



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LAS LANTAS

TESIS EN OPCION AL TITULO ACADEMICO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN BIOTECNOLOGIA VEGETAL

*EMBRIOGENESIS SOMATICA EN EL HÍBRIDO IBP 42-99 DE
PAPAYA (Carica papaya L.).*

ASPIRANTE: Ing. Jorge Gallardo Colina.

TUTOR : DrC. Rafael Gómez Kosky.

Santa Clara, CUBA

2006

Agradecimientos

Quede plasmada mi gratitud para todos aquellos que hicieron posible que pudiera llegar hoy hasta aquí y los que contribuyeron en la realización de este trabajo.

A mi familia que en todo momento ha estado pendiente de mis resultados y ha sabido darme apoyo en los momentos que más lo necesito.

A mi tutor Dr. Rafael Gómez Kosky por abrirme las puertas y saberme guiar en el mundo de la investigación.

A mis compañeros de laboratorio Maritza, Marisol T, Marisol F, Laisyn, Boris, Leyanis, Yudith e Idalia por su apoyo desinteresado.

A mi compañero y amigo Raúl Collado.

A todos los trabajadores del IBP que de una forma u otra contribuyen al buen desempeño de mi trabajo.

A los estudiantes extranjeros de Doctorado Nidia, Polo, Enrique, Dion y Diego que siempre me brindaron su ayuda incondicional.

A todos muchas gracias.

Síntesis

Síntesis.

Para obtener plantas transgénicas en cualquier especie vegetal es necesario contar con metodologías eficientes de transformación y regeneración de plantas por cultivos de tejidos. El principal objetivo fue desarrollar una metodología de embriogénesis somática en un híbrido de papaya a partir de segmentos de tallo de plantas *in vitro*. Como material vegetal se emplearon plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99. Para la formación de callos se utilizó el medio de cultivo Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con diferentes reguladores del crecimiento solos o en combinación (2,4-D, ANA, AIA, 6-BAP, Kinetina). Para obtener y multiplicar embriones somáticos se estudió el 2,4-D en diferentes concentraciones. Para la germinación de los embriones en etapa cotiledonal y torpedo se estudió el 6-BAP en diferentes concentraciones. Los resultados demostraron que con el empleo en el medio de cultivo de 2,4-D solo o en combinación con las citoquininas (6-BAP y Kinetina) no se logró desarrollar callos con las características deseadas a partir de los ápices de las plantas *in vitro*. Con el empleo del AIA combinado con 6-BAP se obtuvieron los callos con mejores características en cuanto a consistencia y aspectos morfológicos. Al emplear ápices como explantes solamente se formó el callo en la zona inferior donde se les realizaba el corte. Sin embargo, cuando se les realizó cortes en ambos extremos el callo se desarrolló a partir de los mismos y cubrió la totalidad del explante. Con concentraciones desde 5 hasta 10 mg.l⁻¹ de 2,4-D se obtiene el mayor número de embriones somáticos a partir de los callos y cuando se elevó la concentración del regulador de crecimiento a 15 mg.l⁻¹ este valor disminuyó significativamente. Al emplear 5 mg.l⁻¹ de 2,4-D en el medio de cultivo se logran los mejores valores de multiplicación y el mayor porcentaje de embriones somáticos en etapa globular, al emplear concentraciones mayores del regulador de crecimiento disminuyó significativamente la multiplicación de los embriones somáticos aunque el 100% de los mismos se encontraba en etapa globular. Se logró al 100% la germinación de los embriones somáticos en etapa de torpedo y cotiledonal al emplear como medio de cultivo las sales MS suplementadas con 0.15 mg.l⁻¹ de 6-BAP.

ÍNDICE

| | | |
|---------------|--|-----------|
| ÍNDICE | | |
| 1 | Introducción..... | 1 |
| 2 | Revisión bibliográfica..... | 4 |
| 2.1 | Taxonomía y Botánica del cultivo..... | 4 |
| 2.2 | Origen y distribución..... | 6 |
| 2.3 | Importancia de cultivo..... | 7 |
| 2.4 | Principales variedades cultivadas en Cuba..... | 19 |
| 2.5 | Propagación en papaya..... | 10 |
| 2.5.1 | Método tradicional..... | 11 |
| 2.5.2 | Cultivo <i>in Vitro</i> | 12 |
| 2.5.2.1 | Organogénesis..... | 13 |
| 2.5.2.2 | Embriogénesis somática..... | 13 |
| 2.5.2.2.1 | Embriogénesis directa..... | 16 |
| 2.5.2.2.2 | Embriogénesis indirecta..... | 17 |
| 2.6 | Factores que afectan la embriogénesis somática..... | 17 |
| 2.6.1 | Genotipo..... | 17 |
| 2.6.2 | Explante..... | 18 |
| 2.6.3 | Medio de cultivo..... | 19 |
| 2.6.4 | Condiciones de cultivo..... | 20 |
| 2.7 | Embriogénesis somática secundaria o repetitiva..... | 20 |
| 2.8 | Germinación y conversión en plantas de los embriones somáticos..... | 22 |
| 3 | Materiales y métodos..... | 24 |
| 3.1 | Formación de callos..... | 26 |
| 3.1.1 | Influencia de la combinación de reguladores del crecimiento en la formación de callos..... | 26 |
| 3.1.1.1 | Efecto del 2,4-D..... | 26 |
| 3.1.1.2 | Efecto de la combinación del 2,4-D y las citoquininas 6-BAP y Kinetina..... | 27 |
| 3.1.1.3 | Efecto del ANA en combinación con el 6-BAP..... | 28 |
| 3.1.1.4 | Efecto del AIA en combinación con el 6-BAP..... | 29 |
| 3.1.2 | Influencia del origen del explante en la respuesta callogénica..... | 30 |
| 3.2 | Embriogénesis somática..... | 31 |
| 3.2.1 | Influencia de diferentes concentraciones de 2,4-D en la formación de | |

| | | |
|----------|---|-----------|
| | embriones somáticos..... | 31 |
| 3.3 | Multiplicación secundaria de los embriones somáticos..... | 32 |
| 3.3.1 | Influencia de diferentes concentraciones de 2,4-D..... | 32 |
| 3.4 | Germinación de los embriones somáticos..... | 33 |
| 3.4.1 | Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP..... | 33 |
| 4 | Resultados y discusión..... | 36 |
| 4.1 | Formación de callos..... | 36 |
| 4.1.1 | Influencia de la combinación de reguladores del crecimiento en la formación de callos..... | 36 |
| 4.1.1.1 | Efecto del 2,4-D | 36 |
| 4.1.1.2 | Efecto de la combinación del 2,4-D y las citoquininas 6-BAP y Kinetina | 38 |
| 4.1.1.3 | Efecto del ANA en combinación con el 6-BAP..... | 40 |
| 4.1.1.4 | Efecto del AIA en combinación con el 6-BAP..... | 42 |
| 4.1.2 | Influencia del origen del explante en la respuesta callogénica..... | 45 |
| 4.2 | Embriogénesis somática..... | 48 |
| 4.2.1 | Influencia de diferentes concentraciones de 2,4-D en la formación de embriones somáticos..... | 48 |
| 4.3 | Multiplicación secundaria de los embriones somáticos..... | 52 |
| 4.3.1 | Influencia de diferentes concentraciones de 2,4-D..... | 52 |
| 4.4 | Germinación de los embriones somáticos..... | 55 |
| 4.4.1 | Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP..... | 55 |
| 5 | Conclusiones..... | 61 |
| 6 | Recomendaciones..... | 62 |
| 7 | Bibliografía..... | 63 |

Introducción

Introducción

En el transcurso del siglo XXI, la humanidad tendrá que enfrentar una serie extraordinaria de retos. Según se estima, en los próximos 30 años, dos mil millones de personas más dependerán de la agricultura para su subsistencia mientras los recursos naturales son cada vez más frágiles (FAO, 2004).

A fin de enfrentar estos retos, será necesario disponer de nuevos conocimientos derivados del avance científico. La biotecnología puede acelerar los programas convencionales de propagación masiva de plantas y de mejoramiento genético y dar soluciones cuando los métodos convencionales fallan.

La principal variedad de papaya que se cultiva en Cuba es la Maradol roja, que a pesar de presentar numerosas ventajas tiene entre sus limitantes, la susceptible a las principales enfermedades virales, además de la rápida maduración de los frutos post-cosecha.

Posada *et al.* (2002) obtuvieron un híbrido (IBP 42-99) a partir del cruzamiento de esta variedad con la *Strawberry*, este híbrido mantuvo las características positivas de la Maradol roja, logró mejorar algunos aspectos como: menor peso y tamaño de los frutos y más brix, no obstante, mantiene la susceptibilidad a los virus y la característica de frutos climatéricos.

Como una herramienta del mejoramiento genético con vistas a resolver estas problemáticas, se introducen las técnicas de transformación genética. Para obtener plantas transgénicas en cualquier especie vegetal es necesario contar con metodologías eficientes de transformación y regeneración de plantas por cultivo de tejidos. Para ello se han desarrollado diferentes protocolos de transformación genética en la variedad de papaya Maradol roja a partir de embriones somáticos

obtenidos de embriones cigóticos inmaduros, con pistola de genes de alta y baja presión (Pons, 2001; Más *et al.*, 2002), respectivamente. Sin embargo, este tipo de explante inicial no puede ser utilizado para genotipos híbridos.

Gallardo *et al.* (2003) desarrollaron un protocolo de transformación directa a partir de los ápices del híbrido de papaya IBP 42-99 con un 0.98% de eficiencia; sin embargo aunque los resultados son alentadores obtener un alto número de líneas para su posterior estudio en campo, resultaría engorroso con un porcentaje tan bajo. Por ello se requiere de protocolos eficientes de regeneración de plantas que apoyen y aumenten los índices de obtención de líneas transgénicas en el proceso de transformación.

La embriogénesis somática ofrece mayores posibilidades de obtener volúmenes de producción superiores en un menor período de tiempo, lo cual la convierte en un método potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Villalobos y Torpe, 1991).

La mayoría de los trabajos en la literatura científica consultada sobre la embriogénesis somática en papaya han sido desarrollados empleando como explantes inicial embriones cigóticos inmaduros (Posada, 1995; Mahon *et al.*, 1996; Castillo *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 1999; Del Sol *et al.*, 2001). Sin embargo, otros autores han desarrollado la embriogénesis indirecta a partir de tejidos somáticos: ejes hipocotilo (Mauren y Fitch, 1993; Castillo *et al.*, 1998), láminas foliares (Arrieta-Espinoza, 1996), raíces (Yu *et al.*, 2001).

Tomando como Base la problemática anteriormente señalada se planteó como hipótesis de trabajo la siguiente:

“Es posible mediante el empleo de secciones de tallo de plantas *in vitro* como explantes iniciales establecer una metodología de embriogénesis somática como una vía alternativa de regeneración de plantas de papaya.”

Para dar cumplimiento a la hipótesis planteada se definieron los siguientes objetivos:

1. Lograr la formación de callos a partir de secciones de tallo de plantas *in vitro* del híbrido IBP 42-99.
2. Obtener embriones somáticos en etapa globular a partir de los callos formados y lograr la multiplicación secundaria de estos.
3. Lograr la germinación de los embriones somáticos obtenidos.

Revisión Bibliográfica

2. Revisión Bibliográfica.

2.1. Taxonomía y Botánica del cultivo

| | |
|--------------------------|---------------|
| Reino | Vegetal |
| División | Anthophyta |
| Subdivisión | Angiosperma |
| Clase | Dicotiledónea |
| Orden | Parietales |
| Familia | Caricáceas |
| Nombre científico | Carica papaya |

Descripción de la planta

Carica, del griego karike, nombre de una higuera, puesto por Linneo por la semejanza de sus hojas. Papaya, adaptación de su nombre nativo caribeño (Botanical-online, 2005).

Se le considera una hierba gigante y no un árbol ya que no tiene madera en su tallo o tronco, el cual en ocasiones puede alcanzar hasta 8 metros o más de altura. Es un tallo único, recto y cilíndrico. El interior del mismo es hueco y está seccionado en las partes más jóvenes por tabiques transversales, los cuales adquieren mayor consistencia a medida que envejecen y a la vez cambian su coloración.

Normalmente no se ramifica, a menos que se le puede o que se le produzca algún daño mecánico (proexant, 2005).

Las hojas son grandes, palmadas, alternas y se compactan en la parte terminal del tallo. El pecíolo es largo, hueco, ligeramente curvo hacia arriba y de color verde o morado, según la variedad. Las hojas se caen a medida que envejecen, dando paso a las inflorescencias y a los frutos, dejando en el tronco cicatrices características (Pestano, 2001).

El sistema radicular lo componen, unas pocas raíces grandes, poco profundas, con una estructura semejante a la del tallo, pero de coloración blanca y provista de muchas raicillas alimentadoras.

Las flores son grandes, blancas de 5 pétalos y 5 sépalos. Nacen en el tallo cerca de la inserción de las hojas en el mismo. Pueden ser de sexo masculino, sin ovario desarrollado; femenino, sin estambres; y hermafroditas, con estambres y ovarios. El sexo de las flores determina el de las plantas y en consecuencia la producción y características de los frutos (Sierra, 2003).

Los frutos son bayas de diferentes formas y tamaños, dependiendo del tipo de flor que los origina, desde casi esféricos o redondeados, a cilíndricos o alargados y con pesos que oscilan entre 200 gramos y 8 kilogramos. Están constituidos por una corteza de color verde y rica en conductos de látex en los frutos jóvenes y se tornan amarillos cuando alcanzan su madurez. Su consistencia interna es comestible y es rica en azúcares, minerales y sustancias colorantes (InfoAgro, 2002).

El color de la pulpa va de amarillo a rojizo, según el cultivar. Tiene un contenido aproximado de 80 a 85 % de agua, sobre un 10 % de azúcar y el resto esta representado por fibras, vitaminas y minerales y entre éstos principalmente el hierro y el calcio. El contenido de caroteno o pro vitamina A, es uno de los más altos entre todas las frutas. En el centro se encuentran las semillas, de color negro y ovaladas, recubiertas por una sustancia algo gelatinosa. Sobrepasan el medio millar de semillas en un fruto de regular tamaño (Rattanapanone y Chongsawat, 2000).

2.2. Origen y distribución

La papaya cuyo nombre científico es *Carica papaya*, pertenece a la familia de las Caricáceas, nativa de Centroamérica, posiblemente entre el sur de México y el norte de Nicaragua. La primera mención de la misma fue en el año 1535 y se le atribuye a Oviedo quien informó a los reyes de España haber visto plantas de papayas creciendo en dicha región (Pestano, 2001).

Su llegada al Caribe y a Suramérica se debió a los marinos españoles y portugueses. En estos lugares se le conoce con diferentes nombres, tales como fruta bomba, lechosa, papaya, pawpaw y otros. Su distribución en todo el resto del mundo tropical se logra durante el siglo XVI (Pestano, 2001).

El cultivo de la papaya en Cuba se realiza desde hace largo tiempo, aseguran algunos investigadores que a mediados del siglo XIX ya había evidencias de su existencia en algunos lugares del país. No se conoce con precisión el momento en

que fue introducida en la isla, sin embargo, se piensa en la posibilidad que haya sido traída por los españoles (Peña *et al.* 1996).

En las décadas del 30 y el 40 del pasado siglo adquirió importancia real, fomentándose áreas en la región más Occidental del país. A partir de ese momento tuvo un descenso en la región mencionada por los daños causados por enfermedades virales y comenzó su incremento en la región Oriental.

Con el triunfo de la Revolución se trazó la política de aumentar las áreas de este frutal, al comprender cabalmente su importancia económica para la nutrición humana y otros fines. Cada año se ha logrado incrementar o estabilizar la producción con el uso de cultivares nacionales (Peña *et al.*, 1996).

2.3. Importancia del cultivo

Este cultivo esta cobrando bastante importancia económica a nivel mundial, debido a que puede consumir como fruta fresca o procesarse para obtener otros productos como dulces, jaleas, licuados y encurtidos, También, por su contenido de nutrientes (tabla 1). Además posee un gran potencial de industrialización en el área farmacéutica, culinaria, médica, industria cervecera y bebidas no alcohólicas (Acuña, 2005)

Algunos productos obtenidos a partir de su industrialización son los siguientes: papaína, pectina, esencias, aceites, diversos medicamentos, néctares, conservas,

miel, jalea, mermeladas, jugos, confitado, etc. También es utilizada para tratamientos médicos de insuficiencias gástricas y duodenales, jarabes expectorantes, elaboración de medios de cultivo y suavizadores de chicles entre otros (Khan y Iqbal, 2000).

Tabla 1. Valor nutritivo de la papaya por cada 100 gramos de porción de fruto.

| Componente | Por cada 100 g de porción |
|-------------------------|----------------------------------|
| Energía | 59.0 KCal |
| Agua | 84.4 % |
| Proteína | 1.0 g |
| Grasa | 0.1 g |
| Carbohidratos | 13.5 g |
| Calcio | 31.0 mg |
| Fósforo | 17.0 mg |
| Hierro | 1.0 mg |
| Sodio | 2.0 mg |
| Potasio | 337.0 mg |
| B – Caroteno | 2431.0 µg |
| Vitamina B ₂ | 0.15 mg |
| Vitamina C | 69.3 mg |
| Vitamina B ₁ | 0.08 mg |
| Magnesio | 0.8 mg |
| Fibra | 0.5 g |

Por: Banerjee (2002).

Algunos países de Asia, Africa y Oceanía los destinan a la obtención de látex, de este líquido lechoso que es abundante en los frutos verdes, se extrae la papaina, la cual se usa ampliamente como ablandador de carnes y también en la clarificación de

cervezas y otras bebidas. Es de gran utilidad para suavizar las lanas, así como en el curtido de las pieles. Tiene gran aplicación en la fabricación de caucho y además en la preparación de remedios caseros, etc. (Caro y Villeneuve, 2000).

Para los productores también ofrece ventajas, dentro de los frutales es de los que inician la cosecha en poco tiempo (6-9 meses) y se puede asociar con granos básicos, hortalizas y frutales perennes (Pestano, 2001).

2.4. Principales variedades cultivadas en Cuba.

Existen diferentes variedades de uso comercial. Entre las que figura la variedad cubana conocida como Maradol roja, que fue obtenida por el esfuerzo combinado de un matrimonio campesino, en la provincia de las Villas. La palabra maradol viene de los nombres de María y de Adolfo, que vivían en la finca El Inglés, situada cerca del poblado de Santo Domingo (Pestano, 2001).

El árbol es de porte relativamente bajo y los frutos son medianos. La pulpa y cáscara son muy firmes, lo que hace a la fruta resistente al transporte, generalmente poseen forma alargada y tamaño mediano, lo cual facilita el empaque, el peso máximo del fruto puede ascender a 2.8 Kg. Tienen muy buen sabor y alto contenido de azúcares. El tamaño de la cavidad central de la fruta es pequeño, sobre todo en frutos de las plantas hermafroditas. El pedúnculo es corto. Existen dos tipos de frutas respecto al color de la pulpa, la roja y la amarilla. Tiene una proporción de 67% de plantas hermafroditas y 33% de plantas hembras en sus descendientes. No existen machos, en las plantas hermafroditas predomina la forma elongata (Otero, 2003).

La variedad Mamey cuyos frutos son de tamaño variable, de 1 a 5 Kg de peso, forma cilíndrica, pulpa rojiza, buena consistencia y resistencia al transporte, con vetas amarillo-rojizas al inicio de la madurez fisiológica. Existen plantas con los tres sexos, sin embargo hay predominancia de individuos hermafroditas.

Otra de las variedades era la llamada Criolla, que se sembraba en la región oriental de Cuba, con rendimientos sobre las 40 toneladas por hectárea y generalmente sin mayores problemas fitosanitarios y con gran adaptación por ser oriunda de esa zona.

2.5. Propagación en Papaya

La propagación de plantas consiste en efectuar su multiplicación por medios tanto sexual como asexual. La forma más económica y fácil de propagar el papayo es por semillas. Se obtendrán distintos resultados, según se empleen semillas procedentes de árboles femeninos fecundados con papayos masculinos o semillas procedentes de árboles femeninos y hermafroditas (tabla 2) (Ronse y Smets, 1999).

Tabla 2 - Proporciones y resultados de cruzas y auto polinización de formas sexuales de Carica papaya

| POLINIZACION | PROPORCION DE LA SEGREGACION | | |
|--------------------|------------------------------|--------------|-------|
| | HEMBRA | HERMAFRODITA | MACHO |
| F * M | 50 | ---- | 50 |
| F * H | 50 | 50 | --- |
| H (autopolinizado) | 33 | 66 | --- |
| H * H | 33 | 66 | --- |

| | | | |
|-------|----|----|----|
| H * M | 33 | 33 | 33 |
|-------|----|----|----|

F : Femenina M: Masculina H: Hermafrodita

Fuente: (Ronse y Smets, 1999).

Otra vía de propagación es mediante esquejes obtenidos de las ramificaciones del arbolito de forma artificial ya que el papayo no se ramifica hasta cuando tienen tres o cuatro años. Los árboles viejos sufrirán la operación de desmoche o eliminación de la cabeza o cogollo del árbol, provocando así la producción de ramas o cogollos laterales (Agronegocios, 2005).

En la actualidad se han desarrollado diferentes métodos de propagación a partir del cultivo de tejidos tanto por organogénesis (Hossain *et al.*, 1993) como por embriogénesis somática (Posada, 1995; Del Sol *et al.*, 2001), sin embargo por ser los métodos biotecnológicos hasta el presente más costosos respecto a la vía por semilla botánica su empleo está limitado solamente para genotipos híbridos que lo justifiquen (Elder y Macleod, 2000).

2.5.1. Método tradicional

La forma típica por su propagación, por su eficiencia, ha sido la reproducción sexual (por semillas). La propagación vegetativa por medio de estacas o injertos no brindan los efectos deseados, las primeras son de lento desarrollo y las segundas degeneran y no mantienen las características deseadas.

Para obtener semillas de calidad los frutos deben provenir del cruzamiento entre plantas hermafroditas, de esta manera se logra 66% de plantas hermafroditas y 33% de plantas femeninas, con esta selección existe la certeza de aparición de plantas masculinas no productivas (Otero, 2003).

El poder germinativo de las semillas del papayo suele ser corto, por lo que se hará una siembra lo más cerca posible a la época de recolección. Esta siembra puede ser directa sobre el terreno o previa en semillero. La siembra en semillero se hará empleando macetas de turba y plástico negro de 10 cm de diámetro y 15 cm de profundidad. La tierra del semillero deberá mantenerse húmeda, cuando las plantitas tengan unos 10-15 cm de altura (unos dos meses después de la siembra) se transplantarán al terreno de cultivo (Agronegocios, 2005).

Para el uso de los esquejes se tomarán brotes de 25-30 cm que se cortan y se cauterizan con agua caliente a unos 50 °C. Estos esquejes se plantan en macetas que se colocan en lugares protegidos de los rayos solares y con humedad hasta la emisión de raíces. Este método de propagación es muy laborioso y costoso ya que implica el mantenimiento de plantaciones de más de tres años para la obtención de plantas madre (Sierra, 2003).

2.5.2. Cultivo *in vitro*

Los orígenes del cultivo *in vitro* se remontan a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt al cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la

totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro* (Cabrera, 1990; Brar y khush, 1994).

El cultivo de tejidos se puede definir como un conjunto de técnicas que permiten cultivar en condiciones asépticas órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Jiménez, 1998). Es una técnica que nos brinda grandes aportes prácticos. Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos de fisiología y bioquímica vegetal (Nash y Davies, 1972; Komamine *et al.*, 1982; Lai y Yeh, 2000) hasta la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva (Vasil, 1994; Kitto, 1997), el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro* (Pérez *et al.*, 1998) y la ingeniería genética (Herrera- Estrella *et al.*, 1983).

Para la manifestación de la totipotencia celular en los cultivos vegetales *in vitro* existen dos vías, la organogénesis y la embriogénesis, la regeneración de plantas por una y otra vía depende de las características genéticas de los cultivos y del manejo del cultivo *in Vitro*, que tiene en cuenta la manipulación, los medios de cultivo y otras condiciones ambientales (Gómez, 1997).

2.5.2.1. Organogénesis

La organogénesis es una manifestación morfogénica que está caracterizada por un desarrollo unipolar a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de esta en un brote vegetativo, donde existe siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno (George y Sherrington, 1984; Ramkhelawan y Baksh, 1999; Vegas *et*

al., 2003). La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: Directa e indirecta.

2.5.2.2. Embriogénesis Somática

La embriogénesis somática se define como la formación de un embrión a partir de células, sin la necesidad de la fusión de gametos (Merkle *et al.*, 1995). Schoots (1997) planteó que al alterar las condiciones de crecimiento y someter los tejidos y órganos inoculados a condiciones no usuales, la planta puede anular o alterar la expresión del gen relacionado a una función específica en la planta.

Para inducir la embriogénesis somática se requiere un cambio en el destino de la célula vegetativa (somática). Generalmente, se requiere de un tratamiento inductivo que inicie la división celular y establezca una nueva polaridad en la célula somática (Parrot, 2002). Las auxinas cumplen esta función y en papaya se emplea comúnmente el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), pero otras auxinas como ácido naftalenacético (ANA) y ácido Indolacético (AIA) son efectivas solas o en combinación con citoquininas (Jordan y Velozo, 1996).

La respuesta de las auxinas es muy compleja y para algunas especies la combinación con citoquininas es fundamental para estimular la formación de callos pero no de embriones somáticos (González *et al.*, 2002). Compuestos inorgánicos como potasio y compuestos orgánicos como prolina en el medio de cultivo se han empleado para regular la embriogénesis o formación de callos, pero ellos no reemplazan a las auxinas (Yemets, 2003).

El proceso de embriogénesis somática ha sido descrito para un gran número de especies (Krishnaraj y Vasil, 1995; Li y Huang, 1996; Yang, 2001) sin embargo, la inducción del embrión somático y la regeneración de plantas todavía no son procesos eficientes para muchas especies. Mientras más parecida es la expresión génica del embrión somático al embrión cigótico, más alta es la probabilidad de obtener sistemas eficientes de regeneración de plantas (Parrot, 1993).

El origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos es un punto controversial. Se ha ilustrado el desarrollo directo de embriones a partir de una sola célula (Steward., 1958), pero también se han reportado muchos casos en que los embriones se forman a partir de agregados de células meristematicas (Schoof, 1997).

La inducción de la embriogénesis somática está determinada por la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido explante, siendo estos reemplazados con un programa de expresión de gen o genes de la embriogénesis somática, en aquellas células del tejido explante, las cuales podrían dar lugar a embriones somáticos (Evans *et al.*, 1981; Sharp *et al.*, 1983). Según Parrot (1993) la inducción del estado embriogénico incluye la inducción de los mismos mecanismos genéticos que conllevan a la embriogénesis cigótica. Contrariamente a los embriones cigóticos los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes, sino que poseen la misma combinación genética de la planta fuente del explante.

Este método es considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, debido a la naturaleza bipolar del embrión, la facilidad con que puede

ser automatizado todo el proceso productivo (Maureen *et al.*, 1990; Pires de Almeida *et al.*, 2001), altos coeficientes de multiplicación en cortos periodos de tiempo, al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semilla artificial (Redenbaugh, 1986; Quiala, 2000; Guerra *et al.*, 2001).

Las células que son embriogénicas no están lejos de este estado y se inducen a la embriogénesis somática fácilmente. Estas células se les denominan células somáticas determinadas proembriogénicamente (CsDPE) (Evans *et al.*, 1981), los factores de crecimiento o condiciones favorables permiten la división celular y la expresión de la embriogénesis somática. En contraste con las CsDPE, las células vegetativas altamente diferenciadas requieren de grandes cambios epigenéticos.

Los reguladores del crecimiento u otros factores estresantes son imprescindibles para la inducción de la desdiferenciación, división celular y para determinar el estado embriogénico (Parrot, 2002). La inducción de la embriogénesis somática a partir de estas células, es indirecto porque requiere de una fase de callo intermedia. La distancia epigenética de las células del explante al estado embriogénico va a determinar si el proceso es directo o indirecto (Roca, 1991).

2.5.2.2.1. Embriogénesis Directa

Este proceso ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente desde el explante utilizado sin la formación de callo. Este desarrollo directo es una fuerte correlación entre el tipo de explante y la concentración de la auxina. Diferentes

autores han desarrollado la embriogénesis somática directa, empleando diferentes reguladores del crecimiento a partir de diferentes explantes, cotiledones de semillas (Collado *et al.*, 2004), embriones cigóticos (Fernando *et al.*, 2001; Del Sol *et al.*, 2001), entre otros.

En el cultivo de la papaya la embriogénesis somática de forma directa es la más utilizada tanto para los estudios de micropropagación, como para el mejoramiento genético utilizando las técnicas de transformación genética (Cabrera-Ponce *et al.*, 1995; Posada, 1995; Mahon *et al.*, 1996; Castillo *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 1999; Del Sol *et al.*, 2001).

2.5.2.2.2. Embriogénesis Indirecta

El proceso de embriogénesis somática indirecta, fue observado por primera vez en suspensiones de zanahoria (*Daucus carota*) por Steward *et al.* (1958) y a partir de callos creciendo en medio de cultivo semisólido por Reinert (1958).

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF) y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF). En la primera el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque, se forman pocos embriones somáticos por callos. Los mismos aparecen aislados o en pequeños grupos y se desarrollan completamente pasando por las diferentes etapas de desarrollo mientras que en la segunda, los embriones somáticos no se desarrollan completamente, manteniéndose

en estado globular, agrupados en un número mucho mayor, apareciendo en un número menor de callos, lo cual ha sido observado en caoba *Swietenia macrophylla* King. (Collado *et al.*, 2004), papaya (Yu *et al.*, 2001), guayaba (Vilche, 2000), bananos y plátano (Escalant y Teisson, 1989; Chong, 2003).

2.6. Factores que afectan la Embriogénesis Somática

2.6.1. Genotipo

El genotipo, estado fisiológico y edad de la planta donadora influyen en la respuesta embriogénica del explante (Roca, 1991; Canhoto *et al.*, 1999).

Se ha podido comprobar que genotipos que provenían de una misma especie pueden variar en cuanto a su respuesta embriogénica, dado por la capacidad para activar las rutas metabólicas (Parrot, 1993). Guerra *et al.* (2001) estudiaron el comportamiento de 5 genotipos diferentes de *F. sellowiana* en la inducción de la embriogénesis somática y señalaron diferencias significativas en cuanto al número de embriones somáticos obtenidos a partir de cada genotipo.

La inducción y control de la embriogenesis ha sido asociada con una interacción entre el genotipo de la planta madre y la constitución del medio de cultivo (Canhoto y Cruz, 1996; Guerra *et al.*, 1997). La influencia del genotipo para la inducción de la embriogénesis somática también ha sido reportada en otros cultivos tales como en confieras (Attree y Fowke, 1993), *Vitis spp* (Gray, 1995), *Juglans spp* (Preece *et al.*, 1995), *Theobroma cacao* (Alemanno *et al.*, 1996), y *Gossypium hirsutum* (González-Benito *et al.*, 1997).

2.6.2. Explante

El tipo de explante puede ser un factor fundamental que determina el fracaso o el éxito de un protocolo embriogénico (Brown *et al.*, 1995; Krishnaraj y Vasil, 1995). La presencia de tejido maduro y más diferenciados inhibe la expresión de la competencia embriogénica en las células (Vasil, 1987).

Según Parrot (1993) el tipo, estado fisiológico y los niveles de diferenciación y polarización de los tejidos utilizados como explantes iniciales son algunos de los factores que favorecen el desarrollo de la embriogénesis somática. Freire (2001) utiliza segmentos de plantas *in vitro* para desarrollar la embriogénesis somática en caña de azúcar (*Sacharum ssp.* Híbrido) y señalan la diferencia a la respuesta embriogénica de los explantes al grado de diferenciación de los tejidos.

En el cultivo de la papaya el explante más utilizado para desarrollar la embriogénesis somática, son los embriones cigóticos (Cabrera-Ponce *et al.*, 1995; Mahon *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 1999; Del Sol *et al.*, 2001). Aunque también se han utilizado otros tipos de explantes como, Discos de hojas (Cabrera-Ponce *et al.*, 1996), segmentos de hipocotilo (Castillo *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2004), Raíces (Yu *et al.*, 2001).

2.6.3. Medio de Cultivo

Para el desarrollo de la embriogénesis somática el medio de cultivo más empleado es el Murashige and Skoog (1962) con algunas modificaciones. Aunque, también

autores como Jordan y Velozo (1996) emplearon el medio de cultivo Nitsch y nitsch (1969).

La mayoría de los investigadores para desarrollar la embriogénesis somática en especies dentro de la familia *Caricaceae* emplean la ½ de la concentración de las sales MS y como regulador de crecimiento 2,4-D en concentraciones desde (1 – 10 mg.l⁻¹) (Fitch, 1990; Posada, 1995; Zhu *et al.*, 2004). Sin embargo, otros autores dentro de esta familia han utilizado como reguladores del crecimiento ANA, AIA, 6-BAP, Kinetina y Zeatina (Jordan y Veloso, 1996; Cabrera-Ponce *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2001).

La inducción de la embriogénesis somática esta relacionada con la mutilación del ADN (Berdasco *et al.*, 2002). LoSchiavo *et al* (1989) señalan que existe una correlación positiva entre la cantidad de ADN metilado y la cantidad de auxina exógena.

2.6.4. Condiciones de Cultivo

Se ha comprobado que para algunas especies es fundamental la inducción de la embriogénesis somática en ausencia de luz, caña de azúcar (Quiala, 2000; Freire, 2001), plátanos y bananos (Daniels, 2002; Chong, 2003).

En el género *Carica* muchos de los trabajos realizan todo el proceso de embriogénesis somática en ausencia de iluminación (Mahon *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 1999; Del Sol *et al.*, 2001), sin embargo otros autores desarrollan la etapa de

formación de callos en presencia de iluminación (Hossain, *et al.*, 1993; Jordan y Velozo, 1996).

La atmósfera gaseosa es un factor importante en el desarrollo de la embriogénesis somática (Abdelmalek y Francine, 1999). Rustant *et al* (1990) incrementaron la capacidad embriogénica de los explantes al adicionar inhibidores del etileno. Barbón (2001) incrementan el número de embriones somáticos al disminuir las concentraciones de dióxido de carbono en los frascos de cultivo.

2.7. Embriogénesis Somática Secundaria o Repetitiva

La proliferación de células embriogénicas es aparentemente influenciada por un número de factores, algunos de los cuales pueden ser controlados durante el proceso y otros que todavía no han sido definidos, siendo muchos de estos los mismos que afectan el proceso de inducción de la embriogénesis (Gray, 1995).

El factor más frecuente asociado a la continua proliferación de los embriones somáticos es la auxina. Una vez que un grupo de embriones somáticos han sido obtenidos la presencia continuada de la auxina inhibe el normal desarrollo y maduración de los embriones somáticos, pero si el nivel de auxina es bastante alto, se inicia un nuevo ciclo de producción de embriones, los niveles de la auxina varían en dependencia de la especie, si los niveles son bajos o se eliminan se produce el desarrollo, maduración y hasta la germinación de los embriones somáticos (Parrot, 2002)

La embriogénesis secundaria comparada con la primaria, presenta mayores ventajas tales como: alto coeficiente de multiplicación, independientemente de la fuente del explante y repetitibilidad; además la embriogénesis somática puede ser mantenida por periodos de tiempo prolongados mediante ciclos repetitivos de embriogénesis secundaria (Raemaker *et al.*, 1995). Para la proliferación de los embriones somáticos es necesario considerar varios factores como: densidad de inóculo, regulador del crecimiento, fuente de nitrógeno, etc; algunos de los cuales podrían ser controlados durante el proceso de cultivo y algunos no están definidos (Yemets *et al.*, 2002).

La embriogénesis somática secundaria constituye uno de los aspectos más interesantes de la embriogénesis somática debido a las posibles aplicaciones de la misma. En cultivos de ciclo de vida largo, como los frutales y forestales, es posible mantener líneas embriogénicas preservadas *in vitro* mientras son probados bajo condiciones de campo, una vez seleccionadas las líneas pueden ser multiplicados en grandes cantidades por embriogénesis secundaria (Wann, 1988). Además la embriogénesis secundaria puede ser usada para la producción de embriones somáticos de especies en las cuales los embriones cigóticos contienen metabolitos de importancia económica (Raemaker *et al.*, 1995).

Otro de los posibles usos de la embriogénesis secundaria dentro del mejoramiento genético es la factibilidad de introducir genes foráneos de interés agrícola, mediante la transformación genética de embriones somáticos que son multiplicados por embriogénesis secundaria, ya que a través de esta es posible separar los embriones

quiméricos de los transformados, cultivando los embriones bajo condiciones de selección (Raemaker *et al.*, 1995; Merkle *et al.*, 1995).

2.8. Germinación y Conversión en Plantas de los Embriones Somáticos

En el proceso de embriogénesis somática los pasos finales lo constituyen la germinación y la conversión en plantas. Las primeras señales de la germinación de los embriones somáticos lo constituye la elongación del hipocotilo, desarrollo de color verde de los cotiledones y la elongación de la radícula (Alemano *et al.*, 1997; Canhoto *et al.*, 1999; Salomao y Mundim, 2000).

La conversión la definen algunos autores como la emisión de brotes con el primer par de hojas verdaderas (Alemano *et al.*, 1997). Mientras que otros la definen como la supervivencia y desarrollo en fase de propágalo en condiciones ambientales *ex vitro* o sea en suelo. La habilidad de obtener *in vitro* plantas con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro* (Senaratna *et al.*, 1990; Fuji *et al.*, 1990).

Muchos reportes señalan la necesidad de dar varios subcultivos en el medio de cultivo de germinación, para lograr que germinen los embriones somáticos como consecuencia de la asincronía en cuanto a las etapas de desarrollo de los embriones somáticos (Cruz *et al.*, 1990; Posada, 1995).

3. Materiales y Métodos.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Embriogénesis Somática y Transformación genética del Instituto de Biotecnología de Las Plantas (IBP), perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV). El mismo se llevó a cabo durante el período comprendido entre Enero de 2004 a Diciembre de 2005.

Técnicas y procedimientos generales de trabajo.

Material Vegetal

Se emplearon plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99, las cuales se encontraban en el 5^{to} y 6^{to} subcultivo en cámara de cultivo con luz solar. Para tomar los explantes (ápices y secciones de tallo) se le eliminaron las hojas por la base del pecíolo con el tallo, con pinzas y bisturí auxiliados del microscopio estereoscopio.

Instrumental

Para la esterilización de los platos de aluminio utilizados en los pasos del material vegetal, se realizó en una estufa a 180 °C durante dos horas. Las pinzas y los bisturios fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% (v/v) durante 15 minutos (Agramante *et al.*, 1993). Las operaciones de inoculación, transferencia y manipulación del material vegetal fueron realizadas en una cabina de flujo laminar horizontal.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C de temperatura y 1.2 kg.cm⁻² de presión. El tiempo de la esterilización estuvo en dependencia del volumen de medio de cultivo, según Sigma (1991). Como gelificante del medio de cultivo se empleó Gelrite a razón de 2.5 g.l⁻¹ y el pH fue ajustado siempre a 5.8 con el uso de ácido clorhídrico (HCl) 1.0 M o el hidróxido de sodio (NaOH) 1.0 M previo a la esterilización. En todos los experimentos se utilizó medio de cultivo semisólido y se emplearon como recipientes de cultivo tubos de ensayo (150 x 25 mm) y frascos de vidrio de 250 ml de capacidad total, los mismos contenían 10 y 30 ml de medio de cultivo, respectivamente.

En la etapa de formación de callos donde se utilizó como regulador del crecimiento 2,4-D y en la obtención y multiplicación de los embriones somáticos los frascos con los explantes fueron colocados en una cámara de cultivo en oscuridad total. En los demás experimentos de formación de callos, así como para la germinación de los embriones somáticos los frascos se colocaron en cámara crecimiento con luz solar con intensidad de 48 - 62.5 mol. m⁻²s⁻¹ y duración máxima y mínima del período luminoso de 13h, 34 minutos y 10h, 41 minutos respectivamente (Freire, 2001) y temperatura de 27± 2 °C.

Análisis Estadístico

En los experimentos llevados a cabo en el laboratorio se aplicó una lectura de las observaciones completamente aleatoria. Para el análisis estadístico de los resultados de cada experimento se realizaron pruebas multivariadas y multifactoriales.

Los grupos homogéneos y/o significativamente diferentes fueron hallados a partir de las pruebas de rangos múltiples (LSD) en un análisis de varianza simple y Prueba de Proporción. Este procesamiento estadístico de las variables en cada estudio fue posible a través de los programas estadísticos computacionales STATGRAPHICS Plus. 4.1 y Statistix Ver 1.0, aplicaciones para window. El nivel de significación fijado para todas las pruebas fue del 95%, o sea. $P < 0.05$.

3.1. Formación de callos

3.1.1. Influencia de la combinación de reguladores del crecimiento en la formación de callos

Con el objetivo de obtener callos con buenas características (Compactos, nodulares, secos) a partir de ápices de plantas *in vitro* de papaya se desarrollaron cuatro experimentos donde se estudiaron el efecto de diferentes tipos y concentraciones de auxinas y citoquininas.

Todos los experimentos se realizaron tres veces en el tiempo y se utilizaron 40 repeticiones por tratamientos. Las evaluaciones se realizaron a los 60 días de cultivo donde se evaluó el número de explantes que formó callo, la textura y color de estos,

la formación de órganos y el área del explante que formó callo según la siguiente escala:

- + 25% del explante cubierto por callo,
- ++ 50% del explante cubierto por callo,
- +++ 75% del explante cubierto por callo,
- ++++ 100% del explante cubierto por callo.

Los resultados de los experimentos, fueron procesados en el paquete estadístico STATISTIX 2.0 donde se les realizó una prueba de proporción con un 95% de significación.

3.1.1.1. Efecto del 2,4-D

El principal objetivo fue determinar la factibilidad del empleo del 2,4-D para formar callos a partir de ápices del híbrido de papaya IBP 42-99. Para esto se tomaron como explantes iniciales, ápices meristemáticos con 5 mm de longitud de plantas *in vitro*. Los mismos se colocaron en el medio de cultivo propuesto por Nitsch y Nitsch (1969) y suplementado con 2,4-D en las concentraciones siguientes (2, 4 y 6 mg.l⁻¹).

3.1.1.2. Efecto de la combinación del 2,4-D con las citoquininas 6-BAP y Kinetina

En base a los resultados del experimento anterior y la bibliografía consultada y con el objetivo de mejorar la calidad de los callos obtenidos, se continuó con el medio de cultivo suplementado con 2,4-D y se combinó con dos citoquininas 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y Kinetina en diferentes concentraciones (Tabla 3). Se utilizó como explante inicial ápices con 5 mm de longitud de plantas *in vitro*.

Tabla 3. Combinaciones del 2,4-D con citoquininas (6-BAP y Kinetina) utilizadas para obtener callos a partir de ápices de plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99.

| Tratamientos | 2,4-D (mg.l ⁻¹) | 6-BAP (mg.l ⁻¹) | Kinetina (mg.l ⁻¹) |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| 1 | 4 | 1 | - |
| 2 | 4 | 2 | - |
| 3 | 4 | - | 0.5 |
| 4 | 4 | - | 1 |
| 5 | 4 | - | 1.5 |

3.1.1.3. Efecto de ANA en combinación con 6-BAP

Tomando como base resultados de experimentos previos no mostrados en este trabajo, los resultados del experimento anterior y con el objetivo de mejorar u obtener callos con las características deseadas, se estudió la auxina ANA en combinación con 6-BAP. Para ello se tomaron como explantes iniciales, ápices meristemáticos de plantas *in vitro*, los cuales se colocaron en el medio de cultivo propuesto por Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con estos reguladores del crecimiento en distintas concentraciones (Tabla 4).

Tabla 4. Diferentes combinaciones de 6-BAP y ANA para la formación de callos a partir de ápices de plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99.

| Tratamientos. | 6-BAP (mg.l ⁻¹) | ANA (mg.l ⁻¹) |
|---------------|-----------------------------|---------------------------|
| 1 | 1.5 | 0.3 |
| 2 | 2.5 | 0.5 |
| 3 | 3.5 | 0.7 |
| 4 | 4.5 | 0.9 |
| 5 | 5.5 | 1.1 |

3.1.1.4. Efecto del AIA en combinación con el 6-BAP

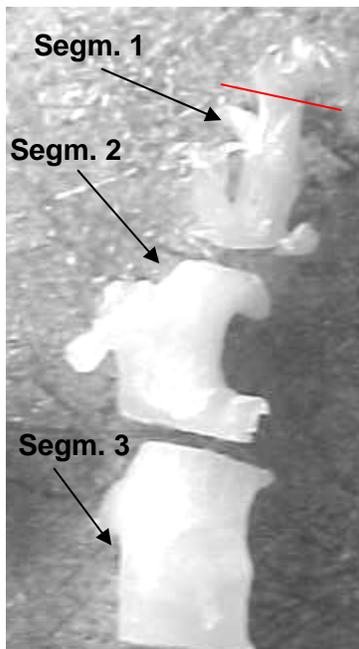
Al analizar los resultados de los experimentos anteriores así como la bibliografía consultada, se estudió el efecto de la combinación de AIA con 6-BAP (tabla 5). Para ello se tomaron como explantes iniciales, ápices meristemáticos de plantas *in vitro*, los cuales se colocaron en el medio de cultivo propuesto por Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con estos reguladores del crecimiento en distintas concentraciones (Tabla 5)

Tabla 5. Distintos tratamientos formados con la combinación AIA y 6-BAP, para la formación de callos a partir de ápices de plantas *in vitro* del híbrido de papaya.

| Tratamientos. | 6-BAP (mg.l ⁻¹) | AIA (mg.l ⁻¹) |
|---------------|-----------------------------|---------------------------|
| 1 | 1.5 | 1.5 |
| 2 | 2.5 | 2.5 |
| 3 | 3.5 | 3.5 |
| 4 | 4.5 | 4.5 |
| 5 | 5.5 | 5.5 |

3.1.2. Influencia del origen del explante en la respuesta callogénica.

El experimento tuvo como objetivo, determinar qué otras regiones del tallo de la planta *in vitro* formaban callos, teniendo en cuenta resultados anteriores en los que se emplearon como explantes ápices. Para ello se utilizó el medio de cultivo Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con 1.5 mg.l⁻¹ de AIA y 1.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP. Se tomaron explantes de diferentes zonas de la planta *in vitro* (Figura 1), siendo estos tres de los cuatro tratamientos estudiados.



Tratamientos:

1. Segmento 1: fragmento de 5.0 mm de longitud de la parte superior de la planta *in vitro* al que se le eliminó el meristemo (aprox. 2mm).
2. Segmento. 2: fragmento de 5.0 mm a partir del segmento 1.
3. Segmento 3: fragmento de 5.0 mm después del segmento 2.
4. Control (Ápice de 5 mm)

Figura 1. Forma en que se seccionaron las plantas *in vitro* para tomar como explantes segmentos de su tallo.

3.2. Embriogénesis somática

3.2.1. Influencia de diferentes concentraciones de 2,4-D en la formación de embriones somáticos

Para la formación de embriones somáticos a partir de los callos obtenidos de secciones de tallo de plantas *in vitro*, se utilizó como medio de cultivo la mitad de las sales MS suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D y Para ello se estudiaron las concentraciones siguientes:

Tratamientos:

1. 1 mg.l⁻¹ de 2,4-D.
2. 5 mg.l⁻¹ de 2,4-D.
3. 10 mg.l⁻¹ de 2,4 D.
4. 15 mg.l⁻¹ de 2,4-D.

A partir de las 6 semanas de cultivo se realizaron las evaluaciones siguientes:

- Número de callos con embriones somáticos.
- Existencia o no de cambios morfológicos en los embriones somáticos obtenidos.
- Número de embriones somáticos por callo/tratamiento.

Este experimento se realizó tres veces en el tiempo y se utilizaron 30 repeticiones. A los resultados se les aplicó una prueba de rangos múltiples (LSD) en el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 4.0.

3.3. Multiplicación secundaria de embriones somáticos

3.3.1. Influencia de diferentes concentraciones de 2,4-D

El principal objetivo fue determinar la concentración de 2,4-D donde se obtiene el mayor número de embriones somáticos en etapa globular. Para el desarrollo de la embriogénesis secundaria en el híbrido IBP 42-99 se tomaron grupos de embriones en etapa globular con una masa fresca de 50 mg (MF) y se colocaron en medio de

cultivo con la mitad de las sales MS suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D.

Tratamientos:

- 2 mg.l⁻¹ de 2,4-D.
- 5 mg.l⁻¹ de 2,4-D.
- 8 mg.l⁻¹ de 2,4-D.

A partir de las 4 semanas de cultivo se realizaron las siguientes evaluaciones.

- Número de embriones somáticos por masa embriogénica.
- Porcentaje de embriones somáticos en etapa globular del total de la masa embriogénica.
- Existencia o no de cambios morfológicos en los nuevos embriones somáticos.

Este experimento se realizó tres veces en el tiempo y se emplearon 30 repeticiones. Los resultados fueron procesados en el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 4.0 a los que se les realizó una prueba de rangos múltiples con la diferencia mínima significativa (LSD).

3.4. Germinación de los embriones somáticos

3.4.1. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP

Con el objetivo de determinar la concentración más adecuada del 6 BAP en el proceso de germinación de los embriones somáticos, se estudiaron diferentes

concentraciones del mismo y se emplearon embriones somáticos en etapa torpedo y cotiledonal (figura 2). Se les realizó a los embriones dos subcultivos en este medio de cultivo teniendo en cuenta resultados anteriores, donde diferentes autores utilizan para la germinación de embriones somáticos de papaya dos (Posada, 1995) y hasta tres subcultivos (Cruz *et al.*, 1990) para completar y lograr el desarrollo de plantas bien formadas.

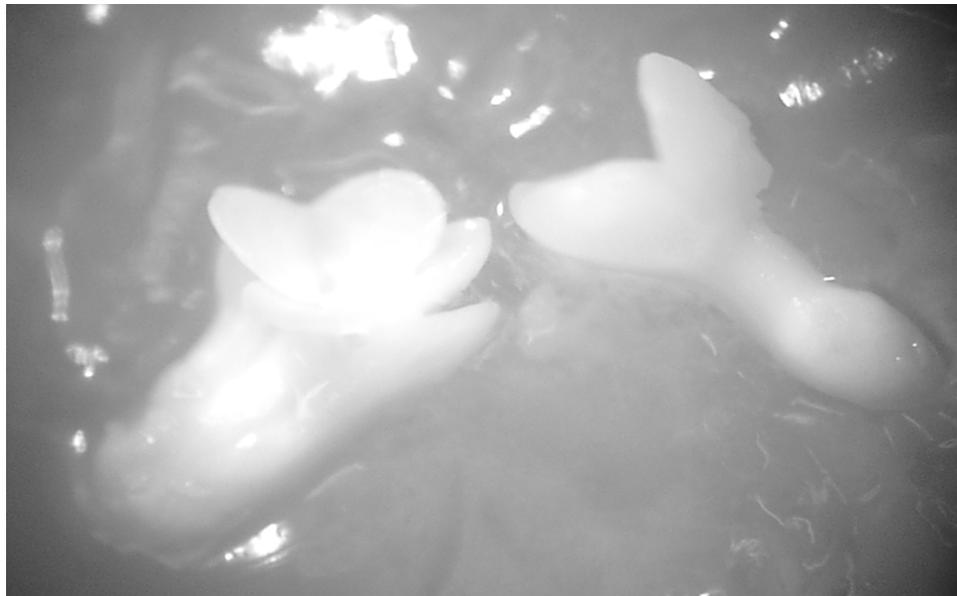


Figura 2. Embriones somáticos del híbrido de papaya IBP 42-99 en etapa torpedo y cotiledonal empleados en la fase de germinación.

Como medio de cultivo se utilizó las Sales MS suplementadas con las concentraciones del regulador del crecimiento siguiente:

Tratamientos:

- 0 mg.l⁻¹ de 6-BAP.
- 0.15 mg.l⁻¹ de 6-BAP.
- 0.30 mg.l⁻¹ de 6-BAP.
- 0.45 mg.l⁻¹ de 6-BAP.

En este experimento se evaluó:

- Inicio de la germinación (días) mediante observaciones diarias.
- El número de embriones somáticos que germinaron para dar lugar a plantas.

Este experimento se realizó tres veces en el tiempo y se utilizaron 50 repeticiones.

Los resultados expresados en porcentajes fueron procesados en el paquete estadístico STATISTIC 2.0 a los que se les realizó una prueba de proporción.

Crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro*.

Las plantas *in vitro* bien formadas obtenidas a partir de la germinación de los embriones somáticos, se colocaron en medio de cultivo de elongación de plantas de papaya, el cual contenía las sales MS suplementadas con 0.25 mg.l⁻¹ de ANA y 0.25 mg.l⁻¹ de 6-BAP. Posterior a las 4 semanas y con una altura promedio de tres centímetros, las plantas *in vitro* fueron colocadas en un medio de cultivo MS suplementado con 5 mg.l⁻¹ de AIB para inducir el enraizamiento, donde permanecieron por espacio de 10 días y luego se colocaron en medio de cultivo MS libre de reguladores de crecimiento para emitir las raíces.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Formación de callos

4.1.1. Influencia de la combinación de reguladores del crecimiento en la formación de callos

4.1.1.1. Efecto del 2,4-D

Se logró obtener callos a partir de ápices del híbrido de papaya IBP 42-99 al utilizar 4 mg.l⁻¹ de 2,4-D, aunque solo en un 47.5 % de los explantes (Tabla 6). Además, los mismos no presentaban las características deseadas, pues eran pequeños con una coloración parda, una textura compacta en el centro y cubierta esponjosa y seca (Figura 3 A). Al elevar la concentración de 2,4-D disminuyó a 33.3 % el número de explantes que formaron callos. Cuando se utilizó el 2,4-D en baja concentración (2 mg.l⁻¹), solamente se desarrollaron raíces en el explante (Figura 3 B), algo negativo en esta etapa, teniendo en cuenta que para esta etapa se debe obtener callos compactos y grumoso. Según Vázquez y Torres (1995) la formación de esbozos radiculares esta en dependencia de la proporción auxina/citoquinina, cuando está favorecida la auxina, pero en concentraciones que no induzcan la desdiferenciación de los tejidos se forman raíces a partir de los explantes como sucedió en el presente acápite.

Tabla 6. Efecto del 2,4-D en la formación de callos a partir de ápices de plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99 a los 60 días de cultivo.

| Tratamientos | 2,4-D (mg.l ⁻¹) | Explante con callos (%) | Formación de callos | Formación de órganos. |
|--------------|--------------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------|
| 1 | 2 | 0 | - | Raíces |
| 2 | 4 | 47.5 a | ++ | - |
| 3 | 6 | 33.3 b | ++ | - |

+ 25% del explante cubierto por callo, ++ 50% del explante cubierto por callo, +++75% del explante cubierto por callo, ++++ 100% del explante cubierto por callo.

* Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$, según prueba de proporción.

Otros autores refieren la formación de raíces a partir de los explantes utilizados para formar callos, cuando utilizan concentraciones de ANA desde (0.1 – 1 mg.l⁻¹) (Shu y Loh, 1991). Solamente al variar el tipo de explante, Castillo *et al.* (1998) obtuvieron callos secos y compactos a partir de secciones de eje hipocotilo en papaya var. Solo, con concentraciones de 1 mg.l⁻¹ de 2,4-D.

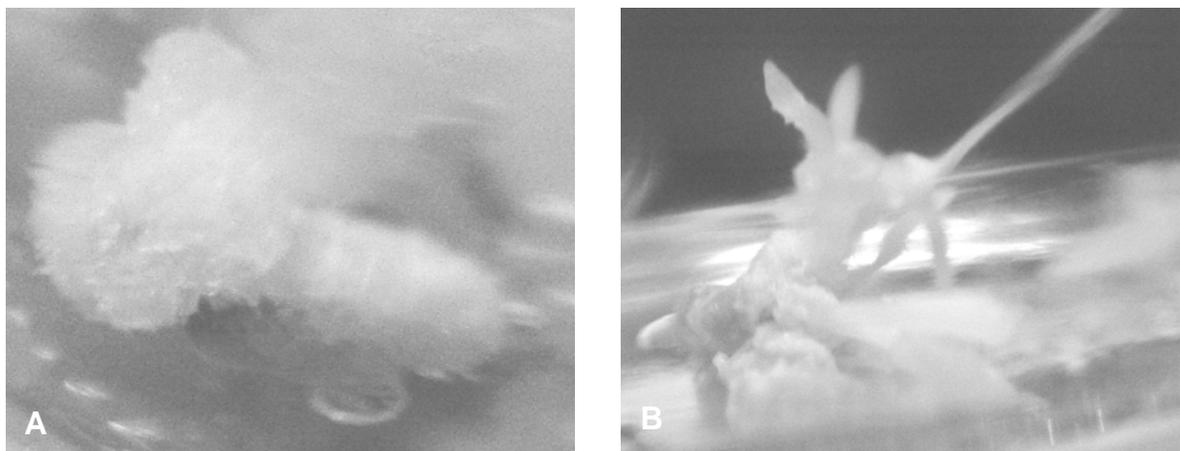


Figura 3. Comportamiento de los ápices del híbrido de papaya IBP 42-99, en medio de cultivo Nitsch y Nitsch suplementado con 2,4 –D, a los 60 días de cultivo. A. (4 mg.l⁻¹). B. (2 mg.l⁻¹).

En otros cultivos como el Henequén (*Agave fourcroydes* Lem), González *et al.*, (2002) utilizan diferentes concentraciones de 2,4-D para formar callos a partir de ápices e informan los mejores resultados con la más baja concentración (0.3 mg.l⁻¹).

4.1.1.2. Efecto de la combinación del 2,4-D con las citoquininas 6-BAP y Kinetina

Al combinar 2,4-D con ambas citoquininas se formaron callos a partir de los explantes empleados. Cuando se adicionó al medio de cultivo 2,4-D y 6-BAP se logran los mayores porcentajes de formación de callos (Tabla 7). Sin embargo, los mismos fueron pequeños y de coloración parda, compactos en el centro y rodeados por una masa esponjosa de coloración más clara. Además, no experimentaron crecimiento secundario cuando se colocaron posteriormente en este mismo medio de cultivo (Figura 4 A).

Empleando como explantes raíces de plantas *in vitro* de papaya, Yu *et al.* (2001) obtuvieron callos y desarrollaron la embriogénesis somática a partir de estos y para ello utilizaron diferentes combinaciones de 2,4-D con 6-BAP en el medio de cultivo.

El empleo del 2,4-D combinado con kinetina aumentó el tamaño de los callos (Tabla 7); sin embargo, se desarrollaron pequeñas hojas a partir de los explantes que ya habían formado callo (Figura 4 B). Estos callos presentaron una consistencia compacta en el centro pero tenían una cubierta blanca esponjosa y seca que cubría la mayor parte del explante. Según Arrieta-Espinosa (1996) en papaya la combinación de 2,4-D y Kinetina favorece la callogénesis del tejido foliar.

Tabla 7. Efecto del 2,4-D combinado con 6-BAP y Kinetina en la formación de callos con estructuras embriogénicas en ápices del híbrido de papaya IBP 42-99.

| Tratamientos | Explante con callo (%) | Formación de callos | Formación de órganos. |
|--|------------------------|---------------------|-----------------------|
| 4 mg.l ⁻¹ (2,4-D) + 1 mg.l ⁻¹ (6-BAP) | 71.4 a | ++ | - |
| 4 mg.l ⁻¹ (2,4-D) + 2 mg.l ⁻¹ (6-BAP) | 57.1 b | ++ | - |
| 4 mg.l ⁻¹ (2,4-D) + 0.5 mg.l ⁻¹ (Kinetina) | 35.7 c | +++ | Hojas |
| 4 mg.l ⁻¹ (2,4-D) + 1 mg.l ⁻¹ (Kinetina) | 21.4 d | ++ | Hojas |
| 4 mg.l ⁻¹ (2,4-D) + 1.5 mg.l ⁻¹ (Kinetina) | 28.5 cd | +++ | Hojas |

+ 25% del explante cubierto por callo, ++ 50% del explante cubierto por callo, +++75% del explante cubierto por callo, ++++ 100% del explante cubierto por callo.

* Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$, según prueba de proporción.

Gendy *et al.* (1996), señalaron que para algunas especies vegetales la adición al medio de cultivo de citoquininas en combinación con el 2,4-D puede incrementar significativamente los porcentajes de formación de callos, o simplemente que pueda ser necesario para el establecimiento de callos, ejemplo *Cymbopogon martín* (Patnaik *et al.*, 1997).

En otra especie como *Eucalyptus globulus*, Pinto *et al.* (2002) obtuvieron poco desarrollo de los callos al emplear esta combinación de reguladores del crecimiento (2,4-D/6-BAP). Por su parte Gogate y Nadguada (2003) emplearon el 2,4-D en combinación con estas dos citoquininas para formar callos y plantearon el desarrollo de la embriogénesis somática directa a partir de los explantes cuando utilizaban el 2,4-D con la kinetina.

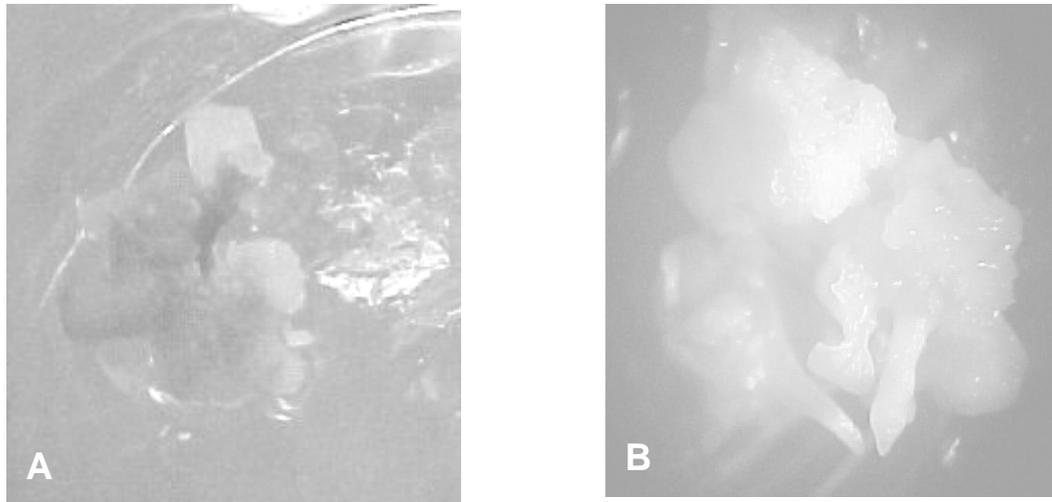


Figura 4. Desarrollo de la callogénesis en ápices del híbrido de papaya IBP 42-99, empleando 2,4 -D combinado con citoquininas a los 60 días de cultivo. A. 4 mg.l⁻¹ de 2,4-D combinado con 1 y 2 mg.l⁻¹ de 6-BAP. B. 4 mg.l⁻¹ de 2,4-D combinado con 0.5, 1, 1.5mg.l⁻¹ de Kinetina.

En especies como el algodón (*Gossypium barbadense*) el empleo de 2,4-D en combinación con la kinetina es capaz de desarrollar callos a partir de secciones de eje hipocotilo, los cuales al ser colocados en medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento fueron capaces de formar embriones somáticos en etapa globular (Kumria *et al.*, 2003).

4.1.1.3. Efecto del ANA en combinación con el 6-BAP

En el tratamiento uno se obtuvieron los mejores resultados con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos, donde el 91.6 % de explantes formaron callos (Tabla 8). Como se puede observar al sustituir el 2,4-D por ANA como auxina en el medio de cultivo, se lograron aumentar los porcentajes de

formación de callos a partir de estos explantes, así como un mayor desarrollo de los mismos (Figura 5).

Con las concentraciones más bajas de los reguladores del crecimiento se obtuvo un mayor crecimiento de los callos formados. Estos presentaron una coloración blanca y una apariencia grumosa; sin embargo, cuando se tomaron con el auxilio de la pinzas se comprobó que presentaban una consistencia suave y esponjosa, estos resultados difieren con Jordan y Velozo (1996) quienes obtuvieron callos en *Carica pubescens* (Lenné) a partir de brotes axilares al utilizar como reguladores del crecimiento ANA combinado con 6-BAP.

Tabla 8. Influencia de la combinación de ANA con 6-BAP en la formación de callos en el híbrido de papaya IBP 42-99 a partir de ápices de plantas *in vitro*.

| Tratamientos | ANA (mg.l⁻¹) | 6-BAP (mg.l⁻¹) | Explante con callo (%) | Formación de callos |
|---------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 0.3 | 1.5 | 91.6 a | ++++ |
| 2 | 0.5 | 2.5 | 83.3 b | +++ |
| 3 | 0.7 | 3.5 | 66.6 c | ++ |
| 4 | 0.9 | 4.5 | 41.6 d | ++ |
| 5 | 1.1 | 5.5 | 58.3 c | ++ |

+ 25% del explante cubierto por callo, ++ 50% del explante cubierto por callo, +++75% del explante cubierto por callo, ++++ 100% del explante cubierto por callo.

* Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$, según prueba de proporción.

Por su parte Arrieta-Espinoza (1996) emplearon láminas foliares para obtener callos en papaya y mencionan la formación de callos en el 100% de los explantes al utilizar el ANA solo o en combinación con 6-BAP.

Otros autores utilizan solamente ANA para formar callos con estructuras embriogénicas en papaya y para ello utilizan otro tipo de explante: ejes hipocotilos (Mauren y Fitch, 1993), pecíolos de hojas (Hossain *et al.*, 1993), informan los mejores resultados con las concentraciones más bajas del regulador de crecimiento.

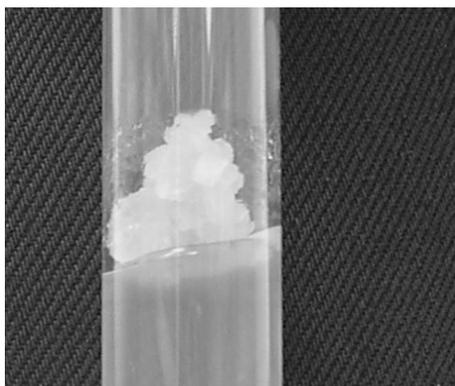


Figura 5. Callo formado a partir de ápices de plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99 en medio de cultivo Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con ANA y 6-BAP, a los 60 días de cultivo.

4.1.1.4. Efecto de AIA en combinación con 6-BAP

Se logró obtener callos compactos, secos y grumosos cuando se empleó AIA como auxina en el medio de cultivo combinado con 6-BAP. Como ocurrió en el experimento anterior con la concentración más baja de los reguladores del crecimiento se obtiene el mayor número de explantes que formaron callos, así como los callos de mayor tamaño (tabla 9).

Tabla 9. Influencia de la combinación de AIA con 6-BAP en la formación de callos en el híbrido de papaya IBP 42-99 a partir de ápices de plantas *in vitro* a los 60 días de cultivo.

| Tratamientos | AIA (mg.l ⁻¹) | 6-BAP (mg.l ⁻¹) | Explante con callo (%) | formación de callos |
|--------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------------|
| 1 | 1.5 | 1.5 | 83.3 a | ++++ |
| 2 | 2.5 | 2.5 | 75.0 ab | +++ |
| 3 | 3.5 | 3.5 | 66.4 b | +++ |
| 4 | 4.5 | 4.5 | 50.0 c | ++ |
| 5 | 5.5 | 5.5 | 43.5 c | ++ |

+ 25% del explante cubierto por callo, ++ 50% del explante cubierto por callo, +++75% del explante cubierto por callo, ++++ 100% del explante cubierto por callo.

* Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$, según prueba de proporción.

En los tratamientos uno y dos se lograron los mejores resultados sin diferencias estadísticas entre ellos, con 83.3 y 75 % respectivamente, siendo superiores significativamente a los demás tratamientos (Tabla 9). Esto podría deberse a los altos niveles de auxina endógenos en los ápices, teniendo en cuenta lo planteado por Vázquez y Torrez (1995) quienes plantean que la mayor producción y acumulación de auxina en las plantas ocurre en las células meristemáticas de los ápices.

Los callos presentaron una coloración parda clara y aunque el tamaño era menor que cuando se empleó como auxina ANA, presentaron una textura grumosa y una consistencia compacta (Figura 6 A). Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Jordan y Velozo (1996) quienes señalaron el desarrollo de callos a partir de

brotos axilares en *Carica pubescens* (Lenné et Koch), empleando como reguladores del crecimiento AIA combinado con 6-BAP.

En ensayos posteriores se usaron concentraciones menores de los reguladores del crecimiento aquí estudiados; sin embargo, no se logró obtener callos verdaderos, solo un engrosamiento y deformación de los explantes (figura 6 B).

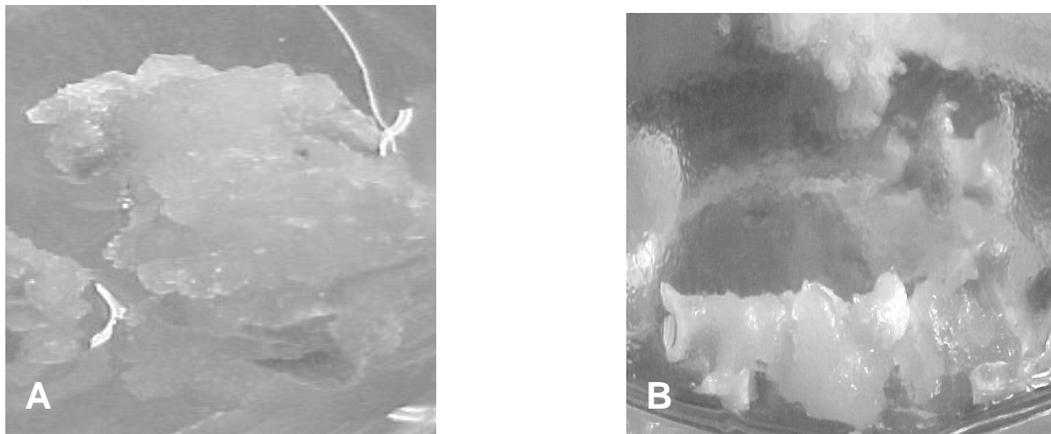


Figura 6. Calogénesis en ápices del híbrido de papaya IBP 42-99 a los 60 días de cultivo, cuando se empleó como reguladores del crecimiento (AIA y 6-BAP). **A.** Callo formado en medio de cultivo suplementado con 1.5 mg.l^{-1} de 6-BAP y 1.5 mg.l^{-1} de AIA. **B.** Malformación de los explantes al emplear bajas concentraciones de los reguladores de crecimiento.

La mayoría de los investigadores tanto en papaya como en otras especies no emplean AIA para formar callos u obtener embriones somáticos, las auxinas más utilizadas son 2,4-D y ANA. Sin embargo, sobre la base de los resultados obtenidos hasta el momento se puede concluir, que con el empleo del AIA combinado con 6-BAP se obtuvieron los callos con mejores características en cuanto a consistencia y aspectos morfológicos.

Al emplear ápices como explantes iniciales los callos a pesar de sus buenas características solamente se formaron en la zona inferior donde se les realizaba el corte. Además, al tomar el ápice prácticamente se desechaba la planta *in vitro*, pues con la manipulación se dañaban las yemas laterales que se encontraban en la parte inferior y de esta forma no podían ser utilizadas como explante para su posterior subcultivo.

4.1.2. Influencia del origen del explante en la respuesta callogénica.

Se logró formar callos a partir de segmentos de tallo en todos los tratamientos estudiados. Sin embargo, al utilizar como explantes los segmentos 1 (ápice de 5.0 mm de longitud al que se le eliminó el meristemo), 2 (5.0 mm a partir del ápice) y 4 (control) se lograron los mejores resultados, con diferencia significativa con respecto al segmento 3 (5.0 mm después del segmento 2) (Tabla 10). En este último segmento debe existir un mayor número de células diferenciadas que forman en muchos casos los tejidos conductores y en los segmentos anteriores ocurrió lo contrario pues son tejidos menos diferenciados.

Freire (2001) también utilizó segmentos de plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Sacharum* spp híbrido) para formar callos y logró los mayores porcentajes con los tejidos más cercanos al meristemo y lo atribuyó al grado de diferenciación.

Según Parrot (1993) el tipo, estado fisiológico y los niveles de diferenciación y polarización de los tejidos utilizados como explantes iniciales son algunos de los factores que favorecen o interfieren la formación de callos.

Tabla 10. Influencia de la zona del tallo de la planta *in vitro* en la formación de callos en el híbrido IBP 42-99 a los 60 días de cultivo.

| Tratamientos | Explante con callo (%) | Formación de callos |
|---|------------------------|---------------------|
| ápice de 5.0 mm sin meristemo (aprox. 2mm) | 96.6 a | ++++ |
| fragmento de 5.0 mm a partir del segmento 1 | 92.0 a | ++++ |
| fragmento de 5.0 mm después del segmento 2 | 71.0 b | +++ |
| Control (Ápice 5.0 mm) | 93.5 a | +++ |

+ 25% del explante cubierto por callo, ++ 50% del explante cubierto por callo, +++75% del explante cubierto por callo, ++++ 100% del explante cubierto por callo.

* Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$, según prueba de proporción.

Los resultados del presente trabajo coinciden con los alcanzados por Jordan y Velozo (1996) quienes obtuvieron los mayores porcentajes con los explantes más jóvenes, al utilizar para la formación de callos en *Carica pubescens*, secciones de brotes axilares de plantas cultivadas en invernadero.

En los primeros 10 días ocurrió un engrosamiento del tejido epidérmico del explante (figura 7 A), lo cual puede estar dado, teniendo en cuenta que es una planta dicotiledónea herbácea, por la formación de nuevas células a partir del tejido del anillo de cambium y células meristemáticas presentes en el mesófilo las cuales se encuentran en esta zona. Rodríguez *et al.* (1995) plantearon que los tejidos vegetales forman un callo a partir de las heridas como una reacción defensiva natural y en particular en las dicotiledoneas a partir de las células del anillo de cambium. Posteriormente debió ocurrir una ruptura del tejido de protección formado en la zona del corte y comenzó el crecimiento del callo.

En el tratamiento cuatro donde se utilizaron como explantes ápices completos, solo se formó callo en la parte basal de los mismos (Figura 7 B); sin embargo, los demás tratamientos a los cuales se les realizaron cortes por los dos extremos a los explantes se originaron callos en ambos extremos y posteriormente lo cubrieron completamente (Figura 7 C).

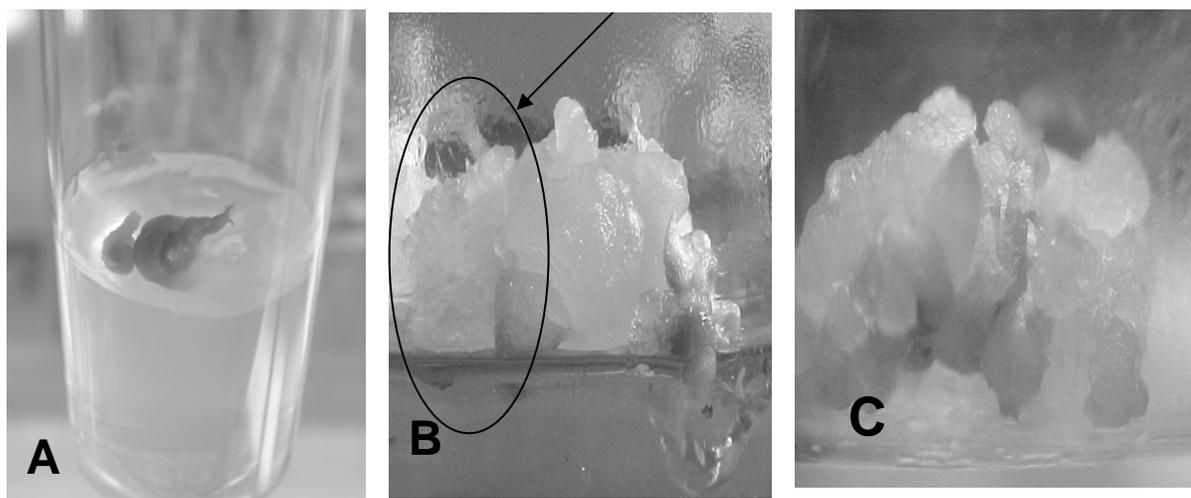


Figura 7. Callos formados a partir de secciones de tallo del híbrido de *C. papaya* en medio de cultivo Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con 1.5 mg.l^{-1} de AIA y 1.5 mg.l^{-1} de 6-BAP. **A.** Explante con 10 días en medio de cultivo de formación de callos con un ligero engrosamiento del tejido epidérmico. **B.** Callo formado a partir de un ápice a los 60 días de cultivo. **C.** Callo formado a partir de secciones de tallo a los 60 días de cultivo.

Hossain *et al.* (1993) obtuvieron callos a partir de pecíolos de hojas de papaya donde utilizaron 6-BAP combinado con ANA y lograron regenerar plantas de los mismos. Estos autores señalaron la formación de los callos a partir de los extremos del explante donde se les había realizado el corte, apoyando los resultados obtenidos en el presente trabajo.

4.2. Embriogénesis somática

4.2.1. Influencia de diferentes concentraciones de 2,4-D en la formación de embriones somáticos.

Al utilizar el 2,4-D en concentraciones entre 5 – 15 mg.l⁻¹ se alcanzó desarrollar la embriogénesis somática (Figura 8). Primeramente los callos tomaron una coloración parda más oscura y a las 6 semanas se observó la presencia de los embriones somáticos, los cuales se encontraban en etapa globular y tenían una coloración amarillo claro.

Con 5 y 10 mg.l⁻¹ de 2,4-D se obtuvieron los mejores resultados sin diferencias estadísticas entre ellos, pero significativamente superiores con el resto de los tratamientos (Tabla 11), otros autores emplean 2,4-D para obtener embriones somáticos en papaya variedad INIVIT 2000 a partir de embriones cigóticos y obtienen los mejores resultados con concentraciones de 4.7 mg.l⁻¹, similares a las del presente trabajo (Del Sol *et al.*, 2001).

Tabla 11. Formación de embriones somáticos del híbrido IBP 42-99 empleando diferentes concentraciones de 2,4-D a los 45 días de cultivo.

| Tratamientos | 2,4-D (mg.l ⁻¹) | Número de embriones somáticos/tratamientos | Callos con embriones somáticos. |
|--------------|--------------------------------|---|------------------------------------|
| 1 | 1 | 0 | 0 % |
| 2 | 5 | 122 a | 50 % |
| 3 | 10 | 107 ab | 52 % |
| 4 | 15 | 95 b | 48 % |
| EE | - | ± 8.2 | - |

*Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$, según prueba de rangos múltiples (LSD) en One-Way ANOVA.

Cuando se elevó la concentración del 2,4-D a 15 mg.l⁻¹ no existieron diferencias significativas en cuanto al número de callos que formaron embriones somáticos. Sin embargo, se observó que disminuyó significativamente el número de embriones por callos. Esto puede estar dado por los altos niveles de auxina, los cuales mantienen un mayor tiempo indiferenciadas las células del callo y siendo menor el proceso de formación de embriones somáticos, teniendo en cuenta lo planteado por Vázquez y Torres (1995) quienes aseguran que cuando se utilizan concentraciones altas de auxina a los tejidos meristemáticos, las células se mantiene en este estado de indiferenciación.

Lin *et al.* (1995) emplearon la combinación carbencillin (250 mg.l⁻¹) con 2,4-D (4mg.l⁻¹) para formar embriones somáticos a partir de callos transformados originados de raíces de plantas *in vitro* de papaya y le atribuyen la poca formación de embriones a una excesiva actividad auxinica ya que el carbencillin tiene una estructura funcional muy parecida a las auxinas 2,4-D y ANA.



Figura 8. Embriones somáticos en etapa globular del híbrido de papaya IBP 42-99 a los 45 días de cultivo, obtenida a partir de callos procedentes de secciones de tallo de plantas *in vitro*.

Con la concentración de 1 mg.l^{-1} de 2,4-D no se obtuvieron embriones somáticos, lo que evidencia que esta concentración de la auxina no es suficiente para inducir el proceso a partir de las células embriogénicas pre-determinadas, en los callos obtenidos a partir de secciones de tallo.

No existió diferencia significativa entre los tratamientos en cuanto al porcentaje de explantes que formaron embriones somáticos, cuando se utilizaron concentraciones del regulador de crecimiento entre 5 y 15 mg.l^{-1} . Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pires de Almeida *et al.* (2001) quienes al utilizar cuatro variedades de

papaya para desarrollar la embriogenesis somática, reportan entre 40 y 51% de callos con formación de embriones somáticos.

Como se ha observado con el aumento de las concentraciones del regulador del crecimiento, disminuyó el número de embriones somáticos a partir de los callos provenientes de los ápices (Tabla 11), esto debe estar dado, por que, las células de los callos al estar expuestas a una alta concentración de auxina, se mantienen en estado indiferenciado por un periodo mayor de tiempo y para que se desencadene el proceso de formación de embriones somáticos, debe ocurrir una cierta diferenciación de las células pre-determinadas embriogénicamente presentes en el callo. Vázquez y Torres (1995) plantean que la condición que se presenta en este fenómeno biológico sustenta el proceso de regulación del crecimiento en los vegetales

Estos resultados coinciden con los obtenidos por algunos autores como: Posada (1995) quien desarrolló la embriogénesis somática en la variedad Maradol roja a partir de embriones cigóticos inmaduros y utilizó concentraciones de 2,4-D similares a las del presente trabajo, e informa disminución del número de embriones somáticos al aumentar las concentraciones de la auxina superiores a 10 mg.l^{-1} . Por su parte Banerjee (2002) para obtener embriones somáticos de papaya empleó concentraciones de 2,4-D desde 2 hasta 25 mg.l^{-1} e informó que a partir de 15 mg.l^{-1} existió una disminución significativa en cuanto al número de embriones y al porcentaje de explantes con embriones.

Podemos concluir que con concentraciones de 5 mg.l^{-1} de 2,4-D se obtiene el mayor número de embriones somáticos por explantes y no existió diferencias significativas

en cuanto a los porcentajes de callos que formaron embriones somáticos con respecto a los demás tratamientos.

4.3. Multiplicación secundaria de los embriones somáticos

4.3.1. Influencia de diferentes concentraciones de 2,4-D

Con el empleo del 2,4-D en el medio de cultivo en diferentes concentraciones, se logró la embriogénesis secundaria o repetitiva en los embriones somáticos del híbrido de papaya IBP 42-99 (Tabla 12). Cuando se utilizaron 5 y 8 mg.l⁻¹ de 2,4-D se lograron los mayores porcentajes de embriones somáticos en etapa globular 98 y 100 % respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos, pero significativamente superior a cuando se utilizó 2 mg.l⁻¹. Cuando los niveles de auxina exógenos se elevan a un nivel, los embriones somáticos no pasan de la etapa globular, donde se detiene su desarrollo y forman embriones nuevos a partir de estos (Parrot, 2002).

Tabla 12. Efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el desarrollo de la embriogénesis secundaria en el híbrido de papaya IBP 42-99 a los 30 días de cultivo.

| Tratamientos | 2,4-D (mg.l⁻¹) | Embriones somáticos (#) | Embriones en etapa Globular. (%) |
|---------------------|--------------------------------------|--|---|
| 1 | 2 | 243.8 a | 91 b |
| 2 | 5 | 268.6 a | 98 a |
| 3 | 8 | 145.5 b | 100 a |
| EE | - | ± 10.2 | ± 0.88 |

*Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$, según prueba de rangos múltiples (LSD) en One-Way ANOVA.

Con el empleo de 2 mg.l⁻¹ existió un mayor porcentaje de diferenciación de los embriones somáticos y se observaron embriones con tendencia a germinar pues tomaron una coloración verde en su extremo superior (Figura. 9. A), esto debió estar dado por un rápido agotamiento del regulador de crecimiento en el medio de cultivo durante este período, al estar en una más baja concentración de la auxina que el resto de los tratamientos. Según Parrot (2002) los tejidos embriogénicos son capaces de formar embriones globulares aún cuando los niveles de auxina exógena disminuyen hasta cierto umbral, pero en ausencia de esta la histodiferenciación ocurre normalmente.

Al utilizar 8 mg.l⁻¹ de 2,4-D, primeramente se formó un callo a partir de los explantes y posteriormente se originaron los embriones somáticos sobre este (Figura 9 B). Esto provocó una disminución en cuanto a la multiplicación de los embriones somáticos, con respecto a los tratamientos 1 (2 mg.l⁻¹) y 2 (5 mg.l⁻¹) los cuales mostraron los

mejores resultados con un mayor número de embriones somáticos desarrollados a partir de los utilizados como explantes.

La embriogénesis somática o repetitiva es de mucha importancia en los programas de mejoramiento genético de especies vegetales y en especial el desarrollo de embriones somáticos en etapa globular, pues la cual es la etapa del proceso de histodiferenciación de los embriones somáticos adecuada para la transformación genética por biobalística (Más *et al.*, 2002). Se determinó que con la concentración de 5 mg.l^{-1} de 2,4-D se logró obtener los mejores resultados en cuanto a porcentajes de embriones somáticos en etapa globular, así como la mayor multiplicación de los mismos.

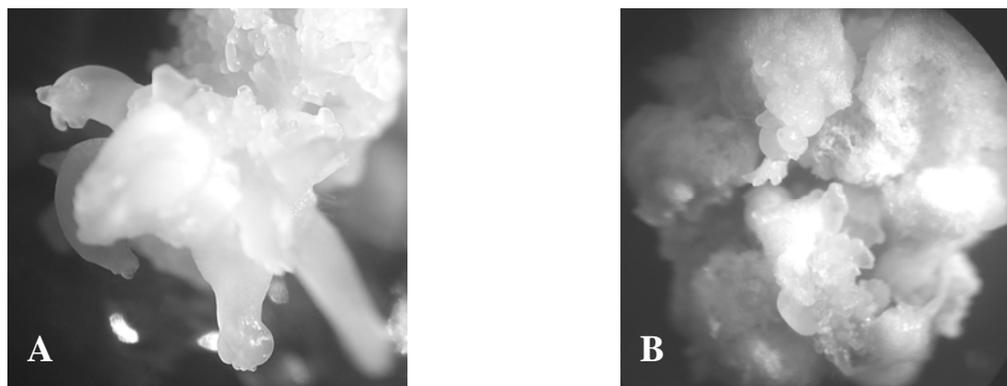


Figura 9. Embriogénesis secundaria a partir de embriones somáticos del híbrido IBP 42-99 a los 30 días de cultivo en medio de cultivo con la mitad de las sales MS suplementados con: **A** - 2 mg.l^{-1} de 2,4 - D. **B** - 8 mg.l^{-1} de 2,4 - D.

4.4. Germinación de los embriones somáticos

4.4.1. Efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP

Se logró la germinación de los embriones somáticos del híbrido de papaya en todos los tratamientos estudiados, siendo significativamente superior cuando se utilizaron reguladores del crecimiento (Tabla 13). Parrot (2002) planteó que la germinación de los embriones somáticos en angiospermas puede ocurrir sin la presencia de reguladores del crecimiento exógenos. Sin embargo, en los tratamientos donde se utilizó citoquinina, el porcentaje de germinación fue significativamente superior.

Tabla 13. Efecto del empleo de citoquinina (6-BAP) en la germinación de embriones somáticos del híbrido de papaya IBP 42-99 a los 60 días de cultivo.

| Tratamientos | Concentración 6-BAP | Germinación (%) | Plantas malformadas (%) |
|--------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|
| 1 | 0 mg.l ⁻¹ | 42 c | 35 c |
| 2 | 0.15 mg.l ⁻¹ | 100 a | 2 a |
| 3 | 0.30 mg.l ⁻¹ | 100 a | 6 ab |
| 4 | 0.45 mg.l ⁻¹ | 92 b | 10 b |

* Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0.05$, según prueba de proporción (STATISTIX ver 2.0).

Cuando se utilizaron concentraciones de 0.15 y 0.30 mg.l⁻¹ de 6-BAP no existieron diferencia significativa y se alcanzaron 100 % de germinación y solamente 2 y 6 % de plantas malformadas, respectivamente. Estos resultados coinciden con Posada (1995) quien utilizó dos citoquininas para la germinación de embriones somáticos de

papaya e informó los mejores resultados con la concentración más baja de 6-BAP (0.22 mg.l⁻¹)

Al aumentar la concentración de 6-BAP a 0.45 mg.l⁻¹, el porcentaje de germinación disminuye significativamente hasta 92% (Tabla 13), lo que evidenció que para la germinación de los embriones somáticos de papaya de este híbrido no se requieren de altas concentraciones de las citoquininas.

Cuando se utilizó el medio de cultivo libre de regulador del crecimiento, solo germinó el 42% de los embriones somáticos. Por otra parte los embriones demoraron más en germinar y el porcentaje de plantas malformadas fue superior significativamente. Chen *et al.*, (1991) utilizaron el medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento para la germinación de embriones somáticos de un híbrido (*C papaya* X *C cauliflora*), y obtuvieron un 20 % de germinación, resultado inferior a los obtenido en el presente trabajo.

Al evaluar los diferentes tratamientos pasado un mes de ser colocados los embriones somáticos en medio de cultivo de germinación, se observó que en el tratamiento donde no se utilizó reguladores del crecimiento se desarrollaron una estructuras alargadas parecidas a raíces y una ligera coloración verde en las hojas cotiledonales (Figura 10 A). Cuando se empleó 0.15 mg.l⁻¹ de 6-BAP se observó un alargamiento del tallo (eje hipocotilo) y el desarrollo del primer par de hojas verdaderas muy pequeñas (Figura 10 B), esto puede estar dado teniendo en cuenta los niveles endógenos de auxina, que al emplear baja concentración de la citoquinina la relación auxina/citoquinina se favorece para la primera y esto provoca el alargamiento celular.

Según Vázquez y Torres (1995) cuando el balance auxina/citoquinina esta por encima de uno favorece el alargamiento y la división celular.

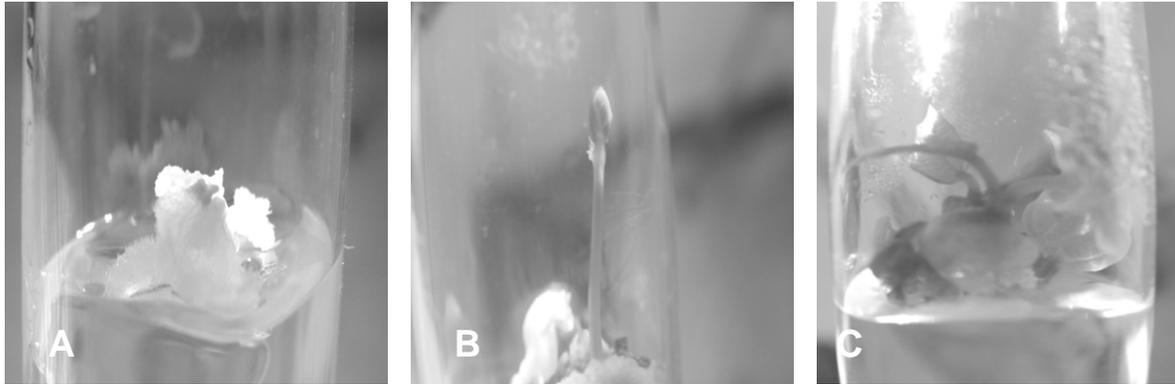


Figura 10. Embriones somáticos del híbrido IBP 42-99 pasado un mes de colocados en medio de cultivo de germinación. **A.** embrión germinando en medio de cultivo sin regulador del crecimiento. **B.** Plántula desarrollada en medio de cultivo con 0.15 mg.l^{-1} 6-BAP. **C.** Plántula obtenida en medio de cultivo con 0.30 mg.l^{-1} de 6-BAP.

En las concentraciones de 0.30 y 0.45 mg.l^{-1} el comportamiento fue similar entre ellos y diferente con respecto al tratamiento uno y dos en cuanto a los diferentes factores evaluados. Existió un escaso crecimiento del tallo pero el desarrollo de las hojas fue mayor, donde para esta etapa ya las plantas *in vitro* presentaban hasta tres hojas verdaderas bien formadas (Figura 10 C). Esto debe estar dado porque en estos tratamientos al existir una concentración de 6-BAP más elevada, el balance esta favorecido para la citoquinina.

Para completar y lograr el desarrollo de plantas bien formadas se les realizó a los explantes un segundo subcultivo en el mismo medio de cultivo y al evaluar los resultados se comprobó de forma general un aumento en los porcentajes de

germinación, además de un mayor desarrollo de las plantas *in vitro* ya formadas. Durante este período en el tratamiento uno se evidenció un mayor desarrollo de las estructuras formadas y se elongaron ligeramente las plantas *in vitro* las cuales habían formado pequeñas hojas, pero sin mucho desarrollo del tallo (Figura 11 A).

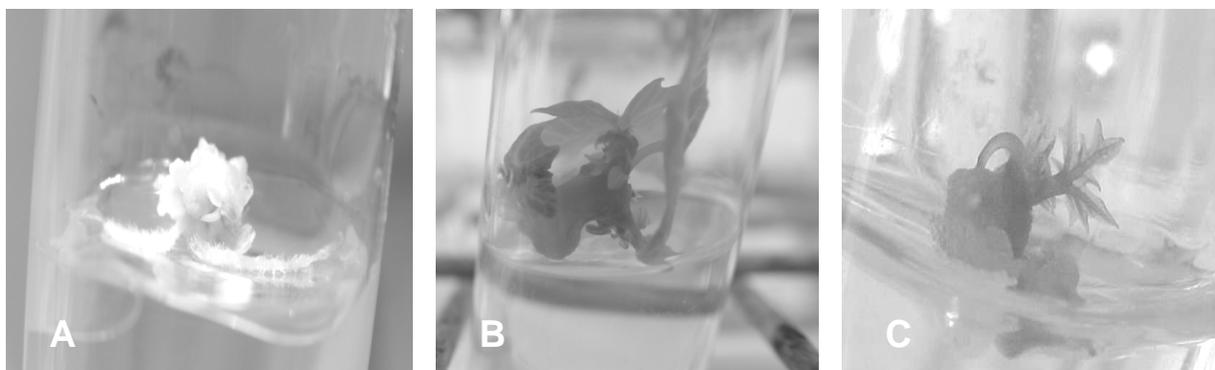


Figura 11. Embriones somáticos del híbrido IBP 42-99 después del segundo subcultivo (60 días) en medio de cultivo de germinación. **A.** embrión germinando en medio de cultivo sin regulador del crecimiento. **B.** Plántula bien desarrollada en medio de cultivo con 0.15 mg.l^{-1} 6-BAP. **C.** Plántula obtenida en medio de cultivo con 0.30 mg.l^{-1} de 6-BAP.

En los tratamientos dos, tres y cuatro las plantas *in vitro* se desarrollaron completamente formando varias hojas verdaderas bien formadas (Figura 11 B C), por lo que se tomó el tratamiento dos como el de mejores resultados ya que es donde se utilizó la menor concentración del regulador de crecimiento.

Debido a que en esta especie la germinación de los embriones somáticos ocurre de forma Parcial (Posada, 1995), fue necesario utilizar un medio de cultivo para elongar las plantas *in vitro* y posteriormente que las mismas enraizaran.

Crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro*.

Las plantas *in vitro* bien formadas obtenidas a partir de la germinación de los embriones somáticos, al ser colocadas en medio de cultivo de elongación presentaron una consistencia robusta y como promedio cuatro pares de hojas (Figura 12. A). Por otra parte existió un desarrolló de las yemas laterales, lo que debió estar dado por la pérdida de la dominancia apical, por ambos subcultivos en medio de cultivo de germinación con citoquininas. Se logró el enraizamiento de las plantas *in vitro*, al ser colocadas en el medio de cultivo de enraizamiento propuesto por Posada (1995). Las raíces presentaron una coloración blanca y alcanzaron una longitud de 5 cm como promedio, Además, presentaban una amplia ramificación de raíces secundarias (Figura 12, B). Debido a las características de esta fase donde se colocan los explantes 10 días en medio de cultivo con auxina (AIB) y luego se subcultivan a medio de cultivo sin regulador de crecimiento por un período de 30 días, le permitió a las plantas *in vitro* que alcanzaran un mayor tamaño.

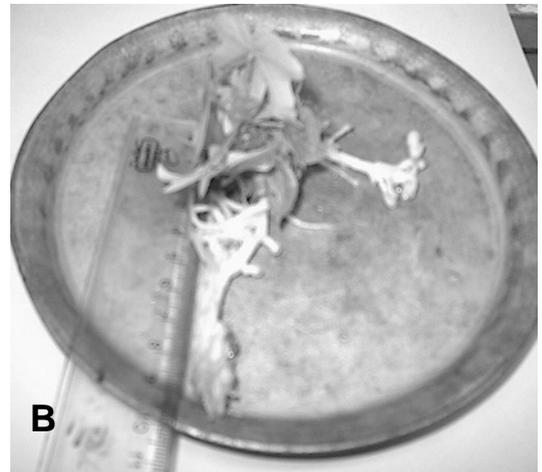


Figura 12: Plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99 obtenidas a partir de embriones somáticos. **A.** Plantas *in vitro* con 30 días en medio de cultivo de crecimiento. **B.** Planta *in vitro* enraizada.

5. CONCLUSIONES.

1. Fue posible lograr la formación de callos a partir secciones de tallo de plantas *in vitro* del híbrido de papaya, con el empleo del medio de cultivo Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con 1.5 mg.l^{-1} de AIA y 1.5 mg.l^{-1} de 6-BAP.
2. Se logró obtener una embriogénesis somática de alta frecuencia a partir de los callos obtenidos de secciones de tallo, al emplear el medio de cultivo compuesto por la mitad de las sales MS suplementadas con 5.0 mg.l^{-1} de 2,4-D.
3. Se alcanzó el mayor número de embriones somáticos en etapa globular durante la embriogénesis secundaria o repetitiva al emplear como medio de cultivo la $\frac{1}{2}$ de las sales MS suplementadas con 5 mg.l^{-1} de 2,4-D.
4. Se logró 100% de germinación de los embriones somáticos y disminuir al 2% el número de plantas *in vitro* con malformación al emplear 0.15 mg.l^{-1} de 6-BAP.

6. RECOMENDACIONES.

1. Emplear esta metodología de trabajo para apoyar el programa de mejoramiento genético por transformación genética vía biobalística del híbrido de papaya IBP 42-99.
2. Continuar los estudios del comportamiento de las plantas obtenidas en fase de aclimatización y campo.

Referencias Bibliográficas

Bibliografía.

1. Arocha, Y, Horta D y Roque A (2002) Detección de diferentes patógenos en plantas de papaya con sintomatología compleja en Cuba. I Simposio Internacional sobre Vigilancia Fitosanitaria y su relación con la Protección del entorno. Palacio de las Convenciones de La Habana. Cuba.
2. Abdelmalek, M y Francine M (1999) Effects of sealed and vented gaseous microenvironments on the maturation of somatic embryos of black spruce with a special emphasis on ethylene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 201-209.
3. Acuña, L E (2005) El cultivo de Mamón (*Carica papaya*) [en línea] En: <http://www.inta.gov.ar/montecarlo/info/documentos/alternativos/cultivo_mamon.pdf> [consulta: 6 de Diciembre 2005]
4. Agramonte, D, Pérez JN, Pérez M y Pérez A (1993) Empleo del hipoclorito de sodio (NaOCl) en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. *Centro Agrícola* 2: 88-89.
5. Agronegocios (2005) Guía técnica del cultivo de “papaya”) [en línea] En: <<http://www.agronegocios.gob.sv/comoproducir/guias/papaya.pdf>> [consulta: 8 de Diciembre 2005]
6. Alemanno, L, Berthouly M y Michaux-Ferriere N A (1996) Histology of somatic embryogenesis from floral tissues of cocoa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46:187-194.
7. Alemanno, L, Berthouly M y Michaux-Ferreiere N (1997) Embryogenese somatique du cacaoya a partir de pieces florales. *Plantation Recherche. Developpment* 3 (4) : 225-237.

8. Arrieta-Espinosa, G (1996) Embriogénesis somática *in vitro* a partir de láminas foliares de papaya (*Carica papaya* L.) provenientes de la multiplicación clonal con yemas axilares de plantas adultas y de plántulas germinadas *in vitro*. Tesis. Mag. Sc. Universidad de Costa Rica. Costa Rica
9. Attree, S y Fowke L (1993) Embryogeny of Gymnosperms: Advances in Synthetic Seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 35:1-35,
10. Banerjee, J (2002) Tissue culture and transformation studies in indian cultivars of papaya (*Carica papaya* L.) Tesis presentada en opción del grado científico de doctor de fisiología botánica. Universidad de pune. India.
11. Barbón, R (2001) Efecto del dióxido de carbono sobre la embriogénesis somática de *Coffea arabica* cv Caturra Rojo y *Clematis Tangutica* K. Tesis en opción al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. IBP. UCLV. Cuba.
12. Berdasco, M, Diego L B, Rodríguez R, Fraga M F y Cañal M J (2002) Marcadores epigenéticos de interés en procesos agroalimentarios. Resúmenes VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. IBP. Cuba. 25-31.
13. Botanical-online (2005) Papayas [en línea] En: <<http://www.botanical-online.com/papayas.htm>> [consulta: 6 de Diciembre 2005].
14. Brar, D S, Khush G S (1994) Cell and tissue culture for plant improvement. En: Basra, A(ed) Mechanisms of plant growth and improved productivity: Modern approaches New York: Marcel Dekker pp: 229-278.

15. Brawn, D C W, Finstad K I y Watson E M (1995) Somatic embriogénesis in Herbaceous Dicots. En: Thorpe TA. Ed. In vitro embryogenesis in plant. London: Kluwer. Academic Publishers pp: 345 – 415.
16. Cabrera, F A (1990) Medios de cultivo para la micropropagación de la caña de azúcar (*Sacharum spp.* Híbrido) y pasto (*Brachiaria brizanta*). Trabajo de diploma. UCLV. Santa Clara. Cuba.
17. Cabrera-Ponce J L, Vegas-García A y Herrera-Estrella L (1995). Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. Plant cell Reports 15: 1-7.
18. Cabrera-Ponce J L, Vegas-García A y Herrera-Estrella L (1996) Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. In vitro Cell. Dev. Biol-Plant 32: 86-90.
19. Canhoto, J M, López M L y Cruz G S (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L). Plant Cell Tiss. Org. cult 57: 13-21.
20. Canhoto, J M y Cruz G S (1996) Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). Protoplasma. 191: 34 - 45.
21. Cai, W, Gonsalves C, Tennant P, Fermin G, Souza M, Sarindu N, Jan FJ, Zhu HY y Gonsalves D (1999) A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant 35: 61-69.
22. Castillo, B, Smith M A L y Yadava U L 1998 Liquid system scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. Journal of Horticultural Science y Biotechnology. 73 (3):307-311.

23. Castillo, B, Smith M A L y Yadava U L (1998) Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. Plant Cell Reports 17: 172-176.
24. Caro, Y y Villeneuve P (2000) Investigation of crude latex from various *Carica papaya* varieties for lipid bioconversions. Journal of the American Oil Chemists' Society. Laboratoire de Lipotechnie, CIRAD/AMIS, Montpellier, Francia. 77(8): 891-901.
25. Chen, M H, Chen C L, Wang D N y Chen F C (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* y *Carica cauliflora* culture *in vitro*. Can. J. Bot. 69: 1913 – 1918.
26. Chong, B (2003) Nueva metodología para el establecimiento de suspensiones celulares de banano cultivar “Gran enano” (*Musa AAA*). Tesis en opción al grado académico de magíster Scientiae. IBP. UCLV. Cuba.
27. Collado, R, Barbón R, Agramante D, Jiménez F, Pérez M y Gutiérrez O (2004). Germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* en medios de cultivo semisólidos. Biotecnología vegetal. Vol 4 (4): 201-205.
28. Cruz, G S, Canhoto J M y Abreu M (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. Plant Science 66: 263-270.
29. Del Sol, L, García M, Gálvez D, Rodríguez S, Torres Y, Medero V, López J, Ventura J, Cabrera M, Rodríguez S, Álvarez M, Bauta M y García J (2001) Efficient plant regeneration from somatic embryogenesis in papaya Cv. INIVIT - 2000. Biotecnología vegetal y Agricultura sostenible Resúmenes evento, 133 - 215.

30. Daniels, D (2003) Desarrollo de la embryogenesis somática y su empleo en la transformación genética por biobalística en el cultivar híbrido "FHIA-21" (*Musa sp* AAAB). Tesis de Doctorado. IBP. UCLV. Santa Clara. Cuba.
31. Elder, R J y Macleod W N B (2000) Growth, yield and phenology of 2 hybrid papayas (*Carica papaya* L.) as influenced by method of water application. Australian Journal of Experimental Agriculture. Department of Primary Industries, Rockhampton, QLD, Australia 40(5): 739-746.
32. Escalant, J y Teisson C (1989) Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. Plant Cell Report. 7: 665-668.
33. Evans, D, Sharp W y Flick C (1981) Growth and behaviour of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: Plants tissue Culture: methods and applications in agriculture. By Thorpe, T. New York, Academic press. Pp: 45-113.
34. FAO (2004) El cultivo de la papaya (*Carica papaya*) [en línea] En: <<http://www.fao.org/newsroom/es/news/2004/41714/index.html>> [consulta: 6 de Diciembre 2005].
35. Fujit, S D, Olsen R, Ruzin S y Redenbough K (1990) Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. Plant Science 72: 93-97.
36. Fernando, J A, Melo M, Soares M K M y Appezzato-da-Glória B (2001) Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. Braz. arch. biol. technol. vol.44 no.3.

37. Fitch, M M (1993) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 205 – 212.
38. Freire, M (2001) Nueva metodología de la embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido var 87-51.) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis de Doctorado. IBP. UCLV. Santa Clara. Cuba.
39. Gallardo, J, Gómez R, Posada L, Reyes M, Chong B, Ocaña B, Herrera I y Freire M (2003) Transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* en papaya a partir de ápices. En: Memorias en CD del congreso internacional de Biotecnología Agrícola (BIOVEG 2003). Ciego de Ávila. Cuba.
40. Gendy, C, Sene M, Van Le B, Vidal J y Tran Thanh Van K (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sorgum bicolor* (L) Moench. *Plant Cell Rep* 15: 900-904.
41. Gogate, S S y Nadgauda R S (2003) Direct induction of somatic embryogenesis from immature zygotic embryo of cashewnut (*Anacardium occidentale* L.). *Scientia horticultrae*. 97: 75-82.
42. Gómez, R K (1997) Curso teórico-práctico de propagación masiva de plantas. Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Cuba.
43. González-Benito, M E, Frota-CHagas J M y Pérez C (1997) Somatic embryogenesis of an early cotton cultivar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 32:485-488.
44. González, G, Alemán S, Barredo F y Robert M L (2002) Embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem. *Biotecnología vegetal*. Vol. 2: 3–8.

45. Gray, D J (1995) Somatic embryogenesis in grape. In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. (eds.), Somatic embryogenesis in woody plants, Angiosperms. Dordrecht, Kluwer Academic Pub., v.2, p.191- 217.
46. Guerra, M P, Pescador R, Dal Vesco L L, Nodari R O y Ducroquet J P (1997) *In vitro* morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: Somatic embryogenesis and plant regeneration. Acta Horticulturae, 452:27-36.
47. Guerra, M P, Dal Vesco L L, Ducroquet J P, Nodari R O y Dos Reis M S (2001) Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: Genotype response, auxinic shock and syntetic seeds. Rev. Bras. Fisiol. Veg. vol.13 no.2.
48. Herrera-Estrella, L, Depicker A, Van Moontagu M y Schell J (1983) Expresión of chimeric genes transferid into plant cell using a tiplasmid derived vector. Nature. Pp: 209-303.
49. Hossain, M, Rahman S M, Islam R y Joarder O I (1993) High efficiency plant regeneration from petiole explant of *Carica papaya* L through organogenesis. Plant Cell Report 13:99-102.
50. InfoAgro (2002) cultivo de la papaya [en linea] En: <http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/papaya.htm>[consulta: 2 de Diciembre 2005]
51. Jiménez, E (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez Ponce J. edt Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Cuba pp: 45 – 56.
52. Jordan, M y Velozo J (1996) Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 44: 189-194.

53. Khan, S A y Iqbal J (2000) Polyclonal-antibody-mediated insolubilization and stabilization of papain. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. Department of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Aligarh Muslim University. India. 32(2): 89-94.
54. Kitto, S L (1997) Commercial micropropagation. *Hort. Science*. Vol. 32(6):310-325.
55. Komamine, A, Mogrisk T M y Fujimura T (1982) Metabolism in synchronous growth and differentiation in plant tissue and cell cultures. En: *Frontiers of plant tissue culture*. Thorpe, T A. (ed). Calgary, Canadá. Pp: 156-168.
56. Krishnaraj, S y Vasil I K (1995) Somatic embryogenesis in Herbaceous monocots. En: Thorpe TA. Ed. *In vitro embryogenesis in plant*. London: Kluwer. Academic Publishers pp: 417 – 470.
57. Kumria, R, Sunnichan G, Das D K, Gupta S K, Reddy V S, Bhatnagar R K y Leelavathi S (2003) High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. *Plant Cell Rep*, 21: 635-639.
58. Lai, C C y Yeh S D (2000) Enhancement of papaya axillary shoot proliferation in vitro by controlling the available ethylene. *Botanical Bulletin of Academia Sinica Taipei*. Department of Botany, National Chung-Hsing University, Taiwan 41(3): 203-212.
59. Li, XY y Huang FH (1996) Induction of somatic embriogénesis in loblolly pine (*Pinus toeda* L). *In vitro Cell. Dev. Boil-Plant* 32:129-135.

60. Lin, J J, Assad-García N y Kou J (1995) Plant hormona effect of antibiotic on the transformation efficiency of plant tissue by *A. tumefaciens* Cell. Plant Sci. 109: 171-177.
61. LoSchinvo, F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Rochi V, Vergara R, Orselli y Terzi M (1989) DNA methylation of embryonic carrot cell culture and its variation as caused by mutation, differentiation, hormona and pomethylating drugs. Theor. Appl. Genet. 77: 325.
62. Mahan, R E, Bateson M F, Chamberlain D A, Higgins C M, Drew R A y Dale J L (1996) Transformation of an Australian variety of *Carica papaya* L. using microprojectile bombardment. Aust. Plant Physiol 23: 679-685.
63. Manshardt, R y Wenslaff T (1989) Zygotic polyembryony in interspecific hybrids of *Carica papaya* y *C. cauliflora*. Amer Soc Sci. 114: 684 – 689.
64. Mas, L, Chong B, Gómez R, Gallardo J, Herrera I y Reyes M (2002) Expresión transitoria de la β -glucoronidasa en papaya empleando una pistola de genes de baja presión. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Resúmenes del evento. p: 35.
65. Maureen, M, Fitch M y Manshardt E (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L). Plant Cell Reports 9: 320-324
66. Mauren, M y Fitch M (1993) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. Plant cell Tissue and Organ Culture 32: 205 – 212.

67. Merkle, SA, Parrot WA y Flinn BS (1995) Morphogenetic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA. Ed. In vitro embryogenesis in plant. London: Kluwer. Academic Publishers pp: 155 – 203.
68. Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 437-497.
69. Nash, D T y Devies M E (1972) Some aspects of growth and metabolism of paul's Scarlet rose cell suspensions. *J. Exp. Bot.* 23: 75-91.
70. Nitsch, J P y Nitsch C (1969) Haploid plant from pollen grains. *Science* 169: 85-93.
71. Otero (2003) Maradol Roja certificada [en línea] EN: <<http://www.semilladelcaribe.com.mx/paginas/tecno.htm>> [consulta: 8 diciembre 2005].
72. Parrot, W (1993) Cell culture techniques. En: Proceedings of the workshop on biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunion INIBAP (1992, San José, Costa Rica) Montpellier, France. Pp: 183-191.
73. Parrot, W (2002) La embryogenesis somática en las angiospermas. Resúmenes. VI Simposio Internacional en Biotecnología Vegetal. IBP. Cuba. 7-15.
74. Patnaik, J, Sahoo S y Debata BK (1997) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension culture of palmarosa grass (*Cymbopogon martinii*). *Plant Cell Rep* 16: 430-434.
75. Peña, H, Días J A y Martínez T (1996) Fruticultura tropical. Ed. Felix Varela. Pp:131-196.

76. Pestano, B (2001) El cultivo de la papaya [en línea] En: <<http://www.gacicuba.net/Pestano6.htm>> [consulta: 6 diciembre 2005].
77. Pinto, G, Santos C, Neves L y Araújo C (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. Plant Cell Rep 21: 208-213.
78. Pires de Almeida, E, Pedroso de Oliveira R y Loyola Dantas J L (2001) Inducao e desenvolvimento de calos e embrioes somáticos em mamoeiro. Sci. Agric. Vol 58 N.1.
79. Pons, M (2001) Transformación genética de papaya (*Carica papaya* L.) mediante biobalística. Tesis en opción al grado academico de magíster Scientiae. IBP. UCLV. Cuba.
80. Posada, L (1995) Desarrollo de la embriogénesis somática en la fruta bomba (*Carica papaya* L). Trabajo de Diploma. UCLV. Santa Clara. Cuba.
81. Posada L, Gómez R, Reyes M, Herrera I y Norman O (2002). Obtención e implantación de *in vitro* de un nuevo híbrido de papaya (*Carica papaya* L). VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Resúmenes del evento. p:84
82. Preece, J E, Mcgranahan, G H, Long, L M y Leslie, C A (1995) Somatic embryogenesis in walnut (*Juglans regia*). In: Jain, S M, Gupta P K y Newton R J (eds.), Somatic embryogenesis in woody plants, Angiosperms. Dordrecht, Kluwer Academic Pub. v.2 p. 99-116.
83. PROEXANT (2005) El cultivo de la papaya (*Carica papaya* L) [en línea] EN: <<http://www.proexant.org.ec/Manual%20de%20papaya.htm>> [consulta: 6 diciembre 2005].

84. Quiala, E (2000) Encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Sacharum spp* híbrido). Tesis en opción al grado académico de magíster Scientiae. IBP. UCLV. Cuba.
85. Raemaker, E, Jacobsen E y Visser R (1995) Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphitica* 81: 93-107.
86. Rattanapanone, N y Chongsawat C (2000) Fresh-cut fruits in Thailand. Hortscience. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Thailand. 35(4): 543-546.
87. Ramkhelawan, E y Baksh N (1999) Propagation of papaya (*Carica papaya* L.) by in vivo methods in Trinidad. Tropical Agriculture. Central Experiment Station, Ministry of Agriculture, Land and Marine Resources, Trinidad and Tobago. April 76(2): 126-130.
88. Redembaugh, H (1986) Analogs of botanic seeds. United states Patent. 4: 562-568.
89. Reinert, J (1958) Uber die konholle der morphogenesis und die induction von adventiven bryomen und gewebeulturen aus kastofel. *Planta* 58: 318-333.
90. Roca, M W (1991) Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. En: Roca, M W y Mogriski, LA (eds) Cali. Colombia. CIAT. 970 p.
91. Rodríguez, C, Pérez Ponce J y Fuchs A (1995) Mejora de plantas. Eds Félix Varela. Habana.
92. Ronse, D L P y Smets E F (1999) The floral development and anatomy of *Carica papaya* (*Caricaceae*). Canadian Journal of Botany. Laboratory of Plant Systematics, Botanical Institute, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. April 77(4): 582-598.

93. Salomao, A N y Mundim R C (2000) Germination of papaya seed in response to desiccation, exposure to subzero temperatures, and gibberellic acid. Hortscience. Embrapa-Recursos Geneticos e Biotecnologia, Brasilia, Brazil 35(5): 904-906.
94. Schoof, H (1997) The original of embryogenic cell in musa. Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium. P: 257.
95. Senaratha, t, Makersie B y Bowler S (1990) Artificial seeds of alfalfa *medicago sativa* L. induction of desiccation tolerance in somatic embryos. In vitro Cell Dev. Biol. 3: 16-85.
96. Sierra, S (2003) Cultivo de papayo [en línea] En: <<http://www.infojardin.com/Frutas/fichas/papayos-cultivo-papayo.htm>> [consulta: 6 de Diciembre 2005].
97. Sharp, W, Evens D, Ammirato P y Yamada Y (1983) Plant Cell and Tissue culture. Principles and Applications. Ohio State University.Press. p: 892.
98. Shu, W y Loh C S (1991) Secondary embryogenesis from thin cell layers of *Brassica ssp. Olifera*. New phytol. 119: 427 – 432.
99. Steward, FC, Mapes MO y Smith J (1958) Growth and organized development of culture cells. American journal of Botany 45: 693-704.
100. Vasil, I K (1987) Developing cell and tissue culture systems for the Improvement of cereal and gross crops. Journal of Plant Physiology 128. 193 – 218.

101. Vasil, I K (1994) Automatic in plantpropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 39 (2): 105-108.
102. Vázquez E y Torrez S (1995) *Fisiología Vegetal*. Ed: Pueblo y educación. Ciudad de la habana. Cuba p:451.
103. Vegas, A, Trujillo G, Sandrea Y y Mata J (2003) Obtención, regeneración y evaluación de híbridos intergenéricos entre *Carica papaya* y *Vasconcellea cauliflora*. *INTERCIENCIA*, Vol. 28 N° 12: 710 – 714.
104. Villalobos, V y Thorpe T (1991) Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca W.M., Mroginski L.A. (Eds) *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, pp. 127-141. CIAT, Colombia.
105. Vilches, J (2001) Embriogénesis somática y regeneración de plantas en el guayabo (*Psidium guajava*) L. cv. Enana roja. Tesis en opción al grado académico de magíster Scientiae. IBP. UCLV. Cuba.
106. Wann, S R (1988) *Horticultural Reviws*. 10: 153-181.
107. Yang, J S (2001) Papaya somatic embryo induction from fruit-brearin field plants: Effects of root supporting material and position of the root explants. *ISHS Acta Horticulturae* 560: IV International Symposium on *In vitro* Culture and Horticultural Breeding.
108. Yemets, A I, Klimkina L A, Tarassenko L V y Blume Y B (2003) Efficient callus formation and plant regeneration of goosegrass (*Eleusine indica* L.) Gaertn. *Plant Cell Rep*. 21: 503-510.

109. Yu, T A, Yeh S D y Yang J S (2001) Effect of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. Bot. Bull. Acad. Sin 42: 281-286.
110. Zhu, YJ, Agbayani P y Moore H (2004) Green Fluorescent protein as a visual selection marker for papaya (*Carica papaya* L) transformation. Plant Cell Rep. 22: 660-667.