

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO IN VITRO DE DOS VARIEDADES DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SAPECHO

Evaluation of the in vitro behavior of two varieties of papaya (*Carica papaya* L.) by somatic embryogenesis at the Sapecho Experimental Station

Johnny Ticona Aliaga¹; Mary Laura Triguero Triguero²

RESUMEN

El área de producción de papaya en la región de Alto Beni ha disminuido gracias a las enfermedades que incidieron en la zona. La biotecnología acelera los programas convencionales de propagación masiva de plantas. Una forma de incrementar la producción de plantas en tiempos cortos es mediante la embriogénesis somática. Los objetivos de la investigación fueron: 1) evaluar diferentes métodos de desinfección para el establecimiento in vitro de embriones cigóticos de papaya variedad Red Lady y Salvietty. 2) Determinar el comportamiento in vitro de la variedad Red Lady y Salvietty mediante el desarrollo embriogénico de los explantes establecidos. La investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología de la Estación Experimental de Sapecho. Las variedades evaluadas fueron; Red Lady y Salvietty, el diseño experimental utilizado para las variables de contaminación y supervivencia fue un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo bi factorial (3x2) generando seis tratamientos, también se utilizó el DCA simple para las variables de desarrollo embriogénico donde se generó dos tratamientos. Los explantes seleccionados se sometieron a tres métodos de desinfección propuestos por diferentes autores. Se empleó el medio (MS) al 50% como medio basal, al cual se adiciono 2,4-D, L-Glutamina, Mioinositol para la formación de callos y embriones somáticos (ambiente oscuro), y 6-BAP, Mioinositol, y riboflavina fotoperiodo 16 horas luz y ocho oscuras. El método de desinfección propuesto por Garcia (2013) alcanzó el mayor porcentaje de supervivencia logrando el 65% de explantes establecidos. En cuanto al desarrollo, el mejor resultado se presentó con la variedad Red Lady llegando a formar seis callos y 43 embriones somáticos por explante, 11 embriones somáticos germinados por muestra. Se concluye que; El comportamiento in vitro de esta especie mediante embriogénesis somática se ve influenciada principalmente por la variedad, y el estado de desarrollo del explante.

Palabras clave: Variedad, embriogénesis somática, desinfección, establecimiento.

ABSTRACT

The papaya production area in the Alto Beni region has decreased thanks to the diseases that affected the area. Biotechnology accelerates conventional programs for mass plant propagation. One way to increase plant production in short times is through somatic embryogenesis. The objectives of the research were: 1) to evaluate different disinfection methods for the in vitro establishment of Red Lady and Salvietty papaya zygotic embryos. 2) To determine the in vitro behavior of the Red Lady and Salvietty varieties through the embryogenic development of the established explants. The research was carried out in the biotechnology laboratory of the Sapecho Experimental Station. The evaluated varieties were; Red Lady and Salvietty, the experimental design used for the contamination and survival variables was a completely randomized design (DCA) with a bi-factorial arrangement (3x2) generating six treatments, the simple DCA was also used for the embryogenic development variables where generated two treatments. The selected explants were subjected to three disinfection methods proposed by different authors. The 50% medium (MS) was used as the basal medium, to which 2,4-D, L-Glutamine, Mioinositol were added for the formation of calluses and somatic embryos (dark environment), and 6-BAP, Mioinositol, and Riboflavin photoperiod 16 light hours and eight dark hours. The disinfection method proposed by Garcia (2013) achieved the highest survival percentage, achieving 65% of established explants. Regarding development, the best result was presented with the Red Lady variety, forming six calluses and 43 somatic embryos per explant, 11 germinated somatic embryos per sample. It is concluded that; The in vitro behavior of this species through somatic embryogenesis is mainly influenced by the variety, and the stage of development of the explant.

Keywords: Variety, somatic embryogenesis, disinfection, establishment.

¹ Docente Investigador, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. johnnyticon@gmail.com

² Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. marytriguero107@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es originaria de América Central se caracteriza por su alto valor de contenido en proteínas y vitaminas además de ser uno de los cultivos tropicales de mayor importancia económica a nivel mundial (Medero, sf.). En Bolivia el área de cultivo de la papaya se ha incrementado en los últimos años, sin embargo, los niveles de producción son bajos y la oferta ha disminuido en relación a la demanda, esto ha sido causado principalmente por las enfermedades virales que afectaron a las principales zonas productoras del país, las cuales son capaces de disminuir en más de un 50% la producción de las plantas (Rodríguez, 2008).

La región de Alto Beni es una de las zonas potenciales en producción de papaya a nivel nacional. La principal variedad que se cultiva en la región es la variedad Red Lady que presenta numerosas ventajas en producción y rendimiento en comparación con las variedades criollas o selecciones locales como la papaya Salvietty inicialmente cultivada en la región (PDM, 2014). Actualmente el área de producción de papaya ha disminuido por efecto de las enfermedades virales que incidieron en la zona, causando pérdidas considerables en las plantaciones de esta especie, por efecto acortando el abastecimiento de este producto a los principales mercados del país por lo que se ve afectada la demanda de este producto.

La papaya puede propagarse de forma sexual (por semillas), también puede ser propagada por medio de estacas o injertos, aunque este método de propagación no brinda los efectos deseados. La biotecnología puede acelerar los programas convencionales de propagación masiva de plantas y dar soluciones cuando los métodos convencionales fallan. En la actualidad se han desarrollado diferentes métodos de regeneración de plantas a partir del cultivo de tejidos tanto por organogénesis como por embriogénesis somática (Elder y Macleod, 2000).

La embriogénesis somática ofrece mayores posibilidades de obtener volúmenes de producción superiores en un menor período de tiempo, lo cual la convierte en un método potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis, además, el cultivo de tejidos es una técnica que puede generar plantas más resistentes en comparación de una planta obtenida de manera convencional (Gallardo, 2006).

Es por esta razón que los objetivos de esta investigación fueron, 1) evaluar diferentes métodos de desinfección para el establecimiento in vitro de embriones cigóticos de papaya variedad Red Lady y Salvietty y 2) determinar el comportamiento in vitro de la variedad Red Lady y Salvietty mediante el desarrollo embriogénico de los explantes establecidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de la zona de estudio

La investigación fue desarrollada en el laboratorio de biotecnología de la Estación Experimental Sapecho dependiente de la Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés. Ubicado geográficamente entre 15° 33' de latitud sur y 67° 19' de longitud oeste a una altitud de 400 m s.n.m., a 270 km al norte de la ciudad de La Paz (SENAMI, 2018). La estación Experimental Sapecho está situada en la región de Alto Beni, municipio de Palos Blancos, esta región presenta un clima cálido con temperatura promedio de 25°C, precipitación anual desde 1000 a 2500 mm, con suelos variados de acuerdo a la topografía en las partes altas suelos rocosos y en las partes bajas laderas y valles suelos diversos de textura liviana mediana y pesada (PDM, 2014).

Metodología

La presente investigación se realizó con las variedades de papaya Red Lady y Salvietty. Como material vegetal se emplearon embriones cigóticos procedentes de frutos inmaduros extraídos de plantas de aproximadamente 11 meses de edad obtenidas de la comunidad Siempre Unidos, distrito de Santa Ana cuarta sección del municipio de Palos Blancos-Alto Beni.

Los frutos recolectados fueron trasladados a laboratorio, donde se sometieron al siguiente protocolo de desinfección: lavado de los frutos con agua corriente y detergente por cinco minutos, posterior a ello con un atomizador se desinfectó la superficie con alcohol al 70% (este protocolo se aplicó para las dos variedades en estudio), hecho esto los frutos fueron trasladados a la cámara de flujo laminar. Se realizó una segunda desinfección dentro de la cámara de flujo laminar, por cada variedad se procedió a abrir los frutos inmaduros extrayendo las semillas, estas fueron separadas por grupos para ser sometidas a diferentes métodos de desinfección (Tabla 1).

Tabla 1. Desinfección de semillas inmaduras de papaya.

Soluciones	Método I		Método II		Método III	
	Tiempo (min)	Concentración (%)	Tiempo (min)	Concentración (%)	Tiempo (min)	Concentración (%)
Alcohol	-	-	0.5	70	1	70
Hipoclorito de sodio	25	1	5	2	3	4

Los métodos de desinfección utilizados fueron propuestos por diferentes autores; Rodríguez (2008) método de desinfección I, Valderrama (2013) método II, García (2013) método III. Al finalizar la desinfección se aplicó tres enjuagues con agua estéril en los tres métodos, al terminar la desinfección, con un estereoscopio se diseccionó las semillas inmaduras realizando cortes en los extremos con el fin de eliminar la testa que cubre al embrión para extraerlo con una aguja histológica.

Se procedió a la siembra de los embriones cigóticos (Figura 1) en el medio de cultivo propuesto por (Rodríguez, 2008) donde se utilizó el 50% del medio basal (MS) adicionando a este las siguientes fitohormonas; 2.4-D (5 ppm), L-Glutamina (400 ppm), y Mioinositol (100 ppm) para inducir la formación de callos y embriones somáticos, estas muestras fueron llevadas a la sala de crecimiento donde se sometió a un ambiente totalmente oscuro a una temperatura de 27°C y humedad relativa del 66% durante 90 días.



Figura 1. Embrión cigótico de papaya (explante inicial).

Durante los primeros 15 días se evaluó el porcentaje de contaminación y supervivencia, para estas variables se empleó un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial de 3x2 (tres métodos de desinfección por dos variedades de papaya), con tres repeticiones y seis tratamiento (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de los tratamientos evaluados para la desinfección de los explantes.

Tratamientos	Métodos de desinfección	Variedad
T1	Método I (Hipoclorito de sodio 1% por 10 minutos)	Red Lady
T2	Método II (Alcohol 70% 30 segundos + hipoclorito 2% por 5 minutos)	Red Lady
T3	Método III (Alcohol 70% 1 minuto + hipoclorito 4% por 3 minutos)	Red Lady
T4	Método I (Hipoclorito de sodio 1% por 10 minutos)	Salvietty
T5	Método II (Alcohol 70% 30 segundos + hipoclorito 2% por 5 minutos)	Salvietty
T6	Método III (Alcohol 70% 1 minuto + hipoclorito 4% por 3 minutos)	Salvietty

Transcurrido los 90 días después de su establecimiento, se realizó un cambio de medio de cultivo utilizando el 50% del medio basal (Murashige Skoog) adicionando a este las hormonas; 6-BAP (0.5 ppm), Mioinositol (100 ppm), y Riboflavina (0.06 ppm) medio de cultivo de germinación. El refrescamiento se realizó para inducir a la maduración de los embriones somáticos en etapa globular presentes en los callos, por lo que estos fueron separados en pequeños grupos, posteriormente se llevó a la sala de incubación

en donde se sometió a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuras durante 30 días.

Con el objetivo de inducir a la germinación se realizó el refrescamiento en el mismo medio de cultivo, en donde fueron separados los embriones somáticos maduros (Figura 2) a razón de siete embriones por vaso y 14 embriones somáticos por muestra, durante 30 días más (fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuras).

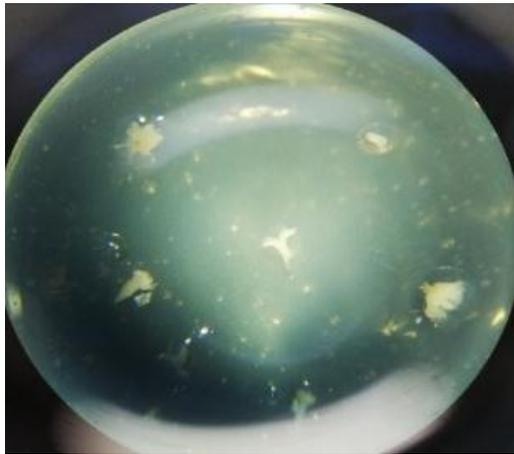


Figura 2. Separación de los embriones somáticos maduros.

Durante los primeros 60 días se evaluó el número de callos por embrión cigótico, a los 90 días se evaluó el número de embriones cigóticos que formaron embriones somáticos, a los 120 días se evaluó el número de embriones somáticos por embrión cigótico a los 150 días se determinó el número de embriones somáticos germinados, para estas variables se utilizó un diseño completamente al azar simple en donde se generó dos tratamientos (T1: embriogénesis somática variedad Red Lady; T2: Embriogénesis somática variedad Salvietty) con cinco repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de contaminación

Los resultados presentados en el análisis de varianza mostraron que no existen diferencias estadísticas entre los métodos de desinfección ($p > 0.05$), por tanto, los factores de estudio no afectaron en forma directa a la contaminación. Los métodos de desinfección utilizados en la investigación fueron eficientes ya que se redujo la contaminación hasta el 35% en promedio mediante el método de desinfección III propuesto por García (2013).

Una de las principales fuentes de contaminación es la inadecuada manipulación del material vegetal, además de las deficientes técnicas de asepsia y/o incompleta esterilización del medio de cultivo así lo afirma (Aguirre et al., 2016).

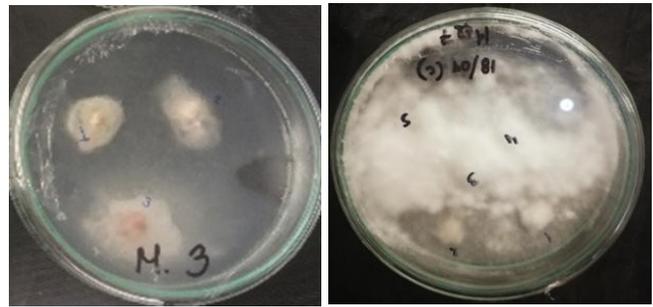


Figura 3. Contaminación de explantes (embriones cigóticos); bacterias (Izq.), hongos (Der.).

Porcentaje de supervivencia

El análisis de varianza para el porcentaje de supervivencia, indicó que no hubo diferencias estadísticas como efecto de los métodos de desinfección ($p > 0.05$) y las variedades así también con la interacción de ambos factores. En promedio se logró establecer hasta el 65% con el método de desinfección propuesto por García (2013), resultados que se aproximan con los obtenidos por Hernández (2013) quien logro establecer explantes de semillas de limón criollo con el uso de alcohol e hipoclorito de sodio en su desinfección alcanzando un promedio de 70% de supervivencia. Este resultado posiblemente se deba a que en algunas plantas existe la presencia de microorganismos contaminantes dentro de los tejidos, así lo afirma Aguirre et al (2016).

Número de callos por embrión cigóticos

De acuerdo al análisis de varianza para la formación de callos, se obtuvo diferencias significativas ($p < 0.05$), el mayor número de callos por embrión cigótico se presentó en la variedad Red Lady, con 6.20 callos por explante a diferencia de la variedad Salvietty que presentó 4.40 callos. En comparación a los resultados, Valderrama (2013), quien empleó como explante inicial embriones cigóticos inmaduros de papaya variedad criolla obtuvo 0.59 callos por embrión cigótico. Los resultados obtenidos posiblemente se deben a las características genotípicas de cada variedad (Figura 4). Al respecto García y Noa (1998) citados por Mamani (2005) mencionan que existe influencia marcada del genotipo en el éxito del cultivo in vitro, donde el comportamiento varía entre especies, variedades y clones.



Figura 4. Formación de callos por variedad; Red Lady (Izq.), Salviety (Der.).

Número de embriones cigóticos que formaron embriones somáticos.

El análisis de varianza mostró que no se obtuvieron diferencias significativas para el efecto de las variedades ($p > 0.05$). Mediante los resultados, en promedio se alcanzó a formar hasta el 79% de presencia embriogénica, es decir que por muestra entre dos a tres explantes formaron embriones somáticos. Resultados que superan a los obtenidos por Rodríguez (2008) que alcanzó el 67.5% de presencia embriogénica.

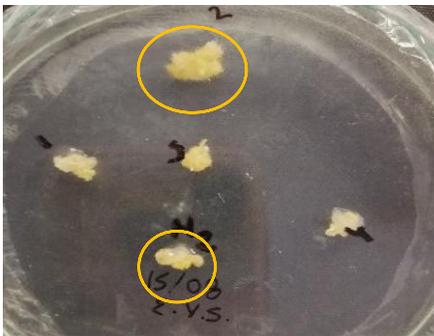


Figura 5. Número de embriones cigóticos con presencia embriogénica.

Los resultados obtenidos en esta variable posiblemente se deba al grado de madurez de los embriones cigóticos utilizados, al respecto (Rodríguez, 2008), menciona que el proceso de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos están predeterminadas embriogénicamente a la etapa de desarrollo de los embriones cigóticos lo que lleva a obtener una mayor o menor respuesta embriogénica.

Número de embriones somáticos por embrión cigótico
El análisis de varianza indicó que no hubo diferencias significativas entre las variedades Red Lady y Salviety ($p > 0.05$).

El número de embriones somáticos por embrión cigótico alcanzó un promedio entre 41 a 43 embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo (Figura 6). Resultado que se aproximan a los obtenidos por (Rodríguez, 2008) quien formó entre 43 a 65 embriones somáticos por masa celular.

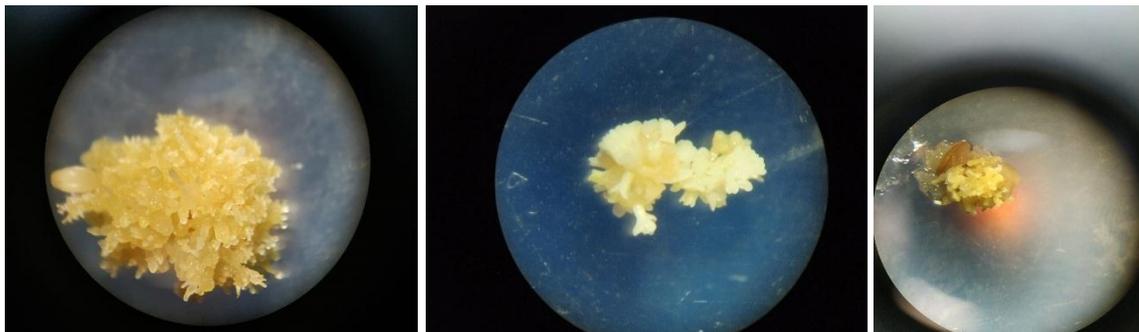


Figura 6. Embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo; globular (Izq.), torpedo o cotiledonal (Cent.), embrión maduro (Der.).

Los resultados obtenidos en esta variable posiblemente se deben a la época de recolección de los frutos, al respecto (Rodríguez, 2008) menciona que el cambio estacional es uno de los factores a considerar en la respuesta embriogénica de diversos cultivos, siendo que la temperatura humedad y precipitación provocan fluctuación en las plantas que influyen en la respuesta in vitro de los explantes.

Número de embriones somáticos germinados

En el análisis de varianza para esta variable mostró diferencias significativas entre las variedades ($p < 0.05$).



Figura 7. Germinación de los embriones somáticos; variedad Red Lady (Izq. y Cent.), variedad Salviety (Der.).

CONCLUSIONES

Los métodos de desinfección utilizados en la investigación son considerados buenos ya que se logró obtener en promedio hasta el 65% de establecimiento de embriones cigóticos con el método de desinfección III propuesto por Garcia (2013). El método de desinfección que mayor porcentaje de contaminación presentó fue el método de desinfección II propuesto por Valderrama (2013) llegando a presentar una pérdida del 42.5% de explantes.

El mejor resultado en el número de embriones somáticos generados por cada explante se obtuvo con la variedad Red Lady llegando a formar en promedio hasta 43 embriones somáticos por cada embrión cigótico, así también, obtuvo el mayor número en la germinación, llegando a formar 11 embriones somáticos germinados por muestra (14 embriones somáticos).

La variedad Red Lady tuvo comportamiento, por lo que, en base a la investigación se concluye que, el comportamiento in vitro de esta especie mediante la regeneración vía embriogénesis somática se ve

El número de embriones somáticos germinados fue 11.09 (79%) para la variedad Red Lady y 8.28 (59%) para la variedad Salviety. Este efecto posiblemente se presentó por las características genotípicas de cada variedad. Al respecto (Rodríguez, 2008) quien trabajo con la germinación de embriones somáticos en la variedad de papaya Maradol Rojo obtuvo entre 58 a 90% de germinación.

Mediante la Figura 7 se evidencia que la variedad Red Lady fue la que genero mayor número de embriones somáticos germinados en comparación con la variedad Salviety.

influenciada principalmente por la variedad, y el estado de desarrollo del explante.

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, G; Pierre, J; Leigue, L. 2016. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos filogenéticos. Bolivia.

Elder, RJ; Macleod, W. 2000. Growth, yield and phenology of 2 hybrid papaya (*Carica papaya* L.) as influenced by method of water application. Australian Journal of Experimental Agriculture.

Gallardo Colina, J. 2006. Embriogénesis somática en el híbrido IBP 42-99 de papaya (*Carica papaya*). Santa Clara, Cuba.

García Peña, A. 2013. Regeneración de híbridos de papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol x *Carica sp*) mediante embriogénesis somática. Universidad de Guadalajara, Mexico.

Hernández Jares, Y. 2013. Establecimiento y multiplicación in vitro de *Citrus aurantifolia* Christm.

Swing. var. Mexicana a partir de semillas. México.

Mamani Sánchez, B. 2005. Comportamiento in vitro de dos variedades de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) para su micropropagación en diferentes medios de cultivo. Tesis Lic. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés.

Medero Vega, V. sf. Micropropagación a partir de embriones cigóticos de la papaya (*Carica papaya* L.) var. 'maradol roja'. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Cuba.

PDM. 2014. PDM, Desarrollo Productivo, Municipio de Palos Blancos. La Paz, Bolivia.

Rodríguez, M. 2008. Estandarización de un protocolo para la Embriogénesis Somática de *Carica papaya* L. var Maradol Rojo. Santa Clara.

SENAMI. 2018. Datos del clima. Bolivia.

Valderrama Chamaya, K. 2013. Obtención de plántulas libres de virus mediante embriogénesis Somática, a partir de embriones inmaduros de *Carica papaya*. Perú.

Artículo recibido en: 12 de febrero 2020

Aceptado en: 6 de junio 2020