

ARTÍCULO ORIGINAL

CALLOS EMBRIOGÉNICOS INDUCIDOS POR ÁCIDO NAFTALENACÉTICO Y 6-BENCILAMINO PURINA EN HOJAS DE *Carica papaya* L.

EMBRYOGENIC CALLI INDUCED BY NAPHTHALENEACETIC ACID AND 6-BENZYLAMINO PURINE IN LEAVES OF *Carica papaya* L.

Jesús Ruiz-Baca¹ & Julio Chico-Ruiz²

¹Facultad de Ciencias. Universidad Nacional del Santa-Chimbote, Perú. jerubaunt30@gmail.com

²Laboratorio de Cultivos Celulares. Universidad Nacional de Trujillo, Perú. jchico@unitru.edu.pe (autor para correspondencia)

RESUMEN

El papayo (*Carica papaya* L.) se desarrolla en todas las áreas tropicales del mundo y se consume principalmente como fruta fresca, en postre o ensalada. Con esta demanda es necesario masificar su siembra y producción y la micropropagación in vitro junto con la embriogénesis somática nos va a permitir obtener volúmenes de producción superiores en un corto tiempo. Previo a la obtención de embriones somáticos se debe conocer la capacidad de respuesta del explante, por ello el objetivo de este trabajo fue inducir callos embriogénicos en hojas de *C. papaya* utilizando ácido naftalenacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (BAP). Se utilizaron secciones de hojas jóvenes de un centímetro cuadrado aproximadamente, introducidas en medio de cultivo M & S y suplementado con ocho diferentes combinaciones de ANA y BAP. A los 80 días se evaluaron las características de los callos embriogénicos y los cambios que se producían en los tejidos mediante cortes histológicos. Los resultados mostraron que, en todas las combinaciones, excepto el tratamiento uno (1 BAP y 0.5 ANA), hubo inducción de callos embriogénicos con tejidos desarrollando a meristemoides. Se concluye que, la concentración que promovió la mayor inducción de callos embriogénicos fue la de 1 ppm de ANA y 1 ppm de BAP.

Palabras clave: *Carica papaya*, callos embriogénicos, ácido naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (BAP).

ABSTRACT

The papaya (*Carica papaya* L.) develops in all the tropical areas of the world and is consumed mainly as fresh fruit, in dessert or salad. With this demand, it is necessary to massify their sowing and production and in vitro micropropagation together with somatic embryogenesis will allow us to obtain higher production volumes in a shorter time. Therefore, the objective of this work was to induce somatic embryos in *C. papaya* leaves using naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzylaminopurine (BAP). Sections of young leaves of approximately one square centimeter, introduced in M & S culture medium and supplemented with eight different combinations of NAA and BAP were used. After 30 days, the characteristics of the embryogenic callus and the changes that were produced in the tissues were evaluated by histological sections. The results showed that in all combinations, except treatment one (1 BAP and 0.5 NAA), there was induction of embryogenic callus with tissues developing meristemoids. It is concluded that the concentration that promoted the highest induction of somatic embryogenesis was 1 ppm of NAA and 1 ppm of BAP.

Key words: *Carica papaya*, somatic embryogenesis, naphthaleneacetic acid (NAA), 6-benzylaminopurine (BAP).

Recibido: 18 de agosto de 2020. **Aceptado:** 21 de octubre de 2020. **Publicado online:** 30 de diciembre de 2020.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos y la regeneración de plantas constituyen etapas determinantes en las estrategias de propagación masiva y mejoramiento genético de especies y variedades de gran valor nutricional y comercial. Estas técnicas se basan en el principio de la 'totipotencia celular' por la cual se regeneran plantas a partir de células aisladas no diferenciadas, órganos u otros tejidos vegetales, y luego se desdiferencian, rejuvenecen y rediferencian nuevamente hasta formar una planta entera; lo cual sólo puede hacerse evidente en presencia de un medio de cultivo adecuado, en el que los reguladores de crecimiento son los principales agentes de estas transformaciones celulares (Leljak-Levanic, 2015; Slater *et al.*, 2003; Akbar & Hakoomat, 2004).

La embriogénesis somática se utiliza para la propagación masiva *in vitro* de muchas especies vegetales de interés económico, a partir de células vegetativas no gaméticas con la cual se mantenía la misma combinación genética que el de la planta fuente del explante (Guan *et al.*, 2016; Bhattacharya, 2002; Jiménez, 2001; Bhojwari & Razdan, 1996). Se pueden obtener embriones somáticos de muy diversas partes de la planta, los cuales pueden seguir dos vías, la directa o la indirecta. La forma directa implica la existencia de células somáticas predeterminadas a seguir la vía embriogénica y las células del explante primario se desarrollan para formar embriones. La forma indirecta implica la necesidad de una inducción para que las células sigan la vía embriogénica, tras pasar por una fase proliferativa (callo) y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis. (Feher *et al.*, 2003; Elhiti *et al.*, 2013).

El callo es una aglomeración de células con características de divisiones masivas, frecuentes, con crecimiento acelerado y superpuesto de las células, que macroscópicamente presenta una apariencia globosa. Este nuevo tejido aparece según el tipo de explante y la fuente exógena utilizada. Entonces para iniciar la obtención de embriones somáticos es necesario conocer este tipo de respuesta del explante (Ikeuchi *et al.*, 2013; Ikeuchi *et al.*, 2017). Si los callos son estudiados mediante la realización de cortes histológicos, se puede determinar la viabilidad de las células presentes en tejidos que conforman las zonas embriogénicas derivadas de los centros meristemáticos, el establecimiento del porcentaje de polaridad y división asimétrica y sobre todo la formación de embriones somáticos que posteriormente representarán una nueva planta, tomando muy en cuenta la similitud de estos con los patrones que se dan en la embriogénesis cigótica (Caranqui, 2011).

El papayo, en el Perú, es consumido masivamente como fruta y muy apreciada por su sabor y aroma. Sus zonas de cultivo están limitadas por el clima y especialmente por el ataque del virus PRSV y otras plagas. Esto nos permite insistir en la necesidad del mantenimiento de su capacidad genética y se puede lograr masivamente y en menos tiempo con la embriogénesis somática (Posada-Pérez *et al.*, 2007; Vázquez *et al.*, 2016) pero antes es necesario conocer la capacidad de respuesta del explante, en este caso de las hojas.

Trabajos relacionados al tema, son los de Schuabb *et al.* (2013) que trabajó con sacarosa y ácido 2, 4 – dicloroacético (2,4 - D) en la inducción de cultivos embriogénicos encontrando que la combinación de 30 g L⁻¹ sacarosa y 20 mM de 2, 4 – D presenta las tasas más altas de inducción y los mayores diámetros de callos. Además, esta combinación fue asociada con el mayor potencial para formar embriones somáticos. Según Arrieta (1996) el utilizar 2,4-D a 1 ppm. y cinetinas da el mejor resultado en el proceso de embriogénesis somática a partir de explantes de hoja en papaya, pero Pires de Almeida *et al.* (2000) reportó buenos resultados con 2,4-D a 10 ppm y Posada- Pérez *et al.* (2007) utilizando 5 mg L⁻¹ de 2,4-D. Koehler *et al.* (2013) utilizando hojas de papayo encontró alta frecuencia de callos embriogénico friable, de color amarillo, en medio de cultivo con 2,4-D.

Conociendo la importancia de la inducción del callo en el explante y la necesidad de

conocer la respuesta del mismo a los reguladores del crecimiento se propuso inducir callos embriogénicos utilizando ácido naftalenacético y 6-bencilamino purina en hojas de *Carica papaya* L.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se hicieron germinar semillas de *C. papaya* var. criolla, obteniéndose 200 plántulas (Fig. 1) las cuales fueron la fuente 400 explantes de 30 días de edad. El medio basal que se utilizó fue el de Murashige & Skoog (MS), el cual estuvo a la mitad de su concentración y fue suplementado con sacarosa (3%), fitagel (0.3%) y reguladores de crecimiento (ANA y BAP).

El pH se ajustó a 5.6 a 6.5 con NaOH 1N o HCL 1N para su regulación. Se inició la experiencia con los explantes en 2,4-D a 0.5 ppm, para inducir callos; la posición del explante fue el envés en contacto con el medio de cultivo. El material introducido fue acondicionado en oscuridad por 10 días (Fig. 1), para posteriormente ser trasladados a las diferentes combinaciones ANA-BAP (Tabla 1) y finalmente dejados en la sala de incubación para que desarrolle el callo embriogénico.

Se evaluaron los explantes a los 85 días anotando color y forma de callos, número de callos por explante y el análisis histológico de los mismos. Los callos seleccionados fueron fijados en solución AFA (1:1:18, formaldehído, ácido acético glacial, alcohol al 70%) por una semana, luego deshidratado con una serie de grados alcohólicos, clarificados con xileno, embebidos en parafina y luego cortadas en secciones de 8-10 um utilizando un micrótopo rotatorio (LEIC rm2245). Las secciones fueron coloreadas con hematoxilina (Da Silva *et al.*, 2015). La captura de imágenes fue establecida utilizando un microscopio de luz

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

TRATAMIENTO	REGULADORES DEL CRECIMIENTO (ppm)	
	ANA	BAP
T1	1	0.5
T2	1	1
T3	5	0.5
T4	5	1
T5	1	0
T6	5	0
T7	0	0.5
T8	0	1



Fig. 1. Fuente de explantes y estos introducidos en 2,4-D (1 ppm) por 10 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

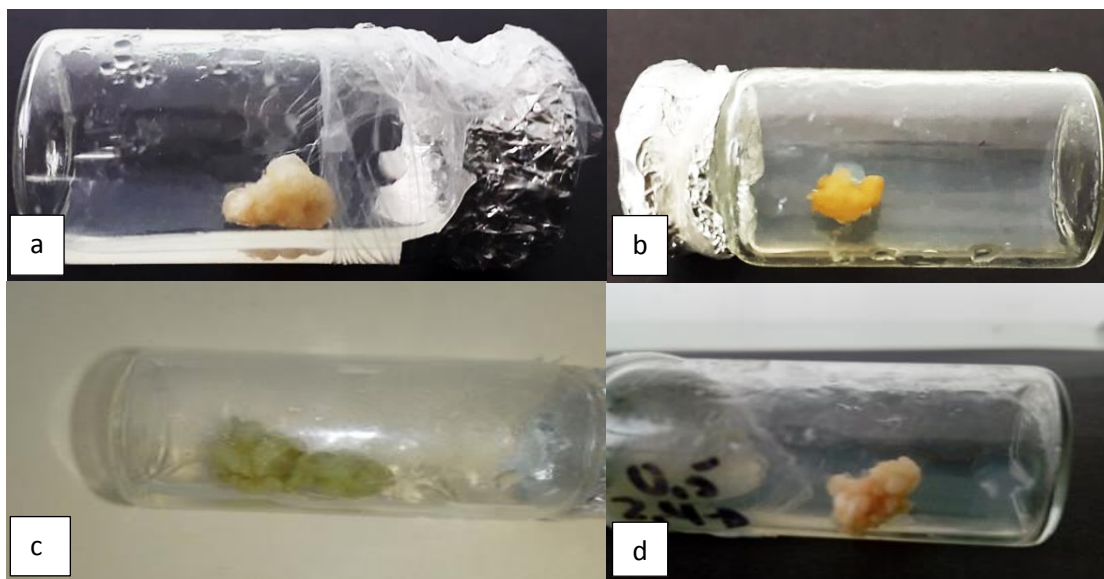


Fig. 2. Callos ovalados casi redondos, de color marrón claro observados en T1 (a) y de color amarillo, en T2 (b), de 25 días de edad. Callos de color verde (c) y marrón claro (d), ambos sin forma definida después de estar 10 días y 30 días, respectivamente, en 2,4-D a 0.5 ppm.

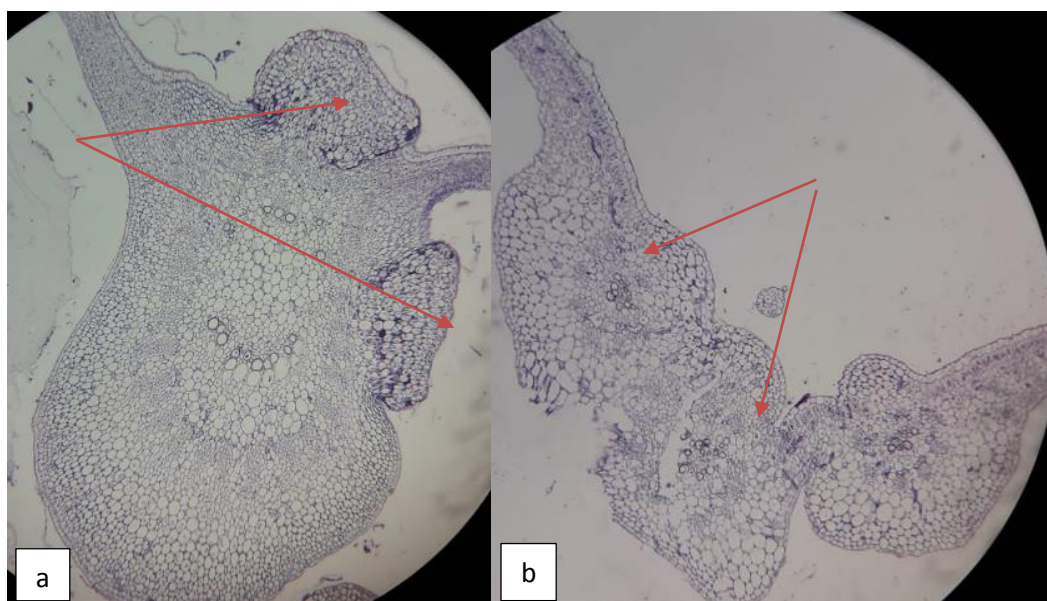


Fig. 3. Células meristemáticas observadas a los 85 días de edad. (a) en el interior del callo (T4 con ANA 1.0 ppm y BAP 5,0ppm). (b) en el mesófilo de la hoja (T8 con ANA 1,0ppm y BAP 0,0ppm) Coloración Hematoxilina, vista a 400x. Corte transversal.

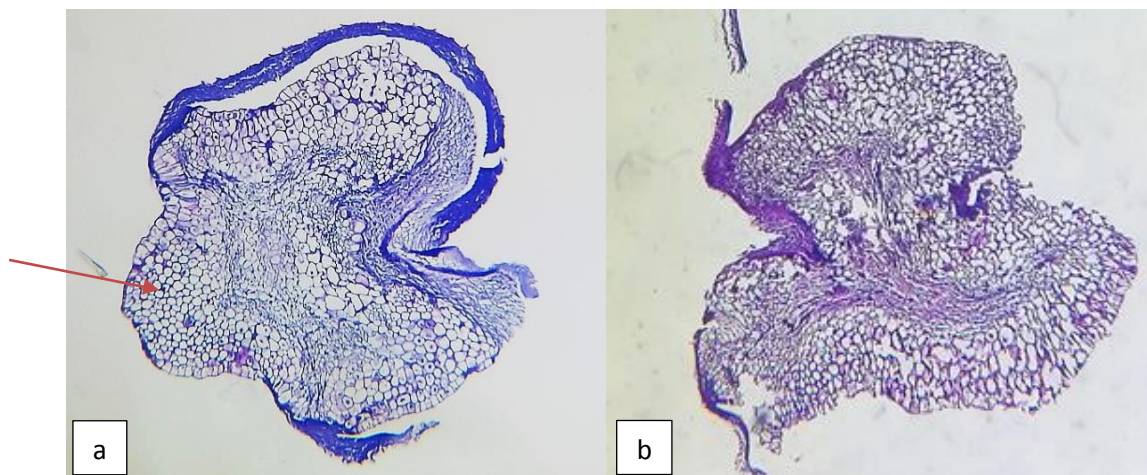


Fig. 4. (a) Células meristemáticas en mesófilo de hoja de *C. papaya L.* a los 89 días de edad (T1 con ANA 0,05ppm y BAP 1,0ppm). (b) No hay células meristemáticas, todas las células tienen el mismo tamaño, a los 85 días de edad (T5 con ANA 0,0ppm y BAP 1,0ppm). Coloración Hematoxilina, vista a 400x. Corte transversal.

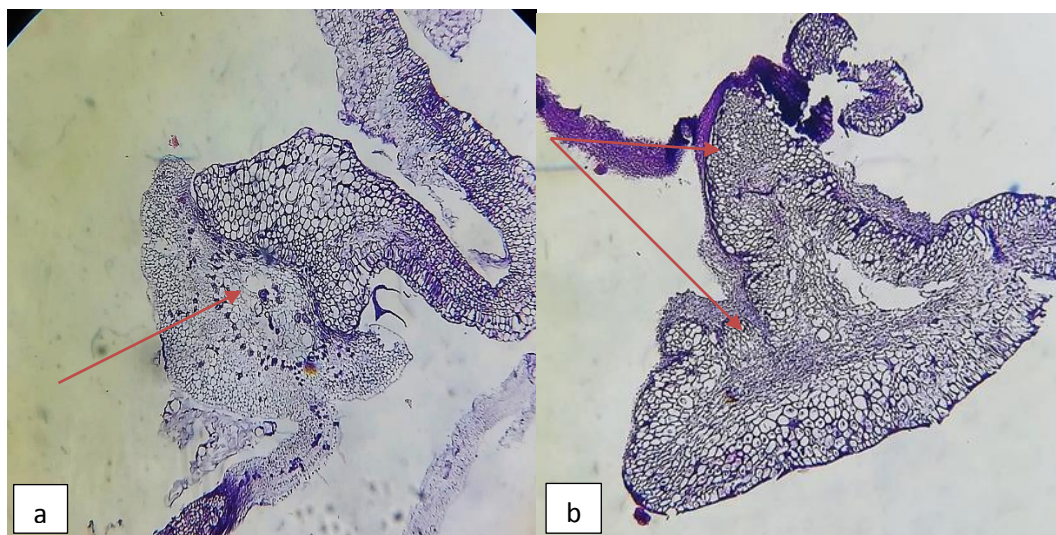


Fig. 5. Proembriones en callos de hojas de *C. papaya L.* a los 88 días de edad. (a) En T 2 con ANA 1,0ppm y BAP 1,0ppm y (b) en T3 con ANA 0,5ppm y BAP 5,0ppm. Coloración Hematoxilina, vista a 400x. Corte transversal.

Tabla 2. Presencia de callos embriogénicos inducidos a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento ANA y BAP por tratamiento.

Tratamiento	N° de muestras	N° de unidades experimentales (callos)	%	Presencia de callos embriogénicos
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	----	

Los ensayos con diferentes concentraciones de auxina-citoquinina (Tabla 2) han permitido la adquisición de la competencia embriogénica en las células vegetales la cual es un prerrequisito para la morfogénesis *in vitro* (Moura *et al.*, 2008), así se ha demostrado la inducción e identificación de células embriogénicas, que en un inicio fueron células meristemáticas según Steinmacher *et al.*, (2007).

También las condiciones de cultivo en las que se desarrollaron los callos embriogénicos (Tabla 2) influyeron de manera directa en la diferenciación celular, donde fue determinante la presencia, la concentración y la actividad de los reguladores del crecimiento empleados, sólo T1, con mayor concentración de citoquinina, no pudo inducir callos embriogénicos; todo lo contrario, fue con los otros tratamientos. Así T2 mostró el porcentaje más alto de callos, su combinación fue en partes iguales de auxina-citoquinina. En los demás tratamientos los resultados fueron similares. Esto se debe, según Viñas & Jiménez (2011) y Lázaro *et al.* (2015), a que los reguladores del crecimiento exógeno, intervienen directamente en la inducción de células embriogénicas y en la formación de embriones somáticos, mediante la modificación de la polaridad celular e interferencia de los gradientes de pH del citoplasma y pared celular del material vegetal, después de una división asimétrica, lo que implica que las células del explante cambien su patrón de expresión y generen estructuras embriogénicas y que las auxinas son responsables de la reprogramación de la expresión génica, seguido de una serie de divisiones celulares que inducen, tanto al crecimiento desorganizado para producir callos, como al crecimiento polarizado que conduce a la formación de embriones somáticos en estado globular.

Las observaciones histológicas muestran una composición celular muy heterogénea, La presencia de células meristemáticas, isodiamétricas y formando zonas (Fig. 3 a y b, 4 a), nos indica intensa actividad mitótica, caracterizada por la presencia de células pequeñas y dividiéndose rápidamente, con núcleo grande, citoplasma denso y vacuola pequeña según Shin & Seo (2018). Para González *et al.* (2005) el conocimiento de la histogénesis de los callos formados es importante, pues permite establecer relaciones entre la influencia de los reguladores del crecimiento vegetal sobre la organización celular de los tejidos que conforman estas estructuras.

Los proembriones (Fig. 5 a y b), producto de las divisiones en forma anticlinal y periclinal de las células meristemáticas, son regiones meristemáticas no globulares de diferente tamaño y frecuentemente aislado por separación de las paredes celulares alrededor de esta nueva estructura (Celestino *et al.*, 2005).

En esta investigación las hojas jóvenes del papayo han demostrado respuesta embriogénica en los tratamientos ensayados con ANA y BAP, lo cual es promisorio para seguir ensayando y establecer un protocolo para posteriormente escalar en biorreactores donde se producirán numerosos embriones somáticos con características homogéneas.

CONCLUSIONES

El tratamiento que indujo el mayor número de callos embriogénicos fue T2, cuya combinación fue de partes iguales de ANA y BAP, 1:1 ppm., respectivamente.

Los callos obtenidos mostraron diferentes colores (marrón, amarillo, verde) y formas.

El análisis histológico permitió observar células meristemáticas y proembriones en los tratamientos ensayados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbar, A. & A. Hakoomat.** 2004. Effect of culture medium in potato. *Biotechnology*; 3: 187-193
- Arrieta-Espinoza, G.** 1996. Efecto del 2,4-D en la inducción de callos de tejido foliar y en la calogénesis a partir de tejido foliar de papaya adulta clonada in vitro. Tesis, Mag. Sc, Universidad de Costa Rica. 92 p.
- Bhattacharya, J. B.** 2002. Tissue culture and transformation studies in Indian cultivars of papaya (*Carica papaya* L.). Tesis Doctoral. Universidad de Pune. India
- Bhojwari, S. & M. Razdan.** 1996. Plant tissue culture: theory and practice a revised. (Ed): Elsevier Science B. V. Netherlands..
- Caranqui, A. J.** 2011. Descripción de especies arbóreas en la ciudad de Riobamba. *Revista Perfiles*, 32 (2): 1390-5740
- Celestino, C.; I. Hernández; E. Carneros; D. López-Vela & M. Toribio.** 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología. *Forestal. Invest Agrar: Sist Recur For.* 14(3), 345-357
- Da Silva, G. M.; A. Da Cruz; W. Otoni; T. Pereira; D. Rocha & M. Da Silva.** 2015. Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). *Vitro Cell Dev Biol Plant* 51:539–545
- Elhiti, M.; C. Stasolla & A. Wang.** 2013. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. In *Sagasteguiana* 8(2): Julio – Diciembre, 2020

Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant, 49:631–642

- Feher, A.; P. Pasternak & D. Dudits.** 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201–228.
- González, O. S.; O. Sam; M. Hernández; M. Coronado & J. Silva.** 2005. Caracterización histológica de la embriogénesis somática a partir de limbos foliares de boniato (*Ipomoea batatas* L. Lam.). *Cultivos Tropicales*, 26 (4): 37–42.
- Guan, Y.; L. Shui-Gen; F. Xiao-Fen & S. Zhen-Hong.** 2016. Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7: 938
- Ikeuchi M.; K. Sugimoto & A. Iwase.** 2013. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, Vol. 25: 3159–3173.
- Ikeuchi, M.; A. Iwase; B. Rymen; A. Lambolez; M. Kojima; Y. Takebayashi; J. Heyman; S. Watanabe; M. Seo; L. De Veylder; H. Sakakibara & K. Sugimoto.** 2017. Wounding Triggers Callus Formation via Dynamic Hormonal and Transcriptional Changes. *Plant Physiology*, 175: 1158–1174
- 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.
- Koehler, A.; C. Carvalho; I. Abreu & W. Clarindo.** 2013. Somatic embryogenesis from leaf explants of hermaphrodite *Carica papaya*: A new approach for clonal propagation. *African Journal of Biotechnology*, 12(18): 2386-239
- Lázaro, A. A.; A. Azpeitia-Morales; L. Sáenz-Carbonell & F. Mirafuentes-Hernández.** 2015. Embriogénesis somática secundaria en el genotipo de cacao (*Theobroma cacao* L.) INIFAP 1 y su descripción histológica. *Nova scientia*, 7(14): 398-417.
- Lejzak-Levanic, D.; S. Mihaljevic & N. Bauer.** 2015. Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. *Acta Physiol Plant* (2015) 37:127.
- Moura, E.F.; M. Ventrella; S. Motoike; A. de Sá Júnior; M. Carvalho & C. Manfio.** 2008. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 95:175–184
- Murashige, T., F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*.15: 473-497
- Pires de Almeida, E.; R. Pedroso & J. Loyola.** 2000. Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. *Pesq. Agropec. Bras.*; 35(10). 2017-2024.
- Posada-Pérez, L.; R. Kosky & M. Reyes.** 2007. Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. var. Maradol rojo. *Biotecnología. Vegetal*. 7(3): 131–138.
- Schuabb, A.; E. Moura; T. Barroso; C. Santa & V. Silveira.** 2013. Polyethilen glycol effects on somatics embriogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(2): 116-124.
- Shin, J. J. & P. Seo.** 2018. Varying auxin levels induce distinct pluripotent states in callus cells. *Frontiers in Plant Science* 9:1653.
- Slater, A.; N. Scott & M. Fowler.** 2003. Plant biotechnology: The genetic manipulation of plants. *Plant Tissue Cult.*; 26: 35-56.
- Steinmacher, D. A.; G. Cangahuala-Inocente.; C. Clement; M. Guerra & E. Yeung.** 2007. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 43(2):124-132.

Vázquez, M.; J. Mijangos-Cortés; M. Zavala; L. Sánchez; A. Quiroz; M. Ortiz; F. Contreras; F. Espadas; G. Fuentes & J. Santamaría. 2016. Genetic characterization by amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers and morphochemical traits of *Carica papaya* L. genotypes. *African Journal of Biotechnology* 15(21), pp. 948-959.

Viñas, M. & V. Jiménez. 2011. Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología* 13 (2):229-242.

