

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE AGRONOMIA

Departamento Académico de Ciencias Agrarias



**“INDUCCIÓN IN VITRO DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS CON
DIFERENTES SUPLEMENTOS ORGANICOS Y REGULADORES
DE CRECIMIENTO EN SEMILLAS INMADURAS DE PAPAYO
(*Carica papaya* L.), CV. PTM - 331 Y CV. TAINUNG”**

TESIS

Para optar al título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

YANET, BERAUN CRUZ

Tingo María - Perú

2014

DEDICATORIA

A nuestro padre Dios quien cada día me da fuerzas y me infunde aliento para seguir adelante en este mundo competitivo.

A mis padres María Enriqueta Cruz Chávez y Falcón Beraun Duran por su amor, trabajo y sacrificios en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Es un privilegio ser su hija.

A mis hermanos, Noemí y Elías quienes en todo momento me dieron su apoyo y me extendieron su mano para compartir momentos buenos y difíciles durante mi etapa de desarrollo profesional.

AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en especial a la Facultad de Agronomía que contribuyó en mi formación profesional.
- Al laboratorio de Micropropagación quien contribuyo para realizar la ejecución de mi proyecto de tesis.
- Al Blgo. M. Sc. Julio Chía Wong por su valiosa colaboración y supervisión en el desarrollo de la Tesis.
- A los miembros del Jurado de Tesis; Ing. M. Sc. David Guarda Sotelo, Ing. Luis García Carrión, Blgo. M. Sc. Miguel Ángel Huauya Rojas por su colaboración en el presente trabajo.
- A los docentes de la facultad de agronomía por ser maestros con una capacidad de lograr profesionales de éxitos.
- A mis amigos que estuvieron en todo momento apoyando de manera desinteresada e incondicional.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	9
II. REVISIÓN DE LITERATURA	13
2.1 Generalidades del cultivo del papayo.....	13
2.1.1 Origen.....	13
2.1.2 Clasificación taxonómica	14
2.1.3 Descripción botánica	14
2.1.4 La semilla	15
2.1.5 Cultivar Tainung.....	17
2.1.6 Cultivar PTM-331.....	18
2.2 Micro propagación in vitro.....	18
2.2.1 El cultivo de tejidos.....	19
2.2.2 Factores que influyen en la adquisición de capacidad embriogénica	24
2.2.3 Aplicaciones de la embriogénesis somática	25
2.2.4 Células proembriogénicas	26
2.3 Antecedentes en el papayo	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Lugar de ejecución	29
3.2 Materiales y equipos	29
3.2.1 Material vegetativo.....	29
3.2.2 Equipos.....	30
3.2.3 Reactivos	30

3.2.4	Insumos	30
3.3	Metodología	31
3.3.1	Obtención del material vegetativo.....	31
3.3.2	Preparación del medio de cultivo.....	31
3.4.	Efecto de los suplementos orgánicos y dos medios de cultivo en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (Ensayo 1)	34
3.4.1	Factores en estudio	34
3.4.2	Diseño experimental para el ensayo 1.....	34
3.4.3	Descripción del ensayo 1.....	36
3.5	Efecto de la combinación del 2,4-D y KIN en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (Ensayo 2).....	36
3.5.1	Factores en estudio	36
3.5.2	Diseño experimental para el ensayo 2.....	37
3.5.3	Descripción del ensayo 2.....	37
3.6	Parámetros a evaluar en el ensayo 1.....	38
3.7	Parámetros a evaluar en el ensayo 2.....	39
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1.	Efecto de los suplementos orgánicos y dos medios de cultivo en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo para el ensayo 1	40
4.1.1	Efectos en el papayo PTM – 331.....	40
4.1.2	Efectos en el papayo cv. Tainung.....	63

4.2 Efecto de la combinación del 2,4-D y KIN en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (Ensayo 2).....	64
4.2.1 Efectos en el papayo cv. PTM – 331	64
4.2.2 Efectos en el papayo cv. Tainung.....	67
V. CONCLUSIONES	68
VI. RECOMENDACIONES.....	69
VII. RESUMEN.....	70
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	72
IX. ANEXO	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Composición del medio MS basal y modificado.....	32
2. Análisis de variancia para el tiempo de aparición de callos embriogénicos	40
3. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el tiempo de formación de callos.....	41
4. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el medio de cultivo (A) en los diferentes suplementos orgánicos (b); en el tiempo de formación de callos.	45
5. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los suplementos orgánicos (B) en el medio de cultivo a_1 y a_2 ; en el tiempo de formación de callos	46
6. Análisis de variancia para el tiempo de aparición de las estructuras proembrionarias.....	49
7. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el tiempo de aparición de estructuras proembrionarias.....	51
8. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el medio de cultivo(A) en el tiempo de formación de estructuras proembrionarias	53
9. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el medio de cultivo (A) en los distintos suplementos orgánicos (b_1 , b_2 , b_4 y b_5) en el tiempo de formación de estructuras proembrionarias.	54
10. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los suplementos orgánicos (B) en los medios de cultivo a_1 y a_2 , en el tiempo de formación de estructuras proembrionarias.....	55

11. Análisis de variancia para el número de estructuras proembrionarias (datos transformados a $\sqrt{x+1}$)).	55
12. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el número de estructuras proembrionarias (datos transformados a $\sqrt{x+1}$).....	56
13. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el medio de cultivo (A), en el número de estructuras proembrionarias (datos transformados a $\sqrt{x+1}$)	59
14. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el medio de cultivo (A) en los compuestos orgánicos b_1 , b_2 y b_3 en el número de estructuras proembrionarias (datos transformados a $\sqrt{x+1}$).....	60
15. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los suplementos orgánicos (B) en el medio de cultivo a_2 en el número de estructuras proembrionarias (datos transformados a $\sqrt{x+1}$)	61
16. Análisis de variancia para los efectos simples de los medios de cultivos (A) y para los suplementos orgánicos (B) en el tiempo de formación de callos.....	78
17. Análisis de variancia para los efectos simples del medio de cultivo (A) para los suplementos orgánicos (B), en el tiempo de formación de estructuras proembrionarias.	78
18. Análisis de variancia para los efectos simples del medio de cultivo (A) y para los suplementos orgánicos (B) en el número de estructuras proembrionarias	79
19. Resultados del balance hormonal de 2,4-D/kinetina (ensayo 2) en papayo PTM-331	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Presencia de organogénesis en los tratamientos en estudio	47
2. Fotos de semillas inmaduras mostrando la organogénesis en los tratamientos T ₄ (a) y T ₅ (b)	47
3. Promedio de estructuras proembrionarias en cada uno de los tratamientos (datos reales).....	57
4. Estructuras proembrionarias obtenidas en semilla inmadura de papayo cv. PTM-331 con los tratamientos.	59
5. Porcentaje de contaminación en los tratamientos en estudio.....	62
6. Contaminación en los tratamientos T ₆ (a) y T ₁₀ (b).	62
7. Porcentaje de callos formados en los tratamientos	65
8. Tiempo de formación de callos en los tratamientos	65
9. Porcentaje de contaminación y organogénesis de los tratamientos..	67
10. Fruto del papayo PTM-331.....	80
11. Fruto del papayo Tainung.....	80
12. Realizando la limpieza de las semillas inmadura de papayo.....	81
13. Realizando la eliminación de la testa que se encuentra en la semilla inmadura de papayo.....	81
14. Realizando el sellado del tubo de ensayo con el tratamiento instalado	82
15. Evaluación de los callos encontrados en los tratamientos	82

I. INTRODUCCIÓN

El papayo (*Carica papaya* L.) es un cultivo semiperenne cuya producción comienza al año de su instalación, y ésta se mantiene anualmente por dos a cuatro años consecutivos aproximadamente. Estas y otras características hacen que este cultivo sea de buena aceptación para los agricultores, ya que permite tener cierto grado de ganancias. Sin embargo, en los últimos años su cultivo en nuestra región se ha visto limitada, pese a ser un cultivo óptimo para la agroindustria en nuestro país, debido a la falta de semillas mejoradas que brinden una buena producción, y sobre todo que tengan resistencia a plagas y enfermedades, tal es el caso del virus de “la mancha anillada de la papaya” (PRSV), cuya presencia en nuestra región 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 campañas para la búsqueda de variedades tolerantes al virus, por ello se ha visto necesario incorporar programas de mejoramiento en muchas empresas e instituciones relacionadas a este cultivo, obteniendo resultados alentadores, pero que a su vez nos llevan al encuentro de otros problemas, tal es el caso que al realizar el cruce de una *Carica papaya* (susceptible a PRSV) con *C. cauliflora* (variedad tolerante) que son sexualmente incompatibles, se pueden obtener embriones que se desarrollan por 1 o 3 meses después de la polinización, abortando generalmente a este tiempo, debido a que el endosperma no se desarrolla (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008).

Otro limitante al avance del mejoramiento genético y biotecnológico del papayo y otros cultivos, es la información por parte de medio ambientalistas extremos sobre estos temas, llevando al poco interés para la realización de estos estudios. Viendo estos problemas, la biotecnología por medio de la embriogénesis que se le ha preferido entre otros métodos, 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 fenólicos (LITZ, 1986).

El desarrollar un protocolo eficiente de regeneración de cultivos celulares de variedades de papayo vía embriogénesis abre la posibilidad para poder resolver más rápido y eficazmente algunos de los problemas de éste y otros cultivos. Además, traería algunos beneficios de estos procesos tales como 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, como es el caso del papayo; para la conservación de especies que se estén en estado de desaparición, para producir semillas artificiales con características de buena producción en el menor espacio posible y restantes o tolerantes a enfermedades y plagas etc. Por lo antes expuesto, nos permite plantear las siguientes hipótesis: de que es factible establecer el proceso de embriogénesis en su primera fase (Inducción de callos) para semillas inmaduras de papayo, en nuestras condiciones y obtener estructuras

proembrionarias con el uso de auxinas y suplementos orgánicos. Para probar estas hipótesis, este estudio tendrá como objetivos:

Objetivo general:

- Desarrollar un método de inducción de callos embriogénicos en semillas inmaduras de papayo cv. PTM-331 y cv. Tainung.

Objetivos específicos:

- Evaluar el proceso de desarrollo de callos embriogénicos en semillas inmaduras de papayo.
- Determinar los efectos de diferentes aportes de un suplemento orgánico en un medio MS y MSm (modificado) en la formación de callos embriogénicos.
- Determinar el mejor efecto del balance hormonal de 2,4 D y KIN (kinetina) en el desarrollo de callos embriogénicos de semillas inmaduras.

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 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 *C. papaya*, es una planta siempre verde de crecimiento muy rápido, el tallo es herbáceo fistulado y con un látex lechoso (FRANCIOSI, 2002; 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 palmatilobadas (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 de 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 esféricas, 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, 2002; 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).

2.1.5 Cultivar Tainung

En Taiwán se ha desarrollado el híbrido Tainung, que produce exclusivamente plantas hermafroditas del tipo elongata, lo cual ha despertado el interés de productores y comerciantes ya que se tendrían únicamente frutas alargadas (GARCÍA, 2010).

a. Características de la planta

Las plantas son vigorosas y pueden medir a la primera cosecha, entre 2.50 a 3.00 m de altura, desarrollan un follaje exuberante, su tallo medido a 0.50 m de altura desarrolla un grosor de 0.20 m, sus hojas, pedúnculos y tallos son de color oscuro. Inician la floración a tres meses de plantada en campo, la distancia entre nudos es corta, su producción de fruta es baja (CAÑAS, 2001).

b. Características de la fruta

Las frutas de plantas de esta variedad, tienen forma alargada, presentando un verde brillante en precosecha, el tamaño de la fruta varía poco, con un peso promedio de 900 g, el largo promedio es de 20 cm y el ancho 12 cm en relación con su tamaño. La cavidad es pequeña, no estrellada con pulpa suave y gruesa. El color de la pulpa es anaranjado intenso. Su cáscara y consistencia permite larga vida y resistencia en el transporte (CAÑAS, 2001).

2.1.6 Cultivar PTM-331

Variedad obtenida en base a selección individual de población en el alto Huallaga, femenina, fruto de tamaño mediano, forma oval, peso de 1.8 a 2.2 kg. Pulpa de color amarillo intenso muy buena calidad de pulpa, tolerante a plagas y enfermedades y producción estimada en 36 a 42 TM/ha, variedad producida en Tingo María, certificada y protegida por INDECOPI (CARBAJAL, 1993).

2.2 Micro propagación in vitro

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 micro propagación, aunque todavía presenta problemas en la reconversión de la 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. Se supone que estos explantes están compuestos principalmente de células que requieren una menor regulación 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 secundarios, o transformación genética tienen como base la embriogénesis recurrente o también llamada repetitiva, accesoria, proliferante o 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 del cotiledón (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 extracelulares (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 naphtalenacetico (ANA), picloram y ácido picolínico. 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 de 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 biorreactores 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 cultivado *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 en el papayo

POSADA *et al.* (2007), mencionan 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 de 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 alcanzaran un promedio de 3.05 cm de longitud y 4.50 hojas, lo cual propició su adecuada supervivencia en la fase de climatización.

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 éstos 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.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Micro-propagación 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 : 8970048.3926 N

Latitud sur : 390514.9524 E

Altitud : 673 msnm.

3.2 Materiales y equipos

3.2.1 Material vegetativo

Se emplearon semillas inmaduras de frutos verdes en buenas condiciones fisiológicas; proveniente de flores femeninas de una sola planta de papayo de dos variedades: PTM-331(Tulumayo-José Crespo y Catillo) y Tainung (Pucayacu-José Crespo y Castillo) de aproximadamente 90 días desde el inicio de la diferenciación del fruto, cosechado tres días anterior a la siembra in vitro, con dimensiones de 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).
- KIN (kinetina).
- Medio basal Murashige y Skoog (1962) (MS).
- Agentes desinfectantes: Alcohol medicinal, hipoclorito de sodio.

3.2.4 Insumos

- Hojas de bisturí Nº 10.
- Mechero de alcohol.
- Frascos y marcadores de vidrio.
- Cinta de sellado Parafim.
- Gradillas inclinadas.
- Pipeta pasteur
- 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 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 enjuagó 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) con la hormona 2,4-D y suplementos orgánicos (caseína hidrolizada, extracto de malta, cisteína y L-glutamina) y con una combinación de 2,4-D y KIN, 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 y MSm para un litro.

Cuadro 1. Composición del medio MS basal y modificado.

Componentes	MS(mg/L)	MSmodificado (mg/L)
Macronutrientes		
KNO ₃	1900	950
NH ₄ NO ₃	1650	825
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	6.20	6.20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30	22.30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	8.60
KI	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	27.80	27.80
Na ₂ -EDTA	37.30	37.30
Vitaminas y compuestos orgánicos		
Tiamina-HCl	1.00	1.00
Ácido nicotínico	0.50	0.50
Piridoxina HCl	0.50	0.50
Glicina	2.00	2.00
L-Glutamina	---	---
Myo inositol	100	100
Sucrosa	30000	30000

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

a. Procedimiento

- Obtenidas las concentraciones requeridas para la preparación de medio de cultivo MS, para el primer ensayo, se procedió a agregar las concentraciones de las fuentes nitrogenadas o suplementos orgánicos (mencionados en la sección 3.4.1) y se agregó 10 mg/L del regulador de crecimiento 2,4 -D a todos los tratamientos. Luego se enrazó con agua destilada.
- En el ensayo 2, se constituyeron los tratamientos para la inducción de los callos embriogénicos, con las combinaciones de 2,4-D más KIN (mencionados en la sección 3.5.1) y se usó como medio basal, al mejor medio basal y suplemento orgánico obtenidos del ensayo 1. 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.

3.4 Efecto de los suplementos orgánicos y dos medios de cultivo en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (Ensayo 1)

3.4.1 Factores en estudio

- **Factor A:** Concentración de los componentes del medio de cultivo.
 - a_1 = MS (100%)
 - a_2 = MS modificado (à mitad de concentración de KNO_3 y NH_4NO_3)
- **Factor B:** Suplementos orgánicos: caseína hidrolizada, extracto de malta, cisteína y L-glutamina.
 - b_1 = Sin suplemento
 - b_2 = Caseína hidrolizada (100 mg/L)
 - b_3 = Extracto de malta (100mg/L)
 - b_4 = Cisteína (10 mg/L)
 - b_5 = L-Glutamina (0,4 mg/L)

3.4.2 Diseño experimental para el ensayo 1

Para el análisis estadístico se usará la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) con diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2×5 , con 10 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento (CALZADA, 1981).

El modelo aditivo lineal del presente experimento será:

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

Dónde:

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

Para:

i = 1,2 concentración de medio MS.

j = 1,2... 5 Suplementos orgánicos.

k = 1,2,...10 repetición

3.4.3 Descripción del ensayo 1

Se utilizaron las semillas inmadura de papaya (90 días de edad) cv. PTM – 331 y del cv. Tainung, en perfectas condiciones, sembradas en 10 tratamientos, en un medio de cultivo base MS y un medio MS a mitad de concentración (Cuadro 1), con 10 repeticiones. Los tratamientos están de acuerdo a la siguiente denominación:

1. $T_1 = a_1b_1 = \text{MS} + \text{sin suplemento}$
2. $T_2 = a_1b_2 = \text{MS} + \text{caseína hidrolizada (100 mg/L)}$
3. $T_3 = a_1b_3 = \text{MS} + \text{extracto de malta (100mg/L)}$
4. $T_4 = a_1b_4 = \text{MS} + \text{cisteína (10 mg/L)}$
5. $T_5 = a_1b_5 = \text{MS} + \text{L-glutamina (0,4 mg/L)}$
6. $T_6 = a_2b_1 = \text{MSm} + \text{sin suplemento}$
7. $T_7 = a_2b_2 = \text{MSm} + \text{caseína hidrolizada (100 mg/L)}$
8. $T_8 = a_2b_3 = \text{MSm} + \text{extracto de malta (100mg/L)}$
9. $T_9 = a_2b_4 = \text{MSm} + \text{cisteína (10 mg/L)}$
10. $T_{10} = a_2b_5 = \text{MSm} + \text{L-glutamina (0,4 mg/L)}$

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

3.5.1 Factores en estudio

- **Factor A:** Concentración del 2,4 D.
 - $a_1 = 0 \text{ mg/L de 2,4-D}$
 - $a_2 = 1 \text{ mg/L de 2,4-D}$

- $a_3 = 5 \text{ mg/L}$ de 2,4-D
- $a_4 = 10 \text{ mg/L}$ de 2,4-D
- **Factor B:** Concentración de kinetina.
 - $b_1 = 0 \text{ mg/L}$ de KIN
 - $b_2 = 1 \text{ mg/L}$ de KIN
 - $b_3 = 5 \text{ mg/L}$ de KIN
 - $b_4 = 10 \text{ mg/L}$ de KIN

3.5.2 Diseño experimental para el ensayo 2

Para el análisis estadístico se usó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) con diseño completamente al azar (DCA), con 16 tratamientos ($T_0, T_1, T_2, T_3 \dots T_{16}$) y 10 repeticiones.

3.5.3 Descripción del ensayo 2

A partir de los resultados del ensayo 1, en el cual se obtuvo el mejor tratamiento (mejor medio de cultivo y suplemento orgánico), se procedió a instalar el ensayo 2. También se utilizaron las semillas inmaduras de papaya (90 días de edad) del cv. PTM – 331 y del cv. Tainung, en perfectas condiciones a las cuales se sembraron en diferentes balances hormonales (2,4-D/KIN) haciendo un total de 16 tratamientos, con 10 repeticiones (CALZADA, 1981). Los tratamientos están de acuerdo a la siguiente denominación:

1. $T_1 = a_1b_1$ (0 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN)
2. $T_2 = a_1b_2$ (0 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN)

3. $T_3 = a_1b_3$ (0 mg/L 2,4-D + 5 mg/L KIN)
4. $T_4 = a_1b_4$ (0 mg/L 2,4-D + 10 mg/L KIN)
5. $T_5 = a_2b_1$ (1 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN)
6. $T_6 = a_2b_2$ (1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN)
7. $T_7 = a_2b_3$ (1 mg/L 2,4-D + 5 mg/L KIN)
8. $T_8 = a_2b_4$ (1 mg/L 2,4-D + 10 mg/L KIN)
9. $T_9 = a_3b_1$ (5 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN)
10. $T_{10} = a_3b_2$ (5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN)
11. $T_{11} = a_3b_3$ (5 mg/L 2,4-D + 5 mg/L KIN)
12. $T_{12} = a_3b_4$ (5 mg/L 2,4-D + 10 mg/L KIN)
13. $T_{13} = a_4b_1$ (10 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN)
14. $T_{14} = a_4b_2$ (10 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN)
15. $T_{15} = a_4b_3$ (10 mg/L 2,4-D + 5 mg/L KIN)
16. $T_{16} = a_4b_4$ (10 mg/L 2,4-D + 10 mg/L KIN)

3.6 Parámetros a evaluar en el ensayo 1

- **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.
- **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).

- **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.
- **Contaminación y fenolización.** Se evaluó el porcentaje por tratamiento de la posible contaminación y fenolización.

3.7 Parámetros a evaluar en el ensayo 2

- Porcentaje y tiempo de formación de callos
- Cantidad y tiempo de formación de estructuras proembrionarias
- Porcentaje de organogénesis
- Porcentaje de contaminación

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto de los suplementos orgánicos y dos medios de cultivo en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo para el ensayo 1

4.1.1 Efectos en el papayo PTM – 331

a. Tiempo de aparición de callos embriogénicos

Para el tiempo (días) que tomó a cada tratamiento en formar los callos, el Cuadro 2 muestra diferencia estadística significativa, tanto para los tratamientos como para la interacción de AxB, mientras que para el factor A (medio de cultivo) el factor B (suplemento orgánico) no se encontraron diferencias estadísticas significativas. Además muestra un coeficiente de variabilidad de 12.33%, indicando que existe una buena homogeneidad en la respuesta de los medios de cultivo y los diferentes los compuestos orgánicos.

Cuadro 2. Análisis de variancia para el tiempo de aparición de callos embriogénicos.

F. de Variación	GL	SC	CM	Sig.
Tratamientos	9	1710.81	190.09	S
A (Medio de cultivo)	1	79.21	79.21	NS
B (Suplemento orgánico)	4	630.56	157.64	NS
A x B	4	1001.04	250.26	S
Error experimental	90	1998.90	22.21	
Total	99	3709.71		

CV: 12.33%

S : Diferencia estadística al 5% de probabilidad

NS: No existe significación Estadística.

Al realizar la comparación de medias para el tiempo transcurrido hasta la formación de callos mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), podemos ver en el Cuadro 3, que solo el Tratamiento T₅ (MS + 0,4 mg/L de L-glutamina) con 46.40 días, mostró diferencia significativa con los tratamientos T₇ (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada), T₁ (MS + Sin suplemento), T₄ (MS + 10 mg/L de cisteína) y T₉ (MSm+ 10 mg/L de cisteína), pero siendo similar al resto de los tratamientos. Por otra parte, el tratamiento T₇ (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada) mostró tener el menor tiempo en la formación de callos, obteniendo los callos solo en 32.60 días, seguido del tratamiento T₁ (MS + sin suplemento) con 33.10 días, pero no encontrándose diferencia significativa entre ellos.

Cuadro 3. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el tiempo de formación de callos.

Clave	Tratamiento (Aplicación)	Tiempo (días)	Sig. *
T ₅ (a ₁ b ₅)	MS + 0,4 mg/L de L-glutamina	46.40	a
T ₃ (a ₁ b ₃)	MS + 100mg/L de extracto de malta	41.60	a b
T ₆ (a ₂ b ₁)	MSm + Sin suplemento	41.50	a b
T ₈ (a ₂ b ₃)	MSm+ 100mg/L de extracto de malta	39.90	a b
T ₂ (a ₁ b ₂)	MS + 100 mg/L de caseína hidrolizada	38.70	a b
T ₁₀ (a ₂ b ₅)	MSm + 0,4 mg/L de L-glutamina	38.50	a b
T ₉ (a ₂ b ₄)	MSm + 10 mg/L de cisteína	35.40	b
T ₄ (a ₁ b ₄)	MS + 10 mg/L de cisteína	34.60	b
T ₁ (a ₁ b ₁)	MS + Sin suplemento	33.10	b
T ₇ (a ₂ b ₂)	MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada	32.60	b

MS = Medio Murashige y Skoog (1962). MSm = Medio Murashige y Skoog (1962) a mitad de concentración

* Los tratamientos unidos por la misma letra en la columna no existe significación estadística.

CABRERA (2013), en su trabajo de tesis encontró callos embriogénicos entre los 33.76 y 73.00 días después de la siembra. Este mismo autor comprobó, en el efecto principal de sus resultados, que es la semilla de 90 días en la que se obtiene callos en menor tiempo (47.56 días) indicando que el menor tiempo de callogénesis obtenida en esta investigación, se debió posiblemente a que se usaron semillas no tan inmaduras, lo que podría generar respuesta más rápida en la formación de callos. Confirmando los resultados obtenidos, donde con semillas de 90 días de edad, se obtuvieron callos entre los 32.6 y 46.0 días después de la siembra, si bien en el presente experimento se ve un menor tiempo en la formación de callos, esto aparte del efecto de la edad de la semilla, posiblemente, también es influenciado por los suplementos orgánicos, como en el caso de la caseína hidrolizada, utilizada en el tratamiento T₇ (tratamiento con menor tiempo en la formación de callo) ya que según SALAZAR *et al.* (2005) la caseína hidrolizada, es una fuente de nitrógeno orgánico beneficiosa para la inducción de callos, especialmente en el cultivo de embriones inmaduros de cacao y otros cultivos, pero inhibe el desarrollo de callos regenerados a partir del cultivo *in vitro* de anteras. La diferencia entre los dos mejores tratamientos (T₇ y T₁) no fue significativa, a pesar de ser tratamientos totalmente diferentes, tanto por el medio de cultivo y el suplente orgánico utilizado, posiblemente estas respuestas similares de ambos tratamientos, se dio gracias a que en el tratamiento T₁ se empleó el medio de cultivo MS estándar o basal, sin la adición de suplementos orgánicos, mientras que en el tratamiento T₇ se empleó un medio de cultivo MS a mitad de concentración (MSm), que se refiere principalmente a la reducción de la

concentración de nitratos (KNO_3 y NH_4NO_3) a la mitad (ver Cuadro 1). Está reducción de nitrógeno en el medio de cultivo utilizado, fue sustituido por otra el suplemento orgánico (caseína hidrolizada), haciendo que ambos tratamientos, al tener posiblemente similar cantidad de nitrógeno, responda de igual manera, no encontrándose diferencia significativa.

También vale resaltar a los tratamientos T_4 (MS + 10 mg/L de cisteína) y T_9 (MSm + 10 mg/L de cisteína), que tuvieron una respuesta similar estadísticamente a los tratamientos T_7 y T_1 , y si bien no se pudo encontrar reportes que permitan explicar esta respuesta, posiblemente al ser la cisteína un aminoácido sulfúrico y que al autoclavarlo, aparentemente se descompone y actúa como una fuente de azufre (DURZAN y STEWARD, 1983), permitiendo un crecimiento y desarrollo de las células, que al ser combinado con el efecto del 2,4-D, logren en un menor tiempo el crecimiento del callo embriogénico. Vale señalar que para todos los tratamientos se empleó una concentración de 10 mg/L de 2,4-D (CABRERA, 2013), por lo que solo se buscó el efecto de los suplementos orgánicos y del medio de cultivo, dando por obvio la influencia de esta hormona en la callogénesis de los tratamientos.

LITZ (1986), probó edades de semillas de 60 y 70 días, obteniendo resultados en la formación de callos a partir de segundo mes, llegando a casi a una totalidad recién al cuarto mes. POSADA *et al.* (2007), emplearon 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 proembrionarios a las 6 semanas (42 días).

Con lo encontrado en el presente trabajo podríamos decir que se minimizaron los días que demoran la formación de callos, gracias a la adición de suplementos orgánicos a un medio de cultivo con dosis de 10 mg/L de 2,4-D.

PARROT (2002), menciona que cuando las concentraciones de auxina exógena se elevan a un determinado nivel, se detiene la formación de callos, CABRERA (2013) encontró que a concentraciones de 8 y 10 mg/L de 2,4-D, los callos proembriogénicos se obtienen en menor tiempo, pero no pudo comprobar lo manifestado por BANERJEE (2002), quien indica que el umbral para la formación de callos es de 15 mg/L de 2,4-D. Este trabajo muestra una nueva opción para reducir el tiempo de callogénesis en papayo PTM – 331, sin la necesidad de elevar las concentraciones de 2,4-D.

En el Cuadro 4 se muestra la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el efecto simple del factor A en b_1 , donde el tratamiento T_1 (MS + Sin suplemento) mostró tener un mejor efecto en la formación de callos, ya que fue el que tuvo un menor tiempo (33.10 días), mostrando diferencia estadística con el tratamiento T_6 (MSm + Sin suplemento) donde se formaron los callos a los 41.50 días. Para el efecto simple A en b_2 , el tratamiento T_7 (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada) demostró tener una mejor respuesta callogénica, tomándole solo 32.60 días en la formación de callos, encontrando diferencia estadística con el tratamientos T_2 (MS + 100 mg/L de caseína hidrolizada). Para el efecto simple de A en b_5 , podemos ver que el tratamiento T_{10} (MSm + 0,4 mg/L de L-glutamina) obtuvo el menor tiempo en la formación de callos con

38.50 días, encontrando diferencia significativa con el tratamiento T₅ (MS + 0,4 mg/L de L-glutamina) donde se encontraron los callos a los 46.40 días.

Cuadro 4. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el medio de cultivo (A) en los diferentes suplementos orgánicos (b); en el tiempo de formación de callos.

Efecto simple	Tratamiento	Tiempo (días)	Sig. *
A en b₁	T ₆ (a ₂ b ₁)	41.50	a
	T ₁ (a ₁ b ₁)	33.10	b
A en b₂	T ₂ (a ₁ b ₂)	38.70	a
	T ₇ (a ₂ b ₂)	32.60	b
A en b₅	T ₅ (a ₁ b ₅)	46.40	a
	T ₁₀ (a ₂ b ₅)	38.50	b

* Los tratamientos unidos por la misma letra en la columna no existe significación estadística.

El efecto de los medio de cultivo (factor A), tanto cuando fueron utilizados con caseína hidrolizada (b₂), L-glutamina (b₅) y sin suplemento orgánico (b₁), mostraron repuestas diferentes. El medio MSm (a mitad de concentración) mostro una mejor respuesta al ser suplementado con caseína hidrolizada, mientras que el medio MS (basal) resultó tener mejores efectos si se suplementa con L-glutamina o si se trabaja sin suplemento. Todas estas repuestas, posiblemente se deban a un sinergismo o inhibición por parte de los componentes nitrogenados, pero no se pudo encontrar reporte que permitan esclarecer más estos resultados.

Para poder observar el efecto simple en el tiempo de formación de callos del factor B (suplementos orgánicos) en los dos medios de cultivo del factor A, el Cuadro 5, muestran la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), donde

los tratamientos T₁ (MS + Sin suplemento) y T₇ (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada) son los que formaron callos en menor tiempo (33.10 y 32.60 días respectivamente), mostrando diferencias significativas solo con algunos suplementos orgánicos utilizados en estos dos medios (a₁ y a₂).

Cuadro 5. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los suplementos orgánicos (B) en el medio de cultivo a₁ y a₂; en el tiempo de formación de callos.

B en a ₁			B en a ₂		
Trat	Tiempo (días)	Sig. *	Trat	Tiempo (días)	Sig. *
T ₅ (a ₁ b ₅)	46.40	a	T ₆ (a ₂ b ₁)	41.50	a
T ₃ (a ₁ b ₃)	41.60	a	T ₈ (a ₂ b ₃)	39.90	a b
T ₂ (a ₁ b ₂)	38.70	a b	T ₁₀ (a ₂ b ₅)	38.50	a b
T ₄ (a ₁ b ₄)	34.60	b	T ₉ (a ₂ b ₄)	35.40	a b
T ₁ (a ₁ b ₁)	33.10	b	T ₇ (a ₂ b ₂)	32.60	b

* Los tratamientos unidos por la misma letra en la columna no existe significación estadística.

La caseína hidrolizada obtuvo una mejor respuesta en el medio de cultivo MSm (a₂), pero solo se encontró diferencia significativa con el tratamiento donde no se utilizó ningún suplemento. En el medio MS (a₁), los suplementos de extracto de malta, cisteína y el tratamiento sin suplemento tuvieron una respuesta similar, no encontrando diferencia significativa entre ellos pero si con el resto de los tratamientos. En este caso tampoco se encontró reportes que permitan explicar estos resultados.

b. Presencia de organogénesis

Dentro de los parámetros en estudio, se evaluó la presencia o formación de órganos como raíces, tallos u hojas (organogénesis) por parte de los tratamientos. La Figura 1 muestra que fueron los tratamientos T₁ (MS + Sin suplemento) y T₅ (MS + 0,4 mg/L de L-glutamina) donde se presentaron los mayores porcentajes de organogénesis. Entre las principales estructuras que se vieron fueron la presencia de raíces y cotiledones (Figura 2).

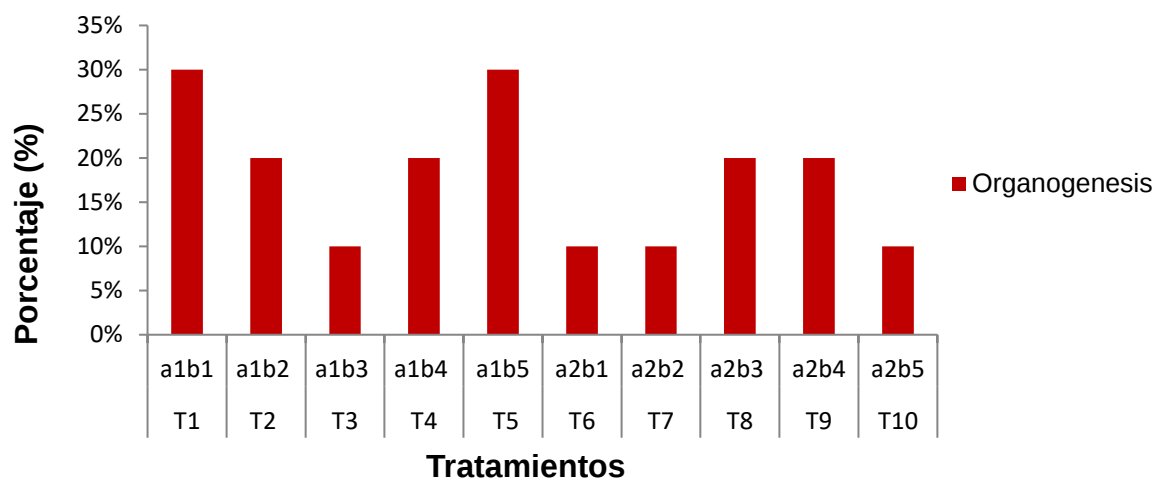
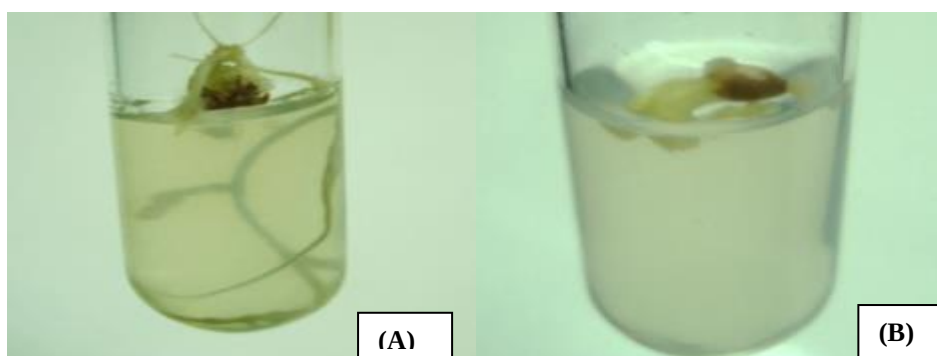


Figura 1. Presencia de organogénesis en los tratamientos en estudio.



A= T₄ (MS + 10 mg/L de cisteína) **B=** T₅ (MS + 0,4 mg/L de L-glutamina)

Figura 2. Fotos de semillas inmaduras mostrando la organogénesis en los tratamientos T₄ (a) y T₅ (b).

GUTIÉRREZ *et al.* (2008) encontraron dentro de sus 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. CABRERA (2013), en su trabajo de tesis encontró desde 0 a 90% de organogénesis, siendo la dosis de 10 mg/L de 2,4-D en donde obtuvo el menor porcentaje. 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, condiciones que no se dieron en el presente trabajo, ya que en todos los tratamientos se contó con una dosis de 10 mg/L de 2.4-D, lo que nos permite suponer que la presencia de organogénesis pudo ser influenciado por los suplementos orgánicos.

SALAZAR *et al.* (2005) manifestó que la caseína hidrolizada induce la organogénesis en callos regenerados in vitro de semillas inmaduras, pero que este efecto se presentó en muy bajos porcentajes en los ensayos realizados por este autor, lo que también se puede ver en el presente trabajo, ya que se encontró solo un 10% de organogénesis en los tratamiento con caseína hidrolizada.

Para el caso de la cisteína, que es un aminoácido azufrado, la presencia de organogénesis fue de 20% para los dos tratamientos donde se utilizó este suplemento. Según DURZAN y STEWARD (1983) aunque las proteínas de las plantas contienen cantidades bajas de estos aminoácidos,

como la cisteína y la metionina, estos son necesarios para un crecimiento y desarrollo vegetativo normal, lo que podría explicar el porqué de la presencia de raíces en un 20% de los tratamientos T₄ (MS + 10 mg/L de cisteína) y T₉ (MSm + 10 mg/L de cisteína).

c. Tiempo de aparición de las estructuras proembrionarias

En el Cuadro 6 podemos ver el análisis de variancia para el tiempo que tomó la aparición de las estructuras proembrionarias en los callos, existiendo diferencia estadística significativa para los tratamientos en estudio, para el factor A y para la interacción AxB, mientras que para el factor B, no se pudo encontrar diferencia estadística significativa. También podemos ver que el coeficiente de variación es de 4.18. Por lo tanto, existe excelente homogeneidad en los resultados experimentales.

Cuadro 6. Análisis de variancia para el tiempo de aparición de las estructuras proembrionarias.

F. de Variación	GL	SC	CM	Sig
Tratamientos	9	3217.09	357.45	S
A (Medio de cultivo)	1	56.25	56.25	S
B (Suplemento orgánico)	4	2085.34	521.33	NS
A x B	4	1075.50	268.88	S
Error experimental	90	724.70	8.05	

C.V. 4.18%

S: existe significación estadística.

NS: no existe significación estadística.

Al realizar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), en el Cuadro 7 podemos ver que existen diferencias estadísticas significativa entre los tratamientos, siendo T₁ (MS + Sin

suplemento) con 59.20 días y T₇ (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada) con 61.30 días, los que mostraron tener los menores tiempos en la formación de estructuras proembrionarias, por lo que fueron considerados como mejores tratamientos.

Los embriones cigóticos son capaces de formar estructuras proembrionarias y luego embriones somáticos, aun cuando los niveles de auxina exógena disminuyen, con niveles más bajos se detienen la formación de estas estructuras en estos tejidos (PARROT, 2002).

Según CABRERA (2013), la dosis de 10 mg/L de 2,4-D ofrece, en papayo PTM-331, la formación de estructuras proembrionarias en un menor tiempo, tomando solo 58.16 días. En el presente trabajo, con la misma dosis (10 mg/L) en un medio de cultivo MS (estándar) se obtuvieron las estructuras en 59.20 días (T₁), y al adicionar como suplemento la caseína hidrolizada, el tiempo se prolongó a 61.30 días (T₇). Por lo que podemos decir que los resultados obtenidos son casi similares a los del autor previamente mencionado.

La caseína hidrolizada ha sido presentada como efectiva en la inducción de embriogénesis somática, especialmente en el cultivo de embriones inmaduros de cacao (Wen y Kinsella, 1993; citado por SALAZAR *et al.* 2005), pero al parecer en papayo no se presenta esta efectividad, ya como se vio en el presente trabajo, la formación de estructuras proembrionarias se debe solo a la presencia de la hormona 2.4-D. Posiblemente, el efecto de la

caseína hidrolizada es inhibida por algunas sustancias presentes en los embriones inmaduros de papayo.

Cuadro 7. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el tiempo de aparición de estructuras proembrionarias.

Clave	Tratamiento (Aplicación)	Tiempo (días)	Sig. *
T ₅ (a ₁ b ₅)	MS + 0,4 mg/L de L-glutamina	77.40	a
T ₉ (a ₂ b ₄)	MSm + 10 mg/L de cisteína	76.90	a
T ₁₀ (a ₂ b ₅)	MSm + 0,4 mg/L de L-glutamina	72.00	a b
T ₆ (a ₂ b ₁)	MSm + Sin suplemento	67.40	b
T ₃ (a ₁ b ₃)	MS + 100mg/L de extracto de malta	67.30	b c
T ₄ (a ₁ b ₄)	MS + 10 mg/L de cisteína	66.40	b c
T ₈ (a ₂ b ₃)	MSm+ 100mg/L de extracto de malta	65.60	c
T ₂ (a ₁ b ₂)	MS + 100 mg/L de caseína hidrolizada	65.40	c
T ₇ (a ₂ b ₂)	MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada	61.30	d
T ₁ (a ₁ b ₁)	MS + Sin suplemento	59.20	d

MS = Medio Murashige y Skoog (1962). MSm = Medio Murashige y Skoog (1962) a mitad de concentración.

* Los tratamientos unidos por la misma letra en la columna no existe significación estadística.

Entre los tratamientos que demoraron más días en formar estructuras proembrionarias, se encuentran aquellos donde se utilizó la L-glutamina (T₅ y T₁₀) con 77.40 y 72.00 días respectivamente. BUENO *et al.* (s/a) en embriones inmaduros de alcornoque (*Quercus suber* L.) encontró que la glutamina incrementa el peso y área de los callos previamente formados en un medio de 2,4-D, debido a las formación más acelerada de estructuras proembrionarias. En el presente trabajo los efectos de este aminoácido fueron lo contrario, debido posiblemente a una respuesta diferente de los embriones

inmaduros de papayo a los del alcornoque y a la etapa en la que se utilizó la glutamina, ya que este autor utilizó este aminoácido después de que los callos se habían formado en medios de cultivo con 2,4-D, mientras que en el presente trabajo se utilizó la glutamina desde la callogénesis, lo que marcó la diferencia entre estos resultados.

Al revisar otras publicaciones, encontramos que POSADA *et al.* (2007), indican 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. Según DEL SOL *et al.* (2001) en papayo variedad INIVIT 2000 a partir de embriones cigóticos, se obtuvieron mejores resultados en la formación de embriones con concentraciones de 4.7 mg/L de 2,4-D. Por otra parte, Fitch y Manshardt (1990), citado por GUTIÉRREZ *et al.* (2008) alcanzaron las estructuras proembrionarias en menor tiempo con una concentración de 10 y 15 mg/L en cuatro variedades de papayo Hawai. Si bien es cierto, que todos estos autores probaron principalmente diversas concentraciones de 2,4-D, con los resultados encontrados en el presente trabajo mostraríamos que, en combinaciones de ciertas dosis de esta hormona (2,4-D) y con algunos suplementos orgánicos, como la caseína hidrolizada, lograríamos mejorar algunos de los resultados obtenidos con anterioridad por parte de estos investigadores.

En el Cuadro 8 podemos observar la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el efecto principal de los factores A (Medios de cultivo),

mostrando diferencia significativa entre los tratamientos. En estos resultados, el medio MS con 67.14 días, demostró ser el que formó estructuras proembrionarias en menor tiempo, siendo más rápido que el medio MSm que demoró 69.46 días.

Cuadro 8. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el medio de cultivo(A) en el tiempo de formación de estructuras proembrionarias.

Factor A			
Nivel	Descripción	Tiempo (días)	Sig. *
a ₂	MSm = Medio Murashige y Skoog (1962)	69.46	a
a ₁	MS = Medio Murashige y Skoog (1962).	67.14	b

MS = Medio Murashige y Skoog (1962). MSm = Medio Murashige y Skoog (1962) a mitad de concentració

* Los tratamientos unidos por la misma letra en el cuadro no existe significación estadística.

En el cuadro 9 muestra la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples, donde para el factor A en b₁, el tratamiento T₁ (MS + Sin suplemento) mostró tener el menor tiempo en la formación de estructuras proembrionarias (59.20 días) encontrando diferencia significativa con el tratamiento T₆ (MSm + Sin suplemento).

Para A en b₂, el tratamiento T₇ (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada) formaron callos más rápidos (61.30 días) que el tratamiento T₂ (MS + 100 mg/L de caseína hidrolizada), encontrándose también diferencias significativas entre ambos. Para el caso de A en b₄ y b₅ también se encontró diferencia significativa, siendo los tratamientos T₄ (MS + 10 mg/L de cisteína) con 66.40 días y T₁₀ (MSm + 0,4 mg/L de L-glutamina) con 72.00 días, respectivamente, los que obtuvieron estructuras en menor tiempo.

Cuadro 9. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el medio de cultivo (A) en los distintos suplementos orgánicos (b_1 , b_2 , b_4 y b_5) en el tiempo de formación de estructuras proembrionarias.

Efecto simple	Tratamiento	Tiempo (días)	Sig. *
A en b_1	T ₆ (a_2b_1)	67.40	a
	T ₁ (a_1b_1)	59.20	b
A en b_2	T ₂ (a_1b_2)	65.40	a
	T ₇ (a_2b_2)	61.30	b
A en b_4	T ₉ (a_2b_4)	76.90	a
	T ₄ (a_1b_4)	66.40	b
A en b_5	T ₅ (a_1b_5)	77.40	a
	T ₁₀ (a_2b_5)	72.00	b

* Los tratamientos unidos por la misma letra en la columna no existe significación estadística.

El Cuadro 10 muestra la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples, donde para B en a_1 , el tratamiento T₁ (MS + Sin suplemento) mostró tener diferencias significativas con los demás tratamientos donde se utilizó el mismo medio de cultivo MS (a_1), siendo este el tratamiento donde se encontraron las estructuras proembrionarias en menor tiempo (59.20 días).

Para B en a_2 son los tratamientos T₇ (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada) y T₈ (MSm+ 100mg/L de extracto de malta) los que demostraron tener un mejor efecto (menor tiempo) en la formación de estructuras proembrionarias (61.30 y 65.60 días respectivamente), pero mostrando diferencias significativas solo con los tratamientos T₉ (MSm + 10 mg/L de cisteína) y T₁₀ (MSm + 0,4 mg/L de L-glutamina).

Cuadro 10. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los suplementos orgánicos (B) en los medios de cultivo a_1 y a_2 , en el tiempo de formación de estructuras proembrionarias.

B en a_1			B en a_2		
Trat	Tiempo (días)	Sig.	Trat	Tiempo (días)	Sig.*
T ₅ (a_1b_5)	77.40	a	T ₉ (a_2b_4)	76.90	a
T ₃ (a_1b_3)	67.30	b	T ₁₀ (a_2b_5)	72.00	a b
T ₄ (a_1b_4)	66.40	b	T ₆ (a_2b_1)	67.40	b
T ₂ (a_1b_2)	65.40	b	T ₈ (a_2b_3)	65.60	b c
T ₁ (a_1b_1)	59.20	c	T ₇ (a_2b_2)	61.30	c

* Los tratamientos unidos por la misma letra en la columna no existe significación estadística.

d. Número de estructuras proembrionarias

Cuadro 11. Análisis de variancia para el número de estructuras proembrionarias (datos transformados a $\sqrt{x+1}$).

F. de variación	GL	SC	CM	Sig.
Tratamientos	9	4.27	0.47	S
A (Medio de cultivo)	1	1.68	1.68	S
B (Suplemento orgánico)	4	0.96	0.24	NS
A x B	4	1.63	0.41	S
Error experimental	90	6.17	0.07	
Total	99	10.44		

C.V. 19.43%

S: existe significación estadística.

NS: no existe significación estadística.

El Cuadro 11 muestra el análisis de variancia para el número de estructuras, donde se observa que existen diferencias estadísticas significativas para los tratamientos, el factor A y la interacción AXB, mientras que para el factor B no se pudo encontrar diferencia. Además el coeficiente de

variabilidad fue de 19.43%, indicando una regular homogeneidad en la respuesta de los semillas inmaduras al efecto de los diferentes tratamientos.

En el Cuadro 12 podemos ver la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los tratamientos, cuyos resultados fueron transformados por la $\sqrt{x+1}$ para ser procesados. El mejor tratamiento fue T₇ (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada) mostrando tener la mayor cantidad de estructuras proembrionarias, siendo estadísticamente superior a los cinco últimos tratamientos (T₂, T₄, T₁₀, T₁ y T₃), pero teniendo una cantidad de estructuras estadísticamente similar al resto de los tratamientos (T₆, T₈, T₅ y T₉).

Cuadro 12. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el número de estructuras proembrionarias (datos transformados a $\sqrt{x+1}$).

Clave	Tratamiento (Aplicación)	Número de estructuras	Sig.*
T ₇ (a ₂ b ₂)	MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada	1.83	a
T ₆ (a ₂ b ₁)	MSm + Sin suplemento	1.57	a b
T ₈ (a ₂ b ₃)	MSm+ 100mg/L de extracto de malta	1.42	a b
T ₅ (a ₁ b ₅)	MS + 0,4 mg/L de glutamina	1.35	a b
T ₉ (a ₂ b ₄)	MSm + 10 mg/L de cisteína	1.35	a b
T ₂ (a ₁ b ₂)	MS + 100 mg/L de caseína hidrolizada	1.24	b
T ₄ (a ₁ b ₄)	MS + 10 mg/L de cisteína	1.21	b
T ₁₀ (a ₂ b ₅)	MSm + 0,4 mg/L de glutamina	1.21	b
T ₁ (a ₁ b ₁)	MS + Sin suplemento	1.17	b
T ₃ (a ₁ b ₃)	MS + 100mg/L de extracto de malta	1.12	b

MS = Medio Murashige y Skoog (1962). MSm = Medio Murashige y Skoog (1962) a mitad de concentración.

* Los tratamientos unidos por la misma letra en la columna no existe significación estadística.

En el Figura 3 podemos observar el número promedio de estructuras proembrionarias encontradas en los tratamientos, donde vemos que el tratamientos T₇ (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada) tuvo 2.5 estructuras proembrionarias en promedio, mostrando ser el mejor tratamiento en este parámetro; seguido del tratamiento T₈ (MSm + Sin suplemento) con 1.5 estructuras. El tratamiento que mostró menor cantidad de estructuras proembrionarias fue T₃ (MS + 100mg/L de extracto de malta) con tan solo 0.3 estructuras en promedio.

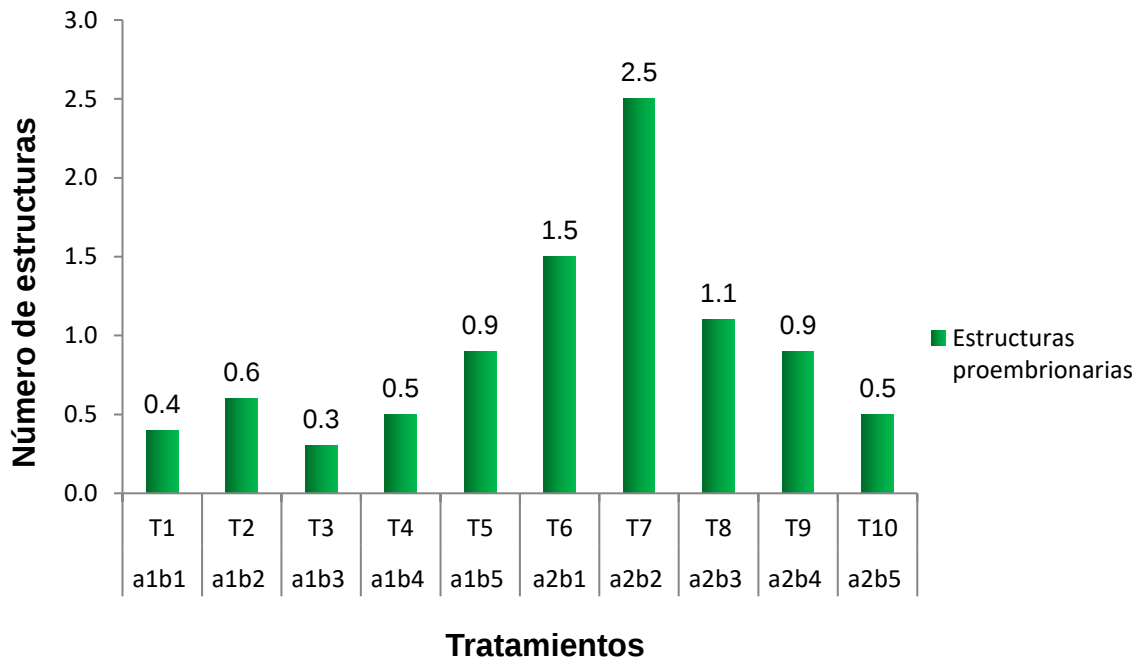


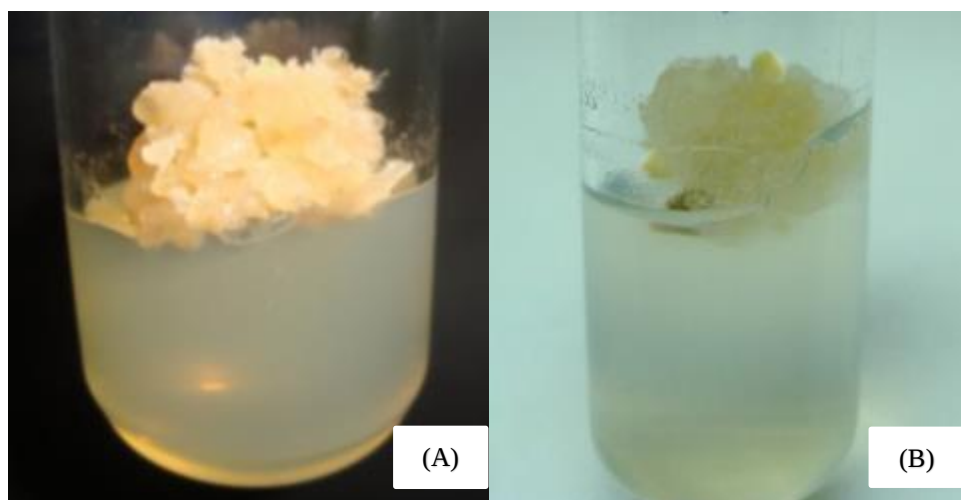
Figura 3. Promedio de estructuras proembrionarias en cada uno de los tratamientos (datos reales).

POSADA *et al.* (2007) manifiesta que en todos los tratamientos independientemente de la concentración de 2,4-D se formaron embriones somáticos. Según PARROT (2002), los tejidos embriogénicos (semillas inmaduras) son capaces de formar embriones globulares, si las

condiciones son las adecuadas. En el presente trabajo se encontraron 2.5 estructuras proembrionarias como máximo (promedio del tratamiento T₇), si comparamos con los 9.4 encontrado por CABRERA (2013), veremos que esta cantidad es muy baja, a pesar de utilizar la misma dosis de 2,4-D (10 mg/L) que este autor, pudiendo atribuirlo esta disminución de estructuras posiblemente al efecto de los suplementos orgánicos utilizados en los diversos tratamientos, pero no se encontró reporte de investigación que indiquen con exactitud alguno de estos supuestos efectos.

Para los tratamientos donde no se utilizaron suplementos orgánicos (T₁ y T₆) los resultados también son muy inferiores (0.4 y 1.5 estructuras respectivamente), a pesar de ser tratamientos similares al mejor tratamiento usados por CABRERA (2013), es decir solo con dosis de 10 mg/L de 2,4-D, 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, explicando en parte lo que posiblemente sucedió en los tratamientos mencionados inicialmente.

En la figura 4, se observan fotos de las estructuras proembrionarias a partir de las semillas de PTM-331 en los tratamientos T₆ y T₇ (a y b).



A=T₆ (ms+sin suplemento orgánico)

B=T₇ (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada)

Figura 4. Estructuras proembrionarias obtenidas en semilla inmadura de papayo cv. PTM-331 con los tratamientos.

Cuadro 13. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el medio de cultivo (A), en el número de estructuras proembrionarias (datos transformados a $\sqrt{x+1}$).

Factor A			
Nivel	Descripción	Numero de estructuras	Sig.*
a ₂	MSm = Medio Murashige y Skoog (1962) modificado.	1.48	a
a ₁	MS = Medio Murashige y Skoog (1962).	1.22	b

* Los tratamientos unidos por la misma letra en la columna no existe significación estadística.

En el Cuadro 13 podemos observar la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el efecto principal de los factores A (Medios de cultivo), donde se encontró diferencia significativa entre los tratamientos. En estos resultados, el medio MSm (a mitad de concentración) con 1.48 estructuras (datos transformados con la $\sqrt{x+1}$), mostró ser el que formó mayor cantidad de

estructuras proembrionarias, encontrándose diferencias significativas con el medio MS (estándar).

En el Cuadro 14 muestra la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples de A en b_1 , A en b_2 , y en A en b_3 respectivamente. Para A en b_1 , el tratamiento T_6 (MSm + Sin suplemento) mostró tener la mayor cantidad de estructuras proembrionarias encontrando una diferencia significativa con el tratamiento T_1 (MS + Sin suplemento). Para A en b_2 , el tratamiento T_7 (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada) formó mayor cantidad de estructuras (1.83) que el tratamiento T_2 (MS + 100 mg/L de caseína hidrolizada) mostrando diferencia estadísticas entre ambos tratamientos. Para el caso de A en b_3 también se encontró diferencia significativa, siendo los tratamientos T_9 (MSm + 10 mg/L de cisteína) con 1.35 estructuras proembrionarias superior al tratamiento T_4 (MS + 10 mg/L de cisteína) que tuvo una cantidad de 1.21 estructuras.

Cuadro 14. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para el medio de cultivo (A) en los compuestos orgánicos b_1 , b_2 y b_3 en el número de estructuras proembrionarias (datos transformados a $\sqrt{x+1}$).

Efecto simple	Tratamiento	Tiempo (días)	Sig. *
A en b_1	T_6 (a_2b_1)	1.42	a
	T_1 (a_1b_1)	1.17	b
A en b_2	T_7 (a_2b_2)	1.83	a
	T_2 (a_1b_2)	1.24	b
A en b_3	T_9 (a_2b_3)	1.35	a
	T_4 (a_1b_3)	1.21	b

MS = Medio Murashige y Skoog (1962). MSm = Medio Murashige y Skoog (1962) a mitad de concentración

* Los tratamientos unidos por la misma letra en la columna no existe significación estadística.

El Cuadro 15 muestra la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los efectos simples de B en a_2 , donde el tratamiento T_7 (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada) mostró tener diferencias significativas con los demás tratamientos en los que se utilizó el medio de cultivo MS (a_1), siendo este el tratamiento en donde se encontró mayor cantidad de estructuras proembrionarias (1.83).

Cuadro 15. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los suplementos orgánicos (B) en el medio de cultivo a_2 en el número de estructuras proembrionarias (datos transformados a $\sqrt{x+1}$).

B en a_2		
Tratamiento	Número de estructuras	Sig.*
T_7 (a_2b_2)	1.83	a
T_8 (a_2b_3)	1.57	b
T_6 (a_2b_1)	1.42	b
T_9 (a_2b_4)	1.35	b c
T_{10} (a_2b_5)	1.21	c

MS = Medio Murashige y Skoog (1962). MSm = Medio Murashige y Skoog (1962) a mitad de concentración

* Los tratamientos unidos por la misma letra en la columna no existe significación estadística.

e. Contaminación

Para ROCA y MROGINSKI (1991) uno de los problemas más grandes para el cultivo de tejido *in vitro* en la agricultura es la contaminación. En la Figura 5 se muestra el porcentaje de contaminación que se tuvo en cada uno de los tratamientos evaluados, donde fueron los tratamientos T_3 (MS + 100mg/L de extracto de malta) y T_6 (MSm + Sin suplemento) los más contaminado con 30%.

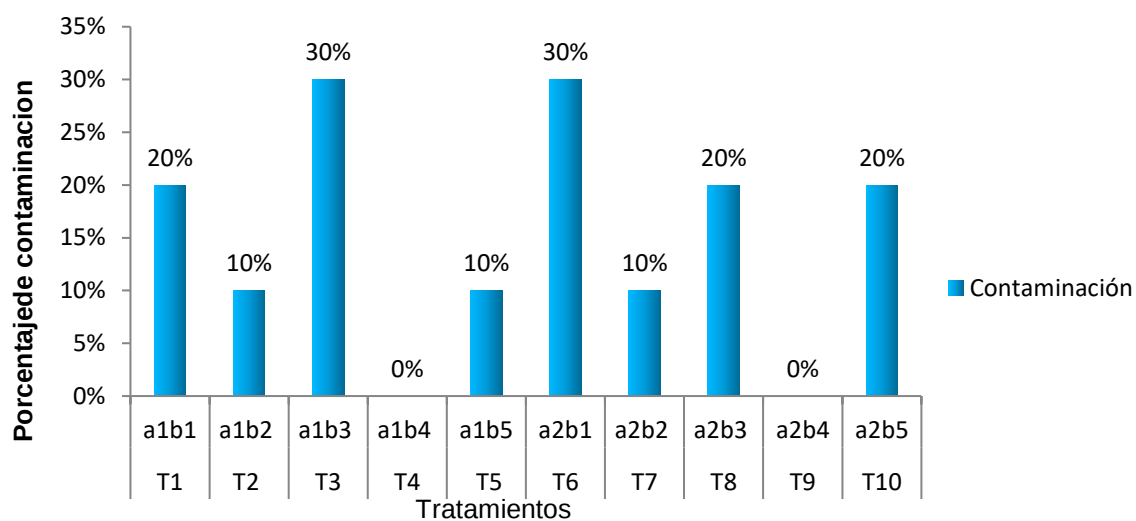
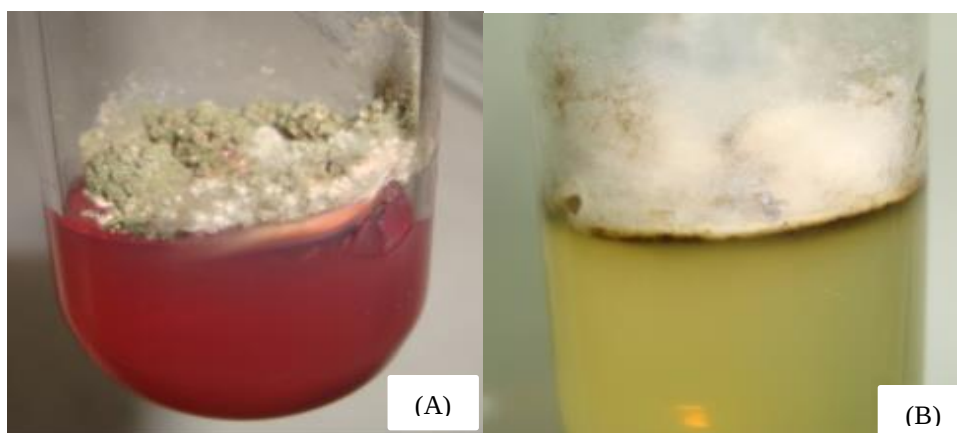


Figura 5. Porcentaje de contaminación en los tratamientos en estudio.

Entre las causas de esta contaminación, FLORES y ABDELNOUR (2000) mencionan que a pesar de seguir un protocolo adecuado para la desinfestación. La contaminación siempre se da en los trabajos *in vitro* (Figura 6), 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, ya que con tejidos de hojas y tallos la contaminación es mayor al de embriones.



A= T₆ (ms+sin suplemento orgánico)

B=T₁₀ (MSm + 0,4 mg/L de glutamina)

Figura 6. Contaminación en los tratamientos T₆ (a) y T₁₀ (b).

Los tratamientos donde se utilizó la cisteína (T₄ y T₉), fueron los que obtuvieron el menor porcentaje de contaminación (0%), posiblemente esto se debió a que la cisteína es un aminoácido azufrado y que al ser autoclavado se descompone y actúa como una fuente de azufre (DURZAN y STEWARD, 1983), sirviendo como un fungicida en el medio, lamentablemente no se pudo hallar reporte que permita corroborar esta suposición.

f. Fenolización

Los tratamientos que se realizaron en este ensayo no mostraron ninguna respuesta de fenolización, ya que esto se presenta frecuentemente en tejidos leñosos y en semillas forestales.

4.1.2 Efectos en el papayo cv. Tainung

En este caso no se encontró efecto de los suplementos orgánicos ni del 2,4-D en los tratamientos donde se sembraron semillas inmaduras de esta variedad de papayo (Tainung), posiblemente esta variedad no tenga dentro de las respuestas de su embrión, la de seguir un proceso callogénico y organogénico.

Otras variedades como la Hawai (Fitch y Manshardt, 1990; citado por GUTIÉRREZ *et al.*, 2008), la var. Maradol rojo (POSADA *et al.*, 2007), la var. INIVIT 2000 (DEL SOL *et al.*, 2001) y la var. PT-101-B (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008) mostraron respuesta favorables.

Esta diferencia con los resultados encontrados para la var, Tainung podría explicarse por lo mencionado por ROCA y MROGINSKI

(1991) quienes indican que los tejidos y células vegetales cultivadas responden diferentemente a los suplementos de aminoácidos y hormonas utilizadas, debido a presencia de algunas sustancias exclusivas de cada variedad, que inhibe los efectos de estos componentes.

4.2 Efecto de la combinación del 2,4-D y KIN en la formación de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo para el ensayo 2.

4.2.1 Efectos en el papayo cv. PTM – 331

a. Porcentaje y tiempo de formación de callos

En este ensayo se probó el balance hormonal de 2,4-D y KIN (kinetina), donde las respuestas para los aspectos evaluados fueron muy pocas, debido a la perdida de muestras por contaminación, por lo que se decidió no realizar el análisis de comparación de medias, ya que no representa mayor significancia para este casos.

Entre las pocas respuestas, la Figura 7 muestra el porcentaje de callos formados en los tratamientos, siendo el T₁₃ (10 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN) el que tuvo 100% de formación los callos, seguido del tratamiento T₁ (0 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN) con 40% y del T₂ (0 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN) con 30%.

Todo estos callos tuvieron un tiempo de formación, la cual se muestra en la Figura 8, donde el tratamiento T₁₀ (5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN) obtuvo callos en menor tiempo (75.00 días), mientras que el tratamiento T₁₄ (10 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN) fue el que demoró más (92.50 días).

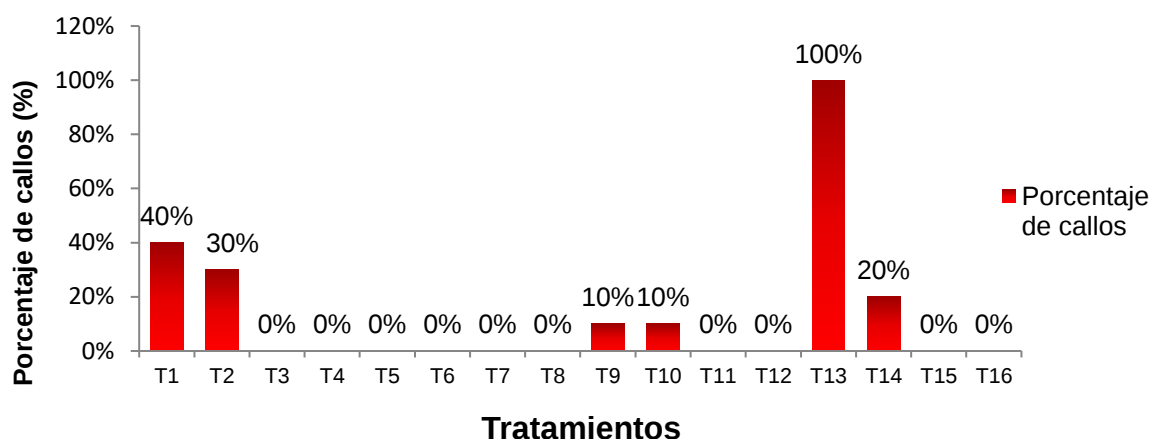


Figura 7. Porcentaje de callos formados en los tratamientos.

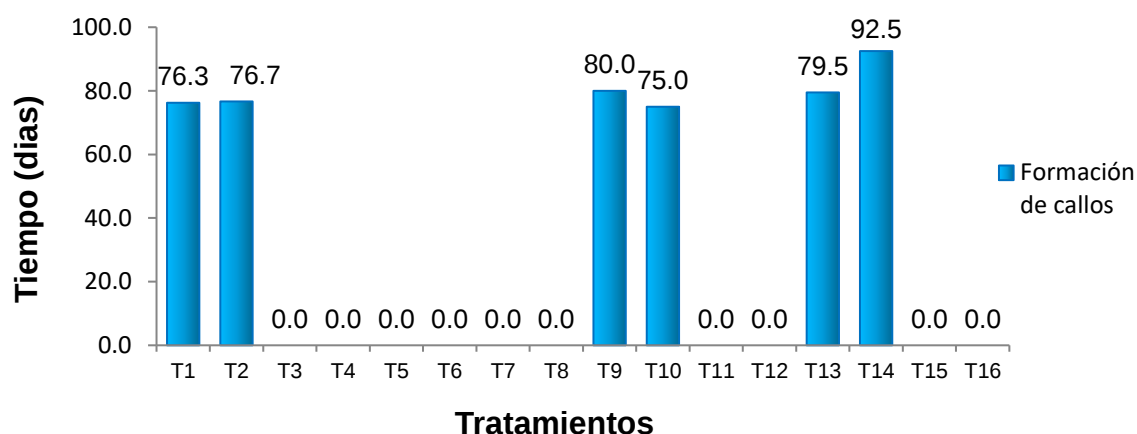


Figura 8. Tiempo de formación de callos en los tratamientos.

CABRERA *et al.* (1996) indican que las citoquininas (kinetina) se utilizan frecuentemente para estimular principalmente la división celular, el crecimiento y desarrollo vegetativo, sobre todo si van acompañados de una auxina, según FREIRE (2003) el balance auxina-citoquinina es un factor muy importante en la regulación del alargamiento o división celular, en procesos de formación de órganos vegetativos. CABRERA (2013) en su trabajo de investigación no encontró respuesta en la formación de callos, al utilizar 10 mg/L de 2,4-D combinado con 0.5, 1, 2 y 4 mg/L de KIN, en el presente trabajo el tratamiento T₁₃ ((10 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN) mostró 100% de presencia de

callos, esto debido a la ausencia de la kinetina en el medio de cultivo, pero también podemos ver que los tratamientos T₂ (0 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN), T₁₀ (5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN) y T₁₄ (10 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN), donde se utilizó 1 mg/L de KIN, se formaron callos aunque en un porcentaje menor (30, 10 y 20% respectivamente) este hallazgo puede ser corroborado por lo reportado por POSADA *et al.* (2007) quienes encontraron respuesta positivas en la formación de callos, incluso llegando a un elevado porcentaje de germinación de embriones, cuando utilizaron kinetina en el medio de cultivo.

b. Cantidad y tiempo de formación de estructuras proembrionarias

En este ensayo no se encontraron estructuras proembrionarias, por lo que no se pudo hacer un análisis de este parámetro, si bien POSADA *et al.* (2007) encontraron, en los tratamientos donde se utilizó kinetina, respuesta positivas en la formación de callos y estructuras proembrionarias; en el presente trabajo, a pesar de haberse encontrado bajos porcentajes de callos, éstos no formaron estructuras proembrionarias, confirmando lo reportado por DEL SOL *et al.* (2001), quienes manifiestan que la kinetina en papayo no tiene respuestas favorable en la formación de estructuras proembrionarias, pero que aún falta hacer mayores investigaciones.

c. Porcentaje de contaminación y organogénesis

En cuanto a la contaminación y organogénesis, la Figura 9 nos muestra el porcentaje obtenido en cada uno de los tratamientos, siendo el T₁₂ (5 mg/L 2,4-D + 10 mg/L KIN) el que tuvo mayor contaminación con 40%,

mientras el tratamiento con mayor organogénesis fue el T₉ (5 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN). DEL SOL *et al.* (2001) indica que en papayo la kinetina es un buen suplemento del medio de cultivos para la organogénesis en callos previamente formados en otros medios.

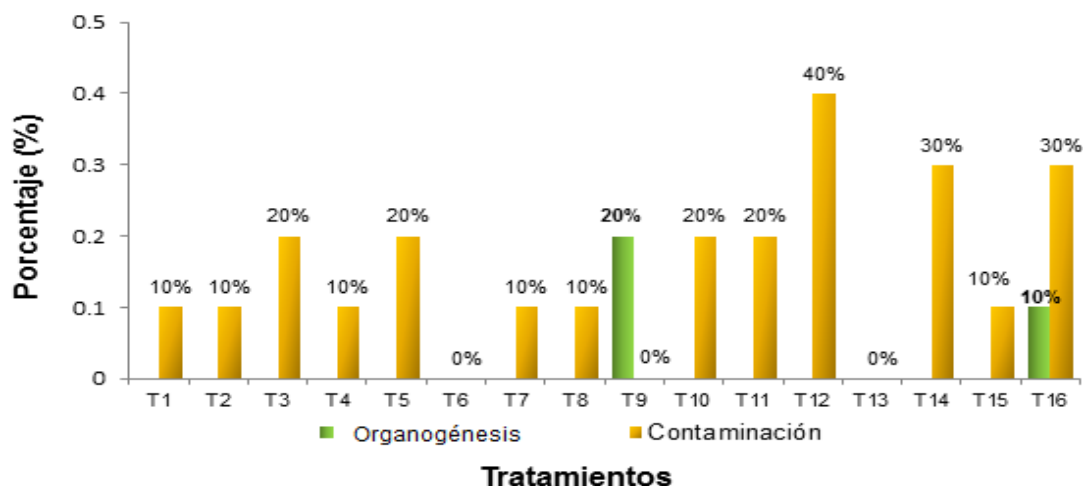


Figura 9. Porcentaje de contaminación y organogénesis de los tratamientos.

4.2.2 Efectos en el papayo cv. Tainung

En este ensayo no se encontró respuesta para los parámetros evaluados, como tiempo de formación de callos organogénicos y contaminación. Según ROCA y MROGINSKI (1991) los tejidos y células vegetales cultivadas responden diferentemente a los suplementos de aminoácidos y hormonas utilizadas, debido a la constitución genética que poseen y para lo que están programadas, pero principalmente a la presencia de sustancias bioquímicas exclusivas de cada una de las variedades, las que inhiben a ciertas sustancias exógenas. Lo mencionado por este autor puede ser lo que posiblemente sucedió en el presente trabajo, principalmente cuando se utilizó la variedad de papayo Tainung.

V. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método exitoso para la inducción de callos embriogénicos únicamente para cv. PTM-331 y no para cv. Tainung.
2. En la inducción de callos embriogénicos se obtuvo respuestas positivas para las semillas inmaduras de papayo cv. PTM-331, no encontrando respuesta en las semillas inmaduras del cv. Tainung.
3. La caseína hidrolizada mostró tener efectos favorables cuando se utilizó en un medio de cultivo MS a la mitad de concentración (MSm), reduciendo el tiempo de formación de callos a 33 días, con aparición de estructuras proembrionarias a los 61 días.
4. La glutamina y el extracto de malta al ser utilizadas en un medio de cultivo MS (T₅ y T₃) tuvieron un efecto negativo, prolongando el tiempo de formación de callos a 46 y 42 días respectivamente. Para el tiempo de aparición de estructuras proembrionarias, la glutamina (T₅) prolongó el tiempo a 77 días.
5. En el segundo ensayo, el mejor tratamiento fue el T₁₃ (10 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN), que mostró un 100% de formación de callos y en un tiempo de 80 días, evidenciando el efecto callogénico del 2,4-D en el cv PTM 331. Así mismo La kinetina a 1 mg/L (T₂, T₁₀ y T₁₄) también tuvo efectos en la formación de callos, y a dosis más altas (5 y 10 mg/L), redujo el efecto callogénico del 2,4-D en semillas de papayo cv. PTM331.

VI. RECOMENDACIONES

1. Usar semillas inmaduras de papayo cv. PTM-331 de 90 días de desarrollo en medio de cultivo MS con 10 mg/L de 2,4-D suplementado con caseína hidrolizada para acelerar la inducción de callos embriogénicos.
2. Realizar nuevos estudios con el cultivar de papayo Tainung, Incluyendo nuevas edades de la semilla y los niveles más adecuados de las concentraciones hormonales, para determinar el efecto que tienen éstos en la formación de callos.
3. Probar diferentes balances hormonales de 2,4-D/KIN en otros ensayos para ratificar o rechazar los resultados negativos obtenidos en el experimento.
4. Realizar nuevos ensayos utilizando cisteína como suplemento de medios de cultivos, para verificar su efecto anticontaminante que mostró en el presente trabajo.
5. Realizar un nuevo ensayo incluyendo, además la dosis (niveles) de reguladores hormonales, la inclusión de (combinado) de todos los suplementos orgánicos.

VII. RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se planteó el objetivo general de desarrollar un método de inducción de callos embriogénicos en semillas inmaduras de papayo cv. PTM-331 y cv. Tainung proveniente de flores femeninas de una sola planta, utilizando suplementos orgánicos y diferentes balances hormonales. El proceso inició con la recolección de los frutos inmaduros del semillero ubicado en el sector de Tulumayo, fueron llevados a un lavado y desinfección en los ambientes del laboratorio de micropropagación, luego se almacenó a temperatura baja. Días siguientes se procedió a preparar los medios utilizados en los diferentes ensayos para lo cual se utilizaron como suplementos orgánicos la caseína hidrolizada, extracto de malta, cisteína y glutamina y las hormonas, solo 2,4-D, para el primer ensayo y 2,4-D + kinetina para el segundo ensayo. Con los medios preparados y suplementados con sus dosis de hormonas, se procedió a la siembra aséptica de las semillas inmaduras sin testa, en tubos de ensayos que contenían el medio de cultivo, para luego ser sellados y llevados a la cámara oscura, a 25°C. Las evaluaciones se realizaron interdiarias con la finalidad de ver la contaminación, para luego hacerlas semanales. Se encontraron callos embriogénicos desarrollados en los tratamientos de T₁ (MS + Sin suplemento) y T₇ (MSm + 100 mg/L de caseína hidrolizada) de 33 días en promedio respectivamente. Estos mismos tratamientos obtuvieron estructuras proembrionarias a los 59 y 61 días en promedio, con una cantidad de estructuras de 0.4 y 2.5 en promedio respectivamente. En el ensayo 2, donde se utilizó kinetina, no se encontró suficiente respuesta para continuar con las evaluaciones estadísticas. Pero si

se encontraron algunas respuestas aisladas, lo que nos pudo indicar que el tratamiento T₁₃ (10 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN) tuvo 100% de presencia de callos en 80 días y que la dosis de 1mg/L de kinetina si manifiesta un efecto en la formación de callos, dosis mayores a estas no tiene respuesta en ningún parámetro.

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. BUENO, M. A, MANZANERA, J. A. y PINTOS, B. (s/a). Propagación clonal de árboles de alcornoque vía embriogénesis somática. Alcalá de Henares Madrid. INIA-CIFOR. 11: 26-50.
5. 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.
6. CABRERA, M. P. 2013. Inducción de callos embriogénicos de semillas inmaduras de papayo (*Carica papaya* L.). Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Nacional Agraria de la Selva Tingo María, Perú 78 p.

7. CALZADA B. J. 1981. Métodos estadísticos para la investigación. 2a. ed. Lima. Perú. Pp 32-50.
8. 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.
9. CARBAJAL, T. 1993. Cultivo de papaya. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú. 23 p.
10. 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).
11. 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.
12. DURZAN, D. J. y STEWARD, F. C. 1983. Nitrogen metabolism. En: Steward, F. C. y Bidwell, R. G. S. (eds). Plant physiology: Atretise. Academia Press, Nueva Cork. V. 8, P. 55-265

13. 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.
14. 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.
15. FLORES, D y ABDELNOUR, A. 2000. Manual de laboratorio de cultivo de tejidos II. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de biología. 50 p.
16. FRANCIOSI, R. 2002. El cultivo de papaya en el Perú. Ed. FUNDEAGRO. Lima, Perú. Pp. 19.
17. FREIRE, S. M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de biotecnología de las plantas. *Biotecnología vegetal*. 3 (4): 195 - 209.
18. GARCÍA M. 2010. Guía técnica del cultivo de la papaya. Programa MAG-CENTA-Frutales. El Salvador. 37 pág.
19. 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.

20. 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.
21. HARLANDER, K. 2002. La evolución de la agricultura moderna y el futuro de la biotecnología. Revista: colegio americano de nutrición. 21(3): 161- 165.
22. INFOAGRO. 2001. Agro en información. Cultivo de papaya [En línea]; INFOAGRO (http://www.infoagro.com/frutas_tropicales/papaya.htm Doc. 15. Nov. 2011).
23. LITZ, R. E. 1986. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension cultures. J. Amer. Soc. Hort. 111(6): 969-972.
24. LITZ, R. E., CHÁVEZ, 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
25. 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.
26. 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).

27. PARROT, W. 2002. La embriogénesis somática en las angiospermas. Resúmenes. VI Simposio Internacional en Biotecnología Vegetal. IBP. Santa Clara. 14 (7): 284-293.
28. 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).
29. 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.
30. 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.
31. ROCA, W. y MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura (Fundamento y aplicación). Ed. XYZ. CIAT. Cali - Colombia. 969 p.
32. SALAZAR, E., TORREALBA, D. y CASTRO, L. 2005. La caseína hidrolizada inhibe el desarrollo de callos provenientes de anteras de cacao cultivadas in vitro. Agronomía Trop. 55(4): 497-505.
33. 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 16. Análisis de variancia para los efectos simples de los medios de cultivos (A) y para los suplementos orgánicos (B) en el tiempo de formación de callos.

F. de variación	GL	SC	CM	Sig.
A en b ₁	4	361.25	90.31	S
A en b ₂	4	396.05	99.01	S
A en b ₃	1	0.45	0.45	NS
A en b ₄	1	5.00	5.00	NS
A en b ₅	1	281.25	281.25	S
B en a ₁	1	1158.00	1158.00	S
B en a ₂	1	484.12	484.12	S
Error experimental	99	2212.00	24.58	

S: existe significación estadística.

NS: no existe significación estadística.

Cuadro 17. Análisis de variancia para los efectos simples del medio de cultivo (A) para los suplementos orgánicos (B), en el tiempo de formación de estructuras proembrionarias.

F. de variación	GL	SC	CM	Sig.
A en b ₁	1	336.20	336.20	S
A en b ₂	1	84.05	84.05	S
A en b ₃	1	14.45	14.45	NS
A en b ₄	1	551.25	551.25	S
A en b ₅	1	145.80	145.80	S
B en a ₁	4	1719.12	429.78	S
B en a ₁	4	1441.72	360.43	S
Error experimental	99	724.70	8.05	

S: existe significación estadística.

NS: no existe significación estadística.

Cuadro 18. Análisis de variancia para los efectos simples del medio de cultivo (A) y para los suplementos orgánicos (B) en el número de estructuras proembrionarias.

F. de Variación	GL	SC	CM	Sig.
A en b ₁	1	0.32	0.32	S
A en b ₂	1	1.77	1.77	S
A en b ₃	1	1.01	1.01	S
A en b ₄	1	0.11	0.11	NS
A en b ₅	1	0.11	0.11	NS
B en a ₁	4	0.30	0.08	NS
B en a ₁	4	2.29	0.57	S
Error experimental	99	6.17	0.07	

S: existe significación estadística.

NS: no existe significación estadística.

Cuadro 19. Resultados del balance hormonal de 2,4-D/kinetina (ensayo 2) en papayo PTM-331.

Tratamientos	Callos (%)	Tiempo (días)	Contam.
T ₁ (0 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN)	40%	76.3	10%
T ₂ (0 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN)	30%	76.7	10%
T ₃ (0 mg/L 2,4-D + 5 mg/L KIN)	0%	0.0	20%
T ₄ (0 mg/L 2,4-D + 10 mg/L KIN)	0%	0.0	10%
T ₅ (1 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN)	0%	0.0	20%
T ₆ (1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN)	0%	0.0	0%
T ₇ (1 mg/L 2,4-D + 5 mg/L KIN)	0%	0.0	10%
T ₈ (1 mg/L 2,4-D + 10 mg/L KIN)	0%	0.0	10%
T ₉ (5 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN)	10%	80.0	0%
T ₁₀ (5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN)	10%	75.0	20%
T ₁₁ (5 mg/L 2,4-D + 5 mg/L KIN)	0%	0.0	20%
T ₁₂ (5 mg/L 2,4-D + 10 mg/L KIN)	0%	0.0	40%
T ₁₃ (10 mg/L 2,4-D + 0 mg/L KIN)	100%	79.5	0%
T ₁₄ (10 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KIN)	20%	92.5	30%
T ₁₅ (10 mg/L 2,4-D + 5 mg/L KIN)	0%	0.0	10%
T ₁₆ (10 mg/L 2,4-D + 10 mg/L KIN)	0%	0.0	30%



Figura 10. Fruto del papayo PTM-331



Figura 11. Fruto del papayo Tainung



Figura 12. Realizando la limpieza de la semilla inmadura de papayo



Figura 13. Realizando la eliminación de la testa que se encuentra en la semilla inmadura de papayo.



Figura 14. Realizando el sellado del tubo de ensayo con el tratamiento instalado.



Figura 15. Evaluación de los callos encontrados en los tratamientos.

