



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“GERMINACIÓN, MICROINJERTACIÓN Y CULTIVO DE
CALLOS *IN VITRO* DE *Vasconcellea stipulata* V.M. Badillo Y
Vasconcellea pubescens A.DC”**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FINAL PARA LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE MAGISTER EN PLANTAS MEDICINALES**

Director: Prof. Ing. Walter I. Abedini

Tesista: Dra. Isabel Espinosa Soto

TABLA DE CONTENIDOS

1. MARCO TEÓRICO	10
1.1. LA FAMILIA CARICACEAE Y EL GÉNERO <i>VASCONCELLEA</i>	10
1.1.1. Componentes de las Caricáceas	13
1.1.1.1. El látex de las Caricaceaes	13
1.1.1.2. Recolección, tratamiento y rendimiento del látex	15
1.1.1.3. Componentes no enzimáticos de los frutos de <i>V. pubescens</i>	17
1.2. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	18
1.2.1. Clasificación de las enzimas proteolíticas	19
1.2.2. Usos medicinales de las enzimas proteolíticas	20
1.2.2.1. Investigación actual en Cisteín-proteasas.....	21
1.2.3. Papaína.....	22
1.2.3.1. Características fisicoquímicas de la papaína	23
1.2.3.2. Biodisponibilidad de papaína	24
1.2.3.3. Formas farmacéuticas	26
1.2.3.4. Seguridad.....	27
1.2.3.5. Panorama de la producción de papaína en el mundo	28
1.3. REVISIÓN AGRO-BOTÁNICA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS....	29
1.3.1. Descripción botánica de <i>Vasconcellea stipulata</i> V.M. Badillo	29
1.3.2. <i>Vasconcellea pubescens</i> A.DC	31
1.3.3. Prácticas de cultivo de <i>Vasconcellea Sp.</i>	33
1.3.3.1. Adaptabilidad ecológica	33
1.3.3.2. Propagación vegetativa.....	34
1.3.3.3. Propagación seminal.....	35
1.3.3.4. Técnicas de Siembra.....	37
1.3.3.5. Riego.....	38
1.3.3.6. Suelo y fertilización.....	38

1.3.3.7.	Ciclo biológico	38
1.3.3.8.	Plagas.....	39
1.4.	CULTIVO DE TEJIDOS EN ESPECIES DEL GÉNERO <i>VASCONCELLEA</i>	40
1.4.1.	Usos de la Biotecnología para la propagación vegetativa de <i>V. stipulata</i> y <i>V. pubescens</i>	41
1.4.2.	Germinación de semillas <i>in vitro</i>	42
1.4.3.	Microinjertación.....	43
1.4.4.	Embriogénesis somática	45
1.4.4.1.	Histología de los embriones somáticos	48
2.	OBJETIVOS	50
2.1.	OBJETIVO GENERAL	50
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1.	MATERIAL VEGETAL.....	51
3.1.1.	Determinación taxonómica y recolección.....	51
3.1.2.	Procesamiento y almacenamiento de las semillas	52
3.2.	TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS.....	53
3.2.1.	Laboratorio de biotecnología	53
3.2.2.	Condiciones generales de cultivo <i>in vitro</i>	53
3.2.3.	Descripción de experimentos.....	54
3.2.3.1.	Métodos de remoción de latencia	54
3.2.3.2.	Método de desinfección de semillas.....	54
3.2.3.3.	Germinación <i>in vitro</i>	55
3.2.3.4.	Microinjertación	56
3.2.3.5.	Cultivo de callos	56
3.2.3.6.	Inducción de embriogénesis indirecta	57

3.2.4. Estudios histológicos y morfológicos	58
3.3. DISEÑO ESTADÍSTICO	58
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1. Desinfección de semillas	59
4.2. Remoción de la latencia	61
4.3. Germinación <i>in vitro</i>	64
4.4. Microinjertación	66
4.5. Cultivo de callos	68
4.6. Embriogénesis indirecta	70
5. CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	77

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a las personas que padecen enfermedades crónico-degenerativas, a quienes esta maravillosa familia de plantas puede beneficiar mientras los alimenta.

Dedico también este esfuerzo a la conservación de las *Vasconcelleas*, frutales en peligro de extinción que habitan en las mismas tierras de donde provienen mis ancestros, cuya sabiduría también corre riesgo de desaparecer.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, José, mi compañero y amigo, Tea mi primera princesa y Maya, nuestra nueva fuente de alegría, quienes estuvieron a mi lado durante el transcurso de esta investigación, acompañándome a buscar las especies vegetales durante días enteros y en pueblos lejanos de mi querido Ecuador. ¡Gracias! por soportar las duras jornadas de trabajo frente a un computador, sin poder salir junto a ellos y suplirme en todas las tareas de casa que no pude hacer. Especialmente mil gracias a mi querida Tea por acompañarme y ayudarme con varias tareas en el laboratorio de biotecnología, y correr conmigo para no atrasarnos a la escuela.

A mi madre, inigualable ser humano y profesional. Entregada con toda el alma a sus hijos y fuente de cariño inagotable. Gracias por su paciencia en la revisión de este trabajo y su esmero en los pequeños detalles.

A Marta Colares, una de las profesoras más brillantes y agradables que he tenido en mi carrera. Le agradezco muchísimo haberme brindado su asesoría, su paciencia y su valioso tiempo.

A Walter Abedini, Director de Tesis, por abrirme con confianza las puertas a CEPROVE para realizar mi trabajo allí.

A Alicia Consolini, Directora de la Maestría en Plantas Medicinales quien desde el inicio de estos estudios de postgrado se mostró como una persona atenta y siempre dispuesta a ayudar.

A todos los profesores de la Maestría en Plantas Medicinales de la Universidad Nacional de La Plata, excelentes profesionales que me brindaron generosamente sus conocimientos.

A mis compañeros de maestría Daniel, Diana y Carolina, quienes siempre estuvieron cerca para ayudarme y brindarme su amistad.

A mis grandes amigos Paola y Esteban por abrir y cerrar nuestro camino en La Plata.

A mi padre, por ayudarnos a preparar un nido a donde volver.

Al Dr. Leonardo Astudillo, médico de cabecera y maestro desde la infancia quien me introdujo en el arte y la ciencia de la medicina natural.

Al Dr. Antonio Crespo, quien me puso en el camino de la Fitoterapia, madre de la medicina de todos los tiempos y esperanza para la salud de la humanidad.

INTRODUCCIÓN

Las especies objeto del presente estudio pertenecen al género *Vasconcellea*, miembros de la familia Caricaceae. La especie más conocida de esta familia es la papaya (*Carica papaya* L.) que produce la fuente comercial más importante, si no única, de la enzima proteolítica papaína. La droga vegetal de estas especies es el látex circulante, el cual contiene altas cantidades de esta enzima que constituye el principio activo de estas plantas.

La papaína tiene importantes usos industriales. En el mercado gastronómico se la utiliza como ablandador de carnes y clarificador de la cerveza; en la cosmética se la utiliza como agente exfoliante químico (*peeling*) y en la última década ha empezado a utilizarse en el área de la salud como suplemento dietario que ayuda a los procesos digestivos. Se ha promovido su uso para mejorar el flujo linfático, como expectorante, antiedematoso, hipolipemiante y desinflamatorio. Su uso tópico para mejorar la cicatrización de heridas ha sido ampliamente probado. Actualmente existen varias líneas de investigación en torno a nuevas familias de quimioterápicos para combatir distintos tipos de cáncer, que provienen de esta familia enzimática, la misma que aún no ha podido ser reemplazada por ningún otro sustituto sintético.

En relación a la papaya, se ha descrito que una de las papayuelas de altura, la especie andina llamada comúnmente toronche (*Vasconcellea stipulata* V.M. Badillo), tiene un látex con actividad proteolítica hasta 17 veces más alta que la encontrada en *C. papaya* (Scheldeman, 2002), lo que la convierte en una especie de gran interés económico.

En varias poblaciones rurales de regiones andinas y centroamericanas se utilizan con fines etnomédicos las hojas, el látex y el fruto de estas especies del género *Vasconcellea* para curar distintas dolencias como la parasitosis, dolores y lesiones musculares, tos, verrugas, entre otras. Sin embargo, el conocimiento médico-tradicional presenta la particularidad de perderse con el paso del tiempo al igual que las papayuelas mismas, las cuales han sido declaradas especies vulnerables que se encuentran en peligro de extinción, en especial *V. stipulata*. (Encalada, *et al.* 2003).

Por otra parte, el chamburo (*Vasconcellea pubescens* A.DC), otra papayuela también de origen andino, ha sido cultivado más ampliamente que *V. stipulata* y ha

presentado buena tolerancia a distintos tipos de suelos y pisos climáticos. Es decir, su manejo en agricultura está mejor definido, sin embargo, comparativamente, la producción de estas especies de *Vasconcelleas* es ínfima en relación con la papaya.

Con el perfeccionamiento de las técnicas biotecnológicas se pueden cumplir varias metas importantes que surgen frente a este panorama. El primero es mejorar la obtención de la enzima papaína mediante la creación de plantas injertadas que sean potencialmente más rentables en la producción de la enzima que la papaya; el segundo es ayudar a la propagación y rescate de especies en peligro de extinción y, por último, recuperar el conocimiento ancestral andino en relación con las papayuelas de altura.

Para esta investigación se ha programado evaluar y establecer protocolos de germinación de semillas *in vitro* de las dos especies mencionadas, pues su proceso germinativo es dificultoso y requiere, para su optimización, un pre-tratamiento con distintos agentes y condiciones.

Además, se ha planteado realizar microinjertos *in vitro* entre dos especies de *Vasconcelleas*, para lo cual se ha escogido *V. pubescens* para ser el pie o patrón del injerto y el *V. stipulata* como el ápice o púa del mismo. Al conseguir plantas libres de enfermedades, la microinjertación *in vitro* permitiría reducir el uso de agentes químicos para el control de patógenos, dando como resultado un medio ambiente con menos contaminación y reducción de costos. A la fecha, no existe un protocolo establecido para la microinjertación de *V. stipulata* y *V. pubescens*, y por ende, es necesario el desarrollo de una técnica mejorada.

Adicionalmente, se planteó el objetivo de ensayar un protocolo para la generación *in vitro* de callos morfogénicos del cuello radicular de plántulas de *V. stipulata* e inducir la embriogénesis somática. Esta técnica biotecnológica es de gran utilidad para la propagación masiva de esta especie, considerando que el índice de germinación de semillas de la misma es muy bajo, lo que dificulta las prácticas de cultivo a mediana y gran escala, y la vuelve aún más vulnerable a la extinción.

Para cumplir con los objetivos planteados fue indispensable el apoyo de un grupo humano altamente capacitado y de un espacio competente y equipado; así, se contó con el Centro Experimental de Propagación Vegetativa (C.E.Pro.Ve.) perteneciente a

la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata,
provincia de Buenos Aires, Argentina.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. LA FAMILIA CARICACEAE Y EL GÉNERO *VASCONCELLEA*

La familia Caricaceae comprende 6 géneros y más de 50 especies (entre 30 y 60 según distintos autores), distribuidas a través del trópico desde el nivel del mar hasta los 3500 m. de altura. En América se encuentran cinco de los seis géneros, con excepción de *Cylicomorpha* (África). La especie económicamente más importante y distintiva de la familia es la papaya común (*Carica papaya* L.) que pertenece al género *Carica* el cual es monotípico. Puede encontrarse con los nombres comunes de papaya, papayo, mamón, lechosa, entre otros. Se la puede hallar en floración y fructificación durante casi todo el año. Se distribuye ampliamente en América tropical, incluyendo México, Sudamérica y las Antillas. Desde hace varias décadas, la papaya ha sido la fuente más importante de papaína natural con fines industriales, sin poder ser reemplazada en la actualidad por ningún otro sustituto sintético.

El presente trabajo tratará sobre el género *Vasconcellea*, menos conocido, pero también perteneciente a la familia de las Caricáceas, el cual contempla especies nativas que pueden ser encontradas desde México hasta el norte de Argentina en alturas comprendidas entre los 1700 a 3500 msnm. Cuenta con 21 especies y un híbrido natural.

El género *Vasconcellea* se consideraba anteriormente una sección del género *Carica*, el cual fue rehabilitado por Badillo (2000) sobre la base de caracteres morfológicos y genéticos. Los estudios de divergencia genética entre ambos géneros fluctúa entre 73 y 77% (Kyndt *et al.*, 2005). Cuenta con 21 especies de Caricaceae, lo que lo convierte en el mayor de los seis géneros de la familia. Se encuentra con más frecuencia a lo largo de los Andes en América del Sur desde el nivel del mar hasta cerca de los 3500 m, con una concentración de especies en Ecuador, donde se pueden hallar 16 de las 21 especies (Kyndt *et al.*, 2005).

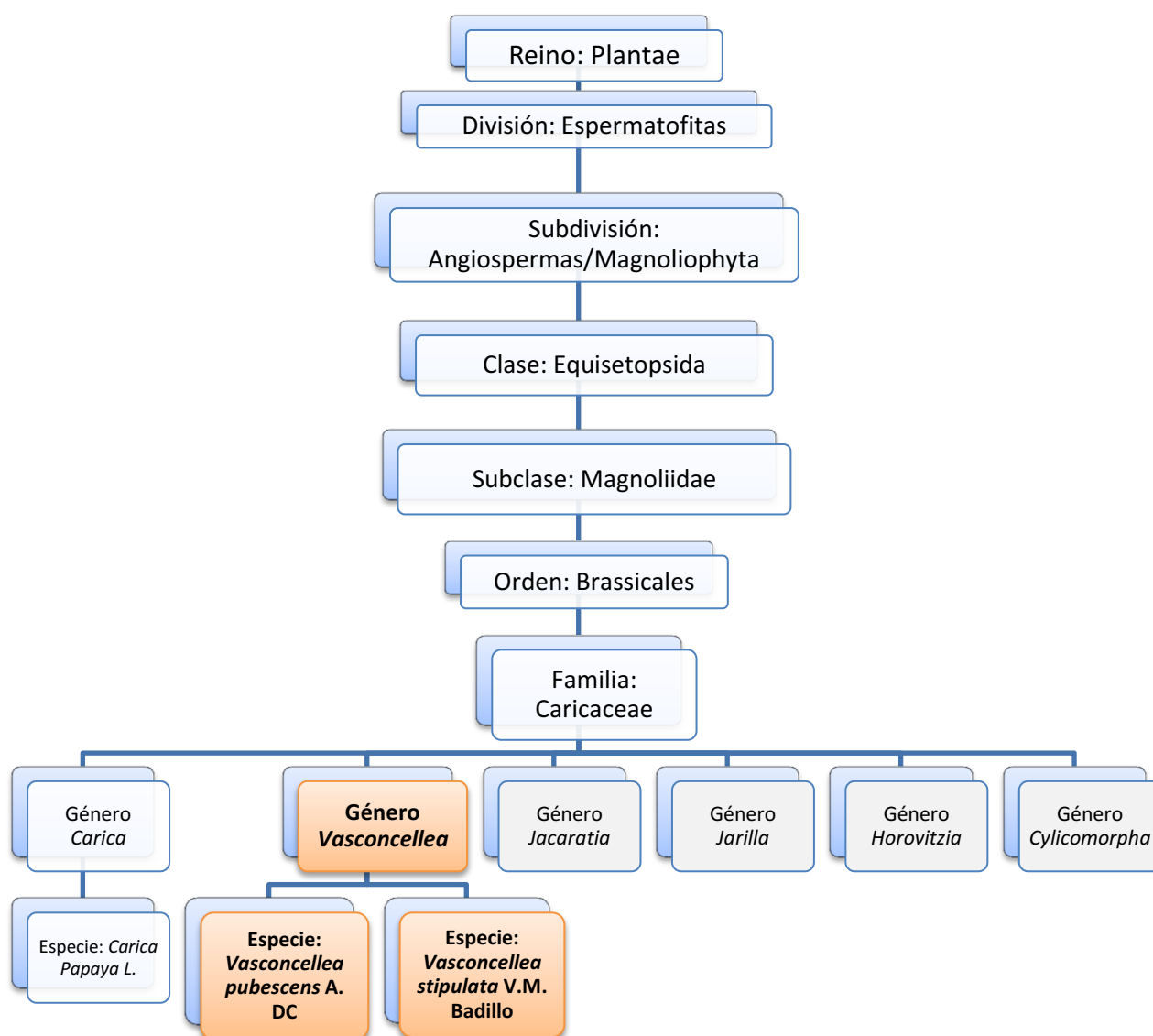


Gráfico 1. Clasificación taxonómica de las especies de *Vasconcelleas* estudiadas en el presente trabajo
Fuente: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 2014

En el Ecuador existe un híbrido natural muy consumido por la población general, el babaco (*Vasconcellea* × *heilbornii* V.M. Badillo) el cual es cultivado ampliamente en la Sierra ecuatoriana por ser una de las frutas más comunes de consumo general. En las últimas décadas su producción es cada vez más importante, llegando inclusive a cultivarse para exportación pues presenta un delicado sabor similar a naranja, frutilla y piña juntos.



Foto 1. Babaco (*Vasconcellea* × *heilbornii* V.M. Badillo)
Fuente: Grupo Tollupol, 2014



Foto 2. Venta de jugos con babaco en Mercado Municipal Loja, Ecuador.
Fuente: I. Espinosa 2014

Por otra parte, los demás miembros del género *Vasconcellea* son consumidos tradicionalmente, aunque en mínima escala en el sur de Ecuador como en otras regiones andinas compartiendo los nombres comunes de papayo de altura, papayo de monte, chihualcán, chamburo, sigalón, entre otros (Badillo, 1971). Probablemente ellas hayan sido obtenidas de los bosques andinos y puestas en cultivo en los huertos familiares, pues presentan un agradable aroma y alto grado de fragancia (mayor a la del babaco) por su alta concentración de terpenos en sus frutos.

V. pubescens y *V. stipulata* tienen frutos que en estado maduro se consumen crudos o cocidos en forma de mermeladas y bebidas; además, como se ha mencionado, sus hojas y látex se usan en medicina tradicional para diversas afecciones (Acosta-Solís, 1992).

Como miembros de la familia Caricaceae, las especies del género *Vasconcellea* también son una buena fuente de enzimas proteolíticas. La droga vegetal de estas especies es el látex circulante, el cual contiene altas cantidades de papaína y otras enzimas proteolíticas que constituyen principios activos de estas plantas (Walraevens, *et al.*, 1993).

Muchas de estas especies se consideran en peligro de extinción (Encalada *et al.*, 2003), como la especie *V. stipulata*. La región austral del Ecuador es uno de los pocos lugares del mundo donde se pueden encontrar variedades casi extintas del género *Vasconcellea*, debido a las especiales condiciones climáticas que presenta.

Resulta indispensable, por lo tanto, conservar y fomentar el cultivo de estas especies *in situ*, con el fin de que constituyan una fuente de alimento y medicina para las comunidades locales, explotar su uso en programas de mejoramiento y producción con el fin de contribuir al incremento del ingreso de los agricultores (Encalada, *et al.*, 2003).

1.1.1. Componentes de las Caricáceas

Las especies de la familia Caricaceae presentan conductos laticíferos en casi todas sus estructuras, incluyendo tallos, ramas y peciolos. En estos elementos se produce una sustancia líquida blanquecina, la cual es exudada ante una lesión física. La mayor cantidad de este látex circulante se encuentra en sus frutos en estado inmaduro, probablemente como mecanismo de defensa para prevenir el consumo de las semillas por sus predadores antes de que se encuentren totalmente desarrolladas. (Mundo y Serrano, 2012).

1.1.1.1. El látex de las Caricáceas

Del látex de las Caricaceae se obtienen cantidades proporcionalmente grandes de enzimas proteolíticas. Cada especie de esta familia presenta diferente composición de proteasas en este fluido. *C. papaya* es la principal productora comercial de estas enzimas dentro de la familia, por lo cual los estudios son abundantes para esta especie. Se han encontrado en ella: papaína, quimopapaína, caricaina (proteína omega) y glicyl-endopeptidasa (proteína de papaya IV), todas ellas pertenecientes a la familia C1 del clan CA. (El Moussaoui *et al.*, 2001).

Estudios en *V. x heilbornii* mostraron actividad proteolítica más intensa que la de la papaya (Dhuique Mayer *et al.*, 2001). Por este motivo, Schledemann (2002) realizó estudios a otras especies del género, encontrando que la especie *V. stipulata* posee un látex que tiene 17 veces más actividad proteolítica que el látex de la papaya.

Especies	Actividad proteolítica (mU BAPNA/mg látex seco)
<i>C. papaya</i> (referencia)	10.4
<i>V. pubescens</i>	57.0
<i>V. stipulata</i>	129.4
<i>V. x heilbornii</i> “babaco”	38.1

Tabla 1. Actividad enzimática de papaína en algunas especies de *Vasconcellea*
Fuente: Scheldeman, 2002



Foto 3. Látex de fruto inmaduro de *V. Stipulata* Jardín Botánico Loja
Fuente: I. Espinosa 2014

Se han realizado ensayos a nivel experimental sobre el contenido de enzimas proteolíticas de *V. pubescens* en los cuales se ha encontrado cuatro proteinasas: CC-I a CC-IV, de las cuales, CC-I corresponde a papaína y CC-III corresponde a quimopapaina (Walraevens *et al.*, 1993). Kyndt *et al.* (2007) plantean en su investigación que el marcado incremento en la actividad proteolítica de diferentes especies de *Vasconcellea* en relación a *C.papaya* puede ser explicada por la presencia de varias isoformas de papaína encontradas en estas especies, en contraste con la única isoforma de papaína presente en *C. papaya*. Este equipo de investigación encontró también la cistein proteinasa CC-23 en *V.pubescens* que no había sido descrita anteriormente.

1.1.1.2.Recolección, tratamiento y rendimiento del látex

Para la producción de papaína se requiere el látex extraído de los frutos de las diferentes especies de caricáceas. En el siguiente apartado se explicarán las técnicas utilizadas en *C. papaya*, pues de esta especie es de donde se ha estudiado mayormente la obtención de la papaína comercial.

El proceso de extracción se conoce como lechada. En el fruto verde se pueden hacer de 2 a 4 lechadas antes de su maduración. La primera etapa consiste en realizar 3 incisiones longitudinales de 2 a 3 mm de profundidad en el fruto verde. Por gravedad el látex se derramará, teniendo que ser recolectado en bastidores en los que se acumula y se extrae para ser almacenado en bolsas plásticas, bandejas u otros contenedores. Es conocido que existen factores que pueden influir en la cantidad de látex extraído. Hay autores que recomiendan que las mejores horas para realizar las operaciones de incisión y recolección del látex son en la mañana y con un clima nublado, sin embargo, otros investigadores han encontrado que esto solamente influye en el porcentaje de humedad del látex, pero no en su actividad (Madrigal *et al.*, 1980). Otros autores, como Scheldeman (2002) mencionan que la actividad proteolítica del látex se afecta por factores tales como el sexo de la planta, la madurez de los frutos y la manera de realizar las incisiones.

Durante el procedimiento de extracción los mismos frutos son cortados nuevamente en diferentes lugares en intervalos semanales. Estos frutos son comestibles, por lo que el látex y el fruto son utilizados.

El rendimiento del látex es óptimo durante los dos primeros años de producción, se recomienda utilizar los frutos inmaduros de *C. papaya* que tengan una edad de entre 2,5 a 3 meses (Chaverri, 1983).

El látex líquido tiene el nombre de papaína cruda y puede ser secada al sol o en hornos desecadores a temperaturas que no superen los 55°C por varias horas. Actualmente se utiliza también procesos de secado más eficientes como el secado por atomización o aspersion (secado spray) o la liofilización (Mundo y Serrano, 2012). A partir de la obtención y desecación del látex fresco el proceso continúa con las siguientes etapas: precipitación, desalinización y liofilización. (Quino, *et al.*,

2010). Para conservar la actividad enzimática, es recomendable almacenar el látex a bajas temperaturas, en envases herméticos y protegidos de la luz.

El rendimiento de látex, resulta de la correlación de los siguientes factores: volumen de látex por fruto, número de frutos verdes por planta y número de plantas por hectárea.

La obtención de papaína cruda en *C. papaya* es de alrededor de 200 g por cada kg de látex fresco, sin embargo hay autores que reportan un rango de rendimiento del 11% a 54,9% (Sheldeman, 2002). Lassoudière (1969) calcula para cultivos de este frutal que el rendimiento es de 100 kg de látex por hectárea por año, mientras que Quino, *et al.* (2008) han reportado rendimientos de 20 a 25 kg de papaína seca por hectárea durante el primer año; 90 a 100 kg durante el segundo; 60 a 90 kg en el tercero; 30 a 40 kg en el cuarto, y 20 kg o menos en el quinto.

En cuanto a las especies de *Vasconcelleas*, los estudios del rendimiento por unidad de superficie son muy pocos. Conteos en plantas de huertos indican que *V. pubescens* puede producir 50-60 frutos en un período de crecimiento que dura aproximadamente 4 meses (FAO, 1992). *V. pubescens* tiene una producción continua durante todo el año (CAF, 1992). FAO (1992) menciona para *V. pubescens* una producción de alrededor de 200 frutos por planta, que resulta en 60 toneladas por hectárea anuales. El ciclo biológico es de aproximadamente 5 años, sin embargo se reporta que puede alcanzar a 25 años.

En el estudio de Vidal, *et al.* (2009) realizado en la región del Bío Bío en Chile, se encontró que en los meses de enero-febrero se presentó el rendimiento más alto de látex, del orden de 0,7 mL/fruto (4-6 mL/planta promedio). El resto del año los rendimientos fueron más bajos, llegando incluso a cero en la estación de otoño, lo que coincide con el bajo número de frutos verdes presentes en esa época. Aunque en la época invernal la actividad enzimática permanece igual, en la región del Bío Bío el número de frutos no hace sustentable la extracción del látex en estos meses del año. Sin embargo, en la región ecuatorial, al no presentar estacionalidad, se ha reportado que la producción del fruto de *V. pubescens* es constante, por lo que es necesario realizar estudios similares al mencionado para valorar el rendimiento mensual de este recurso.

1.1.1.3. Componentes no enzimáticos de los frutos de *V. pubescens*

Los frutos de *V. pubescens* han sido más estudiados que los de *V. stipulata* en cuanto a sus componentes. Bernal y Correa (1990) analizaron la composición nutricional de la pulpa de, *V. pubescens* la cual corresponde al 45% del peso de la fruta en fresco. Los hallazgos derivados de este análisis se resumen en la siguiente tabla:

COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE 100 G DE CHAMBURO	
agua	93.5 g
proteínas	0.7 g
grasas	0.1 g
carbohidratos	3.9 g
fibra	1.2 g
ceniza	0.6 g
calcio	10 mg
fósforo	11 mg
hierro	0.3 mg
vitamina A	100 U.I.
tiamina	0.03 mg
riboflavina	0.03 mg
niacina	0.06 mg
ácido ascórbico	70 mg
calorías	16.

Tabla 2. Componentes físico-químicos de la pulpa del fruto de *V. pubescens*
Fuente: Bernal y Correa, 1990.

Simirgiotis *et al.* (2009) aislaron glicósidos de rutina y manghaslina de los frutos de *V. pubescens* cultivados en Chile, mediante fraccionamiento selectivo usando el ensayo de radicales libres DPPH. Además, 19 compuestos fenólicos fueron identificados por primera vez en los frutos mediante HPLC, UV y espectrometría de masas. Diez de estos compuestos se caracterizaron tentativamente como glicósidos del ácido hidroxicinámico y nueve como derivados de glicósidos de quercetina. Varias de estas sustancias de bajo peso molecular se están investigando en la actualidad por sus propiedades antioxidantes y algunas de ellas han demostrado efectos fitomedicinales muy notables en el aparato cardiovascular (Rangel-Huerta, *et al.* 2015).

En *V. pubescens*, Noriega, *et al.* (2014) detectaron un total de 38 compuestos volátiles en sus frutos. Se identificaron a 20 de ellos, lo que equivale al 92,65 %. Los compuestos más abundantes identificados fueron: etil-hexanoato con el 44,211 %; etil-butanoato con el 12,352 %; 1-octanol 9,142 % y el linalol con el 6,529 %.

Puede concluirse que los frutos presentan también cantidades interesantes de metabolitos primarios y secundarios de acción medicinal, sin embargo, la principal droga vegetal de la familia Caricaceae la constituye el látex, por la gran cantidad que poseen estas especies vegetales.

1.2. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las enzimas son proteínas que actúan como poderosos catalizadores, moléculas que aceleran una reacción química al reducir su energía de activación. Su característica más llamativa es su elevada especificidad de sustrato, así como su especificidad de acción.

Las enzimas proteolíticas son llamadas también proteasas, proteinasas o peptidasas y se clasifican en grupos o clases por su acción específica. Es así que las enzimas proteolíticas forman parte de un grupo mayor llamado hidrolasas, pues catalizan reacciones de hidrólisis. Este grupo enzimático permite escindir moléculas de alto peso molecular, con enlaces peptídicos, ésteres o glicosídicos, mediante una reacción con moléculas de H₂O.

Las hidrolasas forman parte de procesos metabólicos importantes en los vegetales, hallándose en ellos en forma de proteasas, pectinasas, xilanasas, esterasas, poligalacturonidasas y celulasas. De estas, las proteasas o enzimas proteolíticas son las que posiblemente tienen en la actualidad un mayor interés comercial e investigativo, pues constituyen las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mundo (Barrett *et al.*, 2004). La mayor parte se origina de fuentes microbianas, sin embargo, la papaína, bromelina y ficina siguen siendo obtenidas directamente de la papaya, piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) e higo (*Ficus carica* L.) respectivamente, y se usan en un gran número de procesos industriales en los cuales no tienen todavía un reemplazo. Obregon (2008) afirma que en actualidad

existe un gran número de proteasas vegetales que todavía no han sido aisladas ni caracterizadas.

1.2.1. Clasificación de las enzimas proteolíticas

Las peptidasas se dividen en dos grandes grupos según la ubicación de los enlaces hidrolizados: las endopeptidasas, las cuales rompen uniones peptídicas en distintos puntos al interior de las proteínas y las exopeptidasas, las cuales remueven aminoácidos desde los extremos amino o carboxilo (Obregon, 2008). La clasificación en clanes se basa en la molécula que utiliza la enzima para hidrolizar el enlace peptídico, las mismas que pueden ser: los aminoácidos Serina, Cisteína y Treonina (en las serin, cistein y treonin proteasas) o una molécula de agua (en las aspartil, metalo- y glutamil peptidasas).

Una de las mejores fuentes de referencia acerca de las enzimas proteolíticas y las proteínas que las inhiben es la base de datos MEROPS, la cual describe y clasifica cada una de las peptidasas. Bajo este sistema de clasificación se ha establecido una nomenclatura basada en la estructura jerárquica de cada peptidasa. Además, se les ha asignado una familia en base a las similitudes estructurales que presentan en relación a la secuencia de sus aminoácidos. Las familias que se cree que son homólogas se han agrupado juntas en un clan (Rawlings, *et al.*, 2008).

Las peptidasas cisteínicas son las proteasas más extensamente estudiadas. Ejemplo de ellas en los vegetales, además de la papaína, son la ficina, la bromelina y la actinidina. En el reino animal también se encuentran presentes, tales como las calpaínas citosólicas en los mamíferos y proteasas de parásitos encontrados en el género *Trypanosoma*, por ejemplo.

La primera enzima proteolítica reconocida como cisteín-proteasa fue la papaína y la mayoría de las peptidasas vegetales forman parte de su familia (C1) y clan al que pertenece (CA). La papaína es la enzima que ha sido investigada con mayor profundidad, fue la primera proteinasa cisteínica a la cual se la describió en su estructura 3D, por lo cual se la considera el prototipo de este tipo de enzimas (Drenth, *et al.*, 1968).

1.2.2. Usos medicinales de las enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas encontradas en las plantas han sido utilizadas con fines culinarios y medicinales desde tiempos inmemoriales por varias poblaciones alrededor de mundo. Por ejemplo, la ficina del higo se utiliza en Sudamérica como antiparasitario y mucolítico en preparaciones fitoterápicas de uso popular. La bromelina obtenida de la piña al igual que la papaína han sido utilizadas tradicionalmente para tratar inflamaciones y traumatismos, así como coadyuvante en enfermedades respiratorias.

El consumo estas enzimas como suplemento alimentario es cada vez más frecuente debido a la evidencia científica que aumenta progresivamente, y respalda muchos de los usos tradicionales. Esto ha resultado en un aumento en la comercialización internacional de cápsulas y preparados nutricionales de venta libre.

Las propiedades antiparasitarias de estas proteasas vegetales han sido investigadas en múltiples ocasiones, dado su uso tradicional con este propósito en diferentes culturas. Mansur, *et al.* (2014) plantea que se produce por desintegración de las cubiertas externas o tegumentos de los parásitos intestinales del tipo vermes. A pesar de que también se encuentra muy utilizado en la medicina tradicional para prevenir y tratar las amebiasis, no se han realizado todavía suficientes estudios que respalden su eficacia.

Distintos autores concuerdan en que las enzimas proteolíticas vegetales tienen potentes efectos laxantes y digestivos provocados por la propia proteólisis, la cual produce irritación leve de las paredes intestinales y descomposición de los alimentos de origen proteínico que se encuentran en el lumen intestinal. Su efecto tiene relación con la dosis, pues si se utiliza en escasa cantidad, actúa como un digestivo suave facilitando la ingesta de comidas copiosas, mientras que si se utiliza en grandes dosis, su efecto es laxante.

Existen cada vez más evidencias de su uso seguro y prometedor también en otras enfermedades. Por ejemplo, se ha encontrado que su uso en preparados tópicos o ungüentos cicatrizantes, mejora la curación de heridas y evita la hiperqueratinización de las mismas (Pieper, y Caliri, 2003). Hay evidencia de que el consumo de papaína mejora el drenaje de líquidos y evita la inflamación en pacientes postquirúrgicos. En

este sentido, la papaína mejora el flujo linfático para prevenir el edema y evitar las adherencias internas por sus propiedades fibrinolíticas (Hellebrekers, *et al.*, 2000).

En cuanto al sistema respiratorio, las enzimas vegetales se utilizan de manera tradicional así como en medicina convencional para fluidificar el mucus depositado en las vías respiratorias, facilitando la expulsión del mismo de senos paranasales, laringe, tráquea y bronquios (Pfizer, 2016)

Se cree que su mecanismo de acción se basa en la hidrólisis de diferentes enlaces peptídicos involucrados en procesos patológicos. Por este motivo, en la actualidad, el uso de enzimas o consumo de plantas que las contengan ha sido estudiado farmacológicamente en diversas afecciones de tipo crónico-degenerativo con un gran impacto social.

Los pacientes que padecen enfermedades reumáticas han reportado un alivio muy importante de su sintomatología, posiblemente asociada a la degradación de proteínas proinflamatorias endógenas (Leipner, *et al.*, 2001). Desser, *et al.* (2001) hallaron en su investigación que la terapia con enzimas proteolíticas por vía oral reduce considerablemente los niveles de TGF- beta1, citocina que se encontró elevada previamente en pacientes con artritis reumatoide, osteomielofibrosis y herpes zoster.

Sin duda, la hipótesis más interesante, pero todavía en vías de estudio, es el posible efecto anticancerígeno de las enzimas proteolíticas vegetales. Esto se explica porque los tumores se hallan cubiertos por una matriz extracelular conformada por proteoglicanos, ácido hialurónico, colágeno, elastina, laminina y otras proteínas estructurales que restringen la difusión de las drogas antineoplásicas. En el estudio de Parodi, *et al.* (2014), las enzimas proteolíticas aumentaron la difusión de nanopartículas de sílica en tumores *in vivo* e *in vitro*. Así mismo, teóricamente este mecanismo facilitaría el combate del sistema inmune a los tumores mejorando su acceso al tejido maligno.

1.2.2.1. Investigación actual en Cisteín-proteasas

La familia de la papaína (clan CA) es una de las más grandes y mejor estudiadas subfamilias de cistein-proteasas. Un gran número de enzimas en esta familia ha

mostrado estar relacionada con procesos fisiológicos tales como presentación de antígenos, remodelación ósea y regulación transcripcional, así como en importantes procesos patológicos: artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer y cáncer. Como resultado de esto, un esfuerzo significativo ha sido realizado en estos últimos 20 años para desarrollar inhibidores selectivos de miembros de esta familia con el objetivo de adquirir una mejor comprensión de los roles específicos de estas proteasas en determinados estados patológicos y así encontrar potenciales nuevos agentes terapéuticos. (Zatz y Starling, 2005)

Las calpaínas son una familia compleja (ubicua o específica de tejidos) de cisteín-proteasas intracelulares que funcionan en una amplia variedad de actividades celulares. Proteolizan una variedad de sustratos, conducen a su degradación o su modulación funcional y están implicadas en varios fenómenos fisiopatológicos. En la biología de las células sanas como en las tumorales, las calpaínas están involucradas en los procesos de progresión tumoral que incluyen: proliferación celular, muerte celular programada, mecanismos de supervivencia, remodelación del citoesqueleto, migración e invasividad. Tienen una expresión aberrante en muchos tipos distintos de cáncer y se ha encontrado que una variedad de drogas anticancerígenas inducen citotoxicidad a través de la activación de las calpaínas o estas últimas pueden influir en la respuesta a la terapia. (Moretti, *et al.*, 2014). Además se investiga la función del sistema de la calpaína en la respuesta a los tratamientos del cáncer de mama, incluyendo nuevos tratamientos quimioterápicos, endocrinos, terapias dirigidas e inclusive en la progresión y pronóstico de la enfermedad. (Storr, *et al.*, 2015).

1.2.3. Papaína

La papaína es una de las enzimas proteolíticas extraídas del fruto inmaduro de la papaya (*Carica papaya* L.) y otros miembros de la familia Caricaceae. Es una proteína que pertenece a la familia de las cisteín-proteasas y está compuesta de 212 aminoácidos que se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente, el cual tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre del cual depende su actividad proteolítica. Es una enzima de baja especificidad que hidroliza tanto las proteínas como los péptidos de pequeño tamaño, amidas y ésteres. Preferentemente actúa sobre

los aminoácidos básicos Leucina, Glicina, así como sobre Arginina, Lisina y Fenilalanina (Wong, 1995).

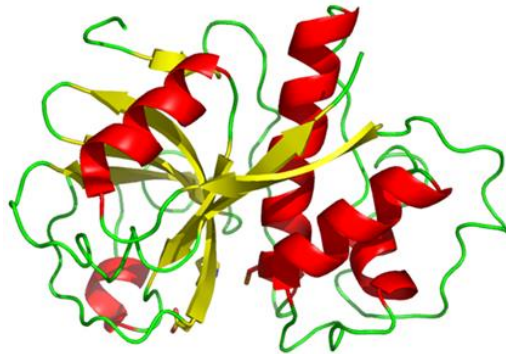


Gráfico 2. Estructura tridimensional de la papaína
Fuente: Botanischer Garten (2016)

La papaína, al provocar la ruptura de múltiples enlaces en proteínas animales y vegetales, tiene importantes usos industriales. En el mercado gastronómico se la utiliza como ablandador de carnes y para evitar la formación de sedimentos proteicos en la cerveza (clarificador). Sus propiedades la hacen irremplazable por algún otro sustituto sintético. (Banchon, 2005).

En la cosmética se la usa como agente exfoliante químico (*peeling*) que remueve las capas superficiales de la piel.

1.2.3.1. Características fisicoquímicas de la papaína

- Activadores: Es activada por el aminoácido cisteína, el tiosulfato y el glutatión. Es inhibida o inactivada por iones metálicos (Zn, Cd, Fe, Pb), oxidantes (H_2O_2 , radicales libres, etc.) y por agentes que reaccionan con los tioles (ácido ascórbico).

Su actividad proteolítica puede ser medida de distintas maneras. Una de las unidades más usadas es: PU/U/USP= unidades de papaína, cantidad de enzima que libera el equivalente a 1 μ g de tirosina por hora bajo condiciones de laboratorio.

- Actividad óptima: Esta enzima presenta su mejor actividad en un pH de 5,0 a 7,0 y a una temperatura de 65°C.

- Peso molecular: de 23.406 Da
- Solubilidad y estabilidad en soluciones: papaína es soluble en agua a 10 mg/ml. Inmediatamente antes de realizar su valoración sobre su actividad proteolítica, la enzima debe ser diluida en un buffer que contenga 5mM L-cisteína. Los agentes estabilizantes incluyen EDTA, cisteína y dimercaptopropanol. Como las soluciones de papaína son estables en diferentes rangos de temperatura, la estabilidad depende del pH circundante. Las soluciones son inestables en un medio ácido. Con un pH menor a 2,8 las soluciones pierden una parte significativa de su actividad. La pérdida de la actividad de la enzima en una solución es de alrededor de 12% por día, probablemente como resultado de autólisis y/u oxidación. Las soluciones de papaína son estables frente a varios agentes desnaturalizantes, por ejemplo, su actividad completa se mantiene después de la recristalización en metanol al 70% y en soluciones de urea 8 M. Sin embargo, hay una pérdida significativa de su actividad cuando la papaína es expuesta a ácido tricloroacético al 10% o a clorhidrato de guanidina a 6M (Mundo y Serrano, 2012; Sigma-Aldrich, 2015).

1.2.3.2. Biodisponibilidad de papaína

La biodisponibilidad oral y la efectividad de las enzimas proteolíticas tales como tripsina, quimotripsina, papaína y bromelina han sido discutida desde su introducción al mercado como suplementos con actividad anti-inflamatoria, anti-edematosa e inmunoestimulante.

Una de las mayores razones para esta controversia tiene relación con la susceptibilidad de las enzimas proteolíticas en el medio gástrico. Sin embargo, a pesar de que en muchos casos sí existe una degradación ante un pH tan bajo como el encontrado en el estómago, existen proteinasas que son estables aún dentro de este entorno.

Actualmente, dentro del proceso de estudio de la biodisponibilidad oral de estas enzimas vegetales persiste el debate, pues existen reales dificultades en su valoración *in vivo*. En sangre las enzimas proteolíticas se unen a antiproteinasas y por lo tanto son difíciles de cuantificar con pruebas inmunológicas y enzimáticas que tienden a subestimarse; lo contrario sucede con los métodos radioquímicos, en los cuales su

contenido tiende a sobreestimarse. No obstante, la cuantificación como un parámetro objetivo es fundamental para cualquier estudio de biodisponibilidad. Independientemente de estas dificultades analíticas, hoy en día se acepta que las enzimas proteolíticas cuando son administradas oralmente al ser humano pueden ser detectadas en el plasma sanguíneo y la linfa intactas como moléculas de alto peso molecular y proteínas fisiológicamente activas. (Kolac, *et al.* 1996). Lo mismo sucede con péptidos y moléculas grandes de proteínas, varias investigaciones han confirmado que pasan a través de la barrera mucosa del tracto gastrointestinal (Lorkowski, 2012).

Usando monocapas de células Caco-2 como modelo, se hicieron algunos progresos para comprender mejor el mecanismo por el cual las moléculas grandes atraviesan la barrera intestinal. Las enzimas proteolíticas tripsina, quimotripsina, papaína y bromelina administradas sin recubrimiento entérico disminuyeron la resistencia eléctrica transepitelial y al mismo tiempo aumentaron el transporte de marcadores fluorescentes que normalmente no son transportados a través de la monocapa de células Caco-2. Los resultados sugieren que las enzimas proteolíticas son capaces de aumentar la permeabilidad de la mucosa y del epitelio, y por lo tanto, facilitar su propia absorción por un mecanismo de difusión paracelular auto-mejorada. (Kolac, *et al.* 1996). Este mecanismo de transporte paracelular resulta de la concentración sub-nanomolar de moléculas de proteasa que se encuentran libres transitoriamente o en un complejo con anti-proteasas en concentraciones más altas. (Lorkowski, 2012).

Los datos de investigaciones farmacocinéticas revelan linealidad de dosis para los niveles plasmáticos máximos de proteasas y una alta variabilidad interindividual. Se ha encontrado que la absorción sigue una farmacocinética inusual en todos sus pasos, incluyendo la eliminación, debido a una velocidad lenta de absorción y una rápida unión al 100% a anti-proteasas. El empleo oral de proteasas conduce a un aumento de la actividad proteolítica en suero y un aumento de las concentraciones plasmáticas de las correspondientes anti-proteasas. Su actividad biológica se determina por su actividad proteolítica como proteasas libres en péptidos solubles/proteínas o receptores de membrana celular (por ejemplo, receptores de la proteasa activada) y su actividad se establece mediante el complejo formado con anti-proteasas específicas y/o inespecíficas. Los complejos anti-proteasa durante las reacciones

inmunes y las lesiones corporales se asocian frecuentemente con diferentes citoquinas y factores de crecimiento que luego se eliminan de los fluidos corporales y los tejidos mediante endocitosis mediada por receptores en los hepatocitos y células sanguíneas. (Lorkowski, 2012).

1.2.3.3. Formas farmacéuticas

Para conservar su efectividad terapéutica, las proteasas animales tales como la tripsina y la quimotripsina presentan para su comercialización farmacológica un recubrimiento entérico para prevenir su desnaturalización e hidrólisis. No obstante, los suplementos de proteasas vegetales son fabricados en su mayoría sin esta capa exterior.

Las formas farmacéuticas aceptables según la monografía sobre la papaína del Departamento de Salud Pública del Gobierno de Canadá (Health Canada, 2012) incluyen, pero no se limitan a cápsulas, masticables (gomitas, tabletas masticables), líquidos, polvos, tiras o tabletas. Esto quiere decir que, si bien son preferibles (según su estabilidad a pH ácido) los comprimidos con recubrimiento entérico, se pueden elaborar también formas farmacéuticas orales que pongan en contacto el fármaco con el entorno gástrico.

La mencionada monografía canadiense (Health Canada, 2012) recomienda no exceder la dosis diaria de 7.200.000 PU (unidades de actividad enzimática de papaína) por día o de 2.400.000 PU por dosis.

Las fórmulas farmacéuticas más utilizadas en Estados Unidos se caracterizan por contener dosis unitarias que varían entre las 300.000 y 1.200.000 de unidades de papaína (PU/USP) por comprimido (Oxford vitality, 2015) (Bio-Health, 2015). (Swanson health products, 2015).

Tomando en cuenta las características fisicoquímicas de las enzimas proteolíticas vegetales, la administración oral de comprimidos con recubrimiento entérico puede ser un método seguro para estabilizarlas e influir positivamente en los procesos fisiológicos e inmunológicos durante ciertas enfermedades y en los consumidores sanos (Lorkowski, 2012).



Fotos 4 y 5. Presentaciones comerciales de tabletas de papaína comercializadas en EEUU
Fuente: Bio-Health y Swanson health products, 2015

1.2.3.4.Seguridad

La papaína es probablemente segura cuando se toma por vía oral en cantidades que comúnmente se encuentran en los alimentos. Se considera también segura en las cantidades comercializadas en forma de suplemento o en formas farmacéuticas tópicas. En cantidades mayores puede causar irritación de la garganta y el estómago. Aunque no hay reportes de graves complicaciones relacionadas a su consumo, se ha considerado que la papaína podría aumentar el riesgo de sangrado en personas con un trastorno de coagulación pues inhibe la agregación plaquetaria y se considera fibrinolítica. Por este motivo, se debe dejar de tomar papaína dos semanas antes de una cirugía programada y evitar el consumo en conjunto con otros fármacos que actúen sobre la coagulación sanguínea. (Web MD, 2009)

Existen personas alérgicas a la papaína, por lo cual siempre es prudente empezar la medicación con pequeñas cantidades de fruta en lugar de extractos más concentrados.

En medicina tradicional se evita dar preparados con altas cantidades de papaína a mujeres embarazadas pues se presume que puede provocar borramiento y dilatación del cuello uterino. Además, existen reportes de que podría causar defectos de nacimiento o aborto involuntario.

Existe la preocupación acerca de si el uso de suplementos con enzimas puede causar una inhibición de las enzimas digestivas endógenas, creando una dependencia con el

uso a largo plazo. Se afirma que no causan la inhibición de la secreción de enzimas endógenas, pues la secreción de los jugos pancreáticos y enzimas está regulada por las hormonas secretina y colecistoquinina, no por la presencia o la concentración de proteasas. (Transformation Enzyme Corp., 2013).

1.2.3.5. Panorama de la producción de papaína en el mundo

Como se mencionó anteriormente, la papaína se utiliza en muchas industrias para diversos usos. Algunos de los usuarios finales son fábricas de cerveza, productos farmacéuticos y medicinales, alimentos, cuero, detergentes, procesamiento de carne y pescado, etc. La mayoría de estas industrias están creciendo en todo el mundo. La papaína de buena calidad o altamente purificada tiene una gran demanda de exportaciones también. A pesar de poder obtener buenas cantidades de papaína en la región y la gran demanda que existe, aún no se presenta un repunte de esta industria en Sudamérica y, por lo tanto, existen buenas perspectivas para las nuevas empresas productoras. Las principales empresas distribuidoras se encuentran en Europa y EEUU, y redistribuyen la enzima a otros países como artículo final procesado o como parte de un producto terminado. El número de compañías involucradas en la compra primaria es relativamente pequeño y todas tienen sus proveedores particulares. La mayor parte de consumidores de papaína lo hacen en grandes cantidades, tanto a nivel nacional como internacional. (Fernández, 2005).

La enzima tiene una gran demanda en el mercado internacional, esencialmente en el Reino Unido, EE.UU., Europa y los países del Golfo. El mercado de alimentos y farmacéutico de la papaína muestra un buen potencial de expansión en el futuro el mismo que está creciendo en un 3% a 5 % anual. (Krishnaiah *et al.*, 2002). Se calcula que el tamaño del mercado es de 900 y 1000 toneladas métricas de producción de papaína al año. No obstante, es importante conocer que existe una brecha de producción de papaína altamente refinada, la cual se estima que está alrededor de 100 toneladas métricas de producción anual. Los principales productores mundiales de papaína altamente refinada son los siguientes países: Uganda, Tanzania, República Democrática del Congo, India, China y Brasil. (Fernández, 2005). La papaína altamente refinada tiene un valor aproximado en el mercado de 100 USD\$ por kilogramo.

1.3. REVISIÓN AGRO-BOTÁNICA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

1.3.1. Descripción botánica de *Vasconcellea stipulata* V.M. Badillo

- Sinónimos: *Carica stipulata* V.M. Badillo
- Distribución: Sólo ha sido encontrada en la Sierra sur de Ecuador (Provincias de Loja, Azuay y Cañar) y el norte de Perú, entre los 1600 y 2450 msnm.
- Nombres comunes: Toronche, Siglalón.
- Descripción morfológica: Según Badillo (1971, 1993) se trata de una planta glabra arbustiva o arborea de hasta 10 m de altura, tronco de hasta 50 cm de diámetro, a veces ramificado arriba, desprovisto de hojas durante la floración; a cada lado de las cicatrices foliares se encuentra una espina cónica aguda y dura de 4-7 mm de longitud. Hojas glabras, de 30 a 40 cm de diámetro, todas profundamente 5-lobuladas, 5-nervias, los lóbulos anchos en su origen y agudos hacia su ápice. El central más ancho y a su vez 3-lobulado; los dos intermedios enteros o a su vez trilobulados; los dos inferiores enteros o con un lóbulo externo próximos o subencubriéndose; haz verde oscuro, envés más claro con las nervaduras prominentes y robustas. Pecíolo de 15 cm aproximadamente de largo, 5-6 mm de diámetro. Estípulas espiniformes una a cada lado que pueden alcanzar una longitud de 1-3 mm, lo cual es característica fundamental para diferenciar a esta especie. Inflorescencias masculinas densas, sésiles o subsésiles de color anaranjado y hacia abajo verdosas. Inflorescencias femeninas cortas, paucifloras, pedúnculo de 1 cm aproximadamente de longitud. Flores femeninas de 17 a 20 mm de largo color verde claro brillante. Fruto amarillo de agradable olor, 5 locular, elipsoide, de 8-10 cm de largo por 4-6 cm de diámetro, trunco en la base y atenuado desde su mitad hasta el ápice con 10 surcos más o menos profundos, 5 de ellos menos acentuados. Semillas numerosas con 6 a 7 crestas discretas longitudinales interrumpidas. Sarcotesta mucilaginoso, abundante blanco-transparente.

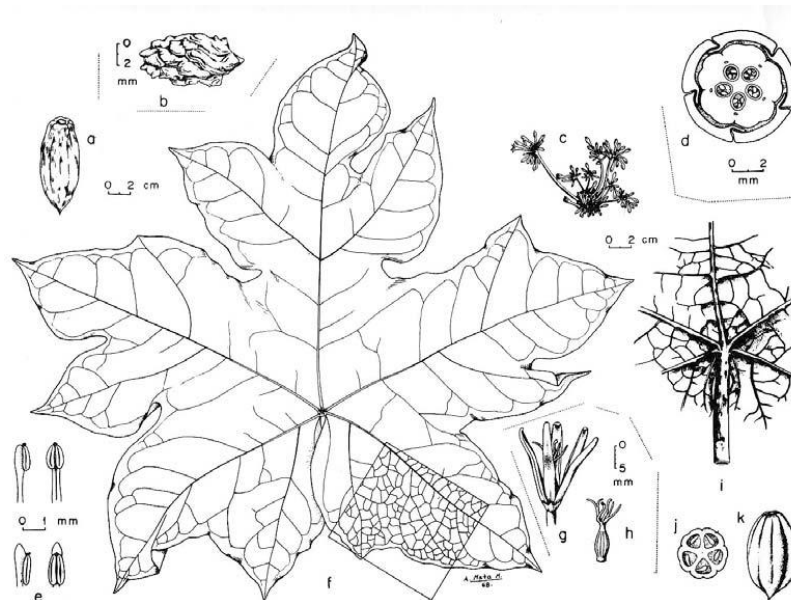


Gráfico 3. *Vasconcellea stipulata* V.M. Badillo. a) fruto; b) semilla; c) inflorescencia masculina; d) sección transversal de inflorescencia femenina en su capullo mostrando la corola y el ovario; e) estambres superiores e inferiores; f) hoja; g) flor femenina; h) gineceo de flor femenina; i) detalle del envés de la hoja; j) corte transversal del fruto; k) vista lateral del fruto.
Fuente: Badillo, 1993



Foto 6. *V. stipulata*. Jardín Botánico Reinaldo Espinosa Aguilar, Loja, Ecuador.
Fuente: I. Espinosa 2014



Foto 7. *V. stipulata*. Jardín Botánico Reinaldo Espinosa Aguilar, Loja, Ecuador.
Fuente: I. Espinosa 2014

1.3.2. *Vasconcellea pubescens* A.DC

- Sinónimos: *Carica candamarcensis* Hook. f., *Carica cestriflora* (A. DC.) Solms, *Carica chiriquensis* Woodson, *Carica pubescens* (A. DC.) Solms, *Carica pubescens* Lenné & K. Koch, *Papaya pubescens* (A. DC.) Kuntze, *Vasconcellea cestriflora* A. DC., *Vasconcellea cundinamarcensis* V.M. Badillo.
- Distribución: Se encuentra en zonas templadas de los Andes, entre los 1500 a 3000 msnm. Se extiende desde Colombia hasta Bolivia en forma natural y cultivada en huertos caseros. Sin embargo, en la actualidad se encuentran plantaciones agrícolas en el centro-sur de Chile que llegan hasta la región del Bío Bío como un cultivo exótico promisorio.
- Nombres comunes: Papayuela, papayo de altura, papayo de monte, chamburo, chihualcán, siglo, bonete, titi-ish, siglalón.
- Descripción morfológica: La especie *V. pubescens* es una planta monóica o dióica, semileñosa, arborescente con una altura de 2-3 metros pero puede llegar a los 10 m. Tiene la apariencia de una pequeña palmera. Su tallo principal es meduloso, succulento, grueso y poco ramificado, marcado por cicatrices foliares conspicuas. Es pubescente en todas sus partes, rasgo que la caracteriza. Las hojas se encuentran agrupadas en una densa corona terminal. Hojas con pecíolos de 17-34 cm de longitud; lámina dentalobulada, de contorno pentagonal, de 20-26 cm de longitud y 34-40 cm de ancho; lóbulo medio con 3-5 lobulillos laterales, oblongo-acuminados. Desarrolla tres tipos de flores: femeninas, masculinas y hermafroditas. Inflorescencia femenina verdosa, glabra o pubescente, corola pubescente o subglabra externamente y glabra o pilosa internamente. El fruto es una baya ovoide, ligeramente apiculado de color amarillo o anaranjado de 5 a 15 cm de largo por 3-8 cm de ancho, 5-lobulado, 5-surcado, que se corresponden con los cinco carpelos del ovario. Presenta fragancia agradable. La cantidad de semillas por fruto varía, puede presentar de 6 a 20 semillas de color café rojizo con protuberancias a modo de costillas interrumpidas de base ancha. Sarcotesta mucilaginoso, abundante blanco transparente. (Badillo, 1971, 1993).

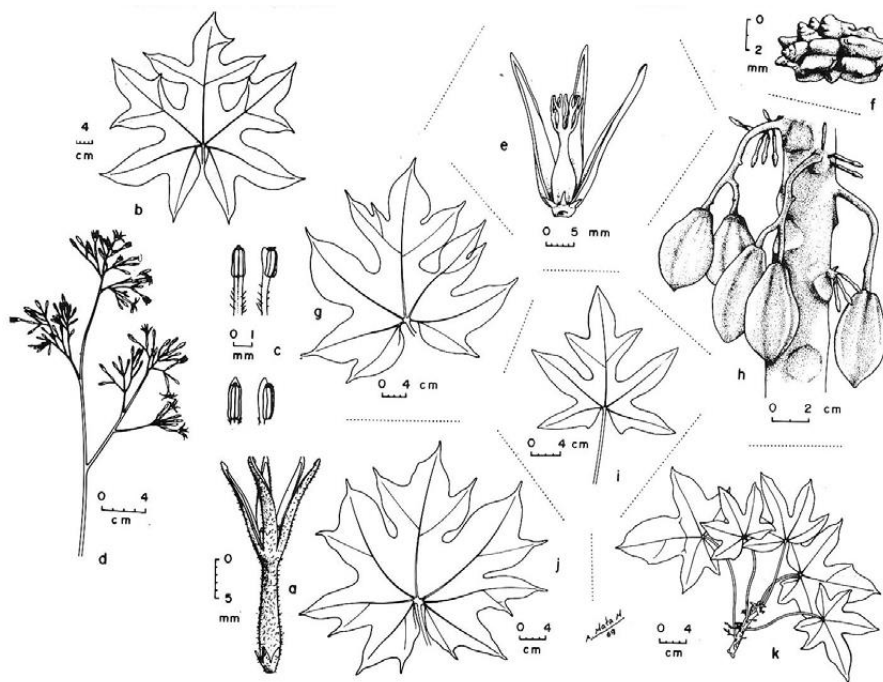


Gráfico 4. *Vasconcellea cundinamarcensis* V.M. Badillo. a) flor masculina; b,g,i-k) formas de hojas; c) estambres superiores e inferiores; d) inflorescencias masculinas; e) flores femeninas, removidos dos pétalos; f) semilla; h) frutos de inflorescencia bisexual .

Fuente: Badillo, 1993



Foto 8. *V. pubescens*. Jardín Botánico Reinaldo Espinosa Aguilar, Loja, Ecuador.

Fuente: I. Espinosa 2014



Foto 9. *V. pubescens*. Detalle de pubescencia en el envés foliar. Jardín Botánico Reinaldo Espinosa Aguilar, Loja, Ecuador.

Fuente: I. Espinosa 2014

1.3.3. Prácticas de cultivo de *Vasconcellea Sp.*

Como se mencionó anteriormente, los estudios agronómicos sobre el cultivo de *Vasconcellea sp.* en la actualidad son reducidos; su propagación y cosecha son tradicionales y se practican en huertos familiares rurales como plantas ornamentales y para consumo de frutos a nivel doméstico. En cada huerto se cultivan pocas plantas, por lo que no se han establecido académicamente técnicas de cultivo específicas para estas especies.

En la actualidad solamente se cuenta con información sobre las técnicas de siembra y recolección del babaco (*V.heilbornii x*) y de la papaya (*C. papaya*) pues son las especies que tienen mayor interés comercial. Sin embargo, comparten con las especies de *Vasconcelleas* las mismas características de recolección de látex para obtener de allí la enzima papaína.

Existe información limitada con respecto al aprovechamiento a gran escala de *V. pubescens* por su reciente explotación en Chile. No obstante, hay escasa investigación sobre *V. stipulata*. De estas dos especies, ha sido mucho más fácil el acceso de datos acerca de la fisiología de su germinación que sobre su manejo agronómico.

1.3.3.1. Adaptabilidad ecológica

En el estudio de Scheldeman (2002), se analizaron las condiciones edafoclimáticas, encontrando que *V. pubescens* y *V. stipulata* se sitúan entre los 993 y 2900 msnm. Para *V. pubescens* la media óptima de amplitud térmica anual es de 12°C a 14° C, sin poder sobrepasar los límites de 10°C a 18°C, no obstante, *V. stipulata* tiene un margen mucho más amplio de temperatura, con un máximo superior de 26°C. Las precipitaciones anuales de las áreas en donde se encuentran las mayores concentraciones de estas especies indican que *V. pubescens* prefiere zonas ligeramente más secas que otras especies de *Vasconcellea*. Sin embargo, el amplio rango de precipitaciones encontrado parece indicar que la precipitación es un factor menos limitante que la temperatura.

Condiciones climáticas	<i>V. stipulata</i> (702 plantas analizadas)	<i>V. pubescens</i> (46 plantas analizadas)
Temperatura anual promedio (°C)	14 - 18	12 - 14
Rangos máximos y mínimos de temperatura anual (°C)	10 - 26	10 - 18
Precipitación anual promedio (mm)	1000 - 1300	800 - 1000
Rangos máximos y mínimos de precipitación anual (mm)	600 - 1300	700-1200

Tabla 3. Condiciones climáticas óptimas y sus rangos para las especies *V. pubescens* y *V. stipulata*
Fuente: Scheldeman, *et al.* 2011

1.3.3.2. Propagación vegetativa

Los pobladores reproducen estos dos frutales generalmente por propagación vegetativa, es decir, por estacas o por brotes que nacen al pie de la planta madre.

Según Jiménez, *et al.*, 1998) la propagación asexual o vegetativa es similar a la de *V. x heilbornii*, la cual puede hacerse por estacas de tallo cortado, que por lo general es el sistema más utilizado y fácil de realizar. Las estacas se cortan de plantas maduras, preferiblemente que sean de la parte media, con la finalidad de obtener buena producción y homogeneidad en el cultivo. También se pueden propagar por estacas talón, para lo cual es recomendable la selección de plantas madre para la propagación en este sistema. Las plantas madre reciben tratos especiales tanto desde el punto de vista nutricional como del estado fitosanitario. Para tal efecto, las plantas mencionadas son cortadas a unos 50 cm, de altura para promover la emisión de brotes; estos se dejan crecer hasta unos 40 cm, para ser cosechados mediante el desprendimiento con tejido de la estaca madre (estaca talón). Las estacas talón así obtenidas son inmediatamente desinfectadas y seguidamente plantadas en su sitio definitivo.

A pesar de que la reproducción vegetativa es la técnica de propagación más utilizada para las *Vasconcelleas*, da lugar a problemas fitopatológicos típicos. Una de las posibles soluciones a este problema de multiplicación radica en el uso de la propagación *in vitro* (Scheldeman, 2002).

1.3.3.3. Propagación seminal

Estas especies se propagan ocasionalmente por semillas pues presentan una germinación errática y tardía, determinada por una latencia de carácter endógeno (Torres, 2006). Este comportamiento puede estar relacionado a un mecanismo de preservación propio de estas especies que les permite sobrevivir y germinar espaciadamente durante el año hasta que las condiciones ambientales sean apropiadas para la germinación (Romero, 2013). Una limitación importante en la propagación somática de especies *Vasconcellea* es la presencia de dioicismo en *V. stipulata* y un sistema complicado de definición genética sexual en *V. pubescens* tanto que resulta en la presencia de numerosos machos estériles o plantas monoicas.

- Tratamientos pre-germinativos: En *C. papaya*, también se ha detectado el mismo problema de germinación errática y dificultosa, sin embargo existen en esta especie abundantes investigaciones que han mejorado mucho las tasas de germinación con distintos pre-tratamientos para romper parcialmente la latencia. Estos incluyen: pre-refrigeración, eliminación de sarcotesta, pre-remojo en agua, aplicación de ácido giberélico (AG₃) a una concentración de 10–1000 ppm y pre-aplicación de nitrato de potasio. Estos pre-tratamientos se han extrapolado a especies de *Vasconcelleas* en estudios como los de Scheldeman (2002) y Benítez, *et al.* (2013) en los cuales se obtuvieron excelentes resultados. Para *V. stipulata*, la germinación es aún más complicada, pues usualmente no supera el 10%, incluso con la pre-aplicación de ácido giberélico. Sin embargo con 24 horas de remojo en altas dosis (600 a 1000 ppm) de ácido giberélico, se ha encontrado un incremento significativo en el porcentaje de semillas germinadas y una reducción en el tiempo de germinación en la mayoría de los casos (Scheldeman, 2002). Una dosis tan alta como 1000 ppm de ácido giberélico como pre-tratamiento no ha mostrado ningún efecto adverso en el crecimiento de las plántulas. El remojo con nitrato de potasio, también ha mostrado un efecto positivo en la germinación por su efecto de remoción de la dormancia de las semillas. Los dos pre-tratamientos mencionados anteriormente son los que mejores resultados dieron en las pruebas de germinación de ambas *Vasconcelleas* en el estudio de Scheldeman (2002) y en *V. pubescens* en la investigación de Benítez, *et al.* (2013). En estos trabajos además de un aumento

en el porcentaje de semillas germinadas, se logró reducir el tiempo de germinación, el cual comienza de 30 a 40 días y llega a un pico a los 100 días de iniciada la imbibición.

En semillas de especies forestales se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) incrementa su germinación, probablemente debido a que ablanda su testa y aumenta la permeabilidad del agua y oxígeno. Además, tiene utilidad en cultivos *in vitro* por su gran capacidad de esterilización superficial (Flores, *et al.*, 2008).

- Remoción de la sarcotesta: las semillas de esta familia se caracterizan por estar recubiertas de una sarcotesta mucilaginosa. En algunas investigaciones en *C. papaya* se ha encontrado que esta capa superficial presenta cantidades significativas de compuestos fenólicos los cuales actúan como inhibidores de la germinación. Además, su presencia es un agente físico que impide el intercambio de líquidos y gases, por este motivo, al removerla aumentan las tasas germinación sustancialmente (Tokuhisa, 2007). Se recomienda retirar la sarcotesta mucilaginosa mientras las semillas se encuentran frescas, cuando los frutos maduros tienen poco tiempo de haber sido recolectados, y previo a su secado y almacenado. Existen técnicas de remoción de la sarcotesta y reducción de la dureza de las semillas mediante escarificación química con distintos agentes: carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 10% por 24 h; hidróxido de sodio (NaOH) al 25% por 15 minutos, según estudio de Muñoz (2009) este procedimiento eliminó 98% de la sarcotesta y presentó 2% de incidencia de microflora, incrementó y homogenizó la germinación; con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 25% por 15 a 25 min se eliminó 100% de la sarcotesta así como la colonización de hongos pero afectó negativamente a la germinación. Mediante la fermentación prolongada con distintas bacterias se han reportado efectos nocivos sobre el embrión (Benítez, *et al.*, 2013). La recomendación es extraer las semillas de frutas seleccionadas maduras, eliminar la sarcotesta remojándolas en agua durante 48 horas lo que facilita la retirada de las mismas, las cuales fermentan ligeramente durante este tratamiento para posterior remoción manual. Las semillas limpias se secan y están listas para la siembra o la conservación.

- Almacenamiento: Alarcón, *et al.* (1997) estudiaron la germinación de *V. pubescens* a diferentes temperaturas y diferentes períodos de almacenamiento.

No se observó influencia sobre la germinación a temperaturas de entre 15-30°C. El almacenamiento de hasta 12 meses mostró jugar un papel benéfico en la germinación la cual aumentó considerablemente, hasta un máximo de 87% en diferentes tiempos de almacenamiento. En este estudio se encontró que el almacenamiento más adecuado y que proporciona un porcentaje mayor de germinación es el de cuatro meses, con el cual se obtiene un porcentaje de 79.5% de semillas germinadas a una temperatura ambiente de 18°C a 22°C y 87.39% de germinación con una temperatura de 30°C. Este hallazgo es importante ya que las tasas de germinación a una temperatura ambiente decaen de manera significativa en semillas recién extraídas a 36% y con 12 meses de almacenamiento a 2,23%.

1.3.3.4. Técnicas de Siembra

Se pueden sembrar dos a tres semillas cuando se usan bandejas con alvéolos, de lo contrario, se siembran en surcos separados 10 cm entre ellos y 2 cm entre semillas a 5 mm de profundidad. Las plántulas son muy susceptibles a condiciones de alta humedad.

Para la propagación se utiliza un sustrato de tierra y cascarilla en proporciones 1:1 y la germinación se da aproximadamente a los 31 días después de la siembra, alcanzando un total del 90% a la sexta semana. La altura de la plántula se incrementa de forma acelerada durante los primeros veintitrés días y la longitud y ancho de las hojas aumentan de manera paralela, siendo la longitud de las hojas la de mayor incremento; el diámetro del tallo presenta un incremento mayor hacia el día 92. Para el trasplante se requiere que la planta tenga una altura de 10 a 15 cm. (Córdoba, *et al.*, 2010).

Según la bibliografía consultada, la distancia entre plantas puede variar entre 1.5 m a 3m entre cada una y de 2 a 3 metros entre cada fila, resultando en 1111 a 3500 plantas por hectárea, según los límites superiores o inferiores que se consideren (CAF, 1992; FAO, 1992). Se recomienda eliminar las plantas masculinas, en caso de que sean especies dióicas, dejando solamente una de ellas por cada 10 plantas femeninas para asegurar la polinización (CTIFL,1992).

1.3.3.5.Riego

Las *Vasconcellea s* son plantas que demandan abundante irrigación, sin embargo, un exceso de humedad en el suelo es perjudicial para las mismas. No tolera sequías. Dependiendo del clima, *V. pubescens* necesita de 800 a 1500 mm de agua por año y comienza a producir frutos a los 10 -15 meses de haber sido plantada. Se le deben proporcionar los cuidados necesarios por ser muy susceptible a las heladas.

1.3.3.6.Suelo y fertilización

Requiere suelos de textura franco-limosa, orgánicos bien drenados y sueltos, de estructura granular con el pH ligeramente ácido (Soria y Viteri, 1999). El tipo de suelo que *V. pubescens* prefiere es ligero y con un bajo nivel nutricional cuando se la compara con sus parientes del género *Vasconcellea*. En general, las papayuelas de altura que se encuentran en pisos altitudinales mayores, prefieren el suelo ácido con moderado contenido de materia orgánica, con un estado nutricional variable y una cantidad baja de fragmentos gruesos. (Scheldeman, 2002).

La fertilización del suelo dependerá de su estado previo. Para las especies estudiadas, por su similitud se podría extrapolar la información encontrada para los cultivares de *V. x heilbornii*, en los cuales se recomienda N: 100-250 kg/ha, P₂O₅:100-200 kg/ha, K₂O: 200-400 kg/ha, Ca: 150-200 kg/ha, Mg: 100-150 kg/ha and S: 30-50 kg/ha. Se aconseja duplicar estos valores en cultivos de invernadero para optimizar su producción (Soria y Viteri, 1999). Además se recomienda fertilización orgánica cada 6 meses (CTIFL, 1992).

1.3.3.7.Ciclo biológico

La información disponible se refiere a la especie *V. pubescens*, en la cual el crecimiento es lento, la aparición de hojas es constante y continua, sin embargo las inferiores van cayendo mientras se elonga el tallo.

Tiene un período de crecimiento que dura aproximadamente 4 meses. La edad de floración es a los 10 a 12 meses luego del trasplante a un sitio definitivo y el ciclo biológico termina a los 5 años (FAO, 1992).

1.3.3.8. Plagas

En las primeras etapas de desarrollo se ha encontrado que en invernaderos las plántulas recién germinadas son atacadas por un complejo de hongos conocido como *damping off* (Córdoba, *et al.*, 2010).

Soria y Viteri (1999) refieren que las especies de *Vasconcellea* salvajes son probablemente menos susceptibles a los problemas fitopatológicos típicos encontrados en *V. x heilbornii*. Las enfermedades fúngicas más importantes de esta última especie, la cual ha sido más estudiada son: *Phytophthora spp.* Esta se produce principalmente durante la multiplicación por estacas y puede causar pérdidas de hasta el 100%. Otra de las infecciones más importantes es la ocasionada por *Fusarium oxysporum* transmitida por el suelo (Ochoa y Ellis, 2002). Esta última provoca en *V. x heilbornii* grandes pérdidas durante la producción, dispersándose a través del riego gravitacional. (Scheldeman, 2002). Freire (2015) utilizó en su investigación portainjertos de *V. stipulata* y *V. pubescens* para ápices de *V. x heilbornii* pues refiere que las dos primeras especies poseen mejor tolerancia a la infección por *Fusarium oxysporum*.

Los nematodos que atacan a *V. x heilbornii* son del género *Meloidogybe sp.*, producen nodulaciones en las raíces y actúan interrumpiendo el paso de nutrientes provenientes del suelo, lo que causa retraso del crecimiento de la planta, flacidez de los tallos, amarillamiento y marchitez general. Cuando existe infestación por nematodos la fusariosis puede ser más severa, pues los primeros lesionan las raíces permitiendo la penetración más fácil del hongo. (Bravo, *et al.*, 2012). Estos autores investigaron con 6 especies de *Vasconcelleas* y determinaron que la infestación de nematodos fue inferior en las especies *V. x heilbornii* cv 024 y en *V. pubescens*, en comparación con el testigo (*V. x heilbornii*). Esto sugiere que estas especies poseen tolerancia al nematodo agallador de las raíces y que pueden ser utilizadas como patrón en el cultivo de *Vasconcellea* sensible tanto a la fusariosis como al ataque de nematodos.

En cuanto a enfermedades virales, *V. x heilbornii* también es susceptible al llamado “virus del mosaico del babaco” (Scheldeman, 2002). Sin embargo, Jordán, *et al.*, (2009) afirman que las especies *V. pubescens* y *V. stipulata* son portadoras de genes que confieren resistencia al “virus del mosaico de la papaya”.

En la actualidad son pocas las investigaciones realizadas sobre las enfermedades y plagas que atacan específicamente a *V. pubescens* y *V. stipulata*. Eraso y Suarez (2008) mencionan en su artículo que una de las afecciones en *V. pubescens* es un trastorno de aparente etiología viral con síntomas como deformación de la lámina foliar, amarillamiento generalizado, mosaico rugoso en brotes y retardo del crecimiento. Asimismo, se acompaña en ocasiones de elongación del pecíolo con hojas pequeñas, proliferación de brotes, acortamiento de entrenudos y defoliación total.

La propagación por estacas disemina fácilmente estas enfermedades virales y solamente debe ser tomado material sano para este tipo de reproducción. Para conseguir controlar la expansión del virus, se deben establecer semilleros libres de virus, evitar la dispersión en forma mecánica durante labores de cosecha y transmisión por áfidos. La microinjertación de meristemas y la embriogénesis somática son herramientas biotecnológicas eficaces para obtener plántulas libres de virus.

1.4. CULTIVO DE TEJIDOS EN ESPECIES DEL GÉNERO *VASCONCELLEA*

En Latinoamérica, así como en el resto del mundo se está impulsando cada vez más el campo de la biotecnología como un área prioritaria para el desarrollo científico y agrícola, y por ende, parte esencial de la economía y el desarrollo de cada nación.

Las nuevas tecnologías permiten actualmente optimizar el rendimiento y la calidad de los cultivos, pero además estas ventajas también se asocian al progreso de la industria farmacéutica pues los avances alcanzados no se limitan solamente al mejoramiento con fines alimentarios.

Nuevos principios activos encontrados en los vegetales hacen necesarias estrategias para la producción de plantas medicinales a gran escala sin la depredación de estas especies dentro de su hábitat de origen, lo cual las pone en peligro de extinción y altera el ecosistema al que pertenecen.

En la región andina cada vez existe mayor interés investigativo en la familia Caricaceae, en particular del género *Vasconcellea*, pues ha quedado claro su potencial como frutales exóticos con gran variabilidad genética, fuentes invaluable

para el mejoramiento vegetal. Además, como se ha analizado en capítulos anteriores, es reconocida la capacidad de producción de esta familia con fines agrícolas, medicinales e industriales.

La reproducción por vía sexual se enfrenta a la gran dificultad para la germinación en la del género *Vasconcellea*. Esto ha hecho necesaria la utilización de la propagación asexual, la cual tiene la ventaja de proporcionar clones de élite. Sin embargo, esta técnica manejada tradicionalmente mediante estacas o esquejes se acompaña de problemas fitopatológicos típicos. Por este motivo, el perfeccionamiento de técnicas biotecnológicas para la propagación *in vitro* de estas especies gana cada día mayor importancia, pues permite mejorar la calidad de las plantaciones con la producción de un material genético homogéneo y libre de organismos patógenos.

Distintas técnicas se han ensayado *in vivo* e *in vitro* para conseguir recombinación genética, selección, generación de genotipos y multiplicación agámica o asexual del género *Vasconcellea* (Jordán, *et al.*, 2009). En este sentido, se ha revisado la información existente sobre el potencial morfogénico y regenerativo de las especies de este género, encontrando que son aún muy escasas las investigaciones en *V. stipulata*.

1.4.1. Usos de la Biotecnología para la propagación vegetativa de *V. stipulata* y *V. pubescens*

Uno de los principales problemas en el cultivo de este género es el ataque de *Fusarium oxysporum* a nivel de las raíces, lo que ocasiona disminuciones significativas en la producción de los sembradíos. El cultivo de plantas de élite provenientes de microinjertación permite reducir el uso de agentes químicos para el control patógenos como éste, dando como resultado un medio ambiente con menos contaminación y reducción de costos. En la actualidad, estos frutales son cultivados en huertos familiares y pequeños productores quienes se verían favorecidos con el manejo de estos especímenes. La investigación realizada por García (2011) permitió realizar injertos tradicionales de *V. x heliborinii* con *Vasconcellea candicans* (A. Gray) A. DC., con el objetivo de mejorar la tolerancia radical al hongo mencionado.

Por otra parte, en el estudio *in vitro* realizado por Criollo (2008) se realizaron comparaciones entre distintos microinjertos de especies del género *Vasconcellea* con

patrón de *C. papaya* L., los cuales no tuvieron buenos resultados, sin embargo, como control, se realizaron microinjertos exitosos de las especies *Vasconcella heilbornii* cv. *pentagona* y *Vasconcella heilbornii* cv. *chrysopetala*. A la fecha, no existe un protocolo establecido para la microinjertación de *V. stipulata* y *V. pubescens* y por ende, es necesario el desarrollo de una técnica mejorada.

La germinación de plantas de *V. stipulata* y *V. pubescens in vitro* permite comprender mejor los procesos fisiológicos de inhibición y latencia de estas especies, las cuales al igual que *C. papaya* presentan un patrón de germinación errática y tardía. De esta manera se pueden establecer protocolos destinados a homogenizar y acelerar la germinación de estas especies que han sido mucho menos estudiadas. Además, siendo la germinación *in vitro* parte del proceso de microinjertación *in vitro*, necesita de un perfeccionamiento de los protocolos en todas sus etapas, desde la desinfección hasta la aplicación de distintos pretratamientos para la correcta emergencia y crecimiento de la plántula. Acorde a lo señalado por Muñoz (2009) al utilizar métodos de desinfección eficaces, removiendo los microorganismos que causan problemas fitosanitarios, se puede estabilizar el rendimiento y minimizar las pérdidas asociadas a la falta de calidad de las semillas.

En cuanto a las ventajas de la embriogénesis somática para la propagación vegetativa de *C. papaya*, Cornejo (2009) menciona la siguiente lista, perfectamente aplicable a las especies estudiadas en el presente trabajo:

- Nos permiten multiplicar individuos vegetales a gran escala, es decir, obtener gran número de plantas a partir de pocos individuos
- Se obtiene una producción de plantas en un tiempo relativamente corto.
- Proporcionan especímenes con características genéticas excepcionales.
- Facilitan la propagación de individuos que no han alcanzado la madurez sexual y por tanto no han llegado a producir semillas.
- Multiplican especies que presentan problemas de fertilidad o germinación.

1.4.2. Germinación de semillas *in vitro*

En el capítulo sobre prácticas de cultivo de *Vasconcella* se mencionó que para una germinación exitosa se deben tomar en cuenta principalmente los procesos de

remoción de latencia mediante una combinación de tratamientos pregerminativos (Scheldeman, 2002 y Benítez, et al., 2013), tales como la pre-aplicación de frío por 7 a 15 días, la aplicación de ácido giberélico a una concentración de 600 ppm por 24 a 48 horas y la aplicación de peróxido de hidrógeno (Flores, et al., 2008)

Al igual que en todas las prácticas de cultivo vegetal *in vitro* la etapa de la desinfección es sumamente importante y, cuando no se dispone de un protocolo ya establecido es preciso basarse en alguno instaurado para una especie emparentada, y ajustarlo luego a la planta estudiada. Esto permite obtener una descendencia uniforme en condiciones de asepsia.

No existe una sola técnica para desinfección de semillas de la familia Caricaceae, sin embargo, las más estudiadas se han realizado en la especie *C. papaya*, la cual al ser una fruta conocida y comercial, tiene extensas investigaciones en el tema. En el estudio de Criollo (2008) el protocolo de desinfección que dio mejores resultados para semillas de esta especie fue lavarlas en una solución con detergente comercial por 5 minutos, luego enjuagarlas dos veces con agua destilada. Posteriormente someterlas en una solución de hipoclorito de sodio diluido al 1% por 30 minutos, para realizarles luego tres enjuagues con agua destilada y esterilizada en autoclave a 15 psi por 60 minutos. En un segundo paso, dentro de la cámara de flujo laminar, se las expone a una solución de etanol al 70% por un minuto, para luego enjuagarlas por 2 ocasiones con agua bi-destilada estéril. Por último, las semillas se secan en papeles estériles.

Para semillas del género *Vasconcellea* las experiencias de desinfección destinadas a germinación *in vitro* son escasas. El mejor tratamiento de desinfección encontrado por Muñoz (2009) para *V. pubescens* se obtuvo al lavar las semillas con H_2SO_4 e introducir las sobre MS (Murashige y Skoog, 1962) logrando un 60% de desinfección, no obstante, en muchos casos se produjo la muerte del embrión debido a su toxicidad.

1.4.3. Microinjertación

La microinjertación se basa en el mismo principio agronómico de la injertación como método de propagación vegetativa, en el cual una parte de tejido procedente de una

planta, llamada injerto propiamente dicho, se une sobre otra ya asentada, al patrón, portainjerto o pie. De esta manera y a partir de la unión de ambos, crecen como un solo organismo.

En los microinjertos, este proceso se lleva a cabo bajo condiciones *in vitro* y con plantas generalmente jóvenes de pequeño tamaño. Según Conci (2010), la técnica nació con el objetivo de realizar microinjertos de ápices caulinares para obtención de plantas de naranjo libres de virus, sin embargo posteriormente se encontró también utilidad al conseguir injertos de mejores condiciones fitosanitarias aprovechando las distintas cualidades genéticas de las especies seleccionadas y contemplando las siguientes ventajas que se obtienen mediante la injertación tradicional (Rojas, *et al.*, 2004):

- Resistencia a enfermedades presentes en el suelo. El injerto no entra en contacto directo con los patógenos, mientras que el patrón que es resistente cumple la función de estrato intermedio aislante.
- Nutrición de plantas con requerimientos relativamente estrictos sobre pies más rústicos.
- Reproducción vegetativa de híbridos obtenidos artificial o naturalmente que poseen características deseables.
- Enanización, es decir obtener variedades de tamaño reducido.

Si la práctica está dirigida directamente a evitar la virosis, se debe extirpar el meristema de la variedad a injertar, y luego depositarla sobre la superficie decapitada del epicótilo de una plántula procedente de una semilla germinada *in vitro* de aproximadamente 2 semanas de edad. (Navarro, *et al.*, 1975). No obstante, si el objetivo no es éste, el ápice del injerto puede ser de un tamaño mayor al de un meristema (Criollo, 2008).

Criollo (2008) en su estudio utilizó para obtener tallos con mayor grosor para facilitar la microinjertación el medio que Pedroza y Perea (1990) usaron en plántulas de *V. heilbornii* para la proliferación de yemas caulinares, el cual consistió en: sales MS (2,4 g/l), AIB (0,5 ppm), sacarosa (25 g/l) y agar (7 g/l).

Muchos de los trabajos actuales en microinjertación derivan de la técnica desarrollada por Navarro, *et al.*,(1975). Sin embargo, Mosella y Ascui (1984) realizaron una variante a la anterior con microinjertos de *Prunus*, obteniendo mejores resultados. Este protocolo se detalla a continuación:

- a) Germinación de las semillas *in vitro* en situaciones estériles.
- c) Decapitación *in situ* del patrón a 2 cm desde la raíz sin abandonar su medio original.
- d) Pretratamiento del ápice a base de auxinas para promover la fusión.
- e) Microinjertación del ápice.
- f) Incubación de la planta microinjertada en un tubo con medio líquido.

Con esta innovación a la técnica, Mosella y Ascui (1984) mejoraron los porcentajes de prendimiento de microinjertos en *Prunus* del 20% a un 60% en la misma especie vegetal.

1.4.4. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es el mecanismo *in vitro* por el cual se obtienen embriones cigóticos sin que se requiera la unión de los gametos. Este proceso es inducido a partir de una célula o grupo de células vegetales que se mantienen en división continua, basándose en el hecho de que mantienen su totipotencialidad. Para inducir la embriogénesis es necesario someter a estas células a un determinado estímulo, el cual es generalmente una combinación de factores de crecimiento.

Como lo menciona Radice (2010), las diferentes fases por las cuales debe pasar un cultivo *in vitro* para alcanzar la etapa de regeneración de embriones somáticos son: adquisición de la competencia, inducción y realización. En la fase de adquisición de la competencia, no hay todavía una respuesta al estímulo organogenético pero se alcanza esta capacidad por presentar desdiferenciación celular. En la fase de inducción los grupos celulares son receptivos a los estímulos aplicados y, en la tercera fase, la de realización, las células manifiestan diferentes cambios y divisiones que dan por resultado la generación de embriones.

Existen dos tipos de embriogénesis: la directa y la indirecta. En la primera, los embriones somáticos se generan directamente a partir de explantos sin la necesidad de formación previa de aglomeraciones celulares desordenadas afuncionales llamadas *callo*. En la embriogénesis indirecta, en primer lugar se produce la formación de callos o suspensiones celulares que inicialmente son indiferenciadas, para luego convertirse en células diferenciadas.

Una de las limitaciones más grandes de la embriogénesis somática consiste en que en la mayoría de las especies, se obtiene a partir de embriones cigóticos inmaduros. En muy pocas especies se ha logrado la formación de embriones somáticos en tejidos procedentes de individuos adultos, y por tanto con posibilidades de ser seleccionados con fiabilidad.

El inmenso potencial multiplicativo de esta técnica debe ser completado con estudios que permitan la producción sincrónica de embriones de calidad, no obstante, este es uno de los pasos más complejos dentro del proceso. Se debe tomar en cuenta que para la producción de cantidades masivas de embriones idénticamente genéticos con fines operativos se requiere el desarrollo del cultivo en medio líquido y la utilización de biorreactores (Celestino, *et al.*, 2005). Actualmente se prefiere la embriogénesis somática a la regeneración por organogénesis ya que se obtiene clonación de plántulas en grandes cantidades en un solo paso, eliminando la inducción de la rizogénesis.

Las células comienzan un proceso de embriogénesis cuando se modifican las condiciones del cultivo *in vitro*. Generalmente para ello se necesita reducir las cantidades de auxinas y citocininas o eliminar las auxinas, sin embargo, depende mucho de la familia botánica, género y especie. Inclusive, el proceso de embriogénesis se puede desencadenar, si el explanto es inmaduro, en ausencia de los reguladores del crecimiento. Esto es así, pues se ha observado la importancia que tiene el balance de nutrientes en el medio de cultivo sobre las respuestas morfogénicas, el cual puede sustituir en ocasiones a los reguladores del crecimiento. (Radice, 2010; Celestino, *et al.* 2005).

A la fecha todavía no hay publicaciones sobre embriogénesis *in vitro* de *V. stipulata* y las investigaciones en *V. pubescens* son escasas. Sin embargo, en *C. papaya* se han

realizado múltiples ensayos para inducir embriones somáticos con el fin de producir plantas, la mayoría a partir de embriones cigóticos inmaduros. De estos estudios se mencionan a continuación aquellos con puntos coincidentes y que han producido altas tasas de eficacia. Tanto las investigaciones de Cai, *et al.* (1999), como la de Guzmán, *et al.* (2010) y Ponce-Cabrera *et al.* (1995) usan para inducción de embriogénesis un medio de cultivo con sales de MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad, 400 mg/L de L-glutamina, 6% de sacarosa, 10 mg/L de 2,4 ácido diclorofenoxiacético (2,4 D) y 0,8% Agar en un pH de 5.8.

Difiriendo cada investigación en lo siguiente:

- Guzmán, *et al.* (2010) prueba además con: 50mg/l de mioinositol, 0,4mg/L de tiamina HCL, 2,0 mg/L de glicina, 0,5mg/L de ácido nicotínico, 0,5mg/L de piridoxina y carbenicilina a 250 mg/L en un entorno de oscuridad a 28° C por 4 a 5 semanas.
- Cai (1999) utiliza 50 mg/L de mioinositol y oscuridad a 27°C por 8 semanas.
- Ponce-Cabrera *et al.* (1995) añade hierro, mioinositol a 26° C en oscuridad y vitaminas.

Por otra parte, con una concentración menor de 2,4 D (5mg/L), Posada-Pérez, *et al.* (2007) obtuvieron embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros de plantas de *C. papaya* en un medio de cultivo muy similar al descrito inicialmente e incubados en oscuridad a 27 ± 2 °C durante 6 semanas.

Una vez transcurrida la etapa de inducción de la embriogénesis, muchos autores sugieren iniciar un siguiente paso de regeneración o germinación embrionaria con un cambio en el medio de cultivo. “Las experiencias demuestran que las células embriogénicas se desarrollan sólo cuando se modifican las condiciones de cultivo. En general, cuando se reducen las cantidades de auxina y citocinina o se elimina la auxina” (Radice, 2010, p.29).

Posada-Pérez, *et al.* (2007) tomaron pequeños grupos de embriones somáticos formados por cuatro a seis embriones y los subcultivaron en un medio de cultivo compuesto por la mitad de la concentración de las sales MS, mioinositol 100 mg/L, vitaminas MS, sacarosa 20 g/L; agargel 5 g/L, con un ajuste de pH 5.8 antes de la esterilización, al que se añadieron diferentes concentraciones de las citoquininas

kinetina y 6-Benziladenina (6-BAP). Los embriones fueron colocados en cámara de luz solar expuestos a una intensidad luminosa de 50-62.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 25 ± 2 °C y humedad relativa de $60\pm 10\%$ por 4 semanas. Se obtuvieron los mejores resultados con 4 mg/L de kinetina produciendo una germinación del 81% de embriones, y con 0.22mg/L de 6-BAP que produjo una germinación de 92.63% de los mismos

1.4.4.1. Histología de los embriones somáticos

Histológicamente, las células embriogénicas generalmente no se desarrollan sincronizadamente. Se caracterizan por no ocupar demasiado volumen, tienen un gran contenido de ribosomas, citoplasma denso, nucléolo agrandado y con presencia de pequeños gránulos de almidón. Cuando el origen es unicelular se puede observar microscópicamente una importante gelificación de la laminilla media a nivel de la pared celular, la cual presenta dentro de sí divisiones polarizadas que forman un embrión globular que progresivamente adquiere simetría bilateral. En los siguientes estadios se hace presente el desarrollo de uno o varios cotiledones, tejidos provasculares, ápices radicales y tallos. Cuando se trata de embriogénesis de origen multicelular o adventicia, los embriones somáticos se forman a partir de células epidérmicas o subepidérmicas. Se diferencian de las anteriores por presentar previamente estructuras proembrionarias con falta de sustancias de reserva, delgada pared celular, alta relación núcleo/citoplasma, citoplasma denso y núcleo voluminoso. Posteriormente acumulan sustancias de reserva, desarrollan epidermis y se polarizan (Radice, 2010). Lara, *et al.* (2003) al igual que otros investigadores mencionan que existe entre la organogénesis y la embriogénesis una diferencia histológica importante. Los embriones, a su vez, no tienen una unión vascular con el tejido circundante.

Para el análisis histológico se deben colocar los embriones somáticos durante 24 horas en una solución de fijación que contenga 37% de formaldehído, 100% de ácido acético y 70% de etanol, en una proporción 5:5:90. Posteriormente, deben ser deshidratados en un gradiente ascendente de etanol e incluidos en parafina. Se deben realizar cortes seriados de 10 μm de grosor con un micrótomo de rotación, fijarse en portaobjetos y teñirse con safranina al 0,5% (García-Águila, *et al.*, 2010). Otra opción de observación de tejido embriogénico realizada por Jácome (2012) en su

investigación es la preparación de placas que contengan 0,5mm de callo embriogénico, el cual se debe teñir con una solución de acetocarmín al 2% por 15 segundos y eliminar el excedente con agua destilada. Con ayuda de un microscopio óptico se pueden visualizar con un aumento 100X el tejido embriogénico el cual se presenta en agregados celulares que tienen las siguientes características: forma redonda, isodiamétrica, citoplasma denso, núcleo grande y presencia de células meristemáticas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer y evaluar protocolos para la germinación de semillas *in vitro*, microinjertación y cultivo de callos de *Vasconcellea stipulata* V.M. Badillo y *Vasconcellea pubescens* A.DC.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Evaluar y establecer distintos pre-tratamientos para germinación de semillas *in vitro* de *V. stipulata* y *V. pubescens*.
- b) Evaluar y establecer un protocolo de desinfección de semillas de *V. stipulata* y *V. pubescens*
- c) Valorar una técnica de microinjertación para *V. stipulata* y un pie o patrón de *V. pubescens* germinados *in vitro*.
- d) Estudiar el proceso de formación de callos en *V. stipulata* para estimular la embriogénesis indirecta.
- e) Adquirir la destreza de cultivar de especies vegetales medicinales *in vitro*.
- f) Contribuir mediante los protocolos establecidos y evaluados a la propagación de especies vegetales del género *Vasconcellea* en peligro extinción y con alto potencial de producción de enzimas proteolíticas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

3.1.1. Determinación taxonómica y recolección

El reconocimiento y determinación taxonómica de las dos especies *Vasconcellea stipulata* V.M. Badillo y *Vasconcellea pubescens* A.DC se realizó en el Jardín Botánico Reinaldo Espinosa Aguilar, que está administrado por la Universidad Nacional de Loja, en Loja, Ecuador, el cual es miembro del "Botanic Gardens Conservation Internacional" (BGCI). Una vez identificadas las características distintivas de ambas especies, se compararon con las descritas por la literatura (Badillo, 1971, 1993), las cuales se encontraron completamente compatibles. Posteriormente, se procedió a la recolección de frutos y semillas de las especies *V. stipulata* y *V. pubescens* en las provincias de Pichincha, Azuay y Loja del territorio ecuatoriano.

Para la recolección de material vegetal se visitaron los lugares en los que se han reportado la mayor cantidad de especímenes de estos individuos según las investigaciones disponibles (Scheldeman, 2002 y Encalada, *et al.*, 2003). Se encontraron frutos maduros con abundantes semillas en las siguientes localidades:

Vasconcellea stipulata V.M. Badillo (Toronche):

- Celica, provincia de Loja
- Rumishitana, provincia de Loja

Vasconcellea pubescens A.DC (Chamburo):

- Cuenca, provincia de Azuay
- Quito, provincia de Pichincha
- Loja, provincia de Loja

Se tomaron fotografías de los distintos especímenes y se recolectaron partes vegetales destinadas a herborización. Un ejemplar de cada especie fue depositado

para su colección en el Herbario (LPAG) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata.

3.1.2. Procesamiento y almacenamiento de las semillas

Se extrajeron las semillas de los frutos maduros, de color amarillo intenso. Se realizó remoción manual de la sarcotesta por resultar conveniente y sencilla a pequeña escala y no afecta al embrión como lo hacen los agentes químicos usados para este fin. Posteriormente se realizó un enjuague simple con agua corriente y se las secó a la sombra por un espacio de 5 a 10 días.

Las semillas fueron almacenadas en frascos opacos, cada uno con un sobre de sílica gel.

Se utilizaron las semillas que tuvieran un periodo de almacenamiento mayor a 3 meses y menor a 10 meses según lo recomendado por la literatura para aumentar el porcentaje de germinación (Alarcón et al., 1997).



Foto 10. Frutos de *V. pubescens* para extracción manual de semillas.

Fuente: I. Espinosa 2014

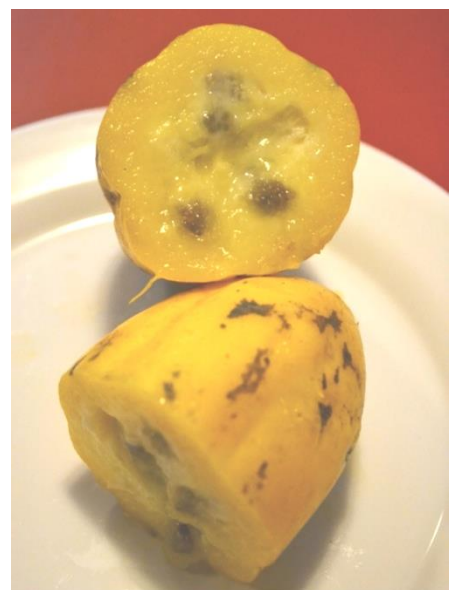


Foto 11. Fruto de *V. stipulata* para extracción manual de semillas.

Fuente: I. Espinosa 2014

3.2. TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS

3.2.1. Laboratorio de biotecnología

El laboratorio de cultivo de tejidos vegetales en el que se realizó el presente estudio estuvo conformado por:

- a) Área de preparación y esterilización: En este espacio se realizaron las tareas de desinfección del material vegetal; lavado y esterilización del material de vidrio e instrumental y la preparación de los medios de cultivo. Los equipos utilizados fueron: autoclave, estufa, microondas, lavavajillas, balanza de precisión, agitador, freezer, heladera, pH metro, instrumental menor de vidrio, instrumental menor de disección, stock de drogas (macro y micronutrientes, compuestos orgánicos, reguladores de crecimiento, etc.).
- b) Sala de transferencia y cámara de cría: En este espacio se manipuló el material asépticamente, para ello se usó una campana de flujo laminar. La cámara de cría reúne las condiciones ambientales requeridas para el cultivo de tejidos *in vitro*. Los equipos utilizados fueron: cámara de flujo laminar, mecheros, alcohol, lupas, instrumentos para disección (bisturíes, diferentes tipos de pinzas, agua destilada estéril, barbijos, guantes de látex, recipientes con alcohol, film transparente); estantería adecuada con luz blanca, termómetros ambientales, aire acondicionado frío/calor, temporizador eléctrico.

3.2.2. Condiciones generales de cultivo *in vitro*

Dentro de la cámara de cría del Centro de Experimental de Propagación Vegetativa (CEPROVE) se manejaron condiciones de cultivo estandarizadas durante todo el tiempo que tomó el estudio, las cuales consisten en:

- Temperatura ambiente: 22 ± 2 °C
- Humedad 100%
- Intensidad luminosa: $60 \pm 5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
- Fotoperíodo: ciclos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

3.2.3. Descripción de experimentos

3.2.3.1. Métodos de remoción de latencia

Se realizaron los siguientes experimentos:

- a) Pre-aplicación de frío (heladera: 4 a 7°C) por 7 días.
- b) Pre-aplicación de ácido giberélico a una concentración de 600 ppm más nitrato de potasio (KNO₃) al 1.5% por 24 y 48 horas.
- c) Pre-aplicación de peróxido de hidrógeno al 3% en condiciones de asepsia 30 minutos antes de su siembra *in vitro*.
- d) Enjuague continuo con agua corriente por 24 y 48 horas.

Se evaluó la aplicación de pre-tratamientos para la remoción de la latencia mediante el cálculo del porcentaje de semillas que germinaron y la existencia de diferencias significativas con los otros grupos de tratamiento.

3.2.3.2. Método de desinfección de semillas

En cuanto a la desinfección se realizaron los siguientes experimentos basados en la investigación de Criollo (2008):

- a) Lavado con detergente comercial por 5 minutos, enjuague por dos ocasiones, inmersión en hipoclorito de sodio (presentación comercial de 50g/L) diluido al 5% por 30 minutos, tres enjuagues con agua destilada y esterilizada en autoclave; dentro de la cámara de flujo laminar inmersión en etanol al 70% por un minuto, enjuague por 2 ocasiones con agua bi-destilada estéril.
- b) Lavado con detergente comercial por 5 minutos, enjuague por dos ocasiones, inmersión en hipoclorito de sodio diluido al 20% (presentación comercial de 50g/L) por 30 minutos, tres enjuagues con agua destilada y esterilizada en autoclave; dentro de la cámara de flujo laminar inmersión en etanol al 70% por un minuto, enjuague por 2 ocasiones con agua bi-destilada estéril.

Se evaluó la esterilización mediante la colocación de las mismas en medio de cultivo de aislamiento previamente esterilizado en autoclave. Los cultivos fueron incubados en la cámara de cría por 15 días bajo las condiciones generales de cultivo *in vitro*.

Se calculó el porcentaje de semillas que permanecieron sin indicios de contaminación durante el período de aislamiento y la existencia de diferencias significativas con los otros grupos de tratamiento.

Además, se cruzaron los valores con el experimento de germinación *in vitro* para evaluar si el proceso de desinfección afectó o no finalmente a la germinación.

3.2.3.3. Germinación *in vitro*

Una vez obtenidos el mejor método de desinfección, se realizaron dos experimentos para evaluar la mejor técnica para germinación *in vitro*:

- a) Siembra en frascos de 200 a 300 ml de capacidad, llenados con 20 a 30 ml de medio de cultivo de aislamiento con 10% de sacarosa y 7.5g de agar/L previamente esterilizado en autoclave.
- b) Siembra en cajas de Petri de 10 cm de diámetro y 15 cm de profundidad, con papeles absorbentes esterilizados y humedecidos con agua destilada estéril, posteriormente rehidratados a los 15 días con una solución acuosa de ácido giberélico a una concentración de 200 ppm.

Los frascos y cajas fueron incubados en la cámara de cría bajo las condiciones generales de cultivo *in vitro*. Aquellas semillas sembradas fueron repicadas a frascos con medio de cultivo fresco cada 2 meses o cuando se presentaron signos precoces de deshidratación del medio. Las semillas sembradas sobre papel fueron regadas mensualmente con agua destilada estéril o cuando se presentaron signos precoces de deshidratación del papel.

3.2.3.4. Microinjertación

Se aplicó una variación a la técnica descrita por Mosella y Ascui (1984) con plántulas de *V. pubescens* como pie y *V. stipulata* como ápice. Las plántulas se obtuvieron de semillas germinadas *in vitro* en la fase anterior y se les realizó el siguiente procedimiento bajo condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar:

1. En plántulas de *V. pubescens* (pie del injerto) se realizó decapitación a 3 cm de longitud desde la raíz con incisión en “v”.
2. En plántulas de *V. stipulata* (ápice del injerto) se obtuvo el ápice de 1 a 1.5 mm de longitud con incisión en “v”.
3. Pretratamiento de ápices según el método descrito por Criollo (2008): sumergirlos por 30 minutos en un medio líquido MS (2.4 g/l) enriquecido con AIA (30 ppm) y sacarosa (15g/l) previamente esterilizado.
4. Microinjertación con ayuda de lupa binocular.
5. Incubación de la planta microinjertada en un tubo con el mismo medio de crecimiento de la fase previa bajo las condiciones generales de cultivo *in vitro*.

El prendimiento es la unión efectiva que se produce entre el injerto y el patrón. Esta unión define el éxito del injerto comprobando la compatibilidad de los mismos. El objetivo evaluar esta variable es hallar el porcentaje de plantas microinjertadas exitosamente.

Se toma el tubo con la planta injertada y se observa la zona del injerto para determinar anomalías tales como presencia de necrosis o decoloración. En un segundo paso se evalúa si la unión fue efectiva mediante un leve estiramiento ayudado por una pinza estéril dentro de la cámara de flujo laminar 20 días después de efectuada la microinjertación.

3.2.3.5. Cultivo de callos

Para producir callogénesis se utilizaron plántulas de *V. stipulata* y *V. pubescens* con dos tratamientos hormonales:

- a) Medio MS en concentración completa más Ácido Indol Butírico (AIB) 0,5 ppm.
- b) Medio MS a la mitad de su concentración con AIB 0,5 ppm.

Ambos experimentos se realizaron bajo las condiciones generales de cultivo *in vitro*. Con el fin de evaluar el resultado del experimento se observó la presencia o ausencia de calogénesis en el explanto a los 30, 60 y 90 días de colocado en el medio de inducción de callos.

3.2.3.6. Inducción de embriogénesis indirecta

Los experimentos para inducir embriogénesis indirecta estuvieron divididos en tres etapas:

1. En la primera etapa de inducción de embriogénesis, los callos generados en la fase anterior fueron sometidos a un medio de cultivo consistente en MS al medio con 5 ppm de 2,4 D más los siguientes nutrientes: 0.04 g/L mioinositol, 0,16 g/L caseína, 0,4 g/L glutamina por 4 semanas bajo las condiciones generales de cultivo *in vitro* en todos sus parámetros, con excepción de que estuvieron en oscuridad durante este tiempo.
2. En la segunda etapa se los removió del medio de cultivo con 2,4 D para suprimir el estímulo hormonal de esta auxina (Radice, 2010) y se los subcultivó al medio inicial de inducción de callos (MS más AIB 0,5 ppm/L) bajo las condiciones generales de cultivo *in vitro* por 2 semanas.
3. En la última etapa, de regeneración o germinación embrionaria, se los colocó frente a dos combinaciones hormonales que consistieron en:
 - a) La mitad de la concentración de las sales MS, mioinositol 100 mg/L, vitaminas MS en concentración normal, sacarosa 20 g/L; agar 5 g/L, pH 5.8 y kinetina 4 mg/L por 4 semanas bajo las condiciones generales de cultivo *in vitro*.
 - b) La mitad de la concentración de las sales MS, mioinositol 100 mg/L, vitaminas MS en concentración normal, sacarosa 20 g/L; agar 5 g/L, pH 5.8 y 6-BAP 0.22 y mg/L por 4 semanas bajo las condiciones generales de cultivo *in vitro*.

3.2.4. Estudios histológicos y morfológicos

Se llevaron a cabo análisis morfológicos a los callos obtenidos con un microscopio estereoscópico Wild M8, con un aumento máximo de 40x para evaluar aspectos tales como textura, color y friabilidad de los callos.

Para los análisis histológicos se realizaron cortes de 0,5 mm a mano alzada con bisturí y posterior tinción con safranina. Se retiró el exceso de colorante con agua destilada. Los cortes histológicos se fijaron y posteriormente se observaron en microscopio óptico Nikon equipado con ocular micrométrico con aumento máximo de 400x.

3.3. DISEÑO ESTADÍSTICO

El presente trabajo tiene un diseño experimental. Con excepción de la microinjertación, se realizó la prueba de Chi^2 con un nivel de significación del 5% por tratarse de cruces de variables categóricas con el fin de establecer o no la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos realizados. Se utilizó el programa en línea Socscistatistics 2016.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según lo encontrado en la literatura, el porcentaje de germinación de *V. Stipulata* es menor al de *V. pubescens*, sin embargo, las dos especies presentan dificultades en su germinación la cual se describe como errática y tardía. En el presente estudio se ensayaron 329 semillas de *V. stipulata* y 308 de *V. pubescens* que presentaron un porcentaje de germinación del 24,32% y del 20,45% respectivamente, es decir no existieron diferencias significativas entre los porcentajes de germinación de ambas especies (Chi^2 : 1.3625. p : 0.243). Para el resto de pruebas se analizan ambas semillas indistintamente.

	Germinó	No germinó	TOTAL	% Germinación
<i>V. Stipulata</i>	80	249	329	24,32%
<i>V. Pubescens</i>	62	246	308	20,13%
TOTAL	142	495	637	

Chi^2 : 1.3625. Valor de p : 0.2046. Esta diferencia no es significativa con $p < 0.05$

Tabla 4. Porcentaje de germinación *in vitro* de las especies *V. pubescens* y *V. stipulata*
Fuente: I. Espinosa 2016

4.1. Desinfección de semillas

Un grupo de 288 semillas de *V. pubescens* y *V. stipulata* fue sembrado *in vitro* en un medio de aislamiento con agar (7,5 mg/L) y sacarosa (15 mg/L). En este grupo se pudo evaluar los dos protocolos de desinfección basados en el estudio de Criollo (2008), variando el porcentaje de solución de hipoclorito (5 o 20%) entre cada uno de ellos. El primer subgrupo de 179 semillas fue sometido a la solución de hipoclorito (50gr/L) al 20% y el segundo grupo de 109 semillas a la solución de hipoclorito al 5%.

Posteriormente, las semillas en el medio de aislamiento fueron incubadas en la cámara de cría por 15 días bajo las condiciones generales de cultivo *in vitro*. Después de este tiempo se pudo comprobar que en el grupo de solución de hipoclorito al 20% se produjo un porcentaje de contaminación bacteriana o fúngica del 44,69%,

mientras que en el grupo de solución de hipoclorito al 5% se observó un porcentaje de contaminación del 31,19%. Estadísticamente, hubo diferencia significativa entre estos grupos.

	HIPOCLORITO 20%	HIPOCLORITO 5%	TOTAL
CON CONTAMINACIÓN	80	34	114
SIN CONTAMINACIÓN	99	75	174
TOTAL	179	109	288
% CONTAMINACION	44,69%	31,19%	
% DESINFECCION	55,31%	68,81%	

CHI² 5.1629. Valor de p: 0.023075. Diferencia significativa con $p < .05$

Tabla 5. Eficacia del protocolo de desinfección con distintas concentraciones de solución de Hipoclorito de sodio (50gr/L) al 5% y al 20%
Fuente: I. Espinosa 2016.

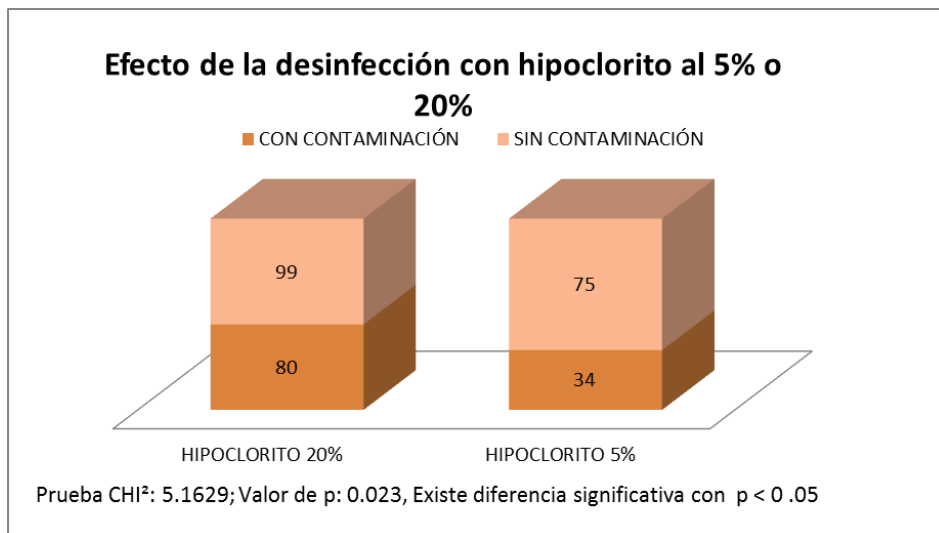


Gráfico 5. Eficacia del protocolo de desinfección con distintas concentraciones de solución de Hipoclorito de sodio (50gr/L) al 5% y al 20%
Fuente: I. Espinosa 2016.

Llama la atención que el porcentaje de contaminación de las semillas con una solución de hipoclorito al 20% es más alta que la solución al 5%, sin embargo esto puede deberse a que la solución de mayor concentración produce probablemente daños en la viabilidad de la semilla, llevándola a un estado de mayor susceptibilidad a la contaminación. En el siguiente análisis se puede observar que las semillas

sometidas a una desinfección con un porcentaje más alto de hipoclorito tienen mayores dificultades en su germinación ($p < 0.05$).

	HIPOCLORITO 20%	HIPOCLORITO 5%	TOTAL
GERMINÓ	15	21	36
NO GERMINÓ	164	88	252
TOTAL	179	109	288
% DE GERMINACIÓN	8,38%	19,27%	12,50%
CHI ² : 7,34 Valor de p=0,0067 No existe diferencia significativa con $p < .05$			

Tabla 6. Porcentaje de germinación *in vitro* de *V. pubescens* y *V. Stipulata* con distintas concentraciones de solución de hipoclorito de sodio (50gr/L)
Fuente: I. Espinosa 2016

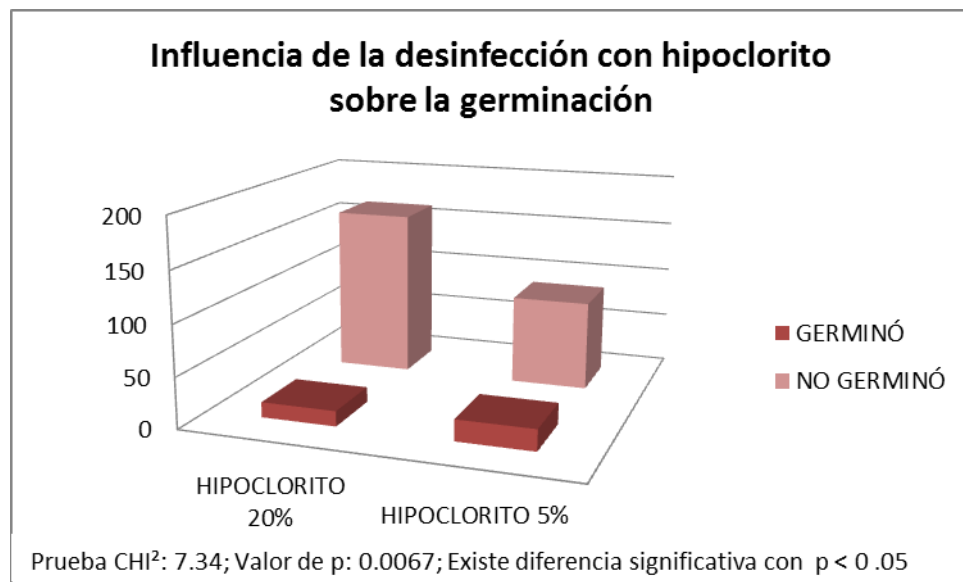


Gráfico 6. Influencia de la desinfección con distintas concentraciones de hipoclorito de sodio (50gr/L) sobre la germinación *in vitro* de *V. pubescens* y *V. Stipulata*.
Fuente: I. Espinosa 2016

4.2. Remoción de la latencia

Uno de los pre-tratamientos que se han practicado en otros estudios (Scheldeman, 2002) a semillas de especies de Caricaceas es el de someterlas por una semana o más a un ciclo de frío. En el presente estudio, un grupo de ellas (*V. stipulata* más *V. pubescens*) fueron sometidas a 7 días de frío en la heladera (4 a 7°C) antes de iniciar su proceso de germinación. Sin embargo, por los datos encontrados se concluye que

no existe una diferencia significativa en los resultados de la germinación de semillas sometidas a frío versus aquellas semillas no refrigeradas.

	PRE FRIO	SIN FRIO	TOTAL
GERMINÓ	74	68	142
NO GERMINÓ	230	265	495
TOTAL	304	333	637
Chi ² : 1.4109. Valor de p: 0.2349. Esta diferencia no es significativa con p < 0.05			

Tabla 7. Germinación *in vitro* de las especies *V. pubescens* y *V. stipulata* sometidas a pre-tratamiento con frío y sin frío

Fuente: I. Espinosa 2016

Se realizaron en dos grupos de semillas el enjuague continuo con agua corriente por 24 y 48 horas con el fin de intentar remover las sustancias inhibidoras de la germinación de la superficie. Mediante el análisis de los datos se pudo comprobar que no existe diferencia significativa entre realizar un enjuague por 24 o 48 horas.

	ENJUAGUE 24 H	ENJUAGUE 48 H	TOTAL
GERMINÓ	66	76	142
NO GERMINÓ	221	274	495
TOTAL	287	350	637
% DE GERMINACIÓN	23,00%	21,71%	
Chi ² : 0,149667558 p= 0,6989			

Tabla 8. Germinación *in vitro* de las especies *V. pubescens* y *V. stipulata* sometidas a pre-tratamiento con enjuague continuo de 24 y 48 horas

Fuente: I. Espinosa 2016

Otro pre-tratamiento descrito en la literatura fue la aplicación de ácido giberélico a una concentración de 600 ppm por 24 horas. En la presente investigación se decidió sumar a este regulador de crecimiento, nitrato de potasio (KNO₃) a una concentración del 1,5% (15mg/L) para dar pre-tratamiento a dos grupos de semillas por 24 y 48 horas. Como resultado se encontró que la combinación de ácido giberélico más KNO₃ favorece la germinación de semillas, pues existe una diferencia significativa entre tratarlas o no tratarlas con este pre-tratamiento, siendo preferible la permanencia en esta solución por 48 horas.

PRE-TRATAMIENTO	GERMINÓ	NO GERMINÓ	TOTAL
SIN PRETRATAMIENTO	7	71	78
AG ₃ + KNO ₃ 24 horas	61	360	421
AG ₃ + KNO ₃ 48 horas	74	64	138
TOTAL	142	495	637
Chi ² : 100.9854. Valor de p: 0.0001. Existe una diferencia significativa con p < 0.05			

Tabla 9. Germinación *in vitro* de las especies *V. pubescens* y *V. stipulata* sometidas a pre-tratamiento con 24 y 48 horas de ácido giberélico a 600 ppm más KNO₃
Fuente: I. Espinosa 2016

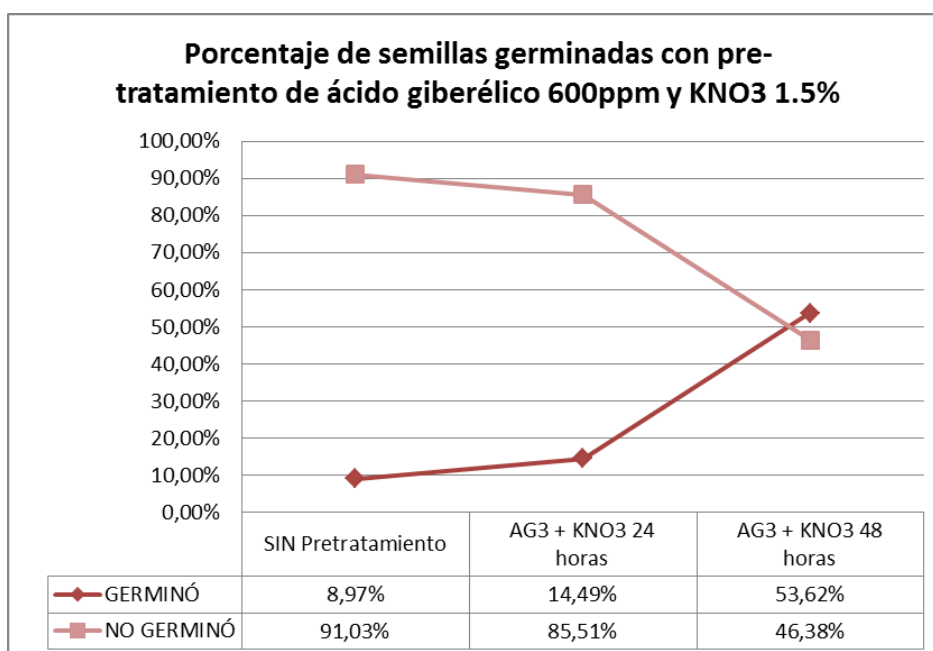


Gráfico 7. Porcentaje de germinación *in vitro* de las especies *V. pubescens* y *V. stipulata* sometidas a pre-tratamiento con 24 y 48 horas de ácido giberélico a 600 ppm más KNO₃, y sin ningún pre-tratamiento. (p < 0.05)
Fuente: I. Espinosa 2016

Por último, se realizó la aplicación de peróxido de hidrógeno al 3% (10 vol.) por 30 minutos antes de la siembra en la cámara de flujo laminar en un grupo de 537 semillas dando como resultado una ventaja significativa en la germinación sobre aquellas semillas que no recibieron este pre-tratamiento.

	CON H2O2	SIN H2O2	TOTAL
GERMINÓ	137	5	142
NO GERMINÓ	400	95	495
TOTAL	537	100	637
% DE GERMINACIÓN	25,51%	5,00%	
	CHI² 20,48	p=0,000	

Tabla 10. Germinación *in vitro* de las especies *V. pubescens* y *V. stipulata* sometidas a pre-tratamiento con 30 minutos de peróxido de hidrógeno.
Fuente: I. Espinosa 2016

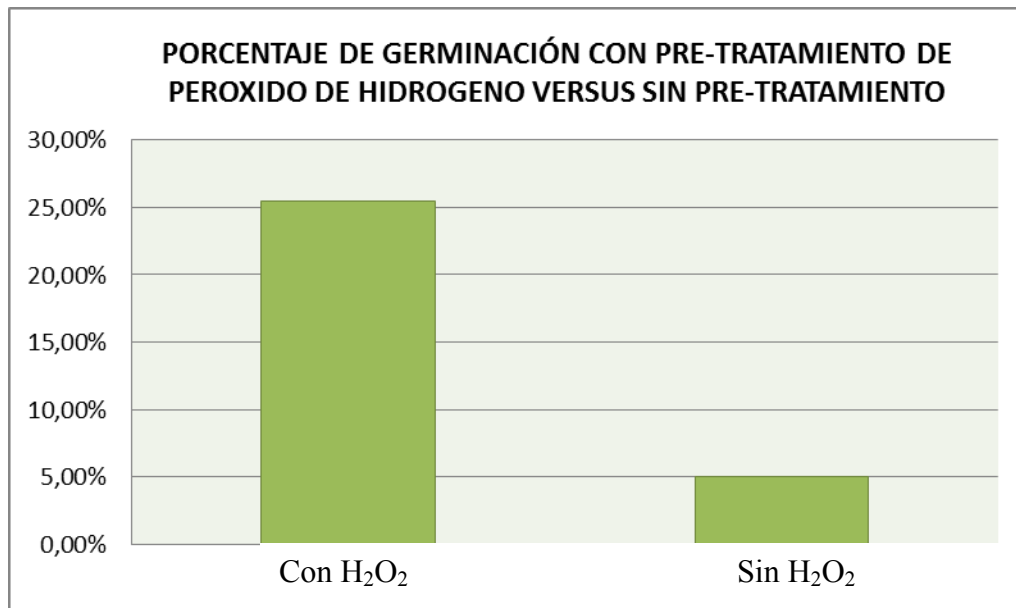


Gráfico 8. Porcentaje de germinación *in vitro* de las especies *V. pubescens* y *V. stipulata* sometidas a pre-tratamiento con peróxido de hidrógeno y sin peróxido de hidrógeno ($p < 0.05$)
Fuente: I. Espinosa 2016

4.3. Germinación *in vitro*

En esta etapa del estudio se evaluó la germinación de las semillas de *V. pubescens* y *V. stipulata* que se sembraron en medio de aislamiento y aquellas que se sembraron en cajas Petri con papeles estériles humedecidos con agua destilada y posteriormente rehidratados a los 15 días con una solución acuosa de ácido giberélico 200 ppm. Se compararon las dos técnicas y se encontró que la germinación en papel es significativamente más efectiva que la realizada en agar y sacarosa.

	AGAR	PAPEL	TOTAL
GERMINÓ	36	106	142
NO GERMINÓ	252	243	495
TOTAL	288	349	637
% DE GERMINACIÓN	12,50%	30,37%	22,29%
CHI² 29.0961. Valor de p= 0.000. Diferencia significativa con p < 0.05.			

Tabla 11. Germinación *in vitro* de semillas de *V. pubescens* y *V. stipulata* en medio de cultivo de aislamiento (agar) y cajas Petri con papel.
Fuente: I. Espinosa 2016

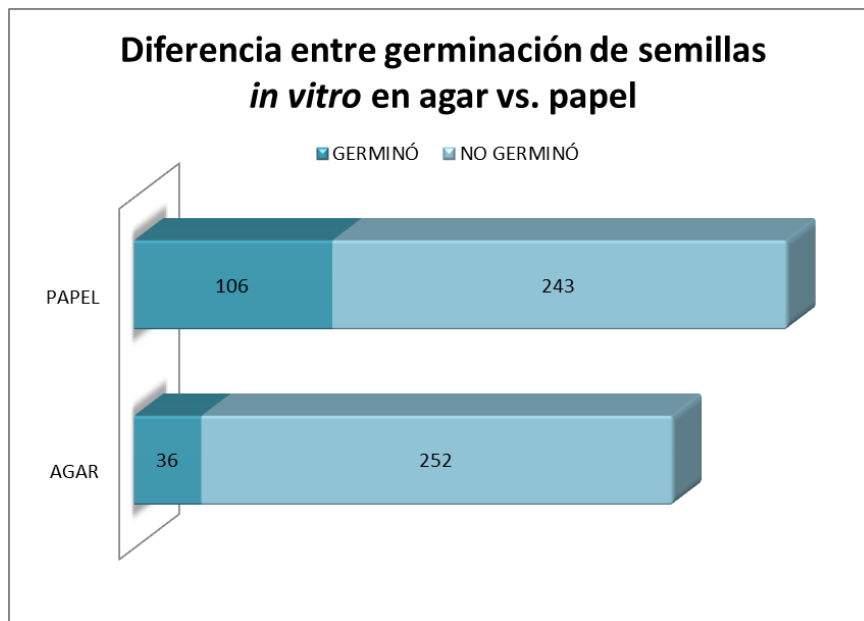


Gráfico 9. Germinación *in vitro* de las especies *V. pubescens* y *V. stipulata* en medio de cultivo de aislamiento (agar) y cajas Petri con papel. (p < 0.05)
Fuente: I. Espinosa 201



Foto 12. Germinación *in vitro* de *V. stipulata* en medio de cultivo de aislamiento (agar)
Fuente: I. Espinosa 2015



Foto 13. Germinación *in vitro* *V. pubescens* caja de Petri con papel
Fuente: I. Espinosa 2015

Tal como se realizó en el estudio de Criollo (2008) para engrosamiento del epicótilo y nutrición de la plántula, se repicaron las semillas germinadas de ambas especies a un medio de cultivo con MS en concentración completa y con MS a la mitad de su concentración, más AIB 0,5ppm, pH 5.8 y agar 7g/L. Durante el transcurso del estudio, en estos medios la mayor parte de las semillas (55,63%) germinadas sufrieron un proceso de necrosis que sobrevino aproximadamente una a dos semanas después de la salida de los cotiledones, otro porcentaje menor (10%) sufrió contaminación microbiana durante el proceso de subcultivo.

	Plántulas germinadas	contaminación post-subcultivo	% muerte	podrición aséptica	% muerte	Supervivientes
<i>V. Stipulata</i>	80	6	8%	53	66%	21
<i>V. Pubescens</i>	62	8	13%	26	42%	28
TOTAL	142	14	10%	79	55,63%	49

Tabla 12. Supervivencia de plántulas germinadas *in vitro* de semillas de *V. pubescens* y *V. stipulata*
Fuente: I. Espinosa 2016



Foto 14. Muerte de semilla germinada de *V. pubescens* sin relación con agentes microbianos
Fuente: I. Espinosa 2016

4.4. Microinjertación

Las plántulas que llegaron a la formación de epicótilo y primeras hojas de *V. pubescens* y *V. stipulata* se obtuvieron de semillas germinadas *in vitro* en la fase anterior. A ocho plántulas de cada especie se les realizó el procedimiento anteriormente descrito en metodología, bajo condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar, respetando rigurosamente cada uno de los pasos.

Se realizaron observaciones en la zona del injerto a las 24, 48 y 72 horas, encontrando en el 100% de los experimentos una zona de necrosis en el sitio de la unión. No se produjo prendimiento en ninguno de los casos, es decir no se obtuvo ningún injerto exitoso, pues no se obtuvo unión efectiva entre el injerto y el pie.



Fotos 15 y 16. Microinjertos en fase temprana (1 -3 horas)
Fuente: I. Espinosa 2015



Fotos 17 y 18. Microinjertos a las 48 horas
Fuente: I. Espinosa 2015



Foto 19. Microinjerto con necrosis 72 horas
Fuente: I. Espinosa 2015

4.5. Cultivo de callos

Como se mencionó anteriormente, con el fin de producir engrosamiento del epicótilo previo a la microinjertación y para generar crecimiento de callos *in vitro* se subcultivaron 80 plántulas de *V. stipulata* y 62 plántulas de *V. pubescens* con dos tratamientos hormonales:

- a) Medio MS en concentración completa más Ácido Indol Butírico (AIB) 0,5 ppm.
- b) Medio MS a la mitad de su concentración con AIB 0,5 ppm.

Al observar las plántulas tratadas a los 30, 60 y 90 días se encontró generación de callos en el cuello de la raíz de 6 plántulas de *V. stipulata* de color parduzco-claro y apariencia esponjosa.

	MS + AIB	callos	% Callos	1/2MS + AIB	callos	% Callos
<i>V. Stipulata</i>	30	4	13%	50	2	4%
<i>V. Pubescens</i>	30	0	0%	32	0	0%

Tabla 13. Generación de callos en plántulas de *V. pubescens* y *V. stipulata*
Fuente: I. Espinosa 2016



Foto 20. Callo obtenido de *V. stipulata* con 4 semanas de crecimiento
Fuente: I. Espinosa 2015



Fotos 21, 22 y 23. Callos obtenidos de *V. stipulata* con 8 semanas de crecimiento
Fuente: I. Espinosa 2016

Posterior a la generación de callos primarios, se procedió a la multiplicación de los mismos en el medio de cultivo compuesto por sales MS en su concentración completa y AIB 0,5 ppm por 12 semanas en las condiciones de humedad, luz y temperatura especificadas en la metodología. Se realizaron tres subcultivos con una separación de 4 semanas entre cada uno. Después de este tiempo se obtuvieron 15 frascos de cultivo con una cantidad aproximada de 100 ml de callos. Se realizó inspección visual para estimar aproximadamente el volumen de cada uno. Con ayuda

de un microscopio estereoscópico se observó la superficie de estos callos encontrando que presentaban un aspecto esponjoso, piliforme.

Semanas	Callos	Frascos	Volumen estimado
1	6	6	5 ml
2	6	6	10 ml
4	12	10	20 ml
6	12	10	35 ml
8	24	12	45 ml
10	40	12	60 ml
12	incontables	15	100 ml

Tabla 14. Observación cualitativa de crecimiento de callos de *V.stipulata*
Fuente: I. Espinosa 2016

4.6. Embriogénesis indirecta

Al obtener gran cantidad de callos en la fase anterior, se intentó generar embriones somáticos mediante el subcultivo en dos medios con reguladores de crecimiento específicos como se detalla en la metodología.

En la primera etapa se expusieron 10 frascos con 5 callos cada uno por 4 semanas para iniciar una fase de inducción de embriogénesis. Como resultado se produjo necrosis en el 30% de los callos probablemente debido a la aplicación de 2,4D, sin embargo el 70% de ellos se mantuvieron vivos, con un cambio de color de blanco cremoso a parduzco.



Foto 24. Callos de *V. stipulata* expuestos por 4 semanas a 2,4 D
Fuente: I. Espinosa 2015

En la segunda fase de multiplicación, al retornar al medio con sales MS más AIB 0,5 ppm/L en condiciones generales de cultivo *in vitro* se produjo un crecimiento aproximado del 50% en el volumen de los callos en 2 semanas de incubación, recuperando parcialmente su aspecto claro y de menor densidad.



Foto 25. Callos de *V. stipulata* expuestos por 4 semanas a 2,4 D y posteriormente al medio de generación (MS +IBA 0,5ppm)
Fuente: I. Espinosa 2015

En la tercera fase de regeneración o germinación embrionaria se dividieron las muestras en dos grupos los cuales se sometieron al experimento señalado la metodología por 4 semanas. El grupo de callos que fueron subcultivados en el medio de cultivo con kinetina y el segundo grupo de callos, que fueron subcultivados con BAP presentaron en el análisis morfológico e histológico los siguientes hallazgos:

a) Análisis con lupa:

En los callos que estuvieron expuestos a kinetina se evidenciaron zonas de aparente transformación embriogénica en un 25% de su superficie. En los callos que fueron expuestos a BAP se apreció una transformación embriogénica del tejido en un 40% de su superficie. El cambio en la apariencia del callo se describe como de aspecto transparente, friable, globular.

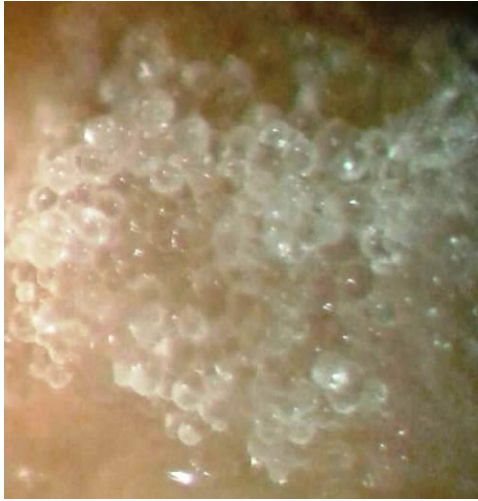


Foto 25. Observación con lupa (40x) de callos de *V. stipulata* expuestos a kinetina
Fuente: I. Espinosa 2016

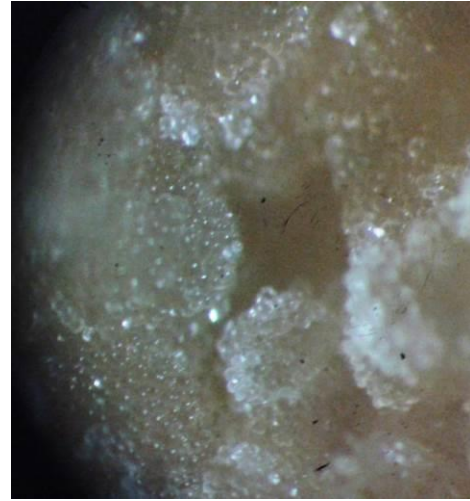


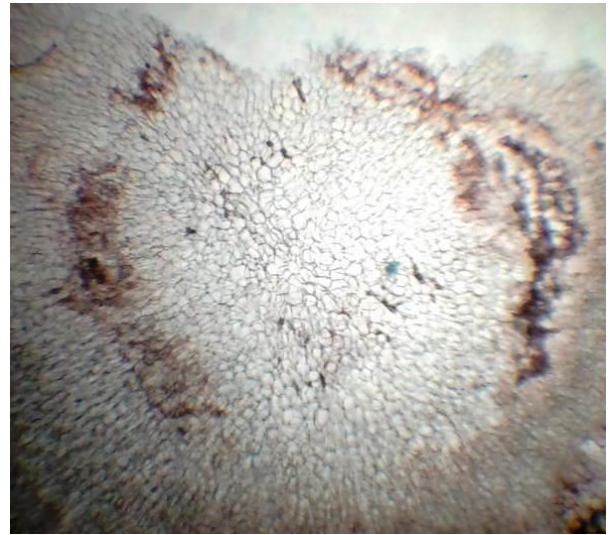
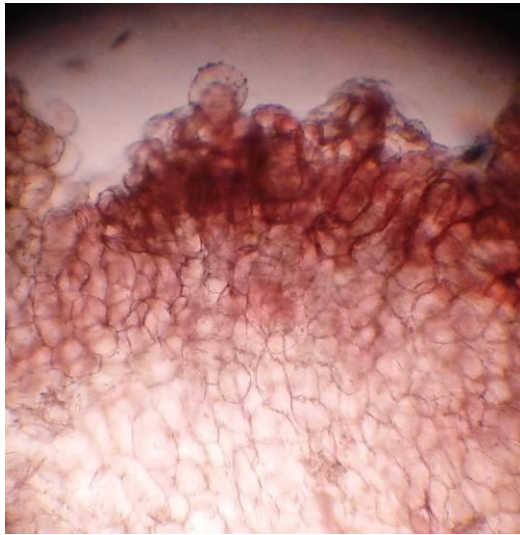
Foto 26. Observación con lupa (40x) de callos de *V. stipulata* expuestos a BAP
Fuente: I. Espinosa 2016

b) Análisis con microscopio óptico:

No se pudieron visualizar correctamente los cúmulos de células meristemáticas que describe la literatura para los callos embriogénicos, con el método descrito por Jácome (2012).



Fotos 27 y 28. Observación con microscopio óptico (400x) de callos de *V. stipulata* expuestos a BAP
Fuente: I. Espinosa 2016



Fotos 29 y 30. Observación con microscopio óptico (400x) de callos de *V. stipulata* expuestos a Kinetina
Fuente: I. Espinosa 2016

5. CONCLUSIONES

Las especies estudiadas, *V. pubescens* y *V. stipulata*, tienen propiedades medicinales muy interesantes derivadas de su alto contenido en enzimas proteolíticas y otros componentes no enzimáticos menos estudiados. Deben continuarse las investigaciones que relacionan estos principios activos con el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas tales como el cáncer, la artritis reumatoide y la osteomielofibrosis, en las cuales hay evidencia de una participación fisiopatológica compleja pero importante. En el campo de la medicina, se debe alentar el uso de preparaciones tópicas para mejorar la cicatrización y en tabletas como suplemento alimenticio para favorecer la digestión, pues estas formas farmacéuticas son seguras para la mayor parte de pacientes.

A pesar del gran potencial económico y medicinal que ofrecen las plantas estudiadas, éstas se encuentran en condición de especies amenazadas y en peligro de extinción. Al momento en Sudamérica constituyen frutales nativos que no muestran grandes beneficios económicos inmediatos. Sin embargo, se puede concluir mediante el análisis realizado, que podría ser altamente rentable el purificar papaína de estas especies en zonas en donde son endémicas, pues allí tienen mejores condiciones edafoclimáticas.

La tasa de germinación de ambas especies es muy baja a pesar de la aplicación de distintos pre-tratamientos, por este motivo es indispensable continuar desarrollando protocolos de propagación vegetativa para evitar la extinción de estas especies. Las estrategias encontradas como mejores pre-tratamientos en el presente estudio deben seguirse recomendando para poder germinar estos frutales a gran escala.

La rama de cultivo de tejidos dentro de la Biotecnología en conjunto con las técnicas de mejoramiento vegetal, se han convertido en valiosas herramientas para producir cultivos de élite con mejores características fitosanitarias, es decir especies con mayor resistencia a plagas y patógenos, así como variedades que aprovechan mejor los recursos del suelo y que tengan una superior capacidad de adaptación a los pisos climáticos deseados. De esta manera se intenta reducir el consumo de plaguicidas y agroquímicos y además, en el caso de las especies estudiadas en este trabajo, se aspira a evitar su extinción.

Sobre las técnicas desarrolladas en el presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

- La desinfección es un proceso crucial para el establecimiento de cultivos *in vitro*, sin embargo, los agentes usados no deben interferir con la viabilidad de las células que van a ser usadas como explanto. Por tanto, para las especies estudiadas es suficiente una dosis de 5% de solución comercial de hipoclorito (50gr/L) en la primera etapa de desinfección de semillas de *V. pubescens* y *V. stipulata* por 30 minutos.
- El enjuague continuo para remover sustancias inhibitoras de la germinación que se encuentran en la sarcotesta o superficie de la semilla es útil y recomendable. Sin embargo, no hay necesidad de realizarlo por más de 24 horas.
- Uno de los pre-tratamientos más efectivos encontrados en la presente investigación es la aplicación de ácido giberélico a 600ppm junto con nitrato de potasio al 1.5% por 48 horas, al igual que la aplicación de peróxido de hidrógeno al 3% (10 vol.) 30 minutos antes de la siembra.
- El pre-tratamiento con frío no es útil en las especies estudiadas. Probablemente esto se deba a que son plantas provenientes de Ecuador, donde el clima es relativamente estable a lo largo del año (10-26 °C) y las especies vegetales no requieren atravesar por un periodo de dormición en temperaturas bajas.
- Si bien hubo un porcentaje aceptable de semillas germinadas, éstas no sobrevivieron lo suficiente como para generar plantas adultas. Probablemente se debió a que fueron cultivadas en una latitud muy distinta (La Plata: 34°55'17"S) a donde pertenecen (norte y sur del Ecuador: entre 0°13'47"S y 03°39'55"S), eso pone de manifiesto la fragilidad de estas especies y su vulnerabilidad.
- La germinación de semillas de *V. pubescens* y *V. stipulata* se da más eficientemente sobre papel que sobre un medio de cultivo en agar. Además, es efectiva y recomendable regarlas a los 15 días con una solución acuosa de ácido giberélico 200 ppm.

- La microinjertación no es práctica a la hora de generar plantas de estas especies a gran escala debido a su bajo porcentaje de efectividad y su alta complejidad. Por otra parte, a pesar de que la microinjertación es una de las mejores estrategias para obtener cultivos libres de virus, en estas especies la virosis no es tan amenazante como la causada por la fusariosis. En esta última enfermedad, la injertación clásica es una excelente herramienta que puede proporcionar un pie más resistente a esta patología. En el caso en el que la virosis se transformara a futuro en un problema mayor, la microinjertación de meristemas debería volverse a estudiar en posteriores investigaciones.
- Al pertenecer a la misma familia que *C.papaya*, los protocolos de callogénesis fueron útiles y produjeron grandes cantidades de callos de *V.stipulata*. En posteriores estudios, se debería intentar nuevamente ajustar este protocolo para producir callos de *V.pubescens*.
- Para generar embriones somáticos a partir de callos (embriogénesis indirecta) es importante contar con el tiempo necesario que se requiere para que la respuesta vegetal se manifieste.
- El análisis morfo-anatómico de los callos es una herramienta de gran utilidad que debería estar mejor desarrollada para especies de esta familia. Lamentablemente la información disponible es muy escasa al respecto.
- El mejor método para la observación microscópica de células embriogénicas o pro-embriogénicas es la técnica de inclusión en parafina, sin embargo es poco factible realizarla sin el suficiente equipo y preparación.
- La capacidad de propagación mediante la embriogénesis somática es muy elevada, aparentemente ilimitada en el tiempo y libre de condicionantes estacionales. Este hecho la convierte en un recurso técnico sumamente útil para plantas como las que se estudiaron, las cuales presentan graves dificultades en su germinación. Esta herramienta proporciona un inmenso potencial multiplicativo que debe ser aprovechado para llegar finalmente a la producción sincrónica de embriones de alta calidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Solís, M. (1992). Vademécum de Plantas Medicinales del Ecuador. 1ra Edición, Quito (Ecuador), Editorial FESO.
- Alarcón, L., Benavides, L., Parodi, G. (1997). Efecto de la temperatura y periodo de almacenamiento sobre la germinación de papayuela (*Carica pubescens* Lenné et Koch). Proceedings Of The Interamerican Society For Tropical Horticulture (Eu). v. 41: 242-245.
- Badillo, V. (1971). Monografía de la Familia Caricaceae. Maracay: Universidad Central de Venezuela.
- Badillo, V. (1993). Caricaceae. Segundo esquema. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, Alcance 43, Maracay, Venezuela, 111 p.
- Badillo, V. (2000). *Carica* L. vs. *Vasconcella* St.-Hil. (Caricaceae) con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, 10(2): 74-79.
- Banchon, C. (2005). Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química. Inmovilización de papaína en soporte de quitosano, <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/413/1/TESIS%20955.pdf> [Leído: 11 de agosto de 2014, 22:00 GMT-3].
- Barrett, A., Rawlings, N., & Woessner, J., eds. (2004). Handbook of Proteolytic Enzymes (2nd. Ed.), Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra.
- Benítez, S., Lobo M., Delgado, O., Medina, C., (2013). Estudios de germinación y remoción de latencia en semillas de papayuelas *Vasconcella cundinamarcensis* y *Vasconcella goudotiana*. Artículo de investigación científica. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, COPROICA. 14(2), 187-197.
- Bernal, H., Correa, J. (1990). Especies promisorias de los países de convenio Andes Bello. Tomo IV. Editorial Guadalupe. Bogota, Colombia. 268-300.
- Bio-Health (2015). Papaya Enzymes. <http://www.bio-health.co.uk/shop/bio-health-product-range/papaya-enzymes/>. [Leído: 11 de octubre de 2015, 17:10 GMT-3].
- Bravo, C., Larriva, W., Minchala, L., (2012). Manejo integrado de la Marchitez Vascular o Fusariosis (*Fusarium oxysporum*) en el cultivo de babaco. Boletín

técnico No. 409. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP. Cuenca, Ecuador.

- Botanischer Garten (2016). Carica papaya - der Melonenbaum. <https://www.botanik.kit.edu/garten/636.php>. [Leído: 11 de agosto de 2014, 22:00 GMT-3].
- CAF (1992). Manual técnico del cultivo de chamburo. Centro Agrícola de Quito, Corporación Andino de Fomento, Quito, (Ecuador).
- Cai, W., Gonsalves, C, Tennant, P., Fermin, G., Souza, M., Sarindu, N., Jan, F, Zhu, H., Gonzalves, D., (1999). A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica Papaya* L. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 35: 61-69.
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D., Toribio, M., (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Invest Agrar: Sist Recur For* (2005) 14(3), 345-357.
- Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes. CTIFL. (1992). Nuevas especies frutales. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Chaverri, A. (1983) Comparación de la actividad proteolítica de la papaína secada por diferentes métodos. Tesis de pregrado. Universidad de Costa Rica.
- Conci, V., (2010). Utilización de cultivos de tejidos para la obtención y conservación de plantas libres de enfermedades. En Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L., (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (pp., 26-33) Buenos Aires: Ediciones INTA y ArgenBio.
- Córdoba, S. Guzmán, J., Pérez, B., Zúñiga, P., Pacheco, R. (2010). Propagación de Especies Nativas de la Región Andina. Subdirección Científica. Jardín Botánico José Celestino Mutis. Bogotá, Colombia.
- Cornejo, M., (2009). Inducción de Embriogénesis somática en tejidos foliares obtenidos de plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) in vitro 100% hermafroditas. Tesis de grado. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Las Agujas, México.
- Criollo, D., (2008). Evaluación de dos técnicas para la microinjertación de babaco (*Vasconcella heilbornii* cv. *Pentagona*) y chihualcán (*Vasconcella heilbornii* cv. *Chrysopetala*) en patrones de papaya (*Carica papaya*) bajo condiciones de laboratorio, Santa Catalina – INIAP. Proyecto previo a la obtención de grado académico o título de Ingeniero en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Quito (Ecuador).

- Desser, L., Holomanova, D., Zavadova, E., Pavelka, K., Mohr, T., Herbacek, I., (2001). Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF-beta levels in human blood. *Cancer Chemother Pharmacol.* Jul;47 Suppl:S10-5.
- Dhuique Mayer, C., Caro, Y., Pina, M., Ruales, J., Dornier, M., Graille, J., (2001). Biocatalytic properties of lipase in crude latex from babaco fruit (*Carica pentagona*). *Biotechnology Letters*, 23(13): 1021-1024.
- Drenth, J., Jansonius, J., Koekoek, J., Swen, H., Wolthers, B., (1968). Structure of papain. *Nature*, 218:929-932.
- El Moussaoui, A., Nijs, M., Paul, C., Wintjens, R., Vincentelli, J., Azarkan, M., Looze, Y., (2001). Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defense mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 556-570.
- Encalada, C., Palomeque, X., Verdugo, A., Criollo, S., Peña, D., (2003). Diversidad de frutales nativos comestibles *Caricaceae – Solanaceae*, fenología, usos y recolección de germoplasma en el sur del Ecuador. Cuenca (Ecuador), Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP.
- Eraso, D., Suarez, D., (2008) CHILACUAN *Vasconcellea cundinamarcensis* Badillo. Trabajo Universitario, Maestría En Ciencias Agrarias Universidad de Nariño, San Juan De Pasto.
- FAO (1992). Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492. Colección FAO: Producción y protección vegetal No. 26. Roma, Italia.
- Fernández, J., (2005). Plan de negocio para la producción de papaína en la séptima región. Tesis de pregrado. Universidad de Talca, Escuela de Ingeniería Industrial. Curicó, Chile.
- Flores, G., Álvarez, M., Rodríguez, O., Corona, A., (2008). Germinación in vitro de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana* 10: 27-33.
- Freire, D. (2015). Reproducción asexual del babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv.) Sobre portainjertos de chamburo (*Vasconcellea cundinamarcensis*) y toronche (*Vasconcellea stipulata*). Tesis de pregrado. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo, Ecuador.
- García-Águila, L., Gómez-Kosky, R., Alvarado-Capó, Y., Sarría, Z., Reyes, M., (2010). Efecto de la densidad de inoculación en la formación y morfología de los embriones somáticos de plátano (*Musa spp.* AAAB, cv. híbrido FHIA-

- 21). Revista Colombiana de Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba.
- García, P. (2011). Evaluación de la tolerancia de cinco accesiones de vasconcellas a *fusarium sp.* Como posible portainjertos para babaco (*Vasconcellea x heilborni*) bajo cubierta plástica en la estación experimental del Austro de INIAP. Trabajo de Investigación previa a la obtención del grado académico de Magister en Gestión de la Producción de Flores y Frutas Andinas para Exportación. Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador.
- Grupo Tollupol (2014). Babaco. <http://www.tollupol.es/2013/09/03/babaco/> [Leído: 11 de agosto de 2014, 22:00 GMT-3].
- Guzmán, S., Valadez, P., Manzo, G., (2010). Embriogénesis somática y transformación genética de papaya (*C.papaya* L.) Maradol por biobalística. Herramientas de biotecnología para una agricultura sustentable. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima.
- Health Canada (2012). Papain Monograph: Guide to industry for the preparation of Product License Applications (PLAs). Government of Canadá, Ontario, Canadá.
- Hellebrekers, B., Trimbos-Kemper, T., Trimbos, J., Emeis, J., y Kooistra, T. (2000). El uso de agentes fibrinolíticos en la prevención de la formación de adherencias postoperatorias. Fertil; 74 (2): 203-212.
- Jácome, J., (2012). Establecimiento, inducción y evaluación a callogénesis *in vitro* de meristemas apicales de árboles jóvenes de Romerillo (*Podocarpus oleifolius*) como futura estrategia de conservación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito. Tesis de grado. Universidad Politécnica del Ejército. Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí, Ecuador.
- Jiménez, Y., Romero, J., Scheldeman, X. (1998). Colección, caracterización y descripción de *Carica × heilbornii nm. pentagona* B.; *Carica pubescens* (A.DC.) Solms-Laub. y *Carica stipulata* B., en la provincia de Loja. Revista de Difusión Técnica y Científica de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Nacional de Loja, 29(1-2): 43-54.
- Jordán, M., Vélez, D., Armijos, D., (2009). Biotecnologías aplicables al desarrollo de algunas especies de Caricáceas cultivadas en la región Andina: avances y problemas. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. Vol. 3, No.1: 9-17.

- Kolac, C., Streichhan, P., Lehr, C., (1996). Oral bioavailability of proteolytic enzymes. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol. 42, no4: 222-232.
- Krishnaiah, D., Awang, B., Rosalam, S., Buhri, A., (2002). Commercialisation of papain enzyme from papaya. Chemical Engineering Programme School of Engineering and Information. Technology University Malaysia Sabah. http://s3.amazonaws.com/zanran_storage/pkukmweb.ukm.my/ContentPages/18257369.pdf . [Leído: 8 de octybre de 2015, 18:50 GMT-3].
- Kyndt, T., Romeijn-Peeters, E., Van Droogenbroeck, B., Romero-Motochi, J., Gheysen, G., Goetghebeur, P. (2005) Species relationships in the genus *Vasconcellea* (*Caricaceae*) based on molecular and morphological evidence. *American Journal of Botany* 92(6): 1033–1044.
- Kyndt T., Van Damme E., Van Beeumen J., Gheysen G. (2007) Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea* spp. *The FEBS Journal*, Vol 274, Número 2.
- Lara, A., Valverde, R., Gómez, L., (2003). Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense* 27(1): 37-48.
- Lassoudière, A. (1969). La papaïne, production propriétés, utilisation (dixième partie). *Fruits*, 24(11-12): 503-517.
- Leipner, J., Iten, F., y Saller. (2001). Terapia R. con enzimas proteolíticas en enfermedades reumáticas. *Biofármacos*, 15 (12): 779-789.
- Lorkowski, G. (2012). Gastrointestinal absorption and biological activities of serine and cysteine proteases of animal and plant origin: review on absorption of serine and cysteine proteases. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 4(1): 10-27.
- Madrigal, L., Ortiz, A., Cooke, R., Fernández, R., (1980). The dependence of crude papain yields on different collection ('tapping') procedures for papaya latex. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31: 279-285.
- Mansur F., Luoga W., Buttle D., Duce I. et al., (2014). The anthelmintic efficacy of natural plant cysteine proteinases against two rodent cestodes *Hymenolepis diminuta* and *Hymenolepis microstoma* *in vitro*. *Veterinary Parasitology* [2014, 201(1-2): 48-58].

- Moretti, D., Del Bello, B., Allavena, G., Maellaro, E., (2014). Calpains and cancer: friends or enemies? *Arch Biochem Biophys.* 15; 564: 26-36. doi: 10.1016/j.abb.2014.09.018. Epub 2014 Oct 11.
- Mundo, J. y Serrano, D., (2012). Extracción de la enzima papaína del látex de *Carica papaya* (papayo) cultivado en el país y su aplicación en cicatrices tipo queiloide y verrugas. Tesis de pregrado. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador.
- Muñoz, V., (2009). Introducción y germinación “*in vitro*” de semillas de *Vasconcellea pubescens* a partir de diferentes procedencias. Tesis de pregrado. Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias. Talca, Chile.
- Mosella, L, Ascui, L. (1984). Obtención de plantas frutales libres de virus a partir de ápices meristemáticos cultivados *in vitro*. *Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica* 23:514-533.
- Murashige, T, Skoog F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 437-497.
- Navarro, L., Roistacher, C., Murashige, T., (1975). Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free Citrus. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 100: 471-479.
- Noriega, P., Calero D., Larenas, C., Maldonado, M., Vita, P., (2014). Componentes volátiles de los frutos de *Vasconcellea pubescens* A. DC. y *Passiflora tripartita var. mollissima* (KUNTH) usando la metodología HS-SPME-GC/MS. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida* 19(1): 5-11. Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador.
- Obregon, W. (2008). Hidrolasas de látex de especies del género *araujia*. purificación y caracterización de las enzimas proteolíticas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina.
- Ochoa, J., Ellis, M., (2002) Componentes del manejo integrado de Fusariosis o marchitez vascular de babaco en el Ecuador. *Revista Técnica Informativa INIAP.* N° 16: 16 – 18.
- Oxford vitality (2015). Ginger, turmeric, papain and bromelain tablets. <https://www.oxfordvitality.co.uk/product/ginger-turmeric-papain-and-bromelain-tablets-2/> [Leído: 11 de octubre de 2015, 17:00 GMT-3].
- Parodi, A., Haddix, S., Taghipour, N., Scaria, S., et al. (2014). Bromelain surface modification increases the diffusion of silica nanoparticles in the tumor

extracellular matrix. ACS Nano. 8(10): 9874-83. doi: 10.1021/nn502807n. Epub 2014 Sep 17.

- Pedroza, J. Perea. D., (1990). Propagación Vegetativa “*in vitro*” del babaco (*Carica heilbornii* nm, *pentagona* (Heilborn) Badillo) mediante proliferación de yemas caulinares e inducción de embriogénesis somática. Boletín Científico ACEVIV -1(3): 11-22. Bogotá.
- Pfizer (2016). Papenzima ®. Prospecto farmacológico de especialidad medicinal. <http://www.farmaciasahumada.cl/fasaonline/fasa/MFT/PRODUCTO/P3878.HTM> [Leído: 16 de diciembre de 2015, 16:27 GMT-3].
- Pieper, B., Caliri, M. (2003). Cuidado de las heridas no tradicional: Una revisión de la evidencia para el uso de los ácidos de azúcar, papaya / papaina y grasos. J.Wound.Ostomy. Continnence. Nurs.; 30 (4): 175-183.
- Ponce-Cabrera, J., 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.
- Posada-Pérez, L., Kosky, R., Reyes, M., (2007). Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. var. Maradol rojo. Biotecnología Vegetal Vol. 7, No. 3: 131-138.
- Quino, J., Bernal, N., Yácono, J., (2008). Diseño de un proceso experimental para la producción de papaina liofilizada. Ingeniería Industrial n. O 26, 2008, ISSN 1025-9929, pp. 201-229. <http://www.redalyc.org/pdf/3374/337428492011.pdf> [Leído: 11 de septiembre de 2015, 16:350 GMT-3].
- Quino, J., Yácono, J., Zelada, M., (2010) Purificación de papaina a partir de látex seco: Un estudio piloto. Universidad de Lima. Ingeniería Industrial No. 28, 2010, ISSN 1025-9929, pp. 177-193
- Radice, S., (2010). Morfogénesis. En Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L., (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*: 26-33. Buenos Aires: Ediciones INTA y ArgenBio.
- Rangel-Huerta, O. Pastor-Villaescusa, B., Aguilera, C., Gil, A., (2015) A Systematic Review of the Efficacy of Bioactive Compounds in Cardiovascular Disease: Phenolic Compounds, Nutrients, 7(7): 5177-5216.
- Rawlings, N., Morton, F., Kok, C., Kong, J., Barrett, A. (2008) MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res 36, D320-D325. <http://web.archive.org/web/20080703074800/http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>. [Leído: 2 de febrero de 2016, 12:00 GMT-3].

- Rojas, S., García, J., Alarcón, M., (2004). Propagación asexual de plantas: conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. República de Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural: Corpoica (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria): 18.
- Romero, J., (2013). Colegio de Postgraduados. Manejo y Conservación de Germoplasma de la Familia *Caricaceae*. Tesis presentada como requisito para obtener el título de Doctor en Ciencias. Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad. Montecillo, México.
- Scheldeman X., (2002). Distribution and potential of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and highland papayas (*Vasconcellea spp.*) in Ecuador. Tesis doctoral, Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Department Plant Production, Ghent, Bélgica.
- Scheldeman X., Kyndt T., Coppens G. (2011) *Vasconcellea*. Chittaranjan Kole Ed. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Tropical and Subtropical fruits. Editorial Springer, 1a. edición.
- Sigma-Aldrich (2015). Papain, Physical Properties and Kinetics. <http://www.sigmaaldrich.com/life%ADscience/metabolomics/enzyme%ADexplorer/analytical%ADenzymes/papain.printerview.html>. [Leído: 15 de octubre de 2015, 18:20 GMT-3].
- Simirgiotis, M., Caligari, P., Schmeda-Hirschmann, G., (2009). Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. Food Chemistry 115 (2009): 775–784.
- Soria, N., Viteri, P., (1999). Guía para el cultivo de babaco en el Ecuador. Proyecto de Fruticultura INIAP-COSUDE, Quito, Ecuador.
- Storr, S., Thompson, N., Pu, X., Zhang, Y., Martin, S., (2015). Calpain in Breast Cancer: Role in Disease Progression and Treatment Response. Pathobiology. 82(3-4):133-41. doi: 10.1159/000430464. Epub 2015 Aug 31.
- Swanson health products (2015). Papain Papaya Enzyme. <http://www.swansonvitamins.com/swanson-premium-papain-papaya-enzyme-100-mg-90-veg-caps>. [Leído: 11 de octubre de 2015, 17:20 GMT-3].
- Tropicos.org. The Missouri Botanical Garden. (1875) *Vasconcellea pubescens* A.DC. Curtis's Botanical Magazine, vol. 101 [ser. 3, vol. 31]: t. 6198 [W.H. Fitch].

- Tokuhisa, D. et al. (2007) Phenolic compound inhibitors in papaya seeds (*Carica papaya* L.). Rev. bras. Sementes, vol.29, n.3: 180-188. ISSN 0101-3122.
- Torres, A., (2006) Development, storage and germination of seeds of tropical fleshy-fruited species of South America, Tesis doctoral, Agriculture, University of Reading.
- Transformation Enzyme Corp. (2013). Systemic Proteolytic Enzymes A Review of Mechanisms of Action and the Resulting Health Benefits. http://www.enzymeessentials.com/HTML/Protease_Science_Brief.pdf.
- Vidal, L., Finot, L., Mora, K., Venegas, F., (2009). Características Físico-Químicas del Látex de Papayuelo (*Vasconcellea cundinamarcensis* Badillo, Caricaceae). Información Tecnológica. Vol. 20(6), 93-103 doi:10.1612/inf.tecnol.4131it.08.
- Walraevens, V., Jaziri, M., Van Beeumen, J., Schnek, A.G., Kleinschmidt, T. & Looze, Y. (1993). Isolation and preliminary characterization of the cysteine-proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 374: 501-506.
- Web MD (2009) Papaína. Vitaminas y suplementos. <http://www.webmd.com/vitamins-supplements/ingredientmono-69-papain.aspx?activeingredientid=69&activeingredientname=papain>. [Leído: 7 de agosto de 2014, 12:50 GMT-3].
- Wong, D. (1995). Food Enzymes: Structure and Mechanism. Champman & Hall, USA, 139-142.
- Zatz, M., Starling, A., (2005). Calpains and Disease. Review article. New England Journal of Medicine;352:2413-23