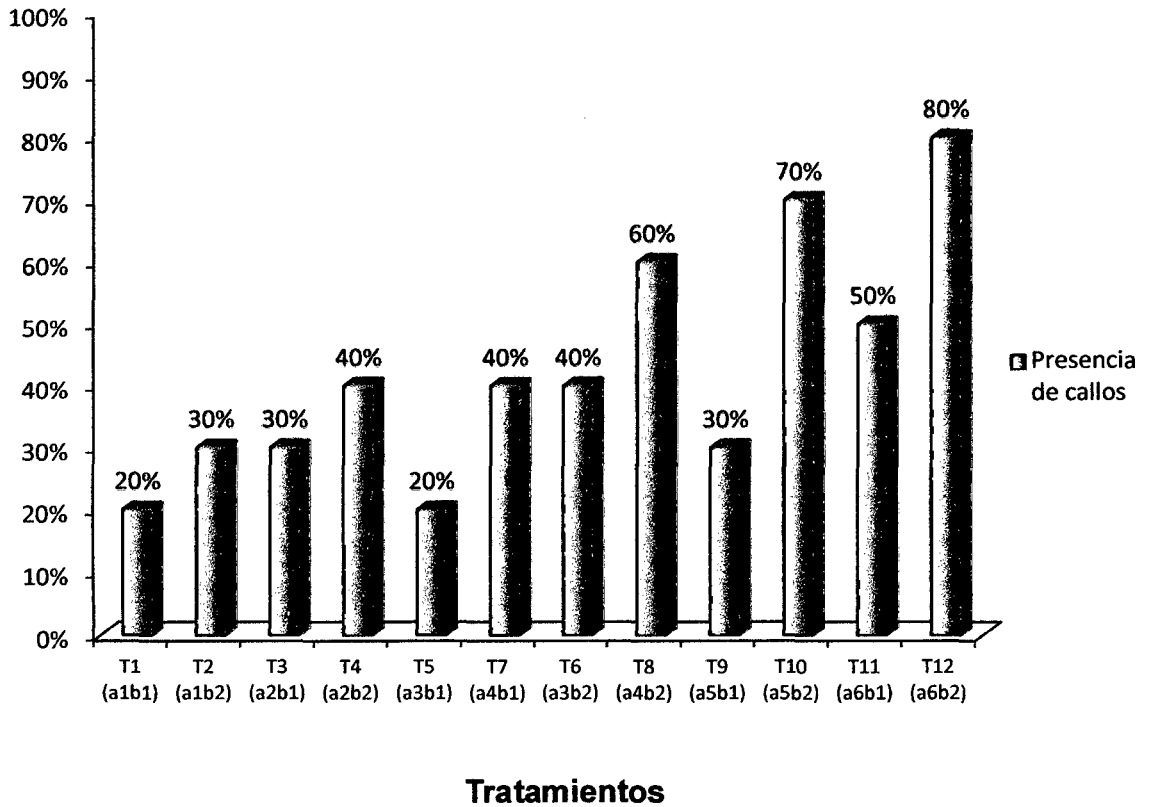


Figura 7. Presencia de callos por tratamiento en el ensayo 1.

Cuadro 23. Presencia de organogénesis por tratamiento en el ensayo 1.

T	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Σ	\bar{x}
T ₁	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	6.0	0.6
T ₂	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	9.0	0.9
T ₃	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	5.0	0.5
T ₄	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	7.0	0.7
T ₅	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2.0	0.2
T ₆	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2.0	0.2
T ₇	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2.0	0.2
T ₈	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
T ₉	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
T ₁₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
T ₁₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
T ₁₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0

0 = Sin presencia
1 = con Presencia

Cuadro 24. Contaminación por tratamiento en el ensayo 1.

T	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Σ	\bar{x}
T ₁	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1.0	0.1
T ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1.0	0.1
T ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
T ₄	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0.1
T ₅	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1.0	0.1
T ₆	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2.0	0.2
T ₇	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
T ₈	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
T ₉	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
T ₁₀	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3.0	0.3
T ₁₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
T ₁₂	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2.0	0.2

0 = Sin presencia
1 = con Presencia