

EFECTO DE LA LUZ ROJA Y EL CONTENIDO DE NUTRIENTES SOBRE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA, ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACIÓN A SUELO DE PLANTAS DE PAPAYA MARADOL

RED LIGHT AND NUTRIENTS CONTENT EFFECTS ON SOMATIC EMBRYOGENESIS, ROOTING AND ADAP- TATION TO SOIL OF MARADOL PAPAYA PLANTS

Gilber Vela-Gutiérrez^{1*}, Erika Judith López Zúñiga¹, Esmeralda García Parra¹, Elizabeth León García², Oscar Andrés Del Angel Coronel³, Arturo A. Velázquez López¹

¹ Laboratorio de Inv. y Desarrollo de Productos Funcionales. Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente 1150. Ciudad Universitaria. Col. Lajas Maciel.

² Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA), Instituto Tecnológico de Veracruz. Av. Miguel Angel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar, 91897 Veracruz, Ver.

³ Instituto Tecnológico Superior de Huatusco. Av. 25 Poniente No. 100, Col. Reserva Territorial. Huatusco, Veracruz, México, C.P. 94100.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la luz roja y la composición del medio de cultivo sobre la embriogénesis somática y enraizamiento de papaya Maradol. De siete a ocho embriones se colocaron dentro de una caja Petri con medio de cultivo embriogénico (MEmb). Las cajas se incubaron en obscuridad proveyéndoles de luz roja (0, 1 y 2 h al día). En cada tratamiento se evaluó: el tiempo de aparición de embriones, la calidad y cantidad de estos. Los embriones se subcultivaron en medio para la generación de plántulas (G4), se probaron diferentes medios de cultivo para enraizamiento (ME1, ME2, ME3 y ME4). Se obtuvieron embriones somáticos al mes y medio de colocar el cigoto en MEmb con 6% de sacarosa, 1 mg/L de 2,4- ácido dicloro fenoxiacético (2,4-D) y expuestos a 2 h de luz roja, mientras el control requirió de tres meses ($p < 0.05$). La mayor inducción de raíces en las plantas ocurrió cuando se utilizó en el medio de cultivo un gradiente descendiente de la concentración de ácido indol butírico (AIB) y del tiempo de exposición. Estos resultados indican una interacción positiva entre el estrés producido por la sacarosa y el 2,4-D, así como la exposición a la luz roja, lo que induce mayor velocidad de embriogénesis.

Palabras claves: Papaya Maradol, luz roja, estrés osmótico, Polietilenglicol (PEG), enraizamiento.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of red light and the composition of the culture medium on the somatic embryogenesis and rooting of papaya Maradol. Seven to eight embryos were placed inside a Petri dish with embryogenic culture medium (MEmb). Petri dishes were incubated in the dark and exposed to red light (0, 1 and 2 h per day). In each treatment the time of appearance of embryos, along with their quality and quantity were assessed. The embryos were sub-cultured in medium for the generation of seedlings (G4); different culture media were examined for

rooting (ME1, ME2, ME3 and ME4). Somatic embryos were obtained one and a half months after placing the zygote in MEmb with 6% sucrose, 1 mg/L of 2,4-dichloro phenoxyacetic acid (2,4-D) and exposed to 2 h of red light, while the control required three months ($p < 0.05$). The highest induction of roots in the plants occurred when adding a descending concentration gradient of indole butyric acid (IBA) and the time of exposure. These results suggest a positive interaction between the stress produced by sucrose and 2,4-D, as well as exposure to red light, which induces a higher rate of embryogenesis.

Keywords: Papaya Maradol, red light, osmotic stress, Polyethylene glycol (PEG), rooting.

INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es un fruto tropical originario de América central y conocido en todo el mundo por su agradable sabor y por sus diferentes propiedades, en general por su fácil digestibilidad. México ocupa el tercer lugar a nivel mundial en la producción de papaya, solo después de Brasil y Nigeria. De acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2018) para el 2017 en México, la superficie cultivada de papaya era de 19,114 ha, con una producción de 964,702 t, y un rendimiento promedio de 57.82 t/ha. Entre los principales estados productores se encuentran Oaxaca (288,160 t), Veracruz (106,888 t), Chiapas (146,432 t), y Colima (167,775 t).

Los frutos de papaya se caracterizan por ser de tipo climatérico, con altas tasas de respiración y producción de etileno, con pericarpio delgado y frágil que los hace altamente susceptibles y perecederos, con una vida de anaquele relativamente corta, según su manejo precosecha y poscosecha, y de las condiciones climáticas de cada región productora (Kader, 2010).

En el cultivo de papaya han sido establecidas algunas metodologías para la regeneración de plantas vía embriogé-

*Autor para correspondencia: Gilber Vela-Gutiérrez
 Correo electrónico: gilber.vela@unicach.mx

Recibido: 2 de mayo de 2018

Aceptado: 7 de septiembre de 2018

nesis somática, las cuales representan un gran potencial para la micropropagación. Una de ellas se basa en el empleo de plantas *in vitro* de papaya, y la otra en el uso como explante inicial de embriones cigóticos inmaduros (Rodríguez *et al.*, 2009).

El cultivo de embriones ha mostrado ser prometedor para algunos cultivos (Medeiros *et al.*, 2015).

En recientes años, la embriogénesis somática (ES) se ha desarrollado para una rápida multiplicación de muchas especies de plantas. El éxito de alguno de los protocolos *in vitro* depende de la habilidad para generar grandes cantidades de plantas (a bajo costo). En general, las plantas obtenidas por ES en medio semi-sólido son adaptadas a las condiciones *ex vitro*, una vez que las plantas producen hojas y raíces (Pinto *et al.*, 2011; Posada-Pérez *et al.*, 2016).

De manera general, las plántulas obtenidas por ES se regeneran *in vitro* en medio semisólido y más tarde se aclimatan cuando tienen hojas y un sistema de raíces adecuado. Estas plántulas *in vitro*, crecen en un microambiente aséptico (recipientes de cultivo a menudo herméticos), con baja intensidad de luz, en un medio que contiene azúcar y nutrientes que permiten el crecimiento heterótrofo y una atmósfera con un alto nivel de humedad (Pinto *et al.*, 2011).

La luz es un factor abiótico particularmente importante para el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Yang *et al.*, 2018). Aquellos que se cultivan con luz natural están expuestos a luz roja coexistentes con otros tipos de luz, sin embargo, estos se pueden separar (Ilieva *et al.*, 2010). Los estudios sobre la relación de los tipos de luz demostraron que podrían no ser independientes entre sí cuando actúan en las plantas. Existen investigaciones en donde la exposición de la luz azul acelera el crecimiento de foliar de los embriones (Furtado *et al.*, 2011; Xue *et al.*, 2013; Fukuda *et al.*, 2016). Xiao *et al.* (2017) indican que una combinación de luz roja y azul aumenta el crecimiento y las propiedades nutrimentales de la lechuga; otros autores han reportado que el uso de luz roja (cerca y lejana) está relacionada con la defoliación, acumulación de carotenoides y con la fotosíntesis, respectivamente (Robin *et al.*, 1994; Gang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2018). El espectro de la luz influye fuertemente en el desarrollo y la fisiología de las plantas; por ejemplo, una longitud de onda particular puede promover la inducción de procesos fisiológicos y, por lo tanto, cambiar la expresión génica y los programas de desarrollo en las plantas. Los fotorreceptores detectan la luz roja y roja muy lejana a través de los fitocromos (phyA y phyB) y la luz azul/UV-A a través de los criptocromos (cry1 y cry2). La activación dependiente de la luz de phyB modula la represión de los genes de la histona arginina desmetilasa, que eliminan las histonas represivas de la histona arginina en GA3ox1 / GA3ox2, y por lo tanto promueve la germinación de la semilla (Schuabb *et al.*, 2017).

El propósito del presente trabajo fue determinar el efecto de la luz roja y la composición del medio de cultivo durante la embriogénesis somática, el enraizamiento y aclimatación de plantas de papaya Maradol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron semillas de frutos inmaduros de papaya Maradol provenientes de huertos de papaya del municipio de Jiquipilas, Chiapas, México. Los frutos se lavaron con agua y jabón, se desinfectaron en una solución clorada al 20%, posteriormente se limpiaron con alcohol etílico al 95%. Se extrajeron y seleccionaron las semillas de los frutos en condiciones de esterilidad (Figuras 1 A, B y C), se colocaron en cajas Petri estériles para su conservación.

Las semillas se desinfectaron y disectaron (Figura 1C) de acuerdo a la metodología publicada por Cabrera-Ponce *et al.* (1995) y modificada por Vela-Gutiérrez *et al.* (2016).



Figura 1. A) Fruto verde de papaya Maradol, B) Semillas estériles de fruto inmaduro, C) Embrión cigótico recién obtenido de la semilla.

Figure 1. A) Green fruit of Maradol papaya, B) Sterile seeds of immature fruit, C) Zygotic embryo newly obtained from the seed.

Cultivo de embriones

Se colocaron entre siete y ocho embriones en cajas Petri que contenían medio de cultivo embriogénico (MEmb: medio de Murashige and Skoog (1962), suplementado con 0.4 g/L de glutamina, ajustado a un pH de 5.8), adicionado con sacarosa (3, 6 y 9%) y 2,4-D (2,4- ácido dicloro fenoxiacético). Finalmente se adicionó 8 g/L de agar-agar; se almacenaron en obscuridad a 26 °C, proveyéndolas de luz roja (0, 1 y 2 horas). El diseño experimental correspondiente se muestra en la tabla 1.

Cada tercer día se realizó un monitoreo de las cajas, con la finalidad de evaluar el tiempo de aparición de embriones somáticos, la cantidad y calidad de estos en un tiempo determinado. La masa embriogénica obtenida se subcultivo en cajas con MEmb incubándolas en obscuridad total para su propagación.

Generación de plántulas

Los embriones se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo para la generación de plántulas (G4) que consistió en medio G, medio de generación de plántulas utilizado por Cabrera-Ponce *et al.* (1995), adicionado con 2% de polietilenglicol (PEG) y 5 mg/L de ácido abscísico (ABA) para elongamiento durante dos semanas, se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo (16 h de luz), utilizando lámparas de luz blanca luminiscente de 6500 Kelvin (6500 K) a 28 °C, para producir pequeñas plántulas; éstas se transfirieron a frascos de vidrio de 200 mL que contenían medio G4 para elongar el tallo y facilitar el crecimiento durante un mes.

Enraizamiento de plántulas

Se probaron 13 medios de cultivo para enraizamiento

Tabla 1. Diseño experimental utilizado en la formulación de medios de cultivo embriogénicos (MEmb).**Table 1.** Experimental design used in the formulation of embryogenic culture media (MEmb).

Tratamientos	Sacarosa (%)	2,4-D mg/L	Luz Roja (h)
T1			0
T2		1	1
T3			2
T4	3		0
<T5		2	1
T6			2
T7			0
T8		3	1
T9			2
T10			0
T11		1	1
T12			2
T13	6	2	0
T14			1
T15			2
T16		3	0
T17			1
T18			2
T19			0
T20		1	1
T21			2
T22	9		0
T23		2	1
T24			2
T25			0
T26		3	1
T27			2

(ME1, ME2, ME3, ME4, ME5, ME6, ME7, ME8, ME9, ME10, ME11, ME12 y ME13), considerando una amplia gama de cofactores de crecimiento, tal y como se describe en la tabla 2. Los mejores resultados obtenidos de inducción al enraizamiento en las plántulas fueron observados en el ME13, formulado con sales y vitaminas de murashige and skoog (MS) al 50%, 1 mg/L de AIB y 30 g/L de sacarosa, a partir de estos resultados se planteó un nuevo diseño experimental, el que se muestra en la tabla 3. Los ensayos derivados del diseño mostrado en la tabla 3, tampoco fueron los adecuados, por lo que se planteó un esquema de enraizamiento por gradientes, el que se describe enseguida; para la preparación del medio de cultivo se utilizó sales de MS al 50% de su fuerza, adicionado con 30 g/L de sacarosa, las plantas se expusieron en cuatro lotes de medio de cultivo con concentraciones diferentes en gradiente descendente de AIB (lote 1: 3 mg/L por 48 horas, lote 2: 1 mg/L durante dos semanas, lote 3 y 4: subcultivos de un mes con 0.5 y 0.1 mg/L, respectivamente), a pH de 5.8, y gelrite® 4 g/L.

Aclimatación a suelo

La aclimatación de las plántulas a suelo se efectuó colocándolas en pequeñas macetas que contenían abono (mezcla de tierra negra y arcilla). Previo al trasplante, se lavaron cuidadosamente las raíces para eliminar los residuos del medio de cultivo, además de mantener las raíces por cinco minutos en una solución de Benomyl® al 1%, y evitar de esa manera problemas de contaminación. Una vez colocadas en las macetas, se protegieron con una bolsa de plástico abierta de los extremos. Al segundo día se amplió el orificio de la bolsa y así paulatinamente hasta liberarla totalmente (8 días).

Análisis estadístico

Los resultados del efecto de la luz roja sobre la embriogénesis y del enraizamiento (primer y segundo diseño) se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza de una vía, utilizando el software estadístico de Minitab® versión 17.0 para windows considerando una $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Generación de la línea embriogénica

Los resultados demuestran el efecto positivo de la luz roja sobre la velocidad de formación de embriones somáticos, los mejores resultados se obtuvieron en T13, T14 y T15 (Figura 2). En la figura 2, se puede constatar que se redujo de tres meses en condiciones de total oscuridad, a 1.5 meses cuando se les suministró una hora de luz roja, y el medio de cultivo se adicionó con 6% de sacarosa y 2.0 mg/L de 2,4-D (T14) (Tabla 1) (Figura 2). Los resultados también demuestran que los tratamientos con 3 y 9% de sacarosa no alcanzaron la velocidad de embriogénesis como se logró con el suministrado con 6%; los tratamientos adicionados con 3% de sacarosa y expuestos a 2 horas de luz roja (T3, T6 y T9), induce la embriogénesis somática de forma similar al control (T10) (6.0% de sacarosa, 1 mg/L de 2,4-D, sin exposición a luz roja) ($p < 0.05$). La transición de semilla a plántula comprende una fase del crecimiento heterotrófico al crecimiento autótrofo, caracterizado por el desarrollo de órganos y la maduración de los cloroplastos con el inicio de la fotosíntesis, para promover el nuevo ciclo de vida de la planta (Warpeha y Montgomery, 2015). Tal y como se suponía, pequeñas dosis de luz roja (1 a 2 horas) parece tener un efecto positivo sobre la velocidad de formación de embriones, lo que permite en menor tiempo (1.5 a 2 meses) obtener una línea embriogénica de papaya, comparado a los resultados obtenidos en ausencia de luz roja. Chen *et al.* (2017) indican que la luz roja afecta la morfogénesis de las plantas al inducir transformaciones en el fitocromo, también es crucial para desarrollar del aparato fotosintético y regula la síntesis de fitoquímicos, como los fenólicos y el oxalato. Además, la luz roja está relacionada con el fitocromo B (phyB) y fitocromo A (phyA), los cuales son fotoreceptores predominantes para luz roja y luz roja lejana, respectivamente (Fakuda *et al.*, 2016). Además, se ha observado que la luz roja afecta positivamente la elongación de plantas de largo día (phyB), debido a que phyB reprime diferentes fenotipos, se le considera el principal actor en la

Tabla 2. Primer Diseño de medios de cultivo para enraizamiento (ME).

Table 2. First design of culture media for rooting (MR).

Componente	ME1	ME2	ME3	ME4	ME5	ME6	ME7	ME8	ME9	ME10	ME11	ME12	ME13
Sales y Vitaminas de MS (%)	100	100	100	100	100	100	50	50	50	100	100	50	50
Ácido Indol Butírico (AIB) (mg/L)	3	1	-	-	-	-	-	-	5	1	-	1	1
Ácido Giberélico (AG3) (mg/L)	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluroglucinol (mg/L)	-	160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mio-inositol (mg/L)	-	-	100	100	100	-	-	-	-	100	-	-	-
Glicina (mg/L)	-	-	2	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-
Tiamina-HCl (mg/L)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Indol Acético (AIA) (mg/L)	-	-	-	-	0.1	5	-	-	-	-	-	-	-
Carbón activado (g/L)	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4-D	-	-	-	-	-	-	5	5	-	-	-	-	-
Raizal* (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.75	7.5	-
Sacarosa (g/L)	30	30	30	30	20	30	30	30	30	30	30	30	30
Agar (g/L)	8	8	-	-	8	7	10	10	10	-	-	-	-
Gelrite (g/L)	-	-	3.5	3.5	-	-	-	-	-	4	4	4	4

Tabla 3. Segundo diseño para medios de cultivo para enraizamiento (MEr).

Table 3. Second design for culture media for rooting.

Componente	MEr1	MEr2	MEr3	MEr4
Sales y Vitaminas de MS (%)	50	50	50	50
Ácido Indol Butírico (AIB) (mg/L)	0.5	1	2	3
Sacarosa (g/L)	30	30	30	30
Carbón activado (g/L)	0.5	0.5	0.5	0.5
Gelrite (g/L)	4	4	4	4
pH	5.8			

represión de la elongación de entrenudos (Demotes-Mainard *et al.*, 2016). Resultados similares han sido publicados por Cai *et al.* (1999), ellos reportaron haber inducido la formación de embriones globulares, de corazón y tórpedos después de cuatro a cinco semanas de subcultivar embriones cigóticos en medio de inducción. El callo embriogénico se forma a partir de los meristemos apicales y radicales del embrión. Los callos embriogénicos se observan de color amarillo y de consistencia frágil que exudan un líquido claro y denso.

Después de obtener la línea embriogénica, con los embriones del T14 se desarrollaron diversos subcultivos para producir suficiente cantidad de masa embriogénica, para ello se realizaron de 3 a 4 subcultivos en MEmb (Sales de MS con vitaminas y suplementado con 2 mg/L de 2,4-D) (Figura 3C). La cantidad de callo embriogénico se incrementó conforme se transfiere a medios de cultivo recién elaborados en presencia

T/ Trats T13 T14 T15

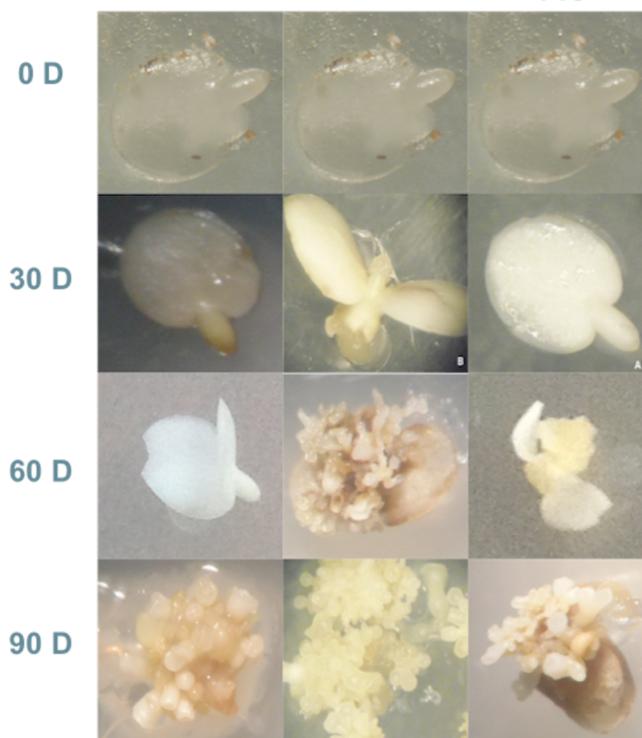


Figura 2. Embriones durante el proceso de incubación para la generación de embriogénesis somática.

Figure 2. Embryos during the incubation process for the generation of somatic embryogenesis.

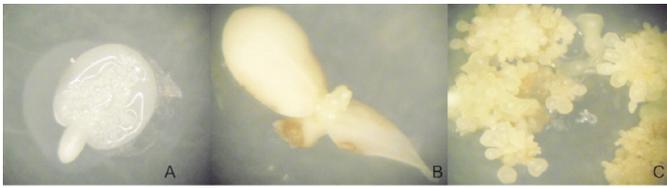


Figura 3. A) Embrión cigótico recién obtenido, B) Embrión cigótico con cotiledones abiertos después de dos semanas de cultivo, C) Embrión globular obtenido entre 3 y 4 meses de cultivo en MEEmb.

Figure 3. A) Zygotic embryo newly obtained, B) Zygotic embryo with open cotyledons after two weeks of culture, C) Globular embryos obtained between 3 and 4 months of culture in MEEmb.

de la auxina (2,4-D), de esta forma se inducen sucesivamente las fases embriogénicas (embriogénesis secundaria). Se sabe que la producción de brotes y raíces *in vitro* está controlada por la relación de auxinas y citoquininas exógenas y por el control de los niveles de hormonas vegetales producidas endógenamente (Kumari *et al.*, 2017). Los mejores resultados obtenidos en la formación de callos embriogénicos y somáticos se obtuvieron utilizando una concentración de 2 mgL^{-1} de 2,4-D (Figura 3). Resultados similares fueron reportados por Gutiérrez-Rosati *et al.* (1999) al estudiar la embriogénesis somática de "papaya" (*Carica papaya* Linnaeus) variedad PT-101-B. En la figura 3C, se pueden observar embriones generalmente en el estadio globular, y muy pocos en fase de corazón y torpédos. Se ha demostrado que el 2,4-D estimula la síntesis de otras auxinas como el ácido indol acético (AIA) en células de zanahoria (*Daucus carota* L). Asimismo, se ha propuesto que el 2,4-D podría actuar no solo como auxina, sino también como un herbicida, el cuál induce respuestas al estrés (Quintana, 2009).

Generación de plántulas

Los embriones obtenidos del tratamiento T14 (Tabla 1) fueron transferidos a medio G4, se obtuvieron 21 plántulas de 30 (70%) embriones somáticos sub-cultivados por dos meses en fotoperiodo (6500 K de luz blanca fría por 16 h). Después de dos semanas de cultivo se observaron pequeñas plántulas de 0.5 a 1.0 cm de longitud (Figura 4 A y B); se transfirieron a cajas Petri con medio G4 recién elaborado, colocando de 5 a 6 plántulas en promedio por caja Petri; dos semanas después se obtuvieron pequeñas plantas de aproximadamente 2 cm de longitud, provista de una a dos pequeñas hojas verdes. Durante los primeros días de desarrollo existe producción basal de auxinas incrementándose posterior a los 15 días

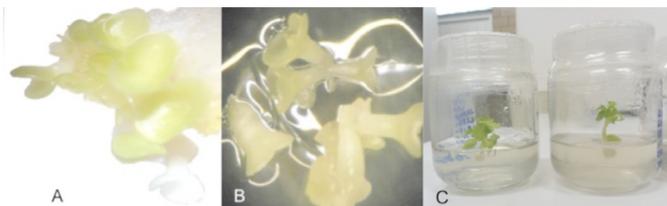


Figura 4. Pequeñas plántulas provenientes de embriones de papaya Maradol cultivadas en medio G4. A y B, dos semanas de cultivo; y C, cinco semanas de sub-cultivo.

Figure 4. Small seedlings from embryos of Maradol papaya grown in G4 medium. A and B, two weeks of culture; and C, five weeks of sub-culture.

del crecimiento, como en la piña al noveno día presenta altos niveles de auxinas (Mercier *et al.*, 2003). Las plántulas cultivadas por cinco semanas en medio G4 presentaron un tamaño entre 3 y 4 cm de longitud, provistas además de 4 a 6 pequeñas hojas de color verde olivo a intenso (figura 4C). Luciany *et al.* (2006) reportaron que entre los factores más importantes que afectan la regeneración de plantas se encuentran el tipo de explante, la condición fisiológica de éste, el genotipo y la combinación de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Además, está regulado por señales de luz percibidas por los fotorreceptores, la señalización mediada por hormonas y los nutrientes disponibles (Warhepa y Montgomery, 2015). Los niveles de hormonas endógenas regulan los procesos de diferenciación de explantes *in vitro* y se postula que son la principal diferencia entre los genotipos con varios grados de competencia (Kumari *et al.*, 2017).

Enraizamiento

De los trece medios de cultivo para enraizamiento probados (Tabla 2), se observó que únicamente el ME2, ME12 y ME13 indujeron la formación de raíces en las plántulas, después de tres semanas de sub-cultivo, las plántulas cultivadas en estos presentaron raíces pivotantes que posteriormente se extendieron hasta aproximadamente 3 cm, en el caso del ME13 (tabla 4), el cual estimula la mayor formación de raíces, y estadísticamente diferente al resto de los medios de cultivo ($p < 0.05$), probablemente se debe a su composición de sales y vitaminas de murashige and skoog (MS) al 50%, 1 mg/L de AIB y 30 g/L de sacarosa. El ME7 presentó el mismo efecto después de cinco semanas de sub-cultivo. Las plantas cultivadas en ME2, previo a la inducción de raíces evidenciaron defoliación, y posteriormente la formación de nuevos brotes que más tarde se convirtieron en hojas (Figura 5A). La formación de raíces fue nula en el resto de los medios de cultivos probados, provocando la muerte de la planta (Figura 5B). Esto debido al cambio de gradiente de concentración de auxina cuando el callo se transfiere a medio con baja o ninguna auxina (Pradeep *et al.*, 2010). El ME2 y ME13 contienen 1 mg/L de IBA en su composición, hormona a la que se le atribuye la inducción de la formación de raíces en plantas. Islam *et al.* (1993) indicaron que la formación de raíces ocurre solo cuando se añade al medio de cultivo 0.1 a 1 mg/L de IBA o de ácido naftalen acético (ANA), y que los brotes son más propensos al enraizamiento cuando se incrementan los sub-cultivos, debido a que los sub-cultivos pueden rejuvenecer las raíces con un alto grado de competencia regenerativa. Los mismos autores reportaron mayor enraizamiento al agregar 1 mg/L de IBA en un estudio realizado de propagación clonal *in vitro* de papaya.

El carbón activado, se ha utilizado por algunos autores en la formulación de medios de cultivo, ya que reduce la oxidación de las células, permitiendo de esa manera mayor efecto para los componentes inductores de raíces. En este sentido, se evaluó inicialmente la presencia de carbón activado en el medio de cultivo ME4 (2 mg/L), sin embargo, se presentó senescencia total de las plantas (Figura 5). En un

Tabla 4. Resultados de la formación de raíces en medios de cultivo para enraizamiento (ME) del primer diseño experimental.
Table 4. Results of root formation in rooting culture media (MR) of the first experimental design.

ME9	1ab	1.0a	4	3-5	2-3
Medio de cultivo para enraizamiento	Número de brotes formados	Longitud del brote formado (cm)	Tiempo de formación del brote (semanas)	Número de hojas formadas en la plántula	Altura de la plántula (cm)
ME1	4c	4	3-4	Senescieron	1-2
ME2	2bc	1.0a	4	3-5	2-3
ME3	0a	0a	4-8	2-3	2-3
ME4	0a	0a	4-8	2-4	2-3
ME5	0a	0a	4-8	2-4	1-2
ME6	0a	0a	6-8	Senescieron	----
ME7	0a	0.5a	6	3-5	2-3
ME8	0a	0a	4-8	2-3	1-2
ME10	0a	0a	4-8	2-3	2-3
ME11	0a	0a	4-8	2-4	1-2
ME12	2bc	1.5b	4	3-5	2-3
ME13	3c	2.0-3.0b	4	3-6	3-4

*Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (ANOVA, $p < 0.05$).

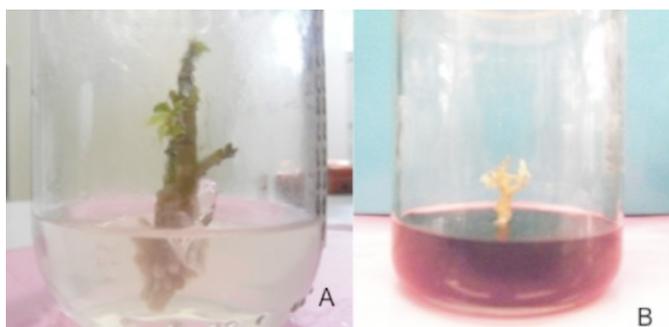


Figura 5. Plántulas de papaya Maradol: A. ME2 (formación de raíces, defoliación y aparición de nuevas hojas), B. ME4 (medio de cultivo adicionado con carbón activado, presencia de senescencia de las hojas).

Figure 5. Maradol papaya seedlings: A. ME2 (root formation, defoliation and appearance of new leaves), B. ME4 (culture medium added with activated charcoal, presence of leaf senescence).

estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo, se evaluaron concentraciones más bajas de este mismo componente, pero tampoco se encontraron resultados favorables. Otros componentes evaluados fueron ácido giberélico (AG3) en una concentración de 0.1 mg/L, fluoroglucinol (160 mg/L) y raizal® (enraizador comercial) (3.75 y 7.5 mg/L), mostrados en la tabla 2, respectivamente, ninguno de ellos mostró resultados satisfactorios en la inducción de raíces de las plántulas, tal y como se observó en los medios de cultivo con presencia de IBA. Datos reportados por Saker *et al.* (1999) indican que la adición de 2 mg/L de IBA produjo un mayor efecto en la formación de raíces (75%), así como mayor longitud (3.15 cm) de éstas, sin inducción a la formación de callos. Lo anterior sucedió al evaluar el efecto de la concentración de la hormona en la inducción de raíces en embriones de papaya. La presencia de bencil amino purina (BAP) y polietilenglicol (PEG) en el medio de cultivo G4 previo a las pruebas de en-

raizamiento, probablemente promovieron la formación de plántulas y limitaron la formación de callo algodonoso en los embriones. Esna-Ashari y Viliers (1998), reportaron que la bencil amino purina (BAP) es un regulador de crecimiento del grupo de las citoquininas que afecta la división celular y estimula la actividad axilar de los brotes, la formación de raíces adventicias y la regulación de diferenciación. Esto promueve la síntesis de proteínas y cambios en su actividad. Sin embargo, su presencia inhibe la formación de raíces (Esna-Ashari y Viliers, 1998).

Respecto al segundo diseño experimental probado con los medios de enraizamiento (MEr1, MEr2, MEr3 y MEr4), se observó suficiente generación de raíces en MEr3 y MEr4, que contienen 2.0 y 3.0 mg/L de IBA, respectivamente (Tabla 3); pero presentaron senescencia después de 12 a 15 días de permanecer en el medio de cultivo; el resto de los medios indujeron la formación de raíces, pero sin elongación (tabla 5). La inducción y formación de raíces del MEr4 fue estadísticamente mayor que el resto de los tratamientos ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos fueron determinantes para subcultivar las plántulas en medios de cultivo con un diseño de gradiente de IBA (lote 1: exposición a medios con 3 mg/L por 48 horas, lote 2: una semana con 1 mg/L, lote 3 y 4: sub-cultivos de un mes con 0.5 y 0.1 mg/L, respectivamente). Se logró de esa manera la inducción de hasta cuatro raíces pivotantes y radicales por planta, así como la elongación de éstas a 3.5 cm, sin evidenciar senescencia (Figura 6). Ying *et al.* (1999), reportaron que líneas de papaya transgénicas resistentes a kanamicina desarrollaron suficiente cantidad de raíces en un lapso de dos a cuatro semanas cuando se expusieron a sales de MS adicionado con sacarosa (20 g/L), mio-inositol (10 mg/L) y tiamina-HCl (0.1 mg/L).

Tabla 5. Resultados de la formación de raíces en medios de cultivo para enraizamiento (MEr) del segundo diseño experimental.**Table 5.** Results of root formation in rooting culture media (MEr) of the second experimental design.

Medios de Enraizamiento	Número de brotes	Longitud del brote	Tiempo de formación del brote (semanas)	Número de hojas	Altura de las plántulas (cm)
MEr1	2a	0.5-1.0	4-8	2-4	1-2
MEr2	3ab	1.0-1.5	4-8	3-5	2-3
MEr3	3-4bc	1.5-2.0	4	Senescente	---
MEr4	4-5cd	1.0-1.5	4	Senescente	---

**Figura 6.** Plántulas de papaya enraizadas en medio de cultivo con gradiente de AIB**Figure 6.** Rooted papaya seedlings in culture medium with AIB gradient

Aclimatación al suelo

En las figuras 7 A, B, C y D, se muestran las plantas obtenidas del cultivo *in vitro*, a una, dos y cuatro semanas posteriores a su trasplante; éstas se observan aclimatadas totalmente, obteniendo suficiente cantidad de follaje posterior a un mes del trasplante. Del total de plantas enraizadas, el 85% se aclimataron totalmente en las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos, el resto de ellas senescieron después de dos semanas de la transferencia. Esto debido a que existen factores bióticos y abióticos, a nivel *In vitro* que influyen en la aclimatación de las plantas, por ejemplo, el alto contenido de humedad en el aire, baja intensidad de luz, esto lleva a que se utilicen los azúcares del medio de cultivo como fuente de carbono y energía (Montes *et al.*, 2016; Indacochea *et al.*, 2017).

La cantidad de oxígeno, luz, el tipo de suelo, la humedad y el tipo de fungicida utilizado en las raíces, son factores importantes durante el periodo de aclimatación para reducir enormemente la muerte de las plantas, tal y como se consideró en este estudio para alcanzar una aclimatación del 85% de las plantas. Ying *et al.* (1999), reportaron en su estudio que del total de plantas enraizadas el 97% se aclimataron al suelo, utilizando como medio de adaptación vermiculita suplementada con un volumen igual de sales de MS en cajas

**Figura 7.** Aclimatación de plántulas a condiciones de suelo. A: Plántula recién trasplantada a suelo (liberada de condiciones *in vitro*); Planta a una (B), dos (C) y cuatro (D) semanas posterior al trasplante en suelo.**Figure 7.** Acclimation of seedlings to soil conditions. A: Plant recently transplanted to soil (released from *in vitro* conditions); Plant at one (B), two (C) and four (D) weeks after the transplant in soil.

magenta, bajo las condiciones de 12 h de luz y 12 oscuridad, 55% de humedad y 29 °C, posteriormente se transfirieron a macetas con tierra estéril cubiertas con bolsas de plástico transparente, en condiciones similares a las nuestras.

CONCLUSIONES

El sistema de embriogénesis somática utilizado (técnica y medios de cultivos), permitió obtener sin contaminación alguna embriones globulares principalmente y torpédicos después de mes y medio de subcultivo del embrión cigoto, posteriormente estos fueron subcultivados de forma eficiente para la generación de masa embriogénica.

Los avances obtenidos, indican una interacción positiva entre el estrés producido por la presencia de sacarosa en el medio de cultivo (60%), la presencia de 2,4-D (2 mg/L) y la exposición a la luz roja (1 h), lo que induce con mayor velocidad el proceso embriogénico de papaya Maradol, obteniendo un protocolo más eficiente a los reportados, tal y como se muestra en el T14. Además de observar suficiente cantidad y calidad de masa embriogénica que puede ser utilizada en procesos de transformación genética, ya que de acuerdo a reportes se requiere embriones de esta naturaleza.

Utilizar un medio de cultivo con un gradiente de concentración de IBA acorde a los tiempos de exposición, permitió generar suficiente cantidad y calidad de raíces en las plantas, logrando posteriormente una aclimatación a suelo del 85% de ellas.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a la Reincorporación de Exbecarios del Programa para el Desarrollo del profesorado (PRODEP) 2017, así como a los CC. Sergio de Jesús Hernández Cabrera y Víctor Hugo Ramos Alfaro becarios del mismo programa, y a quienes participaron en el proyecto "Desarrollo de un protocolo eficiente para la generación y enraizamiento de plántulas de papaya Maradol mediante embriogénesis somática".

REFERENCIAS

- Cabrera-Ponce, J.L., Vegas-García, A., Herrera-Estrella, L. 1995. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports*. 15:1-7.

- 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 *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 35:61-69.
- Chen, X., Yang, Q., Song, W., Wang, L., Xue, X. 2017. Growth and nutritional properties of lettuce affected by different alternating intervals of red and blue LED irradiation. *Scientia Horticulturae*. 223: 44-52.
- Demotes-Mainard, S., Péron, T., Corot, A., Bertheloot, J., Le Gourrier, J., Pelleschi-Travier, S., Crespel, L., Morel, P., Huché-Thélier, L., Boumaza, R., Vian, A., Guérin, V., Leduc, N., and Sakr, S. 2016. Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environ. Exp. Bot.* 121:4-21. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.010>.
- Esna-Ashari, M. y Viliers, T.A. 1998. Plant regeneration from tuber discs of potato (*Solanum tuberosum* L.) using 6-benzylaminopurine (BAP). *Potato Research* 41:371-382.
- Fakuda, N., Ajima, C., Yukawa, T., Olsen, J. 2016. Antagonistic action of blue and red light on shoot elongation in petunia depends on gibberellin, but the effects on flowering are not generally linked to gibberellin. *Environmental and Experimental Botany*. 121:102-111.
- Furtado, A., Vinicius, M., Shwartz, E., Salgueiro, C., Aparecida, M. 2011. The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. *Environmental and Experimental Botany*. 70: 43-50.
- Gang, M., Lancui, Z., Masaya, K., Kazuki, Y., Yoshikazu, K., Masaki, Y., Yoshinori, I., Hikaru, M. 2015. Effect of the combination of ethylene and red LED light irradiation on carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression in the flavedo of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 99: 99-104.
- Gutiérrez-Rosati, A., Jiménez, C. and Yopez, J. Embriogénesis somática en papayo (*Carica papaya* L.) variedad PT-101-B. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. [Consultado 30 de septiembre de 2012] 1999. Disponible en: <http://www.lamolina.edu.pe/cirgebb/papayo%20embriogenesis%201999.pdf>
- Ilieva, I., Ivanova, T., Naydenov, Y., Dandolov, I., Stefanov, D. 2010. Plant experiments with light-emitting diode module in Svet space greenhouse. *Advances Space*. 46:840-845.
- Indacochea, B., Parrales, J., Castro, C., Vera, M., Gabriel, J. 2017. Acimatación *in vitro* de especies forestales nativas del Sur de Manabí en peligro de extinción. *Journal of the Selva Andina* 8(2): 124-134.
- Islam, R., Rahman, S.M., Hossain, M. y Joarder, O.I. 1993. *In Vitro* clonal propagation of papaya (*Carica papaya* L.). *Pakistan Journal of Botany*. 25:189-192.
- Kader, A.A. Department of Pomology, University of California, Davis, CA. [Consultado 25 de mayo de 2011] 2010. Disponible en: <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/Produce>.
- Kumari, A., Baskaran, P., Placková, L., Nemcaková, H., Nisler, J., Dolézal, K., Standen, J. 2017. Plant growth regulator interactions in physiological processes for controlling plant regeneration and *in vitro* development of *Tulbaghia simmleri*. *Journal of Plant Physiology*. 18:1606-1617.
- Luciany, F. G., Mary, K. A., Pellegrini, C. y Curvetto, N.R. 2006. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87:139-143.
- Medeiros, A. S. M., Cabral, M. E., Mota, L. G. V., Willadino, L., Camara, T. 2015. Propagación *in vitro* en Sistemas de Inmersión Temporal de plantas de caña de azúcar variedad 'RB 872552' obtenidas de embriones somáticos. *Biotec Veg.* 15(3): 187-191.
- Mercier, H., Souza, B., Kraus, J., Hamasaki, R., Sotta, B. 2003. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. *Brazilian Journal Plant Physiologic*. 15(2): 107-112.
- Montes, S., Lalama, J., Echeverria, J., Salazar S. 2016. Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero. *Dominio de las Ciencias*. 2: 63-89
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15:431-497.
- Pinto, F., Berti, M., Olivares, D., Sierralta, W., Hinrichsen, P., Pinto, M. 2011. Leaf development, temperatura and light stress control of the expression of early light-inducible proteins (ELIPs) in *Vitis vinifera* L. *Environmental and Experimental Botany*. 72: 278- 283.
- Posada-Pérez, L., Padrón-Montesinos, Y., González-Olmedo, J., Barbón Rodríguez, R., Rodríguez-Sánchez, R., Norman-Montenegro, O., Carlos-Rodríguez, R., Dion-Daniels, E., & Gómez-Kosky, R. 2016. Effect of phloroglucinol on rooting and *in vitro* acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 52:196-203 DOI 10.1007/s11627-015-9733.
- Pradeep, C., Taylor, M., Harding, R., Tyagi, A., Becker, D. 2010. Initiation of embryogenic cell suspensions of taro (*Colocasia esculenta* var. esculenta) and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 100:283-291.
- Quintana, S. M. E. 2009. Transformación genética de cebolla (*Allium cepa* L.) mediante biobalística. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Posgraduados. México. 81p.
- Robin, Ch., Hay, M., Newton, P. 1994. Effect of light quality (red: far-red ratio) and defoliation treatments applied at a single phytometer on axillary bud outgrowth in *Trifolium repens* L. *Oecologia*. 100: 236-242.
- Rodríguez, A., Posada-Pérez, L., Kosky, R. C., Reyes, M., Tejada, M. 2009. Aclimatización de plantas de *Carica papaya* var. Maradol roja obtenidas por embriogénesis somática. *Biotec. Veg.* 9(2): 91-97.
- Saker, M. M., Bekheet, S. A., Taha, H.S. y Reda A. A. 1999. *In vitro* propagation of papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell and Tissue Culture Department, National Research Center, Cairo, Egypt*.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Producción agrícola de papaya (ciclo 2011). [Consultado 20 de febrero de 2018]. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351
- Schuabb, H. A., Souza, R. R., Zanchetta, P. L., De Souza-Filho, G. A. y Santa-Catarina, C., Silveyra, V. 2017. Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. *Acta Physiol Plant*. 52:1-14. DOI 10.1007/S11738-017-2349-1.
- Vela-Gutiérrez, G., Del Angel-Coronel, O. A., Cabrera-Ponce, J. L., Gómez-Lim, M. A., García-Galindo, H. S. Transformación de embriones de papaya maradol (*Carica papaya* L.) con el gen 9/13 de la lipoxigenasa. *RIIT*. 4(22):1-14.

- Warpeha, K. y Monrtgomery, B. 2015. Light and hormone interactions in the seeds-to-seedling transition. *Environmental and Experimental Botany*. Article in press.
- Xiao, C., Chang, Y., Wen, S., Li, W., Wen, G., Xu, X. 2017. Growth and nutritional properties of lettuce affected by different alternating intervals of red and blue LED irradiation. *Scientia Horticulturae*. 223: 44-52.
- Xue, X., Gang, Z., Ying, L., Ming, T., Wen W., Xue, H. 2013. Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under combination of red and blue light. *Scientia Horticulturae*. 153: 50-55.
- Yang, F., Feng, L., Liu, Q., Wu, X., Fan, Y., Raza, M., Cheng, Y., Chen, J., Wang, X., Yong, T., Liu, W., Liu, J., Du, J., Shu, K., Yang, W. 2018. Effect of interactions between light intensity and red-to- far-red ratio on the photosynthesis of soybean leaves under shade condition. *Environmental and Experimental Botany*. 150:79-87.
- Ying, Z., Yu, X. y Davis, M. J. 1999. New method for obtaining transgenic papaya plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 112:201-205.