

Jesús Ruiz-Baca, Digna Isabel Agurto Correa,  
Katherine Liset Garces Paucar, Carlos Enrique San Martín Zapata,  
Willian Humberto Carrasco Chu



## Del genoma al fruto

Embriogénesis somática en papayo  
para la propagación masiva



Religación  
Press

Jesús Ruiz-Baca, Digna Isabel Agurto Correa, Katherine Liset Garces Paucar,  
Carlos Enrique San Martín Zapata, Willian Humberto Carrasco Chu

## **Del genoma al fruto**

*Embriogénesis somática en papayo para la  
propagación masiva*

**Religación Press**  
*[Ideas desde el Sur Global]*

*From Genome to Fruit. Somatic Embryogenesis in Papaya for Mass Propagation*

*Do genoma ao fruto. Embriogênese somática em mamoeiro para propagação massiva*

# Religación Press

*[Ideas desde el Sur Global]*

## **Equipo Editorial**

Editorial team

Ana B. Benalcázar

Editora Jefe / Editor in Chief

Felipe Carrión

Director de Comunicación / Scientific Communication Director

Melissa Díaz

Coordinadora Editorial / Editorial Coordinator

Sarahi Licango Rojas

Asistente Editorial / Editorial Assistant

## **Consejo Editorial**

Editorial Board

Jean-Arsène Yao

Dilrabo Keldiyorovna Bakhronova

Fabiana Parra

Mateus Gamba Torres

Siti Mistima Maat

Nikoleta Zampaki

Silvina Sosa

Victor Ancajima Miñán

.....

**Religación Press**, es parte del fondo editorial del Centro de Investigaciones CICSHAL-RELIGACIÓN | Religación Press, is part of the editorial collection of the CICSHAL-RELIGACIÓN Research Center |

Diseño, diagramación y portada | Design, layout and cover: Religación Press.

CP 170515, Quito, Ecuador. América del Sur.

Correo electrónico | E-mail: [press@religacion.com](mailto:press@religacion.com)

[www.religacion.com](http://www.religacion.com)

Disponible para su descarga gratuita en | Available for free download at

<https://press.religacion.com>

Este título se publica bajo una licencia de Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0)

This title is published under an Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license.



El presente libro tienen el aval del Centro de Investigaciones en Ciencias y Humanidades desde América Latina - CICSHAL.



Título: Del genoma al fruto. Embriogénesis somática en papayo para la propagación masiva

Derechos de autor | Copyright: Jesús Ruiz-Baca, Digna Isabel Agurto Correa, Katherine Liset Garces Paucar, Carlos Enrique San Martín Zapata, Willian Humberto Carrasco Chu

Primera Edición | First Edition: 2026

Editorial | Publisher: Religación Press

Materia Dewey | Dewey Subject: 631.58 - Métodos especiales de cultivo

Clasificación Thema | Thema Subject Categories: TVK - Agronomía y producción agrícola | PST - Botánica y ciencias de las plantas | PSAK - Genética (no médica)

BISAC: TEC003080

Público objetivo | Target audience: Profesional / Académico | Professional / Academic

Colección | Collection: Ingeniería

Soporte | Format: PDF / Digital

Publicación | Publication date: 2026-05-18

ISBN: 978-9942-594-55-6

Nota obra derivada: El libro retoma y amplía, mediante el trabajo colaborativo de un grupo de investigadores, los hallazgos y aportes presentados en la tesis original: "Inducción de embriones somáticos a partir de hojas de *Carica papaya* L. utilizando ácido naftalenacético y 6-bencil amino purina 3" presentada ante la Universidad Nacional de Trujillo por Jesús Ruiz-Bacas en 2019. Note: The book takes up and expands, through the collaborative work of a group of researchers, the findings and contributions presented in the original dissertation: "Inducción de embriones somáticos a partir de hojas de *Carica papaya* L. utilizando ácido naftalenacético y 6-bencil amino purina" presented to the Universidad Nacional de Trujillo by Jesús Ruiz-Baca in 2019.

---

### **[ APA 7 ]**

Ruiz Baca, J., Agurto Correa, D. I., Garces Paucar, K. L., San Martín Zapata, C. E., & Carrasco Chu, W. H. (2025). *Del genoma al fruto. Embriogénesis somática en papaya para la propagación masiva*. Religación Press. <https://doi.org/10.46652/ReligacionPress.415>

## **Revisión por pares**

El presente libro constituye el resultado de un riguroso proceso de investigación académica, cuya calidad metodológica y solidez argumental han sido validadas mediante un sistema de revisión por pares externos implementado bajo el protocolo de doble ciego, bajo la supervisión del Centro de Investigaciones en Ciencias y Humanidades desde América Latina (CICSHAL). Como garantía de transparencia y rigor científico, los informes de evaluación realizados por los especialistas designados se conservan en el archivo institucional de la editorial, a disposición de las instancias que así lo requieran.

## **Peer Review**

This book is the result of a rigorous academic research process, whose methodological quality and argumentative solidity have been validated through an external peer-review system implemented under a double-blind protocol, under the supervision of the Center for Research in Sciences and Humanities from Latin America (CICSHAL). As a guarantee of transparency and scientific rigor, the evaluation reports prepared by the designated specialists are preserved in the publisher's institutional archives, available to any party that may require them.

## Sobre los autores

ABOUT THE

AUTHORS

### **Jesús Ruiz-Baca**

Universidad Nacional de Santa | Nuevo Chimbote | Perú

<https://orcid.org/0000-0002-6196-0246>

[jruizb@uns.edu.pe](mailto:jruizb@uns.edu.pe)

[jerubaunt30@gmail.com](mailto:jerubaunt30@gmail.com)

Biólogo egresado de la UNT. Área: Bioquímica, Biotecnología vegetal 2 ESP: Biología molecular y genética; Maestría en biotecnología y doctorado en biotecnología.

### **Digna Isabel Agurto Correa**

Universidad Nacional de Piura | Piura | Perú

<https://orcid.org/0009-0001-6840-9502>

[dagurtoco@unp.edu.pe](mailto:dagurtoco@unp.edu.pe)

[isabelac\\_11@hotmail.com](mailto:isabelac_11@hotmail.com)

Geóloga, Maestra en Ingeniería Ambiental y Seguridad Industrial. Doctoranda en Ciencias Ambientales en la Universidad Nacional de Piura. Formación en investigación científica y en gestión de proyectos de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+i).

### **Katherine Liset Garces Paucar**

Universidad Nacional de Piura | Piura | Perú

<https://orcid.org/0009-0003-5412-1393>

[kgarces@unp.edu.pe](mailto:kgarces@unp.edu.pe)

[Kate01gp@gmail.com](mailto:Kate01gp@gmail.com)

Bióloga colegiada y Maestra en Ingeniería Ambiental y Seguridad Industrial. Doctoranda en Ciencias Ambientales en la Universidad Nacional de Piura. Formación en investigación científica, biotecnología y gestión de proyectos de I+D+i.

**Carlos Enrique San Martín Zapata**

Universidad Nacional de Piura | Piura | Perú

<https://orcid.org/0000-0002-3861-8119>

[csanmartinz@unp.edu.pe](mailto:csanmartinz@unp.edu.pe)

[sanmartinzapatacarlosdr@gmail.com](mailto:sanmartinzapatacarlosdr@gmail.com)

Ing. Agrónomo, profesor Asociado D.E. Departamento de Agronomía y Fitotecnia de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Piura, con especialidad en Horticultura, pos cosecha y Certificaciones agrícolas.

**Willian Humberto Carrasco Chu**

Universidad Pedro Ruiz Gallo | Piura | Perú

<https://orcid.org/0009-0002-0101-3340>

[willianchu73@gmail.com](mailto:willianchu73@gmail.com)

Magíster en Ciencias de la Educación con mención en Investigación y Docencia; profesor de Historia y Geografía. Cuenta con amplia experiencia en docencia, gestión educativa y formación docente en la región Piura.

## Resumen

Este libro explora el viaje desde la célula indiferenciada hasta la planta completa, utilizando la embriogénesis somática como herramienta central para la propagación masiva del papayo. A través de un recorrido que abarca desde los fundamentos históricos del cultivo de tejidos hasta los protocolos más refinados para la inducción de embriones, la obra presenta una guía detallada para la regeneración clonal de esta especie de alto valor nutricional y comercial. Combinando teoría y práctica, se analizan los factores críticos que determinan el éxito del proceso: desde la selección del explante y el balance hormonal hasta las condiciones de incubación. Una lectura esencial para investigadores, biotecnólogos y profesionales que buscan aprovechar el principio de totipotencia celular para optimizar la productividad y conservar el germoplasma en el sector agrícola tropical.

Palabras clave:

embriogénesis somática; propagación clonal; totipotencia celular; reguladores de crecimiento; biotecnología vegetal.

## Abstract

This book explores the journey from the undifferentiated cell to the complete plant, using somatic embryogenesis as the central tool for the mass propagation of papaya. Through a trajectory that spans from the historical foundations of tissue culture to the most refined protocols for embryo induction, the work presents a detailed guide for the clonal regeneration of this species of high nutritional and commercial value. Combining theory and practice, it analyzes the critical factors that determine the success of the process: from explant selection and hormonal balance to incubation conditions. Essential reading for researchers, biotechnologists, and professionals seeking to harness the principle of cellular totipotency to optimize productivity and conserve germplasm in the tropical agricultural sector.

Keywords:

somatic embryogenesis; clonal propagation; cellular totipotency; growth regulators; plant biotechnology.

## Resumo

Este livro explora a jornada desde a célula indiferenciada até a planta completa, utilizando a embriogênese somática como ferramenta central para a propagação massiva do mamoeiro. Através de um percurso que abrange desde os fundamentos históricos do cultivo de tecidos até os protocolos mais refinados para a indução de embriões, a obra apresenta um guia detalhado para a regeneração clonal desta espécie de alto valor nutricional e comercial. Combinando teoria e prática, são analisados os fatores críticos que determinam o sucesso do processo: desde a seleção do explante e o equilíbrio hormonal até as condições de incubação. Leitura essencial para pesquisadores, biotecnologistas e profissionais que buscam aproveitar o princípio da totipotência celular para otimizar a produtividade e conservar o germoplasma no setor agrícola tropical.

Palavras-chave:

embriogênese somática; propagação clonal; totipotência celular; reguladores de crescimento; biotecnologia vegetal.

## CONTENIDO

Revisión por pares	7
Peer Review	7
Sobre los autores	8
About the authors	8
Resumen	10
Abstract	10
Resumo	11
Introducción	16
Fundamentos y aplicaciones de la embriogénesis somática en <i>Carica papaya</i> L.. Un análisis desde la fisiología vegetal y el mejoramiento genético	16
Origen, importancia nutricional y usos del papayo ( <i>Carica papaya</i> L.)	16
Principios fundamentales del cultivo de tejidos y la embriogénesis somática como estrategia biotecnológica	18
Determinantes fisiológicos y químicos en la inducción de la embriogénesis somática en papaya y especies afines	22

### Capítulo 1

Diseño experimental y abordaje metodológico para la inducción de embriogénesis somática en <i>Carica papaya</i> L.	28	Establecimiento del material vegetal y condiciones iniciales de cultivo	29
		Preparación del medio de cultivo y estandarización de las condiciones basales	30
		Inducción de callos y transferencia a tratamientos hormonales	31
		Condiciones de incubación y análisis histológico de los tejidos	33
		Parámetros de evaluación y análisis estadístico de los datos experimentales	35

### Capítulo 2

Caracterización morfológica e histológica de la respuesta embriogénica	37	Descripción de las estructuras macroscópicas observadas en los diferentes tratamientos	38
		Análisis histológico de las transformaciones celulares	41
		Evaluación cuantitativa de la embriogénesis somática	47

### Capítulo 3

Análisis de los factores determinantes en la embriogénesis somática de *Carica papaya* L. 50

La interacción entre fitoreguladores y tejidos juveniles como base de la competencia embriogénica 51  
 Evidencias histológicas de la reprogramación celular hacia la ruta embriogénica 53  
 Implicaciones de los hallazgos para la micropropagación y el mejoramiento genético 56

### Capítulo 4

Conclusiones y perspectivas para la micropropagación de *Carica papaya* L. 60

Hallazgos fundamentales en la inducción de embriogénesis somática 61  
 Lineamientos estratégicos para la optimización del protocolo 64

### Referencias

69

**FIGURAS**

Figura 1. El inicio del viaje celular	33
Figura 2. Primeras cicatrices en el tejido.	38
Figura 3. Dos arquitecturas para la regeneración.	39
Figura 4. Superficies en calma.	40
Figura 5. Una leve insinuación de volumen.	40
Figura 6. El anuncio microscópico de una nueva planta	41
Figura 7. La esfera prometedora (Fórmula 2).	42
Figura 8. La esfera prometedora (Fórmula 3).	43
Figura 9. La esfera prometedora (Fórmula 4).	44
Figura 10. El silencio del tejido (Fórmula 5).	45
Figura 11. El silencio del tejido (Fórmula 6).	45
Figura 12. Señales de vida (Fórmula 7).	46
Figura 13. Señales de vida (Fórmula 8).	47

**TABLAS**

Tabla 1. Diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y ANA por tratamiento	32
Tabla 2. Presencia de embriones somáticos según concentraciones de ANA y BAP por tratamiento	48



## Introducción

### **Fundamentos y aplicaciones de la embriogénesis somática en *Carica papaya* L.. Un análisis desde la fisiología vegetal y el mejoramiento genético**

*Origen, importancia nutricional y usos del papayo (Carica papaya L.)*

El papayo (*Carica papaya* L.) se erige como una de las especies frutales de mayor relevancia económica y nutricional en las regiones tropicales y subtropicales del globo. Su centro de origen se sitúa en América Central, una región que le ha conferido las adaptaciones necesarias para prosperar en climas cálidos, caracterizándose por un ciclo de producción continua a lo largo de todo el año, lo que garantiza un suministro constante al mercado (Food and Agriculture Organization, 2006). La magnitud de su cultivo a nivel mundial es un testimonio de su importancia, alcanzando en 2006 una producción que superó los 7,7 millones de toneladas, según datos de la misma organización. Este volumen de producción responde no solo a su aceptación como fruta fresca, sino también a su versatilidad agroindustrial, que ha permitido su incorporación en cadenas de valor que van desde el consumo doméstico hasta la exportación masiva hacia mercados exigentes en Europa, América del Norte y Asia. Desde un punto de vista nutricional, el fruto presenta un contenido de azúcares totales que oscila entre el 7% y el 9%, lo que contribuye a su sabor característico y a su valor energético, además de ser una fuente importante de vitaminas A y C, así como de minerales como el potasio y el magnesio, elementos esenciales para la salud humana que refuerzan su condición de alimento funcional.

Más allá de su consumo como fruta fresca, frecuentemente incorporada en postres y ensaladas, el papayo ha sido históricamente aprovechado en una diversidad de preparaciones culinarias y productos procesados que demuestran su plasticidad agroindustrial. Esta versatilidad se extiende a la elaboración de bebidas refrescantes, tanto naturales como carbonatadas, así como a la producción de helados, mermeladas, frutas cristalizadas, encurtidos y pulpa seca para la confitería, lo que evidencia la capacidad de esta especie para adaptarse a diferentes formatos de presentación y consumo (Rodríguez Rivera et al., 1966). En países productores como México, Brasil e India, la industrialización del papayo ha generado un entramado económico que involucra a pequeños agricultores, empresas procesadoras y redes de distribución internacional, consolidando al fruto como un producto estratégico dentro de las economías rurales. Sin embargo, el valor del papayo trasciende su uso alimentario, adentrándose en el ámbito de la biotecnología industrial. Un componente de particular interés es la papaína, una enzima proteolítica con propiedades similares a la pepsina y la tripsina, cuya capacidad para hidrolizar proteínas la convierte en un insumo de alto valor comercial. Esta enzima, que se presenta con una textura pulverulenta y grumosa, ha encontrado aplicaciones en la industria alimentaria como clarificador de bebidas como la cerveza y como ablandador de carnes, donde su acción enzimática permite mejorar la textura y la digestibilidad de los productos cárnicos. En el ámbito farmacéutico, se emplea como un auxiliar digestivo en formulaciones destinadas al tratamiento de trastornos gastrointestinales, demostrando así que la importancia de esta especie se extiende desde el campo hasta la industria biotecnológica y farmacéutica (Jiménez Cruz, 1998). Este amplio espectro de aplicaciones justifica la necesidad de desarrollar herramientas biotecnológicas que permitan su mejora genética y propagación eficiente, especialmente ante la creciente demanda de variedades con mayor resistencia a enfermedades, mejor calidad organoléptica y mayor vida de anaquel.

## **Principios fundamentales del cultivo de tejidos y la embriogénesis somática como estrategia biotecnológica**

El cultivo de tejidos vegetales se ha consolidado como un pilar fundamental en la biotecnología agrícola, constituyendo una etapa decisiva en los programas de mejoramiento genético de especies de alto valor. Estos procedimientos, basados en el principio biológico de la totipotencia celular, permiten obtener plantas completas a partir de células somáticas no diferenciadas, órganos o cualquier tejido vegetal en condiciones asépticas y controladas. La totipotencia, concepto acuñado por Haberlandt a principios del siglo XX y posteriormente demostrado experimentalmente, se manifiesta a través de una serie de procesos celulares secuenciales que incluyen la dediferenciación de células especializadas, su rejuvenecimiento y la posterior rediferenciación, culminando en la formación de una planta entera con todas sus estructuras funcionales (Slater et al., 2003; Akbar & Hakoomat, 2004). Este intrincado proceso solo es factible en un medio de cultivo artificial que provea los nutrientes esenciales —macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y una fuente de carbono— y, de manera crucial, los reguladores de crecimiento vegetal, los cuales actúan como inductores y moduladores de las transformaciones celulares necesarias para la regeneración (Pérez-Bernal et al., 2007). La composición del medio de cultivo, particularmente la relación entre auxinas y citocininas, determina la ruta morfogénica que seguirán las células cultivadas, ya sea hacia la formación de callos no diferenciados, la organogénesis directa o la embriogénesis somática.

Dentro del amplio espectro de técnicas de cultivo de tejidos, la micropropagación y la embriogénesis somática destacan por su eficacia en la propagación masiva de especies de interés económico (Fitch et al., 2004; Bhattacharya, 2002). La embriogénesis somática, en particular, re-

presenta una ruta de regeneración con un potencial excepcional para la clonación masiva y la conservación de germoplasma. Este proceso, descrito por primera vez de manera independiente por Steward en 1958 y Reinert en 1959 en cultivos de zanahoria (*Daucus carota* L.), implica la formación de un embrión a partir de una célula somática o vegetativa, sin que medie un proceso de fecundación (Jiménez, 2001). A diferencia de la embriogénesis cigótica, que resulta de la unión de gametos y genera variabilidad genética, la embriogénesis somática se inicia a partir de células no reproductivas, manteniendo inalterada la combinación genética de la planta donante del explante (Carlota et al., 1997; Parrott, 1993). Esta característica es de suma importancia para la clonación de genotipos superiores que han sido seleccionados por su productividad, resistencia a enfermedades o calidad organoléptica, así como para la conservación de germoplasma élite en bancos de recursos genéticos. La estabilidad genética de los embriones somáticos, aunque generalmente alta, requiere de verificaciones mediante marcadores moleculares para descartar la presencia de variación somaclonal, un fenómeno que puede ocurrir tras prolongados periodos de cultivo *in vitro*.

La capacidad de inducir embriones somáticos no se limita a un tejido específico; diversos órganos y tejidos vegetales pueden fungir como explantes iniciales, ampliando las posibilidades para la iniciación de cultivos embriogénicos. Entre los más comúnmente utilizados se encuentran los ápices radiculares y caulinares, los hipocótilos, los pecíolos, los pedúnculos, las hojas jóvenes y, en general, cualquier tejido con características meristemáticas o embrionarias latentes, que conservan una alta competencia para responder a los estímulos hormonales. También se emplean estructuras reproductivas inmaduras, como embriones cigóticos, inflorescencias, trozos de escutelo, nucela, óvulos, tejido ovárico e incluso endospermo, lo que demuestra la notable plasticidad del desarrollo vegetal (Agúndez et al., 1999). Esta versatilidad en la elección del explante es una ventaja operativa que facilita la implementación de pro-

tolos para diferentes especies y variedades, permitiendo seleccionar el tejido más accesible, de mayor capacidad de respuesta y con menor riesgo de contaminación endógena, aspectos críticos para el éxito de los cultivos in vitro. En el caso particular de la papaya, las hojas jóvenes, los segmentos de hipocótilo y los ápices caulinares han demostrado ser los explantes más receptivos para la inducción de callos embriogénicos.

La vía de formación de estos embriones puede ser de dos tipos: directa e indirecta, cada una con implicaciones distintas para la estabilidad genética y la eficiencia del proceso. La embriogénesis somática directa ocurre cuando las células somáticas del explante ya poseen una predisposición natural para seguir la ruta embriogénica, diferenciándose directamente en embriones sin una fase intermedia de callo (Cai et al., 1999). Esta vía es generalmente preferida cuando se busca minimizar el riesgo de variación somaclonal, ya que evita una fase prolongada de proliferación celular desorganizada. Por el contrario, la embriogénesis indirecta es más común y requiere la desdiferenciación inicial de las células del explante para formar una masa celular desorganizada conocida como callo, la cual puede ser proliferada y mantenida por largos periodos. Es durante esta fase proliferativa donde las células adquieren la competencia embriogénica, para luego diferenciarse en embriones somáticos bajo estímulos específicos, generalmente una reducción en la concentración de auxinas o un cambio en el balance hormonal (Haggman et al., 1999). La elección de una u otra vía depende en gran medida de la especie, el genotipo, el tipo de explante y las condiciones de cultivo, requiriendo en cada caso un proceso de optimización empírica que constituye el núcleo de la investigación en este campo.

Las ventajas de la embriogénesis somática como sistema de propagación son notables y la posicionan como una tecnología superior frente a otros métodos convencionales, especialmente en el contexto de la producción a gran escala. Su principal fortaleza reside en la enorme capaci-

dad de multiplicación que ofrece, especialmente cuando se implementa en sistemas de biorreactores a escala industrial, donde miles de embriones pueden producirse de manera sincronizada en un volumen reducido de medio de cultivo. Este enfoque permite la producción sincronizada de un gran número de estructuras bipolares completas (con ápice caulinar y radicular) en un solo proceso, eliminando la necesidad de etapas de multiplicación de brotes y enraizamiento individualizadas que caracterizan a la micropropagación convencional. Adicionalmente, los embriones somáticos pueden ser sometidos a técnicas de encapsulación para producir semillas artificiales, lo que facilita su almacenamiento por periodos prolongados a temperaturas controladas y su manejo posterior, incluyendo la siembra mecanizada en viveros o directamente en campo (Arrieta-Espinoza, 1996; Salisbury & Ross, 2000). La aplicabilidad de este conocimiento es vasta, abarcando desde la propagación clonal masiva de cultivares élite y el mejoramiento genético asistido por marcadores, hasta el saneamiento de plantas infectadas por patógenos mediante la regeneración a partir de tejidos libres de virus, el intercambio seguro de germoplasma a nivel internacional y la ingeniería genética, donde los embriones somáticos sirven como sistema diana para la introducción de genes de interés mediante *Agrobacterium* o biobalística, y la posterior selección de especímenes transformados (Salisbury & Ross, 2000). En el caso específico de *Carica papaya*, la embriogénesis somática ha sido explorada como una herramienta para la multiplicación de variedades resistentes al virus de la mancha anillada (PRSV), uno de los principales limitantes del cultivo a nivel mundial.

## **Determinantes fisiológicos y químicos en la inducción de la embriogénesis somática en papaya y especies afines**

La eficiencia en la formación de estructuras embriogénicas y su posterior conversión en plántulas completas no es un proceso azaroso, sino que está estrictamente regulada por una compleja interacción de factores endógenos y exógenos que deben ser meticulosamente controlados para lograr resultados reproducibles. Entre los factores intrínsecos al explante se encuentran la fuente tisular, la edad fisiológica de la planta donante, el tamaño y la orientación del explante en el medio de cultivo, así como la época de colecta y, fundamentalmente, el genotipo, que determina la capacidad de respuesta inherente a cada variedad (Pierik, 1990). Estos factores determinan la competencia celular inicial y la respuesta a los estímulos externos, explicando por qué un mismo protocolo puede ser altamente eficiente para una variedad y completamente ineficaz para otra. Los componentes del medio de cultivo, incluyendo la composición de sales minerales —siendo el medio Murashige y Skoog (MS) el más ampliamente utilizado por su riqueza en nitratos, potasio y micronutrientes—, las fuentes de carbono (sacarosa, glucosa, maltosa) que proveen energía y actúan como reguladores osmóticos, y los reguladores de crecimiento, constituyen el segundo grupo de factores determinantes. Las condiciones físicas de incubación, como el fotoperiodo, la intensidad lumínica y la temperatura, completan el triángulo de condiciones que rigen el éxito del proceso (Pierik, 1990). La diferenciación de órganos o embriones depende críticamente del balance cuantitativo y cualitativo entre dos grupos hormonales antagónicos: las auxinas y las citocininas. Tradicionalmente, se acepta que una predominancia de auxinas estimula la formación de raíces y callos, mientras que una predominancia de citocininas favorece la brotación de yemas adventicias, siendo la embriogénesis somática inducida típicamente por una alta concentración

inicial de auxinas seguida de una reducción o eliminación de las mismas (Arrieta-Espinoza, 1996).

Los reguladores de crecimiento, o fitohormonas, son moléculas señal que median la mayor parte de los procesos fisiológicos en las plantas, actuando en concentraciones extremadamente bajas y con interacciones sinérgicas o antagónicas entre sí. En el contexto del cultivo *in vitro*, las auxinas y las citocininas actúan como los principales inductores de los procesos morfogénéticos, modulando la expresión génica y las vías de señalización que conducen a la división, elongación y diferenciación celular. Las auxinas, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o el ácido naftalenacético (ANA), son conocidas por promover la elongación celular, la expansión de tejidos, la formación de callos no organogénicos y la inducción de raíces adventicias. En muchos sistemas, altas concentraciones de auxinas, particularmente 2,4-D, son necesarias para inducir la dediferenciación celular y la formación de callos embriogénicos en cultivos de suspensión, siendo este compuesto el regulador de elección para la inducción de embriogénesis somática en numerosas especies (Cabrera-Ponce et al., 1995). Por otro lado, las citocininas, como la 6-bencilaminopurina (6-BAP o BAP), estimulan la división celular, especialmente en presencia de una auxina, y son cruciales para la diferenciación de brotes y la maduración de embriones somáticos. La 6-BAP es considerada una de las citocininas más efectivas y ampliamente empleada en la inducción de yemas axilares, aunque también se ha utilizado en la inducción de embriones somáticos, posiblemente debido a los efectos de estrés osmótico y oxidativo que puede inducir en los tejidos cultivados, promoviendo la reprogramación celular (Pires de Almeida et al., 2000; Posada-Pérez et al., 2007).

La investigación en embriogénesis somática ha estado frecuentemente orientada a establecer protocolos eficientes mediante la optimización de estos componentes hormonales y nutricionales, reconociendo

que no existe una fórmula universal aplicable a todas las especies o genotipos. Por ejemplo, se ha demostrado que la combinación de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa con 20 µM de 2,4-D es altamente efectiva para inducir callos con altas tasas de crecimiento y un mayor diámetro, asociándose esta combinación con un elevado potencial para la formación de embriones somáticos en diversas especies, probablemente debido a un efecto sinérgico entre la fuente de carbono y la auxina en la modulación del potencial osmótico y la expresión de genes embriogénicos (Schuabb et al., 2013). En el caso particular de la papaya, múltiples estudios han explorado diferentes combinaciones hormonales, reflejando la complejidad de optimizar un sistema de regeneración para esta especie. Arrieta-Espinoza (1996), reportó que el medio MS suplementado con 1 ppm de 2,4-D y cinetinas era óptimo para la embriogénesis somática a partir de explantes foliares, destacando la importancia de combinar auxinas con citocininas en la fase de inducción. En contraste, Pires de Almeida et al. (2000), en Brasil encontraron que una concentración de 10 ppm de 2,4-D era más efectiva para la inducción de callos en discos de hoja de papaya, lo que sugiere que diferencias en las condiciones ambientales, los genotipos empleados o la procedencia del material vegetal pueden influir en los requerimientos hormonales. Por su parte, Posada-Pérez et al. (2007), en Cuba, trabajando con la variedad Maradol, determinaron que 5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D era adecuado para la inducción, y que la adición de 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP tenía un efecto positivo en la multiplicación secundaria de los embriones somáticos, mientras que 5 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB) promovía el enraizamiento de los brotes regenerados, aunque con una longitud inferior a 1.85 cm (Cabrera-Ponce et al., 1996; Velásquez et al., 2006).

La interacción genotipo-medio es un factor crítico que condiciona la transferibilidad de protocolos entre diferentes materiales genéticos, como se evidenció en estudios con *Agave tequilana* Weber cultivar azul. En esta especie, se observaron diferencias significativas en la capacidad embriogénica entre seis genotipos distintos cultivados bajo las mismas

condiciones, lo que subraya la importancia de considerar la variabilidad genética intraespecífica en el diseño de protocolos de regeneración. Se encontró que altas concentraciones de la citocinina BA (44.4 a 66.6  $\mu\text{M}$ ) favorecían la producción de embriones en el genotipo S3, mientras que una mayor relación auxina/citocinina (9.0 y 13.6  $\mu\text{M}$  2,4-D frente a 1.3 y 4.0  $\mu\text{M}$  BA) daba lugar a embriones blanquecinos morfológicamente similares a los cigóticos, lo que indica que la morfología y calidad de los embriones también están influenciadas por el balance hormonal. Las observaciones microscópicas en este sistema confirmaron el origen unicelular de los embriones somáticos indirectos, un hallazgo fundamental para comprender la estabilidad genética de los regenerantes, ya que la formación a partir de una única célula reduce el riesgo de quimerismo (Portillo et al., 2007). Asimismo, en *Dioscorea zingiberensis*, una especie de importancia medicinal, un nuevo método estableció que la mayor frecuencia de formación de callo (87%) se lograba a partir de tallos con 2.0  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D, demostrando la superioridad de este regulador para la dediferenciación. Posteriormente, la combinación óptima de 4.0  $\text{mg L}^{-1}$  de BA y 0.2  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA promovió la formación de embriones en un tercio de los callos subcultivados, demostrando la necesidad de una secuencia de fases con reguladores específicos y confirmando que la etapa de maduración y conversión de embriones requiere condiciones hormonales distintas a las de inducción (Yuan et al., 2005).

Finalmente, el futuro y la aplicación comercial de la embriogénesis somática dependen del desarrollo de protocolos más refinados que permitan producir embriones morfológicamente normales, con alta capacidad de germinación y libres de variación somaclonal, asegurando la fidelidad genética de los regenerantes (Parrott, 2002). Las ventajas inherentes a este sistema, como la obtención de un mayor volumen de producción en menor tiempo y la posibilidad de automatización, lo posicionan como una vía de regeneración potencialmente más eficiente que la organogénesis, especialmente para especies leñosas o de propagación

vegetativa difícil (Villalobos & Thorpe, 1991). Además, la estandarización de estos protocolos es un requisito indispensable para la automatización de la micropropagación mediante sistemas de biorreactores de inmersión temporal o encapsulación, y la consiguiente reducción de costos para su implementación a escala comercial, haciendo factible la producción masiva de plantas de alta calidad genética y fitosanitaria (Smith & Wood, 1998). En este contexto, la presente investigación se enfoca en contribuir a este cuerpo de conocimiento, estableciendo como objetivo inducir embriones somáticos en hojas de *C. papaya* mediante la acción de ácido naftalenacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (BAP), con la finalidad de aportar una alternativa metodológica para la propagación clonal de esta especie de relevancia global.



## **Capítulo**

# **1**

*DISEÑO EXPERIMENTAL Y ABORDAJE METODOLÓGICO PARA  
LA INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CARICA  
PAPAYA L*

## **Establecimiento del material vegetal y condiciones iniciales de cultivo**

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Cultivos Celulares de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT), donde se estableció un sistema experimental destinado a la obtención de material vegetal homogéneo y en condiciones fitosanitarias controladas. Para ello, se procedió a la germinación de semillas de *Carica papaya* L. var. criolla en germinadores de plástico, empleando un sustrato estéril que permitió la emergencia y desarrollo inicial de las plántulas. Este proceso de germinación controlada es fundamental para garantizar que el material de partida se encuentre libre de contaminantes externos y presente un estado fisiológico uniforme, condición indispensable para la reproducibilidad de los experimentos en cultivo de tejidos. Como resultado de este proceso, se obtuvieron un total de 200 plántulas, las cuales constituyeron la fuente primaria para la obtención de los explantes utilizados en las fases subsiguientes del estudio. La selección del explante adecuado constituye un factor crítico en los protocolos de embriogénesis somática, ya que la competencia morfogénica varía según el tejido elegido, su edad fisiológica y las condiciones de cultivo previas. En este caso, se seleccionaron hojas jóvenes provenientes de las plántulas germinadas, considerando que los tejidos juveniles presentan una mayor capacidad de desdiferenciación y respuesta a los reguladores de crecimiento. Se colectaron un total de 400 explantes foliares, cada uno con dimensiones promedio de un centímetro cuadrado y provenientes de plántulas con una edad promedio de 30 días, lo que aseguró que todos los explantes se encontraran en una etapa fenológica comparable, reduciendo así la variabilidad experimental asociada a diferencias en el estado de desarrollo del tejido donante.

## **Preparación del medio de cultivo y estandarización de las condiciones basales**

Para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, se empleó como medio basal la formulación propuesta por Murashige y Skoog (1962), ampliamente reconocida como uno de los medios más completos y versátiles para la regeneración de especies dicotiledóneas. En el presente estudio, este medio fue utilizado a la mitad de su concentración de sales, una modificación frecuentemente empleada para reducir el potencial osmótico y favorecer la respuesta morfogénica en tejidos juveniles. La composición del medio fue complementada con sacarosa al 3% como fuente de carbono y energía, esencial para el metabolismo celular en condiciones heterótrofas, y con fitagel al 0.3% como agente gelificante para proporcionar soporte físico a los explantes. La suplementación con reguladores de crecimiento constituyó el componente central de los tratamientos experimentales, incorporándose ácido naftalenacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en diferentes combinaciones y concentraciones según el diseño experimental. El ajuste del pH del medio a un rango comprendido entre 5.6 y 6.5 se realizó mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH 1N) o ácido clorhídrico (HCl 1N), utilizando un pHmetro previamente calibrado. Este control del pH es crítico, ya que influye en la disponibilidad de nutrientes, la estabilidad de los reguladores de crecimiento y la capacidad de gelificación del medio. Una vez preparado, el medio fue dispensado en frascos de vidrio de 5 cm de altura, con un volumen de 2 ml por frasco, asegurando una superficie de contacto adecuada para los explantes. La esterilización de los frascos con su contenido se realizó en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 30 minutos, condiciones que garantizan la eliminación de microorganismos contaminantes sin degradar significativamente los componentes termolábiles del medio.

## **Inducción de callos y transferencia a tratamientos hormonales**

La fase inicial del proceso de embriogénesis somática consistió en la inducción de callos a partir de los explantes foliares, para lo cual se complementó el medio basal con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a una concentración de 1 ppm. Esta auxina sintética es ampliamente utilizada para promover la dediferenciación celular en cultivos vegetales, induciendo la formación de masas celulares no organizadas que constituyen el callo primario. Previo a la siembra en el medio de cultivo, los explantes foliares fueron sometidos a un riguroso proceso de desinfección superficial para eliminar la carga microbiana presente en la superficie del tejido. Este procedimiento consistió en una inmersión en alcohol etílico al 70% durante un breve periodo, seguida de una incubación en hipoclorito de sodio al 2.5%, un agente oxidante que actúa eficazmente contra bacterias y hongos. Posteriormente, los explantes fueron enjuagados con agua destilada estéril para remover los residuos de los agentes desinfectantes. La siembra se realizó en condiciones de asepsia dentro de una cámara de flujo laminar, colocando cada explante con el envés en contacto con el medio de cultivo, una orientación que facilita la absorción de nutrientes y reguladores por las células epidérmicas y los tejidos subyacentes. Se establecieron un total de 400 explantes en esta fase inicial, los cuales fueron incubados en oscuridad total durante 10 días. Este periodo de oscuridad es un factor determinante para la inducción de callos embriogénicos en numerosas especies, ya que la ausencia de luz favorece la dediferenciación celular y reduce la activación de vías fotomorfogénicas que podrían interferir con el proceso. Transcurrido este periodo, los explantes con formación de callo fueron trasladados a las diferentes combinaciones de ANA y BAP según el diseño experimental descrito en la Tabla 1, momento a partir del cual se inició la fase de inducción de embriones somáticos.

Tabla 1. Diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y ANA por tratamiento

TRATAMIENTO	REGULADORES DEL CRECIMIENTO (ppm)	
	BAP	ANA
1	1	0.5
2	1	1
3	5	0.5
4	5	1
5	1	0
6	5	0
7	0	0.5
8	0	1

Fuente: Ruiz Baca, 2019.

Figura 1. El inicio del viaje celular



Nota técnica: Establecimiento de cultivos in vitro de *Carica papaya* L. a partir de explantes foliares. Secuencia del procedimiento: a) Corte de hojas jóvenes; b) Desinfección de hojas; c) Introducción de explantes; d) Frascos con medio de cultivo; e) Frascos en incubación; f) Formación de callos. Fuente: Ruíz Baca, 2019.

## Condiciones de incubación y análisis histológico de los tejidos

Las condiciones ambientales durante el cultivo in vitro fueron controladas para garantizar la reproducibilidad de los resultados y la expresión óptima de la respuesta morfogénica. Durante la fase inicial de in-

ducción de callos en presencia de 2,4-D, los explantes fueron mantenidos en una cámara de incubación con temperatura regulada entre  $25 \pm 2$  °C y en oscuridad total durante 10 días, condiciones que favorecen la proliferación celular y la dediferenciación. Posteriormente, tras la transferencia a los diferentes tratamientos con ANA y BAP, los cultivos fueron trasladados a un régimen de iluminación controlado, utilizando cuatro lámparas fluorescentes de luz blanca de 40 watts cada una, que proporcionaron una intensidad lumínica adecuada para los procesos de diferenciación celular. El fotoperiodo establecido fue de 16 horas de luz por 8 horas de oscuridad, un ciclo que simula las condiciones de días largos y favorece la organogénesis y la embriogénesis en numerosas especies. La temperatura durante esta fase se mantuvo a  $21 \pm 2$  °C, condiciones que permiten un crecimiento moderado y reducen el riesgo de estrés fisiológico por temperaturas elevadas.

Para el análisis del proceso de dediferenciación celular y la caracterización de las estructuras embriogénicas, se implementó un protocolo de evaluación histológica. Se colectaron muestras de cada tratamiento en momentos específicos del cultivo: al primer día, al quinto día y posteriormente cada 30 días, con el objetivo de seguir la evolución temporal de las transformaciones celulares. Las muestras fueron fijadas en solución FAA, compuesta por formaldehído, alcohol al 70%, ácido acético glacial y agua destilada, una mezcla fijadora que preserva la estructura celular y evita la autólisis de los tejidos. Una vez fijadas, las muestras fueron procesadas mediante deshidratación en series graduales de alcohol, aclarado en xilol e inclusión en parafina para obtener bloques que permitieran realizar cortes histológicos. Los cortes se obtuvieron utilizando un micrótopo, obteniéndose secciones de 8 a 10 micrómetros de espesor, que fueron montadas en portaobjetos para su posterior tinción. La coloración de los tejidos se realizó con safranina al 1% en etanol al 50%, un colorante que tiñe preferentemente las paredes celulares lignificadas y los núcleos. Las observaciones histológicas y la

obtención de fotomicrografías se realizaron utilizando un microscopio OLYMPUS equipado con una cámara digital conectada a un sistema de captura de imágenes, lo que permitió documentar las estructuras celulares observadas en cada tratamiento.

### **Parámetros de evaluación y análisis estadístico de los datos experimentales**

La evaluación de los explantes se realizó periódicamente cada 25 días durante todo el periodo experimental, empleando una combinación de técnicas de observación directa y tinciones diferenciales. Para la observación macroscópica y la caracterización morfológica de los callos y embriones, se utilizó un microscopio compuesto y un estereoscopio binocular, instrumentos que permitieron apreciar la forma, el color, la textura y la organización de las estructuras desarrolladas. La evaluación histoquímica incluyó el uso de colorantes específicos para identificar compuestos y estructuras de interés: el Lugol (solución de yodo y yoduro de potasio) permitió la detección de almidón en los tejidos, un indicador de la acumulación de reservas asociada a la competencia embriogénica; el aceto carmín se empleó para la visualización de núcleos celulares, facilitando la identificación de células en división activa; y la hematoxilina, en combinación con safranina, permitió la diferenciación de tejidos meristemáticos y embrionarios en los cortes histológicos. Los parámetros cuantitativos registrados incluyeron la presencia, color y forma de los callos, el número de callos formados por explante, el número de embriones desarrollados por callo, y los hallazgos del análisis histológico. Para el procesamiento de los datos obtenidos, se emplearon medidas de tendencia central, presentando los resultados en forma de promedios y porcentajes, lo que permitió comparar la respuesta embriogénica entre los diferentes tratamientos.



**Capítulo**

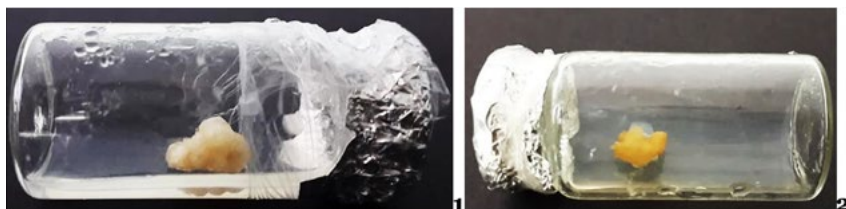
# 2

*CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA DE LA  
RESPUESTA EMBRIOGÉNICA*

## Descripción de las estructuras macroscópicas observadas en los diferentes tratamientos

Los explantes foliares de *Carica papaya* L. cultivados en las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento mostraron una notable variabilidad en su respuesta morfológica, evidenciando diferencias tanto en la forma como en la textura y el color de los callos desarrollados. A los 25 días de cultivo, se observaron patrones morfológicos distintivos que permitieron agrupar los tratamientos según las características de los callos producidos. En los tratamientos 1 y 2, los cuales combinaban BAP a 1 ppm con ANA a 0.5 ppm y 1 ppm respectivamente, se desarrollaron callos de forma ovalada a casi redonda, con una textura amorfa y una consistencia friable, características que en muchos sistemas de cultivo se asocian con una alta competencia embriogénica. Estas observaciones se encuentran documentadas en la Figura 2, donde se aprecia la morfología característica de estos callos a los 25 días de edad.

Figura 2. Primeras cicatrices en el tejido.

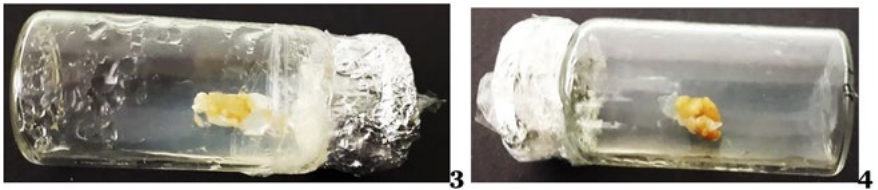


Nota técnica: Callos ovalados y amorfos observados en los tratamientos 1 y 2 a los 25 días de cultivo. Fuente: Ruiz Baca, 2019.

En contraste, los tratamientos 3 y 4, que incorporaban una mayor concentración de BAP (5 ppm) en combinación con ANA a 0.5 ppm y 1 ppm respectivamente, produjeron callos con morfologías diferenciadas. El tratamiento 3 dio lugar a callos de forma plana con una ligera protu-

berancia central, mientras que el tratamiento 4 generó callos de forma redonda más compacta. Esta variabilidad sugiere que la relación entre auxinas y citocininas no solo determina la inducción de la embriogénesis, sino que también modula la arquitectura del callo formado. La Figura 3 presenta las características morfológicas de estos callos a los 25 días de edad.

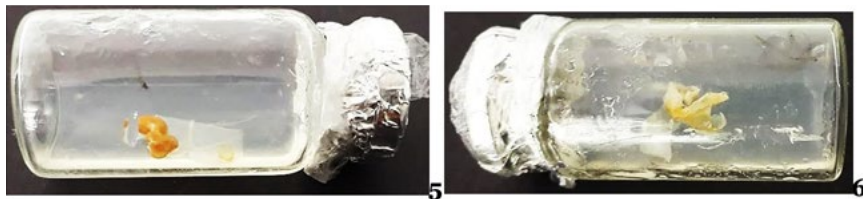
Figura 3. Dos arquitecturas para la regeneración.



Nota técnica: Callo plano ligeramente abultado (tratamiento 3) y callo redondo (tratamiento 4) a los 25 días de cultivo. Fuente: Ruiz Baca, 2019.

Los tratamientos 5 y 6, en los cuales se suprimió completamente el ANA (0 ppm) manteniendo BAP a 1 ppm y 5 ppm respectivamente, produjeron callos de forma predominantemente plana, con escasa proliferación y una textura más compacta. La ausencia de auxina en estos tratamientos parece limitar la capacidad de expansión celular y la formación de callos voluminosos, lo que podría afectar la competencia embriogénica posterior. Estas observaciones se ilustran en la Figura 4, donde se muestran los callos planos característicos de estos tratamientos a los 25 días de edad.

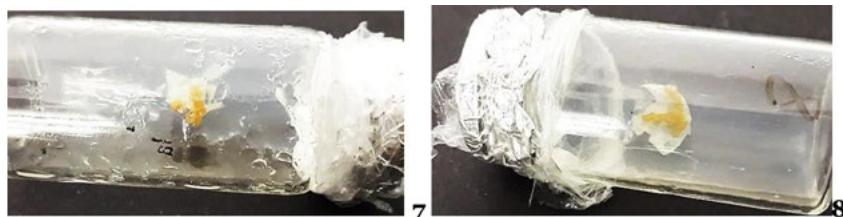
Figura 4. Superficies en calma.



Nota técnica: Callos de forma plana en los tratamientos 5 y 6 a los 25 días de cultivo. Fuente: Ruiz Baca, 2019.

Finalmente, los tratamientos 7 y 8, en los cuales se eliminó el BAP (0 ppm) manteniendo ANA a 0.5 ppm y 1 ppm respectivamente, también produjeron callos de morfología plana, aunque con una ligera hinchazón en el tratamiento 7 y una forma plana ligeramente hinchada en el tratamiento 8. La ausencia de citocinina en estos tratamientos parece orientar la respuesta hacia una proliferación menos organizada, aunque la presencia de auxina mantiene la capacidad de formación de callos. Las características de estos callos se presentan en la Figura 5.

Figura 5. Una leve insinuación de volumen.

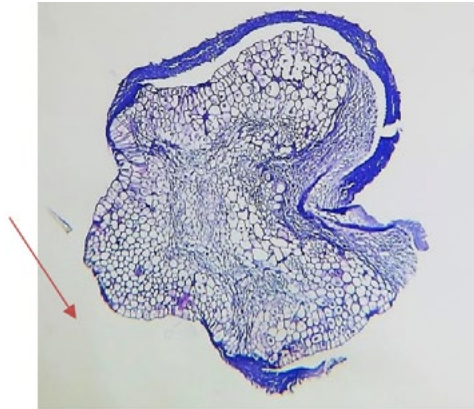


Nota técnica: Callos de forma plana ligeramente hinchados en los tratamientos 7 y 8 a los 25 días de cultivo. Fuente: Ruiz Baca, 2019.

## Análisis histológico de las transformaciones celulares

Los cortes histológicos realizados a los 85 a 89 días de cultivo permitieron identificar con precisión la presencia de células meristemáticas y embriones somáticos en los diferentes tratamientos, confirmando la inducción de la ruta embriónica en aquellos tratamientos que presentaron las combinaciones hormonales adecuadas. En el tratamiento 1, correspondiente a la combinación de ANA 0.5 ppm y BAP 1.0 ppm, se observaron células meristemáticas claramente diferenciadas, caracterizadas por presentar núcleos prominentes, citoplasma denso y una alta relación núcleo-citoplasma, rasgos morfológicos que las distinguen como células competentes para iniciar el desarrollo embrionario. Estas observaciones, documentadas en la Figura 6, revelan la presencia de células meristemáticas a los 89 días de cultivo, evidenciando que esta combinación hormonal favorece la adquisición de competencia embriónica en los tejidos cultivados.

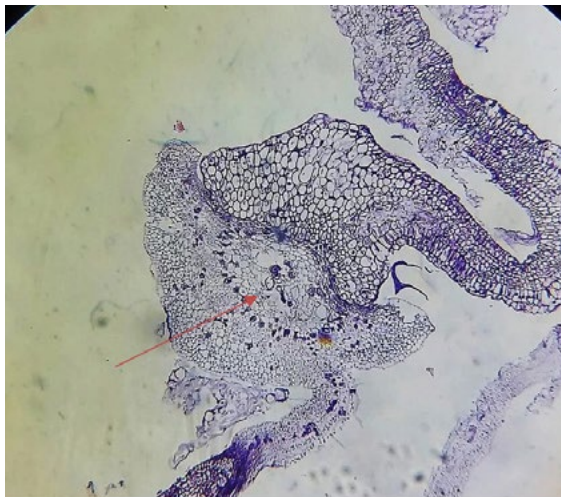
Figura 6. El anuncio microscópico de una nueva planta



Nota técnica: Células meristemáticas que promoverán el desarrollo de embriones a partir de tejido foliar. Fuente: Ruiz Baca, 2019.

En los tratamientos 2, 3 y 4, se observaron estructuras más avanzadas en el proceso embriogénico, identificándose embriones somáticos en estadio globular. En el tratamiento 2, con ANA 1.0 ppm y BAP 1.0 ppm, se encontraron embriones globulares a los 88 días de cultivo, caracterizados por presentar una organización celular polarizada con una masa de células pequeñas y densas en el polo apical y células más vacuoladas en la región basal. La Figura 7 muestra estas estructuras embrionarias en corte transversal.

Figura 7. La esfera prometidora (Fórmula 2).

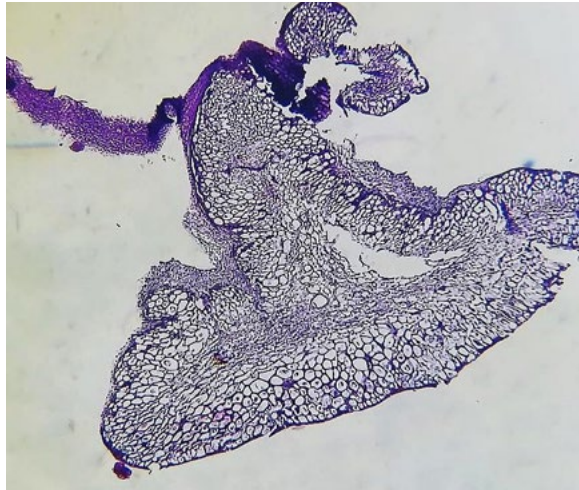


Nota técnica: Embrión globular de *C. papaya* L. obtenido en el tratamiento 2 (ANA 1.0 ppm + BAP 1.0 ppm) a los 88 días de cultivo. Corte transversal, tinción con hematoxilina, 400X. Fuente: Ruiz Baca, 2019.

En el tratamiento 3, con ANA 0.5 ppm y BAP 5.0 ppm, también se identificaron embriones globulares a los 88 días de cultivo, como se aprecia en la Figura 8. La presencia de estas estructuras en tratamientos con diferentes concentraciones sugiere que existe un rango de combina-

ciones hormonales capaz de inducir la embriogénesis, aunque la eficiencia puede variar según la relación entre auxinas y citocininas.

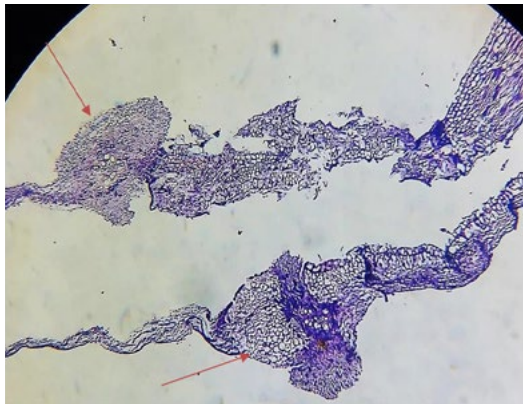
Figura 8. La esfera prometedora (Fórmula 3).



Nota técnica: Embrión globular de *C. papaya* L. obtenido en el tratamiento 3 (ANA 0.5 ppm + BAP 5.0 ppm) a los 88 días de cultivo. Corte transversal, tinción con hematoxilina, 400X. Fuente: Ruiz Baca, 2019.

El tratamiento 4, con ANA 1.0 ppm y BAP 5.0 ppm, mostró igualmente la presencia de embriones globulares a los 85 días de cultivo, como se documenta en la Figura 9. La aparición de embriones en los tratamientos 2, 3 y 4 confirma que la presencia simultánea de auxina y citocinina en proporciones adecuadas es un factor determinante para la inducción y desarrollo de embriones somáticos en *Carica papaya* L.

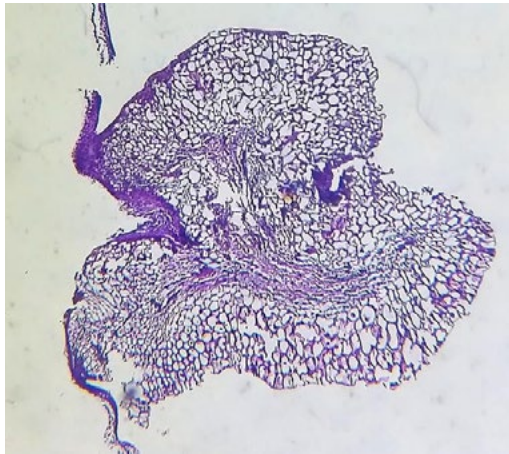
Figura 9. La esfera prometedora (Fórmula 4).



Nota técnica: Embrión globular de *C. papaya* L. obtenido en el tratamiento 4 (ANA 1.0 ppm + BAP 5.0 ppm) a los 85 días de cultivo. Corte transversal, tinción con hematoxilina, 400x. Fuente: Ruiz Baca, 2019.

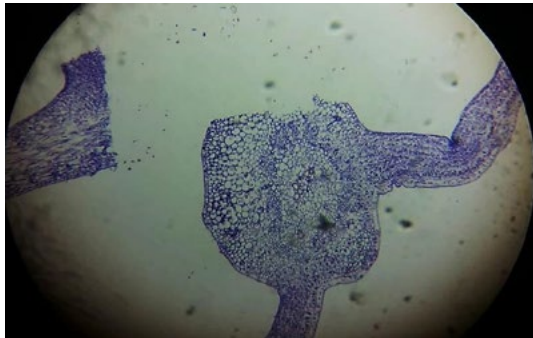
Por el contrario, los tratamientos 5 y 6, en los cuales se suprimió completamente el ANA, no presentaron células meristemáticas ni estructuras embriónicas. En el tratamiento 5, con ANA 0.0 ppm y BAP 1.0 ppm, los cortes histológicos a los 85 días mostraron tejidos parenquimáticos desorganizados sin evidencia de meristemoides o embriones, como se observa en la Figura 10. De manera similar, el tratamiento 6, con ANA 0.0 ppm y BAP 5.0 ppm, tampoco mostró células meristemáticas, como se aprecia en la Figura 11. Estos resultados indican que la presencia de una auxina, en este caso ANA, es necesaria para la inducción de la ruta embriónica en este sistema experimental.

Figura 10. El silencio del tejido (Fórmula 5).



Nota técnica: Ausencia de células meristemáticas en el tratamiento 5 (ANA 0.0 ppm + BAP 1.0 ppm) a los 85 días de cultivo. Corte transversal, tinción con hematoxilina, 400x. Fuente: Ruiz Baca, 2019.

Figura 11. El silencio del tejido (Fórmula 6).

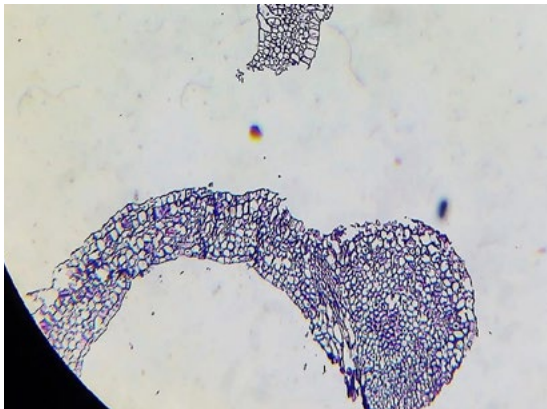


Nota técnica: Ausencia de células meristemáticas en el tratamiento 6 (ANA 0.0 ppm + BAP 5.0 ppm) a los 85 días de cultivo. Corte transversal, tinción con hematoxilina, 400x. Fuente: Ruiz Baca, 2019.

En los tratamientos 7 y 8, en los cuales se suprimió el BAP manteniendo diferentes concentraciones de ANA, se observó la presencia de

células meristemáticas, aunque no se identificaron embriones somáticos plenamente formados. En el tratamiento 7, con ANA 0.5 ppm y BAP 0.0 ppm, se encontraron células meristemáticas a los 85 días de cultivo, como se muestra en la Figura 12. De manera similar, el tratamiento 8, con ANA 1.0 ppm y BAP 0.0 ppm, también mostró células meristemáticas en los cortes histológicos a los 85 días, como se aprecia en la Figura 13. Estos hallazgos sugieren que la auxina por sí sola puede inducir la dediferenciación celular y la formación de meristemoides, pero la presencia de citocinina parece ser necesaria para la progresión hacia la formación de embriones somáticos completos.

Figura 12. Señales de vida (Fórmula 7).



Nota técnica: Presencia de células meristemáticas en el tratamiento 7 (ANA 0.0 ppm + BAP 5.0 ppm) a los 85 días de cultivo. Corte transversal, tinción con hematoxilina, 400x. Fuente: Ruiz Baca, 2019.

Figura 13. Señales de vida (Fórmula 8).



Nota técnica: Presencia de células meristemáticas en el tratamiento 8 (ANA 1.0 ppm + BAP 0.0 ppm) a los 85 días de cultivo. Corte transversal, tinción con hematoxilina, 400x. Fuente: Ruiz Baca, 2019.

### **Evaluación cuantitativa de la embriogénesis somática**

La evaluación cuantitativa de la presencia de embriones somáticos en los diferentes tratamientos permitió determinar la eficiencia de cada combinación hormonal para inducir la ruta embriogénica. Los callos sometidos a los diferentes tratamientos presentaron formación de células embrionarias en diversos grados, siendo el tratamiento 1 el que mostró el mayor porcentaje de formación de embriones, con un 75% de los callos evaluados presentando estructuras embrionarias. Los tratamientos 2, 3, 5, 6 y 8 presentaron un 44% de formación embrionaria, mientras que los tratamientos 4 y 7 mostraron un 33% de formación. Es importante destacar que, salvo el tratamiento 1, todos los demás tratamientos indujeron cambios histológicos evidentes, es decir, desdiferenciación de los

tejidos hacia la ruta embriogénica, lo que se indica con un signo positivo en la tabla correspondiente. Estos resultados, sintetizados en la Tabla 2, demuestran que la combinación de reguladores de crecimiento tiene un efecto determinante sobre la inducción de la embriogénesis somática en hojas de *Carica papaya* L., siendo la presencia de una auxina en combinación con una citocinina en proporciones adecuadas un factor clave para la expresión de la competencia embriogénica.

Tabla 2. Presencia de embriones somáticos según concentraciones de ANA y BAP por tratamiento

TRATAMIENTO	Nº DE MUESTRAS	Nº DE UNIDADES EXPERIMENTALES (CALLOS)	%	EMBRIONES
T1	8	6	75	-
T2	9	5	56	+
T3	9	4	44	+
T4	9	3	33	+
T5	8	4	44	+
T6	8	4	44	+
T7	10	3	33	+
T8	9	4	44	+
TOTAL	70	33		

Fuente: Ruiz Baca, 2019.

Salvo el tratamiento 1, todos los demás tratamientos indujeron cambios histológicos, o sea dediferenciación de los tejidos, hacia una nueva ruta, la embriogénica (+).



**Capítulo**

# 3

*ANÁLISIS DE LOS FACTORES DETERMINANTES EN LA  
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE CARICA PAPAYA L*

## **La interacción entre fitoreguladores y tejidos juveniles como base de la competencia embriogénica**

El análisis morfológico y anatómico de los procesos de embriogénesis somática inducidos a partir de hojas jóvenes de *Carica papaya* L. permite establecer una correlación directa entre los eventos morfológicos observados y las condiciones experimentales implementadas, particularmente en lo que respecta a la selección del material vegetal y la composición hormonal del medio de cultivo. Los hallazgos de esta investigación coinciden con lo señalado por Tisserat et al. (1979), quienes establecieron que la inducción exitosa de embriones somáticos en plantas superiores depende fundamentalmente de dos factores críticos: la presencia de fitoreguladores en concentraciones y combinaciones adecuadas, y el empleo de explantes provenientes de tejidos jóvenes, caracterizados por mantener un alto grado de competencia celular. Este último aspecto resulta particularmente relevante, ya que las células de tejidos juveniles conservan una mayor capacidad de respuesta a los estímulos externos, facilitando la desdiferenciación y la posterior rediferenciación hacia la vía embriogénica. La totipotencia celular, entendida como la capacidad inherente de una célula somática para regenerar una planta completa bajo condiciones de cultivo apropiadas, constituye el fundamento teórico que sustenta estos procesos, permitiendo que tejidos aparentemente diferenciados recuperen su capacidad de desarrollo embrionario cuando se someten a los estímulos hormonales adecuados (Tisserat et al., 1979). Este principio ha sido ampliamente demostrado en numerosas especies vegetales, desde modelos experimentales como la zanahoria (*Daucus carota* L.) hasta cultivos de importancia económica como el café, el arroz y diversas especies frutales, donde la selección cuidadosa de explantes juveniles ha resultado determinante para el éxito de los protocolos de regeneración *in vitro*.

Las características morfológicas de los callos obtenidos en los diferentes tratamientos, documentadas en las Figuras 2, 3, 4 y 5, revelan una variabilidad significativa en cuanto a forma, coloración y textura, aspectos que han sido ampliamente reconocidos en la literatura especializada como indicadores de la calidad embriogénica de los tejidos cultivados. Mauren y Fitch (1993) señalaron que la observación macroscópica de los callos constituye una herramienta diagnóstica de gran utilidad para discriminar entre aquellos tejidos con potencial embriogénico y aquellos que carecen de esta capacidad. En el presente estudio, los callos de coloración amarillenta, textura friable y morfología nodular, observados predominantemente en los tratamientos que combinaban auxinas y citocininas, mostraron una mayor tendencia a la formación de embriones somáticos, mientras que los callos de aspecto acuoso o pardusco presentaron escasa o nula capacidad embriogénica. Esta relación entre morfología del callo y competencia embriogénica ha sido documentada en numerosas especies, donde la compactación celular, la presencia de células pequeñas con núcleos prominentes y la acumulación de reservas almidonadas se asocian positivamente con la expresión de la ruta embriogénica. Por ejemplo, en estudios realizados con *Coffea arabica*, se ha demostrado que los callos embriogénicos se caracterizan por su color amarillo intenso y su estructura granular, mientras que los callos no embriogénicos presentan una coloración parda y una textura acuosa o mucilaginosa, hallazgos que guardan similitud con las observaciones realizadas en el presente trabajo.

El papel de los fitoreguladores en la modulación del ciclo celular y la determinación del destino morfogénico constituye un aspecto central en la comprensión de los procesos observados. Soni et al. (1995), demostraron que las auxinas y las citocininas actúan de manera coordinada sobre la dinámica del ciclo celular, regulando la transición entre las diferentes fases y promoviendo tanto la proliferación celular como la adquisición de competencia para la diferenciación. En el presente estu-

dio, la inclusión de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) durante la fase inicial de inducción de callos resultó determinante para la desdiferenciación de los tejidos foliares, estableciendo las bases para la posterior formación de embriones somáticos. Esta observación se alinea con los hallazgos reportados por Schuabb et al. (2013), quienes demostraron que la combinación de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 20 mM de 2,4-D produce las tasas más altas de inducción de callos y los mayores diámetros de estas estructuras, asociándose además con un mayor potencial para la formación de embriones somáticos. La eficacia del 2,4-D como inductor de la embriogénesis somática ha sido atribuida a su capacidad para modular la expresión de genes involucrados en la reprogramación celular y la activación de vías de desarrollo embrionario, estableciendo las condiciones necesarias para que las células adquieran la competencia requerida para la formación de embriones. Investigaciones recientes en especies como *Theobroma cacao* y *Musa* spp. han confirmado que la exposición inicial a concentraciones relativamente altas de 2,4-D es un requisito indispensable para la inducción de callos embriogénicos, debiendo luego ser reducida o eliminada para permitir la diferenciación embrionaria, un patrón que se corresponde con la estrategia metodológica implementada en el presente estudio.

### **Evidencias histológicas de la reprogramación celular hacia la ruta embriogénica**

Los análisis histológicos realizados sobre los callos de *Carica papaya* L. proporcionaron evidencias concluyentes de la ocurrencia de embriogénesis somática en los tejidos cultivados, confirmando la efectividad de los tratamientos hormonales implementados para inducir la reprogramación del desarrollo. La presencia de estructuras embriogénicas en los cortes histológicos, caracterizadas por la formación de célu-

las pequeñas con citoplasma denso, núcleos prominentes y alta relación núcleo-citoplasma, constituye un marcador inequívoco de la activación de la ruta embriogénica. Estos hallazgos resultan consistentes con lo reportado por Hutchinson et al. (1997), en estudios realizados con *Zea mays*, donde la aparición de embriones somáticos en callos tratados con BAP fue documentada mediante análisis histológicos detallados, demostrando la capacidad de esta citocinina para inducir la formación de estructuras embrionarias en tejidos que previamente habían sido desdiferenciados en presencia de auxinas. La similitud entre los hallazgos obtenidos en gramíneas como el maíz y los observados en la presente investigación sugiere que los mecanismos subyacentes a la embriogénesis somática presentan un alto grado de conservación entre grupos taxonómicos distantes, lo que refuerza la validez de los resultados obtenidos y su aplicabilidad en el contexto del mejoramiento genético de *Carica papaya* L.

La dinámica temporal de los eventos morfogénicos observados permite establecer una secuencia de transformaciones celulares que culminan con la formación de embriones somáticos maduros. Durante las etapas iniciales del proceso, las células del explante foliar experimentan un proceso de desdiferenciación caracterizado por la pérdida de las características estructurales propias de las células mesofílicas y la adquisición de un fenotipo meristemático, con divisiones celulares activas y formación de agregados celulares compactos. Este fenómeno ha sido descrito en detalle por diversos autores, quienes señalan que las células del mesófilo, originalmente especializadas en fotosíntesis, sufren una profunda reorganización de su citoarquitectura, incluyendo la fragmentación de los cloroplastos, la redistribución de los orgánulos y la reactivación del ciclo celular. Posteriormente, bajo el estímulo de las combinaciones hormonales específicas, se inicia la organización de estos agregados en estructuras embrionarias polares, que atraviesan las etapas típicas del desarrollo embrionario: globular, corazón, torpedo y cotiledonar. La etapa globular, caracterizada por la formación de una masa

esférica de células pequeñas con paredes delgadas, constituye el primer indicio visible de la organización embrionaria, seguida por la etapa corazón, donde se inicia la diferenciación de los primordios cotiledonares y la adquisición de la polaridad bipolar que distingue a los embriones somáticos funcionales.

La explicación para la ocurrencia de estos eventos se relaciona directamente con el perfil de consumo de los reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo. Las citocininas, al ser metabolizadas más lentamente que las auxinas, pueden ejercer su efecto promotor de la diferenciación una vez que las auxinas han sido consumidas o degradadas, favoreciendo así la transición desde la proliferación celular hacia la organización embrionaria y la formación de brotes (Hutchinson et al., 1997). Este mecanismo ha sido confirmado mediante estudios de seguimiento de la concentración de reguladores en el medio de cultivo a lo largo del tiempo, los cuales han demostrado que la concentración de 2,4-D disminuye drásticamente durante las primeras semanas de cultivo, mientras que las citocininas como el BAP se mantienen en niveles detectables por periodos más prolongados. Durante la transición de la etapa globular a la etapa torpedo, se establece la simetría bilateral característica de los embriones somáticos, proceso que implica el cese del crecimiento uniforme y la iniciación de los primordios cotiledonares, fenómeno observable en los cortes histológicos realizados en las diferentes etapas del cultivo. Este proceso de adquisición de simetría bilateral es particularmente relevante, ya que embriones que no logran completar esta transición presentan anomalías morfológicas que comprometen su capacidad de germinación y conversión en plántulas funcionales.

El análisis comparativo de los diferentes tratamientos permite establecer relaciones significativas entre la composición hormonal del medio y la eficiencia en la inducción de embriones somáticos. En la Figura 6, correspondiente al tratamiento 1, se observan células meristemáticas

normales sin evidencia de diferenciación hacia estructuras embrionarias, lo que sugiere que esta combinación hormonal no resultó efectiva para inducir la formación de embriones somáticos en *Carica papaya* L. Esta ausencia de diferenciación podría explicarse por una relación auxina-citocinina que, si bien es adecuada para mantener la proliferación celular y la competencia meristemática, no proporciona las señales necesarias para desencadenar la organización embrionaria. En contraste, en las Figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 se observan claramente células meristemáticas de diferentes tamaños organizadas en agregados que evidencian la formación de embriones somáticos en distintos estadios de desarrollo. Estas estructuras, caracterizadas por su polaridad, la presencia de una protodermis incipiente y la organización de los tejidos fundamentales, confirman que los tratamientos correspondientes lograron inducir la reprogramación del desarrollo hacia la vía embriogénica. La heterogeneidad en el tamaño y grado de organización de las células meristemáticas observadas refleja la naturaleza asincrónica del proceso embriogénico, fenómeno ampliamente documentado en cultivos *in vitro*, donde diferentes células o agregados celulares pueden encontrarse en distintos estadios de desarrollo al momento de la fijación y el análisis histológico. Esta asincronía representa un desafío técnico para la optimización de los protocolos de micropropagación, ya que dificulta la sincronización de los procesos de maduración y germinación embrionaria.

### **Implicaciones de los hallazgos para la micropropagación y el mejoramiento genético**

La efectividad de los tratamientos hormonales en la inducción de embriones somáticos puede ser atribuida a la capacidad de las auxinas y citocininas para modular la expresión de genes involucrados en la determinación del destino celular y la organización de los patrones de de-

sarrollo. Estudios realizados en diversas especies han demostrado que la combinación de una auxina como el ANA o el 2,4-D con una citocinina como el BAP activa vías de señalización que promueven la formación de centros organizadores y el establecimiento de ejes de polaridad, procesos fundamentales para la formación de embriones somáticos con estructura normal y capacidad de germinación. En particular, se ha demostrado que la activación de los genes *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) y *BBM* (*Baby Boom*) constituye un evento temprano en la adquisición de competencia embriogénica, siendo su expresión inducida por la exposición a auxinas sintéticas como el 2,4-D. La posterior activación de genes de tipo *LEC* (*Leafy Cotyledon*) por acción de las citocininas permite la progresión hacia estadios avanzados del desarrollo embrionario, incluyendo la acumulación de reservas y la adquisición de tolerancia a la desecación.

Los hallazgos de la presente investigación contribuyen a consolidar el conocimiento sobre los requerimientos hormonales para la embriogénesis somática en *Carica papaya* L., proporcionando evidencia experimental sobre la importancia de la selección adecuada de combinaciones de reguladores de crecimiento para el éxito de los procesos de micropropagación y mejoramiento genético de esta especie de relevancia económica. La papaya, siendo una de las frutas tropicales de mayor consumo a nivel mundial, enfrenta desafíos significativos relacionados con la propagación de variedades superiores, la conservación de germoplasma y el mejoramiento para resistencia a enfermedades como el virus de la mancha anillada (PRSV). La disponibilidad de protocolos eficientes de embriogénesis somática, como el desarrollado en este estudio, abre la posibilidad de implementar estrategias de propagación clonal masiva que permitan la multiplicación rápida y uniforme de genotipos élite, así como la aplicación de técnicas de ingeniería genética para la introducción de genes de resistencia. Además, la posibilidad de encapsular embriones somáticos para producir semillas artificiales representa una

alternativa prometedora para la conservación de germoplasma y el intercambio de material vegetal entre diferentes regiones productoras, reduciendo los riesgos fitosanitarios asociados al movimiento de plantas completas.

Los resultados obtenidos también aportan información relevante sobre la morfología y anatomía de los callos embriogénicos en papaya, estableciendo criterios visuales que pueden ser utilizados por otros investigadores para la selección temprana de tejidos con potencial embriogénico, optimizando así los recursos y el tiempo dedicado al establecimiento de cultivos. La correlación observada entre la morfología de los callos y su capacidad para formar embriones somáticos constituye una herramienta práctica de gran utilidad en el ámbito de la biotecnología vegetal, permitiendo la identificación y selección de los tejidos más competentes sin necesidad de realizar análisis histológicos complejos en cada etapa del proceso. Esta simplificación metodológica resulta particularmente valiosa en contextos donde los recursos para equipamiento especializado son limitados, facilitando la transferencia tecnológica y la adopción de estas técnicas por parte de laboratorios de producción de material vegetal en países en desarrollo, donde la papaya constituye un cultivo de importancia estratégica para la seguridad alimentaria y la generación de ingresos en comunidades rurales.



## **Capítulo**

# **4**

*CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS PARA LA  
MICROPROPAGACIÓN DE CARICA PAPAYA L*

## Hallazgos fundamentales en la inducción de embriogénesis somática

A partir del desarrollo experimental llevado a cabo en la presente investigación, se logró establecer un protocolo eficaz para la inducción de embriones somáticos utilizando hojas jóvenes de *Carica papaya* L. como material de partida, confirmando así la viabilidad de esta vía de regeneración para la propagación clonal de la especie. Este resultado resulta particularmente significativo si se considera que la embriogénesis somática representa una de las estrategias más promisorias para la multiplicación masiva de genotipos élite, permitiendo la obtención de un elevado número de plantas en un tiempo reducido y con una alta uniformidad genética. La capacidad de inducir embriones somáticos a partir de tejido foliar juvenil constituye un avance importante, ya que las hojas constituyen una fuente de explante fácilmente disponible, abundante y cuyo manejo no compromete la integridad de las plantas donantes, a diferencia de otros tejidos como los ápices meristemáticos o los embriones cigóticos, cuya extracción puede resultar más invasiva o limitada por la disponibilidad estacional. La selección de hojas jóvenes como explante inicial responde además a la evidencia acumulada en la literatura especializada, que indica que los tejidos en etapas tempranas de desarrollo conservan una mayor competencia morfogénica debido a que sus células no han completado su proceso de diferenciación terminal, manteniendo así la capacidad de responder a los estímulos hormonales con una desdiferenciación eficiente y una posterior rediferenciación hacia la ruta embriogénica. Este principio, fundamentado en el concepto de totipotencia celular, ha sido ampliamente demostrado en especies tan diversas como la zanahoria, el café, el arroz y diversas frutales tropicales, consolidándose como un pilar teórico y práctico del cultivo de tejidos vegetales. En el caso particular de la papaya, la confirmación experimental de esta capacidad regenerativa a partir de hojas jóvenes abre posibilidades

concretas para la conservación de germoplasma de variedades nativas, muchas de las cuales poseen características organolépticas y nutricionales sobresalientes pero se encuentran en riesgo de erosión genética debido a la presión de los monocultivos comerciales. La implementación de bancos de germoplasma *in vitro* basados en embriones somáticos encapsulados permitiría preservar por largos periodos la diversidad genética de esta especie, facilitando al mismo tiempo el intercambio seguro de material vegetal entre diferentes regiones productoras sin los riesgos fitosanitarios asociados al movimiento de plantas completas o semillas convencionales.

En cuanto a las condiciones hormonales requeridas para la inducción de callos, los resultados obtenidos permiten establecer que la concentración de 0.5 ppm de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) resultó ser la más efectiva para promover la proliferación de callos, alcanzando un 75% de inducción a los 16 días de cultivo. Esta respuesta favorable al 2,4-D confirma lo ampliamente documentado en la literatura sobre el papel central de esta auxina sintética en la desdiferenciación celular y la adquisición de competencia embriogénica en numerosas especies vegetales. El 2,4-D, al ser una auxina de tipo fenoxiacético con una alta estabilidad y una prolongada persistencia en el medio de cultivo, induce una serie de transformaciones a nivel molecular que incluyen la modificación del patrón de expresión génica, la reactivación del ciclo celular y la reorganización de la arquitectura celular hacia un estado de menor especialización funcional. La alta eficiencia de inducción observada con esta concentración (75%) supera los valores reportados en algunos estudios previos para esta especie, lo que sugiere que las condiciones experimentales implementadas, incluyendo la calidad del material vegetal, la composición del medio basal y las condiciones de incubación, resultaron particularmente adecuadas para potenciar la respuesta morfogénica. Este hallazgo tiene importantes implicaciones prácticas, ya que permite establecer un punto de partida confiable para la producción masiva

de callos embriogénicos, los cuales constituyen el sustrato a partir del cual se desarrollarán los embriones somáticos en las etapas posteriores del protocolo. Es importante destacar que la eficiencia en la inducción de callos no solo depende de la concentración hormonal, sino también de factores como la edad fisiológica de las plantas donantes, la posición del explante en la hoja, y la orientación de este en el medio de cultivo, aspectos que fueron cuidadosamente controlados en este estudio y que contribuyeron a la reproducibilidad de los resultados. La inducción exitosa de callos en el 75% de los explantes tratados con 0.5 ppm de 2,4-D representa un parámetro de referencia valioso para futuras investigaciones, permitiendo establecer comparaciones con otros genotipos de papaya y con otras estrategias de inducción que involucren diferentes auxinas o combinaciones hormonales. La rapidez con la que se obtuvo esta respuesta, apenas 16 días después del establecimiento de los cultivos, constituye además una ventaja operativa significativa, ya que reduce los tiempos de exposición de los tejidos a condiciones de cultivo *in vitro* y, con ello, el riesgo de contaminación y la aparición de variación somaclonal.

Con respecto a la fase de diferenciación embrionaria, los resultados demostraron que la concentración de 1 ppm de 6-bencilaminopurina (BAP) indujo la mayor tasa de formación de embriones somáticos, alcanzando un 55.6% a los 45 días de cultivo a partir de hojas jóvenes de *Carica papaya* L. Esta respuesta favorable al BAP, una citocinina sintética ampliamente utilizada en cultivo de tejidos vegetales, confirma la importancia de las citocininas en las etapas finales del proceso embriogénico, una vez que las células han adquirido la competencia necesaria para organizarse en estructuras polares con capacidad de desarrollo autónomo. El BAP actúa promoviendo la división celular y modulando la expresión de genes involucrados en la determinación del destino celular, favoreciendo la transición desde el estado indiferenciado del callo hacia la formación de meristemoides y la posterior organización embrionaria.

La concentración óptima de 1 ppm identificada en este estudio coincide con los valores reportados en investigaciones previas para otras variedades de papaya, lo que sugiere que este rango de concentración podría ser considerado como un punto de referencia para el desarrollo de protocolos de embriogénesis somática en la especie. El tiempo de 45 días requerido para la aparición de los embriones representa un período razonable dentro de los estándares de la micropropagación *in vitro*, aunque la optimización de las condiciones de cultivo podría permitir acortar este lapso en futuras investigaciones. La tasa de formación embrionaria del 55.6%, si bien es significativa, deja un margen de mejora considerable, lo que sugiere que la implementación de estrategias complementarias como el fraccionamiento de los callos, la selección visual de los agregados más competentes, o la incorporación de compuestos como el polietilenglicol para la maduración de embriones, podría contribuir a incrementar la eficiencia global del proceso. Los análisis histológicos realizados confirmaron la naturaleza embriogénica de las estructuras formadas, descartando la posibilidad de que se tratara de organogénesis adventicia u otros procesos morfogénicos no deseados. La presencia de embriones en estadios globular, corazón y torpedo, observada en los cortes transversales teñidos con hematoxilina, proporciona evidencia concluyente de que el protocolo implementado logra inducir una verdadera embriogénesis somática, con la organización bipolar característica de los embriones y la capacidad potencial de desarrollar una plántula completa.

### **Lineamientos estratégicos para la optimización del protocolo**

A partir de los hallazgos obtenidos y de las limitaciones identificadas durante el desarrollo experimental, se formulan una serie de recomendaciones orientadas a la optimización del protocolo de embriogéne-

sis somática en *Carica papaya* L., con miras a su aplicación en programas de mejoramiento genético y producción comercial de material vegetal de alta calidad. En primer lugar, se recomienda explorar el uso de otros tipos de explante como fuente de tejido para la inducción de callos embriogénicos, considerando que la búsqueda de eficiencia en la propagación masiva implica necesariamente la reducción de los tiempos de cultivo y los costos asociados. Si bien las hojas jóvenes demostraron ser un explante adecuado, con un período de aproximadamente tres meses desde el establecimiento hasta la emergencia de los embriones somáticos, la utilización de tejidos con una mayor competencia embriogénica intrínseca podría permitir acortar significativamente este lapso. Entre los explantes alternativos que han mostrado resultados promisorios en otras especies y que podrían ser evaluados en papaya se encuentran los embriones cigóticos inmaduros, los ápices caulinares, los segmentos de hipocótilo provenientes de plántulas germinadas *in vitro*, y los tejidos provenientes de flores inmaduras como el ovario o los pétalos en desarrollo. Cada uno de estos tejidos presenta características particulares en cuanto a su grado de diferenciación, su contenido de reservas y su respuesta a los reguladores de crecimiento, por lo que la evaluación sistemática de diferentes fuentes de explante constituye una estrategia válida para identificar el material de partida que ofrezca la mejor relación entre tiempo de respuesta, eficiencia de inducción y facilidad de manejo. La experiencia en especies como el cacao, el banano y la palma aceitera ha demostrado que la selección del explante adecuado puede reducir los tiempos de regeneración en varias semanas, lo que se traduce directamente en una disminución de los costos de producción y en una mayor capacidad de respuesta ante las demandas del sector productivo. En el caso particular de la papaya, los embriones cigóticos inmaduros, extraídos de frutos en estados tempranos de desarrollo, podrían constituir una alternativa particularmente interesante, ya que estos tejidos se encuentran naturalmente programados para seguir la ruta embriogé-

nica y podrían requerir menores estímulos externos para expresar esta capacidad. La principal limitación de este tipo de explante es su disponibilidad estacional y la necesidad de contar con árboles donantes en fructificación, lo que podría restringir su aplicabilidad en programas de propagación continua a lo largo del año.

En segundo lugar, se recomienda ampliar el espectro de fitoreguladores evaluados, así como explorar combinaciones diferentes a las ensayadas en el presente estudio, con el objetivo de identificar aquellas que permitan acelerar la respuesta embriogénica y aumentar la frecuencia de formación de embriones. Si bien el 2,4-D y el BAP demostraron ser efectivos en sus respectivas fases del proceso, la literatura especializada reporta que otras auxinas como el ácido naftalenacético (ANA) o el ácido indolbutírico (AIB) pueden inducir respuestas cualitativamente diferentes en términos de la estructura y competencia de los callos formados. De manera similar, otras citocininas como la cinetina, la zeatina o el tiazurón (TDZ) han mostrado una mayor eficiencia en la inducción de embriones somáticos en determinadas especies, debido a su diferente afinidad por los receptores hormonales y a su distinta estabilidad en el medio de cultivo. La posibilidad de que la limitación en la velocidad de respuesta no esté determinada exclusivamente por el tipo de explante sino por la formulación hormonal abre un campo de investigación promisorio, que podría incluir no solo la variación en las concentraciones sino también la implementación de estrategias de pulsos hormonales, donde los tejidos son expuestos a altas concentraciones de auxinas por períodos breves antes de ser transferidos a medios con concentraciones reducidas o nulas de estos reguladores. Este tipo de aproximaciones ha demostrado ser efectiva en especies recalcitrantes, donde la exposición prolongada a auxinas puede resultar en la pérdida de la competencia embriogénica o en la formación de embriones anormales con baja capacidad de germinación. Adicionalmente, la incorporación de compuestos como el polietilenglicol, el ácido abscísico o la putrescina en las etapas

de maduración embrionaria podría contribuir a mejorar la calidad de los embriones y su capacidad de conversión en plántulas funcionales, aspectos que determinan en última instancia la aplicabilidad comercial del protocolo. La inclusión de polietilenglicol en el medio de cultivo, por ejemplo, aumenta la presión osmótica y simula las condiciones de estrés que ocurren durante la maduración de los embriones cigóticos, favoreciendo la acumulación de proteínas de reserva y la adquisición de tolerancia a la desecación. Esta estrategia ha sido implementada con éxito en especies como el pino, el café y la soya, logrando incrementos significativos en la tasa de conversión de embriones somáticos a plántulas.

Finalmente, se recomienda proceder con el afinamiento del protocolo ensayado, particularmente en lo que respecta a la optimización de las concentraciones de reguladores de crecimiento, explorando rangos más estrechos alrededor de los valores óptimos identificados. La respuesta de los tejidos vegetales a las fitohormonas no es lineal, y pequeñas variaciones en la concentración pueden tener efectos significativos sobre la eficiencia de la embriogénesis y la calidad de los embriones formados. Por esta razón, el establecimiento de protocolos robustos requiere generalmente de experimentos de optimización fina, donde se evalúen incrementos graduales en las concentraciones de los reguladores para identificar con precisión el punto en el que se maximiza la respuesta deseada sin inducir efectos adversos como la vitrificación, la formación de callos no embriogénicos o la aparición de variación somaclonal. Asimismo, el afinamiento del protocolo debería incluir la evaluación de otros factores que influyen en el éxito de la embriogénesis somática, como la calidad y la intensidad de la luz durante las diferentes fases del cultivo, la composición de la fuente de carbono (tipo y concentración de azúcar), el potencial osmótico del medio y las condiciones de temperatura. La integración de estas variables en un diseño experimental factorial permitiría establecer las condiciones óptimas para cada una de las etapas del proceso, desde la inducción de callos hasta la maduración y germinación

de los embriones somáticos, sentando las bases para la implementación de un sistema de micropropagación eficiente y económicamente viable para *Carica papaya* L., una especie de incuestionable relevancia para las economías tropicales y para la seguridad alimentaria de numerosas regiones del mundo. La transferencia de este tipo de tecnologías a los sistemas de producción locales, acompañada de programas de capacitación para técnicos y productores, podría contribuir significativamente al fortalecimiento de las cadenas de valor asociadas al cultivo de papaya, generando oportunidades de desarrollo rural sostenible y contribuyendo a la conservación de la diversidad genética de esta importante especie frutal. Además, la disponibilidad de un protocolo estandarizado de embriogénesis somática abre la posibilidad de implementar programas de mejoramiento genético asistido por marcadores, donde la selección de individuos con características superiores pueda ser seguida de una rápida multiplicación clonal para su evaluación en campo y eventual liberación comercial. En el contexto actual de cambio climático, donde se prevé un aumento en la frecuencia e intensidad de eventos extremos que afectan la producción agrícola, contar con herramientas biotecnológicas que permitan la rápida propagación de variedades resilientes se convierte en una prioridad estratégica para garantizar la sostenibilidad del sector frutícola. La embriogénesis somática en papaya, con el potencial de producir millones de plantas a partir de un pequeño fragmento de tejido, representa una respuesta concreta a este desafío, ofreciendo una solución tecnológica escalable y adaptable a las necesidades de los diferentes actores de la cadena productiva.

## **Referencias**

- Agúndez, D., Bautista, D., & González, J. (1999). *Factores que afectan la embriogénesis somática en plantas*. Editorial Agrícola Española.
- Agúndez, D., Cervera, M. T., Alba, N., Martínez, J. M., & Grau, J. M. (1999). Genetic identification of commercial clones of *Populus* based on isozymes and AFLPs. En S. Espinel, & E. Ritter, (eds.). *Proceedings of application of biotechnology to forest genetics: Biofor 99* (pp. 549–552). Vitoria-Gasteiz.
- Akbar, A., & Hakoomat, A. (2004). Effect of culture medium in potato. *Biotechnology*, 3, 187–193.
- Akbar, M., & Hakoomat, A. (2004). Totipotency and plant regeneration from cell cultures. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(5), 789–795. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2004.789.795>
- Arrieta-Espinoza, G. (1996). *Efecto del 2,4-D en la inducción de callos de tejido foliar y en la callogénesis a partir de tejido foliar de papaya adulta clonada in vitro* [Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica].
- Bhattacharya, J. B. (2002). *Tissue culture and transformation studies in Indian cultivars of papaya (Carica papaya L.)* [Tesis doctoral, Universidad de Pune].
- Bhattacharya, P. (2002). Somatic embryogenesis in woody plants. *Current Science*, 82(1), 44–50. <https://www.jstor.org/stable/24105968>
- Bhojwari, S. S., & Razdan, M. K. (1996). *Plant tissue culture: Theory and practice*. Elsevier.
- Cabrera-Ponce, J. L., López, L., & Herrera-Estrella, L. (1995). Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 14(7), 425–429. <https://doi.org/10.1007/BF00234045>
- Cabrera-Ponce, J. L., Vegas-García, A., & Herrera-Estrella, L. (1996). Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 32, 86–90. <https://doi.org/10.1007/BF02823119>

- Cai, Q., Guy, C. L., & Moore, G. A. (1999). Direct somatic embryogenesis in citrus. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 35(4), 283–287. <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0037-6>
- Cai, W., Gonsalves, C., Tennant, P., Fermin, G., Souza, M., Sarindu, N., Jan, F. J., Zhu, H. Y., & Gonsalves, D. (1999). A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 35, 61–69. <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0012-2>
- Carlota, F., Trabace, T., & Sunseri, F. (1997). High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledon way somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 16, 295–298. <https://doi.org/10.1007/s002990050227>
- Carlota, R., Naranjo, J., & Martínez, M. (1997). *Embriogénesis somática en frutales tropicales*. Editorial Universitaria.
- Fitch, M. M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., & Slightom, J. L. (2004). Micropropagation of papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell Reports*, 12(5), 245–249. <https://doi.org/10.1007/BF00237115>
- Fitch, M., Moore, P., & Leong, T. (2004). Progress in transgenic papaya research: Transformation for broader resistance among cultivars and micropropagating selected hybrid transgenic plants. *Biotecnología Vegetal*, 4(3), 153–158.
- Food and Agriculture Organization. (2006). *El cultivo de la papaya (Carica papaya)*.
- Food and Agriculture Organization. (2006). *FAO statistical yearbook 2006*. FAO.
- Haggman, H., Aronen, T., & Stomp, A. M. (1999). Somatic embryogenesis in conifers. *Forestry Sciences*, 54(3), 123–145. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1596-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1596-6_7)
- Haggman, H., Jokela, A., Krajinakova, J., Kauppi, A., Niemi, K., & Aronen, T. (1999). Somatic embryogenesis of Scots pine: Cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *Journal of Experimental Botany*, 50, 1769–1778. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.341.1769>

- Hutchinson, M. J., Senaratna, T., & Saxena, P. K. (1997). Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. induced by benzyladenine. *Plant Cell Reports*, 16(6), 416–420. <https://doi.org/10.1007/s002990050253>
- Hutchinson, M. J., Senaratna, T., Tsujita, J. M., & Saxena, P. K. (1997). Somatic embryogenesis in liquid cultures of a tetraploid *Alstroemeria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 293–297. <https://doi.org/10.1023/A:1005935801743>
- Jiménez Cruz, A. (1998). *La papaína: Propiedades y aplicaciones industriales*. Editorial Tecnológica.
- Jiménez Cruz, F. (1998). *Cómo cultivar la papaya “Maradol” en la Mixteca Poblana* (ITa No. 32). Instituto Tecnológico Agropecuario.
- Jiménez, V. M. (2001). Embriogénesis somática: Un modelo para el estudio de la morfogénesis vegetal. *Agronomía Costarricense*, 25(2), 107–119. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43625211>
- Jiménez, V. M. (2001). Review: Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(2), 196–223. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202001000200008>
- Mauren, M., & Fitch, M. M. (1993). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyls callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32, 205–212. <https://doi.org/10.1007/BF00029845>
- Mauren, M., & Fitch, M. M. (1993). Morphological indicators of embryogenic competence in papaya callus. *Plant Cell Reports*, 12(8), 456–460. <https://doi.org/10.1007/BF00234712>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Orellana, P. A. (1998). Propagación vía organogénesis. En *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología* (p. 151). Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Orellana, P. (1998). *Reguladores del crecimiento vegetal: Fundamentos y aplicaciones*. Editorial Agrícola.
- Parrott, W. A. (1993). Cell culture techniques: Cell-culture, in vitro selection and somaclonal variation. En *Biotechnology applications for banana and plantain improvement: Proceedings of a meeting held in San José, Costa Rica, 1992* (pp. 183–191). INIBAP.
- Parrott, W. A. (1993). Somatic embryogenesis in legumes. *Plant Tissue Culture Manual*, 4(1), 1–12. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2696-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2696-2_15)
- Parrott, W. A. (2002). La embriogénesis somática en las angiospermas. *VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal* (pp. 7–15). Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Parrott, W. A. (2002). Somatic embryogenesis: A tool for clonal propagation. *Plant Biotechnology*, 19(2), 85–92. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.19.85>
- Pérez-Bernal, J. L., García, E., & Rodríguez, M. (2007). Totipotencia celular y regeneración de plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(1), 45–53.
- Pérez-Bernal, M., Delgado, M., Hernández, C. A., & Armas, R. (2007). Evaluación morfológica de brotes regenerados de callos de arroz (variedad IA Cuba-28) resistentes a higromicina. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(11), 35–40.
- Pierik, R. L. M. (1990). *Cultivo in vitro de plantas superiores*. Editorial Mundi Prensa.
- Pierik, R. L. M. (1990). *Cultivo de tejidos vegetales*. Editorial Acribia.

- Pires de Almeida, E., Pedroso, R., & Loyola, J. L. (2000). Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35(10), 2017–2024. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2000001000014>
- Pires de Almeida, W., Rodríguez, A. P. M., & Mendes, B. M. J. (2000). Somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L.) from leaf discs. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 12(2), 98–105. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202000000200003>
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., & Gutiérrez-Mora, A. (2007). Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Plant Cell Reports*, 26(7), 963–970. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0322-4>
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A., & Rodríguez-Garay, B. (2007). Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43, 569–575. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9087-9>
- Posada-Pérez, L., Gómez-Kosky, R., & Reyes, M. (2007). Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. var. Maradol. *Biotecnología Vegetal*, 7(3), 145–152. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=71270303>
- Posada-Pérez, L., Kosky, R. G., & Reyes, M. (2007). Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. var. Maradol rojo. *Biotecnología Vegetal*, 7(3), 131–138.
- Rodríguez Rivera, A., Rodríguez Nodals, A., & Corrales, R. S. (1966). *La Frutabomba Maradol*. 1ra Conferencia Nacional de Fruticultores.
- Rodríguez Rivera, J., García, R., & Fernández, M. (1966). *El papayo: Cultivo e industrialización*. Editorial Agropecuaria.
- Ruiz Baca, J. (2019). *Inducción de embriones somáticos a partir de hojas de Carica papaya L. utilizando ácido naftalenacético y 6-bencil amino purina* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Trujillo]
- Salisbury, F. B., & Ross, C. W. (2000). *Fisiología vegetal*. International Thomson Editores.

- Salisbury, F. B., & Ross, C. W. (2000). *Fisiología de las plantas*. Thomson Editores Spain Paraninfo.
- Schuabb, A., Moura, E., Barroso, T., Santa, C., & Silveira, V. (2013). *Polyethilen glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN*.
- Schuabb, S. R., Paiva, L. V., & Santos, B. R. (2013). Effects of sucrose and 2,4-D on somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35(4), 467–473. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i4.16789>
- Slater, A., Scott, N., & Fowler, M. (2003). *Plant biotechnology: The genetic manipulation of plants*. Oxford University Press.
- Smith, C., & Wood, J. E. (1998). *Biología molecular y biotecnología*. Addison Wesley Longman.
- Smith, D. R., & Wood, A. (1998). Automation of somatic embryogenesis for commercial micropropagation. *Acta Horticulturae*, 461(1), 123–130. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.461.12>
- Soni, R., Carmichael, J. P., & Murray, J. A. H. (1995). Cell cycle regulation in plants. *Plant Molecular Biology*, 28(6), 1001–1012. <https://doi.org/10.1007/BF00032659>
- Soni, R., Carmichael, J. P., Shah, Z. H., & Murray, J. A. H. (1995). A family of cyclin-D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *The Plant Cell*, 7, 85–103. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.1.85>
- Tisserat, B., Esan, E. B., & Murashige, T. (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Horticultural Reviews*, 1(1), 1–78. <https://doi.org/10.1002/9781118060748.ch1>
- Velásquez, M., Peña, M., & González, J. (2006). Enraizamiento de brotes de *Carica papaya* L. en condiciones in vitro. *Agronomía Tropical*, 56(4), 521–529.

- Velásquez, S. R., Colmenares, J., Chirinos, M., Noguera, A., & Pérez, M. (2006). Embriogénesis somática en Samán. *Agronomía Tropical*, 56(4), 593–600.
- Villalobos, V. M., & Thorpe, T. A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodologías y resultados. En *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (pp. 128–141). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Villalobos, V. M., & Thorpe, T. A. (1991). Somatic embryogenesis in conifers. *Forestry Abstracts*, 52(4), 279–292.
- Yuan, J., Li, J., & Zhang, Z. (2005). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(2), 165–171. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-0690-5>
- Yuan, S., Yan, Y. C., & Lin, H. H. (2005). Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80, 157–161. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-0915-z>





Religación  
**Press**  
Ideas desde el Sur Global



ISBN: 978-9942-594-55-6

