ASPECTOS ANATÓMICOS Y VIABILIDAD DE SEMILLAS DE PAPAYA (*CARICA PAPAYA* L.) VARIEDAD "MARADOL ROJA" SOMETIDAS A ALMACENAMIENTO PROLONGADO.

José A. Fresneda Buides, Alejandro González Álvarez, Pedro Luis González La Fé y Guillermo Guibert Sánchez

RESUMEN

Con el fin de generar conocimientos sobre diversos factores que influyen sobre la calidad de la semilla de papaya "Maradol Roja" se valoraron aspectos anatómicos, fisiológicos y bioquímicos de un lote comercial producido en el año 2014, el cual fue conservado en ambiente refrigerado a 6 ± 2°C durante 28 meses. Para ello se realizó la separación de una muestra en tres fracciones en las cuales se determinaron los porcentajes de semillas carentes de embrión, así como se compararon las estructuras internas de las semillas vanas respecto a las que completaron su desarrollo con el empleo de cortes histológicos y exámenes bajo microscopía óptica. Mediante el ensayo topográfico de tetrazolio se determinó la viabilidad de las semillas en cada fracción y se comprobaron los resultados con los valores alcanzados en la prueba rutinaria de germinación. Los resultados pusieron de manifiesto que en las semillas de mayor diámetro el porcentaje de vanas fue insignificante, pero este se incrementó en las semillas más pequeñas con diámetro inferior a 4 mm. Las estructuras seminales principales permanecieron intactas en las semillas que llegaron a formar los primordios de las plantas, mientras que en lasvanas aparecieron todas las estructuras formadas por los tegumentos que rodean al óvulo, pero evidentemente falló la fertilización y con ello la embriogénesis. La prueba de tetrazolio reveló que las semillas de mayor tamaño mostraron los mayores porcentajes de deterioro parcial o total; sin embargo, las de tamaño intermedio alcanzaron el mayor porcentaje de viabilidad, lo cual fue comprobado mediante el análisis de germinación. Se apreciaron diversos grados de tejidos débiles o muertos en semillas de todos los estratos, pero en los embriones el deterioro tiende a comenzar por los cotiledones.

Palabras clave: semilla de papaya, anatomía y viabilidad

Anatomic aspects and viability of papaw (*Carica papaya* L.) seeds variety submitted to a long storage period.

ABSTRACT

With the aim of enhancing knowledges on diverse elements having influence on Red Maradol papaw seed quality there were assessed, anatomic, physiologic and biochemical factors were assessed in a commercial lot conserved for 28 months under refrigerated conditions at 6 ± 2°C. With that purpose, a lot sample was divided into three fractions for evaluation of the amount of normal and without embryo seeds

---

Dr.C. José A. Fresneda Buides, Investigador Titular del Departamento de Recursos Fitogenéticos del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT). MINAG. Calle 188 #38754 e/ 397 y Linderos, Santiago de las Vegas, Boyeros. La Habana, Cuba. Email: semillainvest@inifat.co.cu

present; internal structures of both were compared by mean of histological cuts and observations under optic microscopy. Seed viability in each fraction was evaluated by using topographic tetrazolium test and results were compared with those of routine germination test. Results showed that in the biggest seeds the percentage of vanes was insignificant but increased in the smallest diameter of the seed lot. Main seminal structures as seed coat, endosperm and embryo remained intact in those seeds that were able to form embryobut in vain one just were present those structures formed by the integuments surrounding the ovule but indeed fertilization failed and consequently the embryogenesis. Tetrazolium test showed that biggest seeds had the higher percentage of total or partial damages but on the contrary those of intermediate size were more viable and it was reaffirmed by the germination test. Several degrees of dead or weak tissue have been found in seeds of all stratus but commonly the declinetend to begin by cotyledons.

Key words: papaw seeds – anatomy – viability

INTRODUCCIÓN

El cultivo de papaya es una de las posibles opciones de la agricultura cubana para la comercialización de frutas frescas en el exterior, en particular la variedad Maradol Roja que ha alcanzado una gran difusión en varios países y es bien apreciada dada su gran precocidad, excelente aroma, color y sabor del fruto, así como sus condiciones excepcionales en el manejo poscosecha (Rodríguez Nodals y Rodríguez Manzano, 2000).

El fruto del papayo es uno de los de mayor consumo en varios países del área como México, donde alcanza importancia social y económica pues forma parte significativa en la alimentación, su cultivo se aprovecha para comercializar los frutos lo cual ha consolidado al país históricamente como el principal exportador y uno de los mayores productores a nivel mundial (Romero *et al*., 2013), en Colombia es uno de los frutos de mayor consumo en el interior del país (Gil y Miranda 2005), así como se cultiva ampliamente en Brasil (Soares, 1998), Venezuela (Hernández, 2016; Urdaneta, 2016) y otras regiones (Wikipedia, 2016); en general los mercados de papaya han aumentado considerablemente mostrando un crecimiento continuo y estable (Pérez Escalona, 2005).

La comercialización de las semillas se valora como una opción importante de ingresos, para lo cual es necesario garantizar condiciones de alta calidad física, fisiológica y sanitaria, de manera que cumpla estándares mínimos para la producción de plántulas sanas.

Un punto de partidaen la búsqueda de este objetivo es lograr la identificación de las distintas características morfológicas y fisiológicas comopaso importante en el estudio del desarrollo de las semillas (Gil y Miranda, 2008), tomando en cuenta que al estar el embrión encerrado por el endospermo y este a su vez estar dentro del integumento del óvulo, estas tres estructuras deben conjugar su desarrollo y funcionar regularmente para producir una semilla madura de tamaño adecuado.

El objetivo del presente trabajo fueapreciarla pérdida de la vitalidad que se produce en semillas de papayasometidas a un almacenamiento prolongado, pudiendo afectar los niveles de organización (morfológico, fisiológico y bioquímico) y reducir con ello la capacidad para producir plantas nuevas durante el proceso de germinación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomó un lote de 9,5 Kg de semillas de papaya Maradol Roja producido en marzo del año 2014 en la provincia Sancti Spíritus, el cualhabía sido sometido a procesamiento fermentativo para la eliminación de la exotesta (sarcotesta) y secado convenientemente, alcanzando al inicio 80% de germinación y humedad de 11%, que fueron avalados por el órgano Servicio de Inspección y Certificación. Luego de 28 meses de conservación en cámara refrigerada a la temperatura de 6 ± 2°C y en bolsas de nylon herméticas, se procedió a tamizar una muestra de 1 kg, para realizar una estratificación por tamaño en tres fracciones: a. > 4,75 mm, b. entre 4,75 y 4,00 mm y c. < 4,00 mm.

De cada fracción se tomaron al azar 200 semillas a las cuales se le hicieron diversos estudios:

- Observación directa bajo microscopio estereoscopio con el fin de determinar si existieron cambios en el tiempo.
- Cortes histológicos longitudinales y transversales con el fin de determinar diferencias internas en las semillas de diversos estratos.
- Estimación de la viabilidad de las semillas mediante la prueba topográfica de tetrazolio.
- Evaluación de la germinación en cada uno de los estratos ensayados.

Los cortes histológicos se realizaron de forma transversal y longitudinal empleando 25 semillas en cada caso; las semillas fueron embebidas en parafina fundida, enfriadas hasta solidificar y seccionadas manualmente con cuchillas de afeitar. Se realizaron observaciones bajo microscopios estereoscopio (60 X) y compuesto (100 X).

Para la valoración de la viabilidad se tomaron dos muestras de 25 semillas de cada fracción; una de las muestras proveniente de cada tamaño fue humedecida previamente en agua destilada durante 24 horas antes de realizarcortes longitudinales (dejando una pequeña separación del eje central para emplear la mitad que contenía el embrión) y colocadas en la solución de cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio (CTT) al 1% (Pérez Escalona, 2005); las restantes fueron sometidas a cortes longitudinales y colocadas directamente en la solución de CTT al 1%. Una vez situadas en estas condiciones se procedió a incubarlas en oscuridad constante para examinar el grado de tinción de los tejidos vivos a las 12 y 24 horas. El ensayo fue repetido en dos ocasiones.

La evaluación de la germinación se realizó tomando de cada fracción al azar cuatro grupos de 50 semillas (200 en total) que fueron colocadas por separado en mantas de yute de 60 x 30 cm. humedecidas y dobladas, los cuales

habían sido esterilizados previamente en autoclave a 120°C durante 30 minutos. Los sacos se situaron en bandejas plásticas de 30 x 30 cm. esterilizadas mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 5% durante 15 minutos. Las bandejas con las semillas se colocaron en lugar oscuro, a la temperatura ambiente que osciló diariamente entre 28 y 32°C, los sacos se mantuvieron humedecidos al realizar dos nebulizaciones diarias (en la mañana y en la tarde) de agua corriente.

Las plántulas germinadas fueron retiradas cada tres días hasta cumplir el período de 27 días, a partir de las observaciones de Soares (1998) respecto a que en la papaya la germinación comienza después de los 10 y se extiende hasta los 30 días después de la siembra y en concordancia con lo recomendado en la NR 191 (2011), que establece hasta 28 días para las pruebas de germinación de esta especie. El criterio de germinación fue la aparición de las radículas y sus ramificaciones iniciales en las plántulas, estando el hipocotilo en forma de codo o erecto y las hojas cotiledonales presentes. Con los datos obtenidos se realizó el análisis de varianza y la estimación de medias mediante la dócima de Duncan (Lerch, 1977; Little y Jackson Hills, 1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fraccionamiento de las semillas en tres categorías permitió encontrar diferencias internas que se correspondieron con los tamaños seleccionados, dado que en las de diámetros superiores a 4,7 mm el porcentaje de semillas vanas fue más bien irrelevante al no sobrepasar el 0,5 % (Tabla 1), pero a medida que fue disminuyendo el diámetro en los otros dos estratos se fue incrementando el número de semillas vanas hasta alcanzar el 48,5 % de la población, cifra considerablemente alta para un lote de semillas de alta categoría.

Tabla. 1. Porcentajes de semillas completas y vanas en diferentes fracciones.

No.	Diámetro	Cantidad	Con embrión (%)	Vanas (%)
1	> 4,7 mm	200	99,5	0,5
2	Entre 4,7 y 4,0 mm	200	89,5	10,5
3	< 4 mm	200	51,5	48,5

La operación rutinaria de tamizar las semillas en el acondicionamiento de estas, desechando las más pequeñas, es sin lugar a dudas una buena práctica para garantizar el mejor establecimiento del cultivo en semilleros o en bandejas.

En las observaciones directas realizadas a las semillas incluidas en las tres fracciones se apreciaron iguales características externas en cuanto a la presencia delhilum y el micrópilo (Figura 1), la formación de la mesotesta de color oscuro, de aspecto rugoso y consistencia dura, siendo el tamaño alcanzadola única diferencia.

En los cortes histológicos transversales hechos a las semillas con buena formación interna se pudoapreciar claramente tres zonas de tejidos que conforman la cubierta seminal, el endospermo y el embrión; las estructuras quese forman a partir de la cubierta seminal bitunicadason por una parte la mesotestayla endotesta, que junto a la exotesta (sarcotesta) ya eliminada en la fermentación forman parte de los tegumentos externos y por otra parte el tegmen que proviene de los tegumentos internos (Figura 2).También se puede diferenciar una perforación en forma de canal por donde pasa el haz vascular. Tal estructura es posible por poseer la papaya un saco embrionario anatropo lo cual hace que el corra paralelo a aquelhasta encontrar la calaza. Junto a esto se identificó el endospermo de consistencia suave y aspecto carnoso.

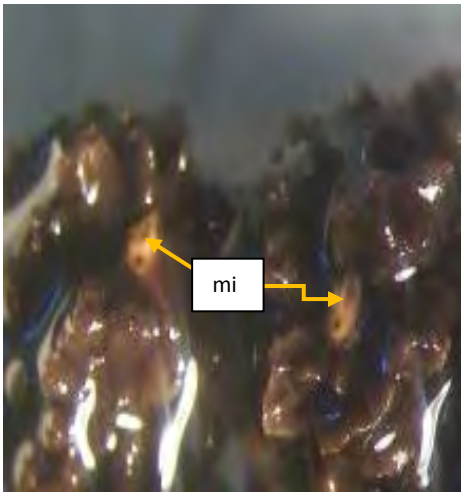


Figura 1. Micrópilo (mi) de la semilla.

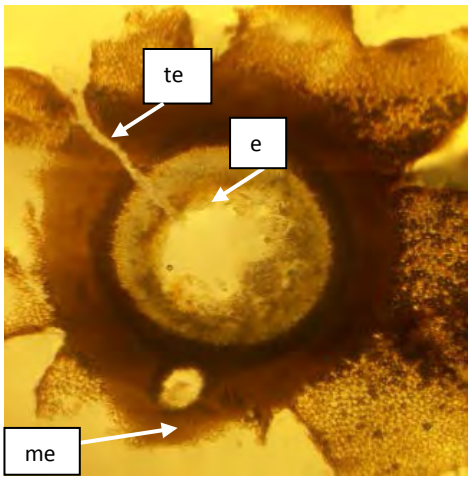


Figura 2. Estructura interna: (me) mesotesta, (e) endotesta, (te) tegmen, (end) endospermo y (hy) haz vascular.

Comparando los cortes transversales y longitudinales se puede apreciar que aún después del largo período de almacenamiento las semillas poseían una estructura normal (Figuras 3 y 4), lo cual coincide con Gil y Miranda (2005), el embrión se ubicó longitudinalmente en el centro de la semilla mostrando su forma espatulada con sus cotiledones rectos, así como estaba circundado totalmente por el endospermo y la radícula se encontraba bien diferenciada.

Por su parte en las semillas vanas encontradas en las tres fracciones, de manera común se encontraron todas las estructuras que conforman la cubierta seminal (Figura 5), las cuales son formadas por los tegumentos que rodean el óvulo, incluso el punto en el cual el haz vascular se conecta con la calaza, pero evidentemente falló la fertilización y consecuentementela embriogénesis, por lo cual no se formó el endospermo cuya función central es la nutrición y protección del embrión, quedando la cavidad vacía.

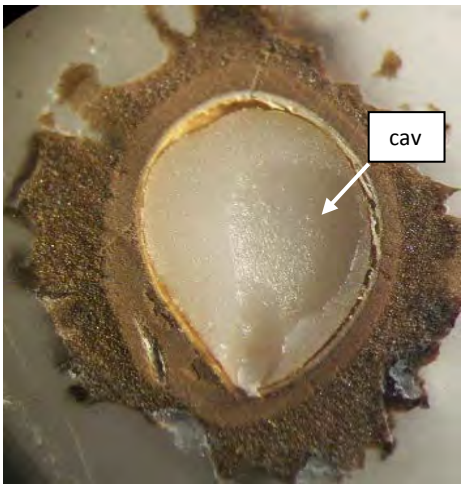


Figura 3. Corte longitudinal: (cav) cavidad

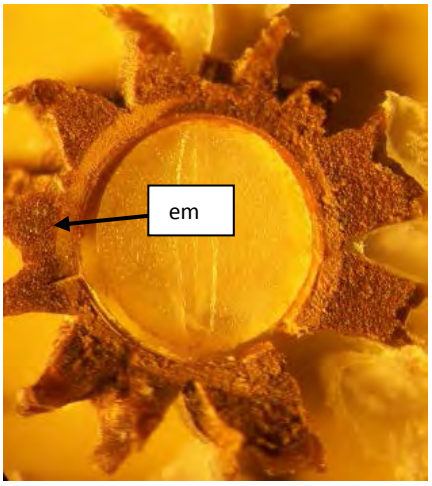


Figura 4. Corte transversal del embrión: (em) embrión espatulado.

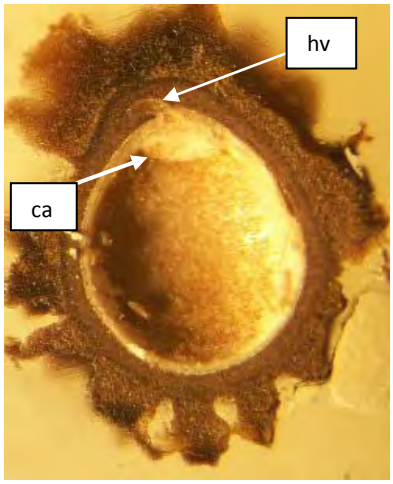


Figura 5. Semilla vana: (ca) calaza Y (hv) haz vascular.



Figura 6. Fruto con poca placentación y semillas pregerminadas.

Si se tiene en cuenta que el alargamiento celular en la cubierta seminal es influida por el crecimiento del endospermo, se puede explicar en buena medida el motivo por el cual esta fracción del lote es más pequeña. Por otra parte, aquellas simientes pequeñas que lograron formar el embrión tendrán reservas limitadas al ser el endospermo un tejido efímeroel cual contiene principalmente lípidos y proteínas que serán consumidos por la semilla en desarrollo o después de su germinación (Gil y Miranda, 2005), así la poca acumulación de reservas es perjudicial para el pleno establecimiento de las plántulas que comienzan.

El fenómeno descrito se puede considerar diferente a la reducción en la formación de semillas (Figura 6) que se produce en momentos en que la temperatura y humedad son extremadamente altas, en los cuales disminuye considerablemente la placentación parietal en el fruto por lo cual se reduce la formación de óvulos, incluso parte de las semillas formadas puedenllegar a germinar en su interior dadas las condiciones ambientales extremas a que están sometidas.

En lo que respecta a la morfología de la semilla se encontraron algunas anomalías que repercuten de manera negativa en el desempeño del lote, pero al valorar la germinación alcanzada en las diversas fracciones se hizo evidente que otrasafectaciones también toman lugar, como es de esperar, en la medida en que transcurre el tiempo de almacenamiento.

Si bien el lote de semillas frescas alcanzó inicialmente el 80% de germinación, ya a los dos años y medio había disminuido al 27% (Tabla 2), aunestando almacenadobajo condiciones de temperatura controlada de 6 ± 2°C y conservado en recipientes herméticos. Romero *et al*. (2013) señalaron la posibilidad de que la semilla de papaya alcanzara una viabilidad potencial de 90%, así como que puedan ser almacenadas durante al menos 3 añosa - 5° C y en clima templado semiseco a 16 ± 7°C; sin embargo, advierte que fueron observadas diferencias de germinación entre géneros y condiciones de almacenamiento. Para los lotes comercializados internamente en el país se admite como mínimo 70% de germinación en la semilla registrada (EPSV, 1980), no así para los lotes destinados a exportación cuya germinación debe ser como mínimo de 80% (NR 191, 2011).

Tabla 2. Porcentajes de germinación en diferentes estratos.

TRATAMIENTOS	MEDIAS	Sign. (1%)
> 4,7 mm	12,5	c
Entre 4,7 y 4,0 mm	46,0	a
< 4 mm	24,0	b

En las pruebas de germinación realizadas a cada fracción los mayores porcentajes fueron alcanzados en la fracción cuyo diámetro varió entre 4,7 a 4,0 cm, con cerca del 50 % de las semillas en condiciones de aportar plantas sanas, difiriendo significativamente del valor más cercano alcanzado por las semillas de diámetro inferior a 4 mm y a su vez ambos valores fueron superiores significativamente a los alcanzados por las semillas mayores de 4,7 mm. Esto conduce a pensar que a mayor diámetro de las semillas ocurre un deterioro interno con mayor severidad luego de un período largo de almacenamiento.

Antes de que ocurra la muerte biológica las semillas pierden su capacidad germinativa, lo cual implica la disminución paulatina y progresiva de los procesos y sistemas vitales en la medida que pasa el tiempo, hasta perder por completo la capacidad de germinar (Delouche, 2002).

Al realizar el ensayo topográfico de tetrazolio se encontró que los cortes longitudinales brindaron buena información para evaluar las semillas, pues tanto el endospermo como elpropio embrión pudieron ser observados en toda su longitud y de esta manera se pudo determinar las áreas no coloreadas en las cuales no ocurrieron procesos oxidativos.

Las coloraciones variaron desde el rojo intenso en todo el embrión y el endospermo, lo que indicó alta viabilidad (Figura 7), a tonalidades rosadas que indicaron respiración débil (Pérez Escalona, 2005) incluso la combinación de estas con partes del embrión y del endospermo de color rojooscuro dando evidencia de áreas aun vitales, hasta ninguna coloración en el embrión que correspondió al tejido muerto (Figura 8).

Considerando tales áreas con variaciones de la coloración es importante tener en cuenta que por lo general donde hay tejidos muertos surgirá la posibilidad de que queden expuestos al ataque de organismos patógenos y/o saprofíticos, o se produzca una germinación reducida en dependencia del área afectada, o sencillamente no germine la semilla.

En la Tabla 3 se puede apreciar que las semillas de mayor tamaño mostraron los mayores porcentajes de deterioro parcial o total (color rosado o sin teñir) al aparecer áreas con poca o ninguna respiración pues no se produce en las células la transformación enzimática del cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio en formazán, compuesto insoluble de color rojo. Por su parte en las semillas de tamaño intermedio se encontraron los mayores porcentajes de viabilidad (60 % o más de color rojo intenso), mientras que en las semillas de menor tamaño cerca del 50 % fueron viables y el resto no dio señales de respiración.

En concordancia con Delouche (2002) al producirse una disminución de la velocidad de germinación y del desarrollo de las plántulas en el período de muerte de las semillas, puede suceder que aun siendo funcionales y teniendo legalmente poder germinativo, estén muy cercanas a su muerte. Estos resultados se corresponden proporcionalmente con los obtenidos en la prueba de germinación e indican la utilidad de la prueba de tetrazolio para determinar el estado fisiológico de los lotes de semillas de papaya. Es importante recordar que en las semillas de diámetro <4,00 mm. Se consideraron solo aquellas que alcanzaron a formar el embrión porque cerca del 50% no lo lograron (Tabla 1).

Por último, al observar las descripciones de Shie y Kuo (1999) se hacen visibles los daños descritos que conducen a que las semillas sean no viables, con la particularidad de que en la mayor parte de los embriones separados se apreció que los daños comenzaron por el epicotilo, mientras que el hipocotilo ubicado del otro lado del eje cotiledonal aún mostraba tejido vivo en muchas ocasiones, así en los embriones debilitados la pérdida de viabilidad tendía a comenzar por los cotiledones que no se tiñen de rojo (Figura 9), aun cuando la radícula puede permanecer viable, reafirmando los criterios de Delouche (2002) respecto a que el proceso de muerte de la semilla sucede gradualmente. Por oposición en las semillas no afectadas aparece el embrión completamente teñido (Figura 10).

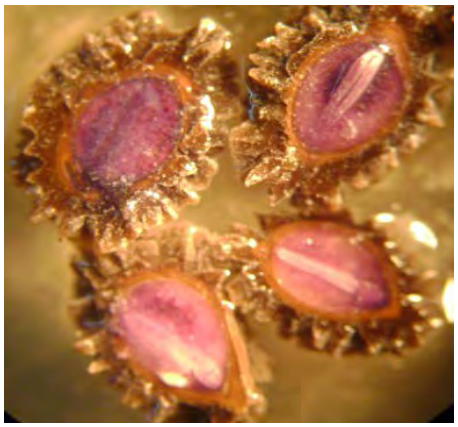


Figura 7. Semillas con áreas de tejido viviente.



Figura 8. Semillas con poca o ninguna respiración.

Tabla 3. Porcentajes de semillas teñidas con tetrazolio.

Repeticiones	I			II		
Diámetros (mm.)	< 4,75	4,75 – 4,00	< 4,00	< 4,75	4,75 – 4,00	< 4,00
Color rojo intenso	16	64	48	24	60	48
Color rosado	60	16	44	42	20	32
Sin teñir	24	20	8	34	20	20



Figura 9. Cotiledones no teñidos.



Figura 10. Embrión totalmente teñido.

CONCLUSIONES

- En el acondicionamiento de las semillas de papaya la separación en fracciones, desechando las más pequeñas, es una buena práctica para garantizar un mejor establecimiento del cultivo en el semillero. Luego de dos años y medio de almacenamiento a 6 ± 2°C en recipientes herméticos las semillas de papaya muestran una estructura anatómica normal, pero han tenido una reducción importante de sus procesos y sistemas vitales, por lo que la germinación desciende dramáticamente. Las semillas de mayor diámetro son las que sufren mayor deterioro en el almacenamiento prolongado.
- El ensayo topográfico de tetrazolio ofrece información valiosa sobre la viabilidad de la semilla antes de proceder a realizar los ensayos de germinación y existe correspondencia entre ambas pruebas.
- La preparación de las semillas para los ensayos de tetrazolio en papaya incluyen cortes longitudinales y humedecimiento previo durante 24 horas antes de su inmersión en la solución de CTT al 1% durante 24 horas.
- En los ensayos de CTT cuando aparecen tonalidades rosadas junto con áreas del embrión y del endospermo de color rojo oscuro dan evidencias de debilidad en las semillas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Delouche, J. (2002): Las semillas también mueren. Parte II. Ensayo. Seed News. Año VI, No. 4, pg. 30. Julio – agosto. ISSN 1415 – 0387.

EPSV (Empresa de Producción de Semillas Varias) (1980): Fruta bomba (*Carica papaya* L.). Instructivos técnicos. Ministerio de la Agricultura, 149 – 157.

Gil, A. I. y Miranda, D. (2005): Morfología de la flor y de la semilla de papaya (*Carica papaya* L.): variedad Maradol e híbrido Tainung-1. Agronomía Colombiana, 23 (2): 217 – 222.

Gil, A. I. y Miranda, D. (2008): Aspectos anatómicos de la semilla de papaya (*Carica papaya* L.). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 2 (2): 145 – 156.

Hernández, F. (2016): Cultivo de la lechosa o papaya. Disponible en www.agro-tecnología-tropical.com/cultio de la lechosa.html. Consultado en septiembre de 2016.

ISTA (International Seed Testing Association) (2014): International rules for seed testing 2014(Ed.). Bassersdorf, CH-Switzerland. ISSN 2310-3655. 243 pp.

Lerch, G. (1977): La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Editorial Científico-Técnica. La Habana. Cuba. 451 pp.

Little, M. T. y F. Jackson Hills (1991): Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Edit. Trillas. México. 270 pp.

NC (Norma Cubana) 618 (2008): Ensayos de semillas agrícolas – Determinación de la germinación. Ministerio de la Agricultura. Oficina Nacional de Normalización. La Habana. Cuba. 19 pp. ICS: 65-020-20.

NRAG (Norma Ramal) 191 (2011): Semillas de papaya (*Carica papaya* L.). Certificación. Dirección de Calidad. Ministerio de la Agricultura. La Habana, Cuba. 10 pp.

Pérez Escalona M. Y. (2005): Valoración de la eficiencia de la prueba de viabilidad con tetrazolio en semillas de papaya (*Carica papaya* L.). Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara, México, 23(2): 217 – 222.

Rodríguez Nodals, A. y A. Rodríguez Manzano (2000): El papayo "Maradol": un aporte cubano a la agricultura tropical. Revista Cubana de Agricultura, 1 (1): 73 – 77. ISSN: 1607 -5080.

Romero Rodríguez, J. A.; J. A. Mejía Contreras, A. Carballo Carballo; A. López Giménez; C. Ávila Reséndiz y J. A. Rangel Lucio (2013): Latencia y longevidad de semillas de *Carica papaya* L. y *Vasconcellea cauliflora* Jacquin. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 1 (1): 7 - 13

Shie, C. y H. J. Kuo (1999): Tetrazolium test for seed of *Carica papaya* L. Seed and Nursery Taiwán, 1:47 – 56.

Soares, N. B. (1998): Mamão*. Carica papaya* L. Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. Boletim 200, 6ta Edição. Instituto Agronômico Campinas (SP), 139 – 140.

Urdaneta, T. (2016): Manejo del cultivo de la lechosa. Disponible en revfacagronluz.org.ve/Compendio digital/Ronda municipal/Conferencia Tibisay Urdaneta.pdf. Consultado en septiembre de 2016.

Wikipedia (2016): *Papaya*. Disponible en: https://eswikipedia.org/wiki. Consultado en septiembre de 2016.

Fecha de recepción: 17 octubre 2016

Fecha de aceptación: 8 enero 2017

Agrotecnia de Cuba
ISSN impresa: 0568-3114
ISSN digital: 2414- 4673
http:www.ausuc.co.cu