



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LAS PLANTAS



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



*Estandarización de un protocolo para la Embriogenesis
Somática de Carica papaya L. var. Maradol Rojo*

Autor: Lic. Alexis Maria Rodríguez Concepción

Tutor: Dr. Rafael Gómez Kosky

Santa Clara

2008



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LAS PLANTAS



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

*Estandarización de un protocolo para la Embriogenesis
Somática para la Papaya Carica papaya L. var. Maradol Rojo*

Autor: Lic. Alexis Maria Rodríguez Concepción

Tutor: Dr. Rafael Gómez Kosky

Santa Clara

2008

Pensamiento

“... El trabajo ha sido el gran maestro de la humanidad,
el gran propulsor de la humanidad...”.

“... No hay satisfacción mayor que aquel trabajo que nos
permite sentir seguridad de lo que se ha hecho y
que lo que se ha creado podrá ser preservado...”.

Fidel Castro Ruz

Dedicatoria.

✚ A mis niños.

✚ A mi esposo, padres, hermanos, y demás familiares por su ayuda en el transcurso de mi vida.

✚ A todos mis amigos, profesores, técnicos e investigadores que dedicaron parte de su tiempo a mi formación profesional.

Agradecimientos

Me resulta muy difícil en pocas líneas expresar el agradecimiento que siento por todos que de una forma u otra han contribuido a mi formación, desde las edades más tempranas hasta estos días, a todos sin excepción mi eterno y sincero agradecimiento.

- ✚ En especial a mis niños Yilian y Sadiel, quienes me han dado siempre el motivo de vivir y luchar a pesar de las dificultades, y a quienes pretendo servirle de ejemplo para toda la vida.
- ✚ A mis padres por sus ejemplos y valores que han creado en mí durante toda mi vida.
- ✚ A mi tutor Dr. Rafael Gómez Koski por su gran ayuda y dedicación en el resultado de este trabajo.
- ✚ A todos los investigadores, técnicos y trabajadores del IBP por su apoyo incondicional durante toda la maestría y su aporte a mi formación profesional.
- ✚ A la Revolución Socialista Cubana en especial a nuestro Comandante en Jefe Fidel Castro Ruz y a todos los que con sus esfuerzos permiten que como yo, muchos realicen sus sueños.

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar un protocolo para la obtención de plantas de *Carica papaya* L. variedad Maradol rojo a partir de embriones cigóticos inmaduros como una vía alternativa para la propagación masiva de esta especie. Se evaluó la influencia de la época del año y del tipo de frasco de cultivo en la formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos. Se determinó la concentración mas adecuada de 2,4 D (2, 5 y 10 mg.l⁻¹) y el efecto del número de explante por frasco cultivo en la multiplicación de los embriones somáticos. En la germinación se evaluó la influencia del tipo de frasco de cultivo y en condiciones de casa de cultivo se evaluó el tipo de cobertor, la influencia de la altura y el tipo de raíz de las plantas de papaya procedentes de embriogénesis somática. Los resultados obtenidos permitieron definir que la época del año para la colecta de los frutos inmaduros no tuvo influencia en la formación de embriones somáticos, sin embargo al emplear frascos de vidrio se alcanzó un 63.7% de embriones cigóticos que desarrollaron embriones somáticos. Fue posible lograr los mayores valores (12.8 ± 0.2) en el coeficiente de multiplicación de los embriones somáticos obtenidos al emplear 5 mg.l⁻¹ de 2,4-D y utilizando ocho grupos de embriones somáticos por frascos de cultivos. Con el empleo de frascos de cultivo de vidrio se alcanzó un 90.7% de germinación de los embriones somáticos. Las plantas de papaya cultivadas *in vitro* lograron la aclimatización empleando un cobertor de nylon y malla que les permitió alcanzar un 80% de supervivencia. Además las plantas deben ser trasferidas a condiciones de casa de cultivo con no menos de 3 cm de longitud y la presencia de raíz pivotante tienen influencia en el desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro*, por lo cual debe tenerse en cuenta estos parámetros en la selección de las plantas *in vitro* para ser transferidas a la fase de aclimatización.

INDICE

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2. 1 Origen y distribución	5
2.1.2 Clasificación	5
2.1.3 Generalidades del cultivo de la Papaya	6
2.1.4 Importancia económica del cultivo de la papaya	7
2.2 Principales variedades cultivadas en Cuba	8
2.3 Cultivo de la papaya	9
2.4 Propagación de la papaya	10
2.4.1 Propagación por semillas y esquejes	10
2.5 Cultivo <i>in vitro</i>	13
2.5.1 Organogénesis	14
2.5.2 Embriogénesis somática	14
2.6 Embriogénesis Somática Secundaria o Repetitiva	15
2.7 Factores que afectan la Embriogénesis Somática	16
2.7.1 Genotipo	16
2.7.2 Explante	16
2.7.3 Medio de Cultivo	17
2.7.4 Condiciones de Cultivo	17
2.8 Ambiente <i>in vitro</i>	18
2.8.1 El ambiente <i>in vitro</i> y la embriogénesis somática	18
2.9 Embriogénesis somática en papaya	20

2.9.1 Embriogénesis Directa	21
2.9.2 Obtención y multiplicación de los embriones somáticos	21
2.9.3 Germinación de los embriones somáticos	22
2.9.4 Enraizamiento y aclimatización del cultivo de la papaya	22
2.9.4.1 Enraizamiento in vitro	23
2.9.4.2 Enraizamiento ex vitro	23
2.9.4.3 Aclimatización	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Obtención de los embriones somáticos a partir de embriones cigóticos.	28
3.1.1 Influencia de la época del año	28
3.1.2 Influencia del tipo de frasco de cultivo	29
3.2 Multiplicación secundaria de los embriones somáticos	30
3.2.1 Efecto de la auxina 2,4-D.	30
3.2.2 Influencia del número de grupos de embriones por frasco	31
3.3 Germinación de los embriones somáticos	31
3.3.1 Influencia del tipo de frasco	31
3.4 Conversión	33
3.4.1 Influencia del tipo de cobertor en la conversión.	33
3.4.2 Influencia de la altura de las plantas en la conversión	35
4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1 Obtención de los embriones somáticos a partir de embriones cigóticos	37
4.1.1 Influencia de la época del año	37
4.1.2 Influencia del tipo de frasco de cultivo	40

4.2 Multiplicación secundaria de los embriones somáticos.	43
4.2.1 Efecto de la auxina 2,4-D.	43
4.2.2 Influencia del número de grupos de embriones por frasco	45
4.3 Germinación de los embriones somáticos	47
4.3.1 Influencia del tipo de frasco	47
4.4 Conversión	52
4.4.1 Influencia del tipo de cobertor en la conversión.	52
4. 4.2 Influencia de la altura de las plantas en la conversión	56
5. CONCLUSIONES	60
6. RECOMENDACIONES	61
7. BIBLIOGRAFÍA	62

1. Introducción.

La papaya (*Carica papaya* L.) es oriunda de América Central y se caracteriza por ser un cultivo productivo en corto tiempo y de forma continua durante todo el año. La producción mundial en el 2006 ascendió a 6 708 551 toneladas (FAO, 2006). Por lo tanto tiene gran importancia económica a nivel mundial, debido a que se puede consumir como fruta fresca o procesarse para obtener otros productos como dulces, jaleas, licuados y encurtidos. También posee un gran potencial de industrialización en el área farmacéutica, culinaria, médica, industria cervecera y bebidas no alcohólicas (Acuña, 2005).

En Cuba en los últimos años se ha incrementado el área de cultivo de la papaya, sin embargo, los niveles de producción son bajos y la oferta no se corresponde con la demanda, esto ha sido causado principalmente por las enfermedades virales, las cuales son capaces de disminuir en más de un 50% la producción de las plantaciones (Arocha *et al.*, 2002). A esto se adicionan las lesiones provocadas por hongos sobre los frutos post-cosecha, debido a la rápida maduración que presentan los mismos, lo cual limita su aceptación en el mercado, por este motivo existe la necesidad de buscar alternativas para aumentar la propagación y comercialización de esta especie.

La principal variedad que se cultiva en Cuba es la Maradol rojo, que a pesar de presentar numerosas ventajas tiene entre sus limitantes, la susceptibilidad a las principales enfermedades virales, además de la rápida maduración de los frutos post-cosecha (Pestano, 2001).

La forma tradicional de propagación de la papaya, ha sido la reproducción sexual (por semillas), también puede ser propagada por medio de estacas o injertos aunque este

método de propagación no brinda los efectos deseados, las estacas son de lento desarrollo y los injertos 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 puede lograr un 66% de plantas hermafroditas y 33% de plantas femeninas, con esta selección existe la certeza de no aparición de plantas masculinas no productivas (Otero, 2003).

La biotecnología puede acelerar los programas convencionales de propagación masiva de plantas y dar soluciones cuando los métodos convencionales fallan. En la actualidad se han desarrollado diferentes métodos de regeneración de plantas a partir del cultivo de tejidos tanto por organogénesis (Hossain *et al.*, 1993, Vegas *et al.*, 2003) como por embriogénesis somática (Posada, 1995; Del Sol *et al.*, 2001, Gallardo, 2006), sin embargo por ser los métodos biotecnológicos hasta el presente más costosos respecto a la vía por semilla botánica su empleo esta limitado solamente para genotipos híbridos que lo justifiquen (Elder y Macleod, 2000).

La organogénesis compite con la semilla botánica por los altos costos, por lo que es necesario buscar un sistema de propagación eficiente que permita la propagación de esta especie, la embriogénesis somática puede ser una vía alternativa, ya que, 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).

Durante la evaluación en campo de plantas proveniente del cultivo de tejido se observó que el 100% de las plantas de papaya obtenidas por embriogénesis somática evaluada en campo, han resultado ser hermafroditas, este resultado es de gran importancia ya que los frutos obtenidos de estas plantas presentan una mayor calidad, en cuanto a

tamaño, color de la pulpa, muy buen sabor y alto contenido de azúcares lo que conlleva a una mayor demanda en el mercado comercial Gómez (2008) comunicación personal.

En el cultivo de la papaya varias metodologías de regeneración de plantas vía embriogénesis somática han sido establecidas, pero, su fin fundamental ha estado dirigido al mejoramiento genético, una se basa en el uso como explante inicial de embriones cigóticos inmaduros (Posada, 1995) y la otra con el empleo de plantas *in vitro* de papaya (Gallardo, 2006). Sin embargo este proceso de la morfogénesis *in vitro* también puede ser utilizado para la producción de semillas de plantas élites en este cultivo. No obstante no se encontraron en la literatura científicas consultadas referencias sobre el uso de este método de propagación a nivel comercial. Contar con procedimientos eficientes para la propagación masiva de esta especie permitirá mejorar la propagación comercial y constituirá una herramienta para el desarrollo de nuevas variedades mediante la transformación genética. (Vargas *et al.*, 2004)

Si se tiene en cuenta estos criterios y los antecedentes mencionados, se justifica realizar estudio para realizar innovación a un protocolo mejorado vía embriogénesis somática en papaya variedad Maradol rojo para regenerar plantas a nivel comercial.

Por lo antes expuesto se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

” La estandarización a escala productiva de un protocolo para la obtención de plantas de *Carica papaya* L. a partir de embriones cigóticos permitirá contar con una vía alternativa para la propagación masiva de esta especie”

A partir de esta hipótesis planteada se definieron los siguientes objetivos:

1. Determinar la influencia de la época del año y del tipo de frasco de cultivo en la formación de embriones somáticos.
2. Determinar la concentración de 2,4-D, así como la cantidad de explantes por frasco de cultivo más adecuada para la multiplicación de los embriones somáticos y la influencia del tipo de frasco de cultivo durante la fase de germinación.
3. Evaluar el tipo de cobertor y la influencia de la altura, el tipo de raíz de las plantas de papaya procedentes de embriogénesis somática en la supervivencia en casa de cultivo.

2. Revisión Bibliográfica.

2.1. Origen y distribución

La papaya (*Carica papaya* L.) es una planta propia de la América Tropical (Reyes, 1983), su origen se ha situado en varios países de esta región (Muñoz, 1983). La descripción más antigua de esta especie es la del cronista Oviedo en 1535. Se señala su origen en la región de Panamá (Muñoz, 1983). Según Kim *et al.* (2002) se originó en Centroamérica. La mayoría de las especies del género se encuentran en estado silvestre y amenazadas por un alto grado de erosión genética. La papaya, en la actualidad, es la única entidad taxonómica del género *Carica* debido a la categorización reciente del grupo *Vasconcellea* (Morales *et al.*, 2004). Su cultivo se ha distribuido ampliamente a lo largo de los trópicos y subtrópicos (Davis, 1996). Se supone que sus semillas se distribuyeron por el Caribe y el Sureste Asiático durante las exploraciones en el Siglo XVI, extendiéndose rápidamente a India, el Pacífico y África (Villegas, 1997). Generalmente no se considera que la papaya sea un cultivo invasivo en ninguna región del mundo (OECD, 2003), no obstante, existen evidencias de que en regiones de las Islas Marianas, la papaya puede conformar hábitats desordenados (Space *et al.*, 2000).

2.1.2. Clasificación.

La *Carica papaya* clasificada así por A.Cronquist., 1988 presenta la siguiente posición:

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliosida*

Subclase: *Dilleniidae*

Orden: *Violales*

Familia: *Caricaceae*

Género: *Carica*

Especie: *Carica papaya* L.

2. 1.3. Generalidades del cultivo de la Papaya

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 pade 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 ovalado, recubiertas por una sustancia algo gelatinosa. Sobrepasan el medio millar de semillas en un fruto de regular tamaño (Rattanapanone y Chongsawat, 2000).

2.1.4. Importancia económica del cultivo de la papaya

Este cultivo esta cobrando gran 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 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).

Algunos países de Asia, África y Oceanía destinan los frutos para la obtención de látex, de este líquido lechoso que es abundante en los frutos verdes, se extrae la papaína, la cual se usa ampliamente como ablandadora de carnes y también en la clarificación de cervezas y otras bebidas. Además, es de utilidad para suavizar las lanas, así como en el curtido de las pieles. Tiene gran aplicación en la fabricación de caucho y en la preparación de remedios caseros, etc. (Caro y Villeneuve, 2000).

Aunque Brasil está considerado el mayor productor de papaya en el mundo (Elizondo, 2002); México, Nigeria, India e Indonesia han logrado grandes producciones durante los últimos años, alcanzando más del 71 % de la producción mundial. En el año 2004 se alcanzaron valores superiores a los 6.5 millones de toneladas métricas (TM) de las cuales Brasil aportó el 24 %, México el 15 %, Nigeria el 12 %, India el 11 %, Indonesia el 10 %, Etiopía el 3 %, Congo el 3 % y otros 47 países el 22 %. El principal exportador es México, seguido por Malasia y Brasil (FAO, 2004).

Es técnicamente una hierba y las hojas se usan a menudo para ablandar carnes y reducir nebulosidad en la cerveza durante su proceso de elaboración (Stanley *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001; Swain y Powell, 2001).

2.2. Principales variedades cultivadas en Cuba

Existen diferentes variedades de uso comercial. Entre las que figura la variedad cubana conocida como Maradol rojo, 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.

2.3. Cultivo de la Papaya

Zonas adecuadas

Las temperaturas óptimas para el cultivo se encuentran alrededor de 25°C. Se consideran como límites térmicos extremos 20°C y 33°C debido a que las temperaturas inferiores a 21°C y superiores a 33°C favorecen los fenómenos de carpeloidía y

esterilidad femenina, respectivamente. Estas condiciones de temperatura limitan por lo tanto las zonas de cultivo de la Papaya. Hay que destacar que las bajas temperaturas y el viento son también factores limitantes para el cultivo, por lo que fuera de las zonas más cálidas, su cultivo es solo aconsejable en invernadero (Rodríguez *et al.*, 1995a).

Suelos apropiados

La papaya se adapta a una muy variada gama de suelos, aunque siempre es preferible que este sea arenoso-limoso, con buena estructura, rico en materia orgánica y principalmente con buen drenaje y aireación. El pH óptimo está comprendido entre 5.5 y 6.5, pero puede cultivarse sin graves problemas hasta pH 8 (Rodríguez *et al.*, 1995a).

2.4. Propagación de la papaya

La propagación de plantas consiste en efectuar su multiplicación por métodos tanto sexuales como asexuales. La forma más económica y fácil de propagar la papaya es por semillas. Se obtendrán diferentes resultados, según se empleen semillas procedentes de árboles femeninos fecundados con papayas masculinas o semillas procedentes de árboles femeninos y hermafroditas (Ronse y Smets, 1999).

Otra vía de propagación es mediante esquejes obtenidos de las ramificaciones del árbol de forma artificial ya que la papaya 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, lo cual provocará así la producción de ramas o cogollos laterales (Agronegocios, 2005).

2.4.1. Propagación por semillas y esquejes

La forma típica para su propagación, por su eficiencia, ha sido la reproducción sexual (por semillas). La propagación vegetativa por medio de estacas o injertos no brinda 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 puede lograr un 66% de plantas hermafroditas y 33% de plantas femeninas, con esta selección existe la certeza de no aparición de plantas masculinas no productivas (Otero, 2003).

El poder germinativo de las semillas de papaya suele ser corto, por lo que la siembra debe efectuarse lo más cerca posible a la época de recolección. Esta puede ser directa sobre el terreno o previa en semillero. Para la siembra en semillero puede emplearse macetas de turba y plástico negro de 10 cm de diámetro y 15 cm de profundidad. Un aspecto importante es que la tierra del semillero deberá mantenerse húmeda y cuando las plantitas tengan unos 10-15 cm de altura (unos dos meses después de la siembra) pueden ser transplantadas al terreno de cultivo (Agronegocios, 2005).

Para el uso de esquejes como material vegetal de propagación deben tomarse brotes de 25-30cm que se cortan y luego 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).

En la producción de plantas en vivero ó cultivo protegido es importante considerar varios factores como la calidad de la semilla, el sustrato, el contenedor, luz, humedad, temperatura y manejo principalmente (aplicación de fungicidas, fertilizante foliar, insecticidas, riegos, etc.) En el cultivo de la papaya la mayoría de los productores utilizan como sustrato tierra de aluvión (limo - arenosa) como el "Topuri" en Michoacán ó el "Cuelilla y Yocuela" en Oaxaca y Guerrero ó Tierra lama en muchos otros Estados de

México. Pueden utilizarlo para el llenado de las bolsas sólo ó mezclados con material orgánico y tierra "pesada" (arcillosa). Las mezclas proporcionalmente tienen relación 1:1:1, esto es: 33% de arena, 33% de materia orgánica (estiércol vacuno, hojarasca, etc. Ésta debe estar bien descompuesta, seca, cernida y desinfectada) y 33% de suelo franco (Otero, 2003)

Debido a que el sustrato que se utilice para la siembra será el medio de desarrollo del sistema radical y por consiguiente del suministro de los nutrientes y el agua para el óptimo desarrollo de la futura planta, es necesario la desinfección del mismo cuando utilicemos suelo como tal, ya sea sólo ó mezclado con materia orgánica (estiércol vacuno, gallinaza, hojarasca, bagazo, etc.). Es común que el suelo sea el hábitat de muchos seres vivos y algunos de éstos son dañinos para el cultivo de la papaya como son: hongos, plagas (particularmente nemátodos) y semillas de malezas. El agroquímico más usado para la desinfección del suelo ó sustrato es el bromuro de metilo (gas) usando 1 libra / m³ de suelo, el sustrato se debe tapar con un plástico para asegurar su desinfección y que el gas se distribuya uniformemente. Su aplicación debe hacerse con cuidado ya que es muy tóxico. Se aplica con un dosificador. El sustrato se deja tapado de 48 - 72 horas. Se destapa y se ventila durante 24 horas. Otra manera práctica de desinfección del sustrato, es la aplicación de Furadán 350 L ® (Carbofurán 33.21%) líquido a razón de 500 ml. por 200 Lts. de agua adicionándole Captan ® (Captán 50%) ó Tecto 60 ® (Tiabendazol 60%) a razón de 300 gramos respectivamente. También se puede aplicar con efectividad Furadán 350 L ® (Carbofurán 33.21%) a razón de 500 ml + Previcur N ® (Propamocarb clorhidrato 64%) y Derosal 500 D ® (Carbendazim 43%), a razón de 250 ml y 200 ml respectivamente, todo en 200 litros de agua, la desinfección se debe realizar con una semana de anticipación antes de la siembra y se le agregan 50 mililitros de la mezcla a cada bolsa, éstas deben de tener perforaciones para un buen

drenaje, después de aplicar la mezcla, hay que regar todas las bolsas para percolar el producto y que todo el sustrato quede desinfectado (Otero, 2003).

2.5. 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).

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- Organogénesis

La organogénesis es una manifestación morfogenéticas 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- 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 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).

La embriogénesis somática es considerado como el método 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)

2.6. 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).

2.7. Factores que afectan la Embriogénesis Somática

2.7.1. 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 embriogénesis 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).

2.7.2- 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.

2.7.3. 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 *Caricacea* emplean la $\frac{1}{2}$ 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; Gallardo *et al.*, 2004a).

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.

2.7.4. 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

2.8. Ambiente *in vitro*

El ambiente físico influye en el crecimiento y desarrollo morfogénético del tejido *in Vitro* (Nguyen y Kozai, 1998; Kozai *et al.*, 1996). Los factores más notables son el CO₂, O₂, el etileno, temperatura y humedad relativa. La composición del gas en el frasco de cultivo esta influenciada por el volumen del vaso de cultivo y la magnitud de la ventilación (Barbon., 2003). La concentración de O₂ en el frasco de cultivo decrece paralelamente con el incremento de la concentración de CO₂ (Doi *et al.*, 1989). Según Ziv (2000) los requerimientos de CO₂ en procesos no fotosintéticos como es la embriogénesis

somática, pudiera estar involucrado en determinadas vías metabólicas como es la biosíntesis de aminoácidos. El proceso de inducción y diferenciación de embriones somáticos esta muy vinculado con el comportamiento de los pH del medio de cultivo y la concentración de CO₂ en el frasco de cultivo (Barbon., 2004).

2.8.1 El ambiente *in vitro* y la embriogénesis somática

Muchos de los efectos del dióxido de carbono y el oxígeno han sido descritos para el crecimiento de plantas *in vitro* (Buddendorf -Joosten y Woltering, 1994), pero poco se conoce sobre la influencia de la atmósfera gaseosa sobre el proceso de embriogénesis somática (Shimazu y Murata, 1999).

El CO₂ y el O₂ son de importancia tanto para la embriogénesis cigótica como para la embriogénesis somática en algunas especies (Kvaalen y von Arnold, 1991). Hace casi 30 años, Kessel y Carr (1972) demostraron que en suspensiones celulares de zanahoria existe un desarrollo de la embriogénesis si la presión parcial de oxígeno disminuye, mientras que la embriogénesis del cultivo de anteras puede ser inducida con elevadas concentraciones de dióxido de carbono. Este gas a pesar de su conocido efecto positivo en la fotosíntesis de las plantas, también promueve el crecimiento en suspensiones celulares heterotróficas de *Catharanthus roseus* (Ducos *et al.*, 1993).

La diferenciación y desarrollo de los embriones somáticos parecen ser inhibidos por el etileno (Biddington, 1992; Merkle *et al.*, 1995). De hecho, la adición de inhibidores de la síntesis de etileno, como cobalto, níquel (Roustan *et al.*, 1990), activa la embriogénesis somática en *Daucus carota* L. Sin embargo, en el caso de *Medicago sativa* L., la maduración de los embriones somáticos requiere de la presencia de etileno (Merkle *et al.*, 1995).

La embriogénesis somática puede ocurrir bajo diferentes régimen de luz y/o oscuridad (Thorpe, 1998); una intensidad luminosa alta es esencial para obtener embriones somáticos en *Nicotiana tabacum* L. (Haccius y lakshmanan, 1965). Sin embargo, La

embriogénesis somática se favorece generalmente mediante incubación en la oscuridad continua (Ammirato, 1989); en *Daucus carota* L. (Ammirato y Steward, 1971), *Manihot sculenta* Crantz (Sábados et al., 1993) y *Saccharum* spp. Híbridos (Liu, 1993; Gómez et al., 1994) es necesaria la oscuridad para el desarrollo y maduración normal de los embriones somáticos.

Por otra parte, durante la germinación, es necesario el control de la intensidad de la luz y foto periodos.

El tipo de recipiente de cultivo (tamaño, forma, material y sistema de cierre) puede condicionar la evolución de la composición gaseosa en su interior durante el cultivo. En recipientes de cultivo cerrados herméticamente se ha detectado una acumulación de gases (dióxido de carbono, etileno, etanol, acetaldehído) que además de influir o controlar el crecimiento, también pueden afectar los procesos de diferenciación y morfogénesis (Thomas y Murashige, 1979, Righetti y col., 1990)

2.9. Embriogénesis somática en papaya

En el cultivo de la papaya la embriogénesis somática de forma directa es la más utilizada tanto para la micropropagación, como para el mejoramiento genético con el uso de 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; Banerjee, 2002).

El explante más utilizado en este cultivo, independiente de la variedad, para lograr la embriogénesis somática, es el embrión cigótico (Cabrera-Ponce et al., 1995; Posada, 1995; Mahon et al., 1996; Cai et al., 1999; Del Sol et al., 2001). No obstante, también se han utilizado otros tipos de explantes como: discos de hojas (Cabrera-Ponce et al., 1996; Arrieta-Espinoza, 1996), segmentos de hipocotilo (Castillo et al., 1998; Zhu et al., 2004), raíces (Yu et al., 2001), así como ápices y segmentos de plantas *in vitro* (Gallardo et al., 2004a).

Varias metodologías de regeneración de plantas por esta vía en el cultivo de la papaya han sido establecidas, su fin fundamental ha estado dirigido al mejoramiento genético (Posada, 1995). Sin embargo, este proceso de morfogénesis *in vitro* también puede ser utilizado para la producción de semillas de plantas élites o hermafroditas en este cultivo. En el Instituto de Biotecnología de las Plantas se han desarrollado dos metodologías las cuales representan un gran potencial para la micropropagación y el mejoramiento genético. Una se basa en el uso como explante inicial de embriones cigóticos inmaduros y la otra con el empleo de plantas *in vitro* de papaya, específicamente del híbrido IBP 42-99.

2.9.1. 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 la micropropagación, como para el mejoramiento genético con el uso de técnicas de transformación genética (Cabrera-Ponce *et al.*, 1995; Posada, 1995; Mahon *et al.*, 1996; Castillo *et al.*, 1998; Caí *et al.*, 1999; Del Sol *et al.*, 2001; Banerjee, 2002; Gallardo *et al.*, 2004a).

2.9.2. Obtención y multiplicación de los embriones somáticos

Posada, 1995) refiere que para la obtención de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos el medio de cultivo debe estar compuesto por las sales MS al 50% y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones entre 5 – 10 mg.l⁻¹ y para la

multiplicación de los embriones obtenidos, el medio de cultivo utilizado debe contener la mitad de las sales MS y 2 mg.l⁻¹ de 2,4-D. Las condiciones de cultivo son oscuridad y temperatura de 27±2 °C. para ambas fases.

Según Parrot (2002) cuando las concentraciones de auxina exógena se elevan a un determinado nivel, los embriones somáticos no pasan de la etapa globular, se detiene su desarrollo y forman embriones nuevos a partir de estos. Los resultados descritos permiten afirmar que dicho fenómeno puede ser utilizado en el cultivo *in vitro* de la papaya para la multiplicación secundaria de los embriones.

2.9.3. Germinación 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 hipócotilo, 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 propágulo 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).

Diferentes autores utilizan para la germinación de embriones somáticos de papaya dos y hasta tres subcultivos en un medio de cultivo de germinación (Cruz *et al.*, 1990; Posada, 1995) para completar y lograr el desarrollo de las plantas. Las condiciones de cultivo son cámaras de luz solar con un flujo de fotones de 48-62.5 mol.m⁻²s⁻¹ y una temperatura de 27±2 °C. A los embriones somáticos que ya alcanzaron las etapas de

torpedo y cotiledonal se les realizan dos subcultivos en medio de cultivo con 6-BAP en concentraciones entre 0.2- 0.5 mg.l⁻¹ (Posada, 1995)

2.9.4. Enraizamiento y aclimatización del cultivo de la papaya

Dentro de las fases del proceso de micropropagación de la papaya, las de mayores problemas y costo lo constituyen el enraizamiento *in vitro* (Kataoka e Inoue, 1987), porque las raíces obtenidas no siempre son funcionales (McCown, 1988), y la aclimatización por las pérdidas que acarrea (Winnaar, 1988).

El enraizamiento en la micropropagación de la papaya puede ser logrado en condiciones *in vitro* y *ex vitro*

2.9.4.1. Enraizamiento in vitro

Para el enraizamiento *in vitro* se recomienda el empleo de un medio de cultivo de enraizamiento, compuesto por el 50% de las sales Murashige y Skoog (1962) (MS) y Ácido Indol-3-butírico (AIB) como regulador del crecimiento (Drew, 1988; Reuveni *et al.*, 1990; Rahaman *et al.*, 1992; Islan *et al.*, 1993 y Vianna, 1996).

En este medio de cultivo se induce la formación de raíces y luego se transfieren a un medio de cultivo compuesto por sales MS sin reguladores de crecimiento para completar el proceso. Al final de este período las plántulas formarán raíces con pelos absorbentes y estarán listas para ser trasladadas a condiciones ambientales de aclimatización (Drew *et al.*, 1991).

Gallardo *et al.* (2004) obtuvieron resultados satisfactorios en el enraizamiento del híbrido IBP 42-99 al emplear frascos de cultivo con 30ml de medio de cultivo MS (1962) y AIB a una concentración de 5 mg.l⁻¹.

Cruz, (2007) obtuvieron resultados satisfactorios en el enraizamiento *in vitro* de

plantas transgénicas de papaya al emplear frascos de cultivo con 30ml de medio de cultivo propuesto por Drew *et al.* (1991) el cual contenía la mitad de las sales MS (1962) suplementado con 2 mg.l^{-1} de AIB y pH 5.8 previo al autoclave.

2.9.4.2. Enraizamiento *ex vitro*

Otra variante que también puede ser empleada es el enraizamiento *ex vitro* (Kataoka e Inoue, 1991). Estos autores emplearon plantas de cultivo *in vitro* de 10 Mm... de altura a las que se les eliminaron las hojas basales y fueron tratadas con $250 - 2500 \text{ mg.l}^{-1}$ de AIB en etanol al 50% por 10 segundos.

2.9.4.3. Aclimatización

La fase de aclimatización de las plantas *in vitro* es una de las etapas críticas de cualquier protocolo de propagación en este cultivo. Lo fundamental en esta fase es que las plantas formen un buen sistema radical, debido a que su nutrición dependerá durante mucho tiempo y en gran parte de la efectividad de sus raíces.

En la papaya resulta fundamental y merece una mayor atención mantener una alta humedad relativa para lograr mayor éxito en la adaptación a las condiciones ambientales. Gallardo *et al.* (2002) para conseguir este propósito cubrieron individualmente las plantas con frascos de vidrio (250ml) durante cuatro semanas. Con ello garantizaron que durante los períodos de riego solo se humedeciera el sustrato y se mantuviera la humedad con lo cual aumentaron los porcentajes de plantas aclimatizadas hasta un 71%. Las plántulas colocadas en los contenedores de polieturano de 70 alveolos de 120 cm^3 de capacidad llegan a alcanzar a los 60 días una altura de 10-15 cm y emiten de 7-12 hojas y las raíces con una longitud entre 6-10 cm con lo cual están listas para el transplante a condiciones de campo.

El riego una vez al día con nebulizadores es suficiente. Durante la fase de aclimatización deben emplearse como sustrato productos que presenten como características fundamentales: (Posada, 2007)

- Una adecuada condición física que permita el intercambio de aire.
- Contenido de materia orgánica inerte (70 %).
- Contenido de zeolita (30%).
- Buena capacidad para retención de agua.
- Estar libre de agentes dañinos como pueden ser nemátodos, bacterias y hongos patógenos.
- Libre de semillas de plantas de otras especies. Las plantas responden muy bien a la aplicación semanal de urea (10g.l^{-1}) de forma foliar, toman una consistencia vigorosa y desarrollan hojas de color verde intenso (Posada, 2007).

3. Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) perteneciente a la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. La misma se llevó a cabo desde enero del 2006 hasta diciembre del 2007.

Material vegetal

Como material vegetal inicial se emplearon frutos inmaduros (90-120 días después de la antesis) de la variedad de papaya Maradol rojo procedentes de flores hermafroditas elongatas, obtenidos a partir de plantas de campo.

En el laboratorio primeramente fueron lavados con una solución de detergente comercial y luego se colocaron 30 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1.0% (v/v) con dos o tres gotas de Tween 80 por litro de solución. Posteriormente se lavaron dos veces con agua destilada estéril, se secaron en la cabina de flujo laminar y se procedieron a abrirlos con ayuda de una cuchilla, se extraeron las semillas y se cortaron con el auxilio de bisturí No. 11 y pinzas curvas para obtener los embriones cigóticos inmaduros (Figura 1).

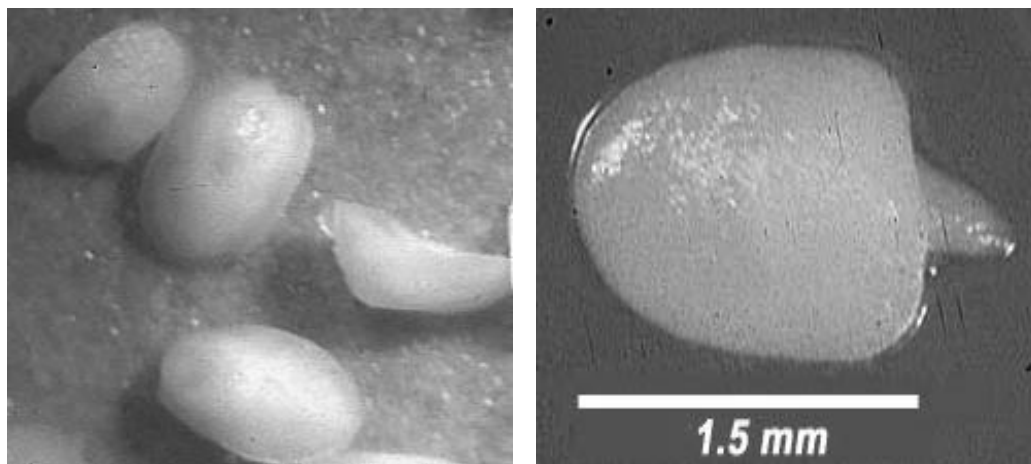


Figura 1: Semillas y embrión cigótico inmaduro de papaya variedad Maradol rojo.

Procedimientos generales

Todos los experimentos en laboratorio se realizaron en condiciones asépticas. La cristalería así como el instrumental de trabajo empleado se esterilizó en estufa a 180 °C durante dos horas. Las pinzas y los bisturís se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio [NaOCl] al 1.0% (v/v) durante 15 minutos (Agramonte *et al.*, 1993). Las operaciones de transferencia y manipulación del material vegetal fueron realizadas en una cabina de flujo laminar horizontal.

Medios de cultivo

Los medios de cultivos fueron esterilizados en autoclave vertical a 120 °C 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 Agargel (Sigma Co) razón de 5g .l⁻¹ y Gelrite (Duchesfa Co) a razón de 2.5 g.l⁻¹ y el pH fue ajustado siempre a 5.8 con el uso del ácido clorhídrico (HCL) 1.0 M ó 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 frascos de cultivo de 250 ml (de vidrio) con 30 ml de medio de cultivo, frascos de cultivo de 500 ml (magentas de plástico) con 60 ml de medio de cultivo y placas de Petri de vidrio, de 94 x16 mm de diámetro con 30 ml de medio de cultivo respectivamente.

En la etapa de formación y multiplicación de los embriones somáticos los frascos de cultivo con los explantes fueron colocados en cámara de cultivo en oscuridad total y temperatura de 27±2 °C. Para la germinación en plantas de los embriones somáticos los explantes se colocaron en una cámara de cultivo con luz solar con una intensidad de fotones fotosintético 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 (Walter y Lieth, 1967; citado por Freire, 2001), con igual rango de temperatura que la cámara de cultivo con oscuridad.

Análisis Estadístico

En los experimentos llevados a cabo en el laboratorio se aplicó una lectura de las observaciones completamente aleatoria. Los grupos homogéneos y diferentes fueron hallados a partir de las pruebas de Duncan y Prueba de Proporción. Este procesamiento estadístico de las variables en cada estudio fue posible a través de los programas estadísticos computacionales SPSS ver. 15.0, STATGRAPHICS Centurium XV 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 embriones somáticos a partir de embriones cigóticos.

3.1.1. Influencia de la época del año.

El experimento tuvo como objetivo determinar el efecto de la época del año en la formación de los embriones somáticos a partir de los embriones cigóticos inmaduros.

La toma de los frutos inmaduros y la implantación *in vitro* se realizaron en la época de lluvia en los meses de (marzo y junio) y en la época de seca en los meses de (octubre y diciembre) del año 2006.

Se colocaron cuatro embriones cigóticos por frasco de vidrio con una capacidad de 250 ml, el cual contenía 30 ml de medio de cultivo compuesto por el 50% de las sales MS, suplementadas con vitaminas MS, con 5 mg.l⁻¹ de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 400 mg.l⁻¹ de L-glutamina, 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, , 30 g.l⁻¹ de sacarosa.

A las seis semanas de cultivo se evaluó:

- ❖ Número de embriones cigóticos (Ec) que formaron embriones somáticos (Es).

- ❖ Pérdidas durante el proceso (número de frascos contaminados por hongos y bacterias).

Este experimento se realizó tres veces en el tiempo y se utilizaron 40 repeticiones por implantación por mes. Los datos fueron procesados en el paquete estadístico Statistix ver 1.0 a los que se les realizó una prueba de proporciones.

3.1.2. Influencia del tipo de frasco de cultivo

Este experimento tuvo como objetivo determinar el frasco de cultivo más adecuado para la formación de los embriones somáticos. Para esto se estudiaron tres tipos de frascos:

- ❖ Tratamiento 1: Frascos de cultivo de 250 ml (de vidrio) con 30 ml de medio de cultivo.
- ❖ Tratamiento 2: Frascos de cultivo de 500 ml (magentas de plástico) con 60 ml de medio de cultivo.
- ❖ Tratamiento 3: Placas de Petri de vidrio, de 94 x 16 mm. de diámetro con 30 ml de medio de cultivo.

En dependencia del tipo de frasco se colocaron diferentes cantidades de embriones cigóticos empleando la misma cantidad de medio de cultivo por explante en cada tipo de frasco estudiado (7.5 ml x embrión). Se colocaron 4, 8 y 4 embriones cigóticos por tipo de frasco respectivamente. Se utilizó el mismo medio de cultivo que en el experimento anterior. A los 45 días de cultivo se evaluó:

- ❖ Número de embriones cigóticos que formaron embriones somáticos.

Este experimento se realizó tres veces en el tiempo y se utilizaron 40 repeticiones por tratamientos. Los datos fueron procesados en el paquete estadístico Statistix ver 1.0 a los que se les realizó una prueba de proporciones.

3.2 Multiplicación secundaria de los embriones somáticos.

3.2.1 Efecto de la auxina 2,4-D.

El objetivo de este experimento fue determinar la concentración del regulador de crecimiento donde se obtiene la mayor multiplicación secundaria de los embriones somáticos obtenidos a partir de los embriones cigóticos.

Se tomaron pequeñas masas de embriones en etapa globular, formadas por grupos de 10-15 embriones somáticos, y se colocaron en un medio de cultivo con el 50 % de las sales MS suplementadas con vitaminas MS, 400mg.l⁻¹ de L-glutamina, 100mg.l⁻¹ de mioinositol, sacarosa 60 g.l⁻¹ y 2, 5 y 8 mg.l⁻¹ de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), lo cual constituyeron los tratamientos estudiados, basados en la literatura consultada. El medio de cultivo fue solidificado con agargel (5 g.l⁻¹)

A las cuatro semanas de cultivo se evaluó:

- ❖ Número de embriones por grupo. Esta evaluación se realizó a través de conteo de los embriones y para ello se utilizó un microscopio estereoscópico.
- ❖ Coeficiente de multiplicación : El coeficiente de multiplicación se calculó dividiendo la cantidad de embriones somáticos producidos por grupos entre la cantidad de embriones somáticos por grupo al inicio del cultivo y para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$CM = \text{No. ES producido por grupos} / \text{No. de ES por grupos al inicio del cultivo}$$

Estos experimentos se realizaron tres veces en el tiempo y se colocaron cinco grupos de embriones somáticos por frasco de cultivo. Los datos fueron procesados en los programas estadísticos computacionales SPSS ver. 15.0 y STATGRAPHICS Centurium XV, a los que se

les realizó una ANOVA simple y para determinar la diferencia entre las medias se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan.

3.2.2. Influencia del número de grupo de embriones por frasco.

Este experimento se realizó con el objetivo de determinar el número de grupos de embriones (explante) para la multiplicación secundaria de los mismos. Se colocaron 6, 8 y 10 explantes por frasco de cultivo (vidrio) con una capacidad de 250 ml, los grupos de embriones somáticos contenían de 10-15 embriones respectivamente. Se utilizó el medio de cultivo descrito en el acápite anterior y complementado con la mejor concentración de 2,4-D obtenida.

A los 30 días de cultivo se evaluaron las siguientes variables::

- ❖ Número de embriones por grupo
- ❖ Número de embriones por frasco de cultivo
- ❖ Coeficiente de multiplicación. El coeficiente de multiplicación se determinó como se describió en el experimento anterior.

Estos experimentos se realizaron tres veces en el tiempo y se emplearon 40 replicas por tratamientos. Los datos fueron procesados en los programas estadísticos computacionales SPSS ver. 15.0 y STATGRAPHICS Centurium XV, a los que se les realizó una ANOVA simple y para determinar la diferencia entre las medias se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan.

3.3. Germinación de los embriones somáticos.

3.3.1. Influencia del tipo de frasco.

Este experimento tuvo como objetivo determinar el tipo de frasco de cultivo adecuado para lograr la germinación de los embriones somáticos de papaya. Se emplearon dos tipos de frasco.

Frascos de 250 ml (vidrio) y frascos plásticos (polipropileno) de 500 ml de capacidad respectivamente y se utilizaron embriones somáticos en etapa torpedo y cotiledonal (Figura 2).

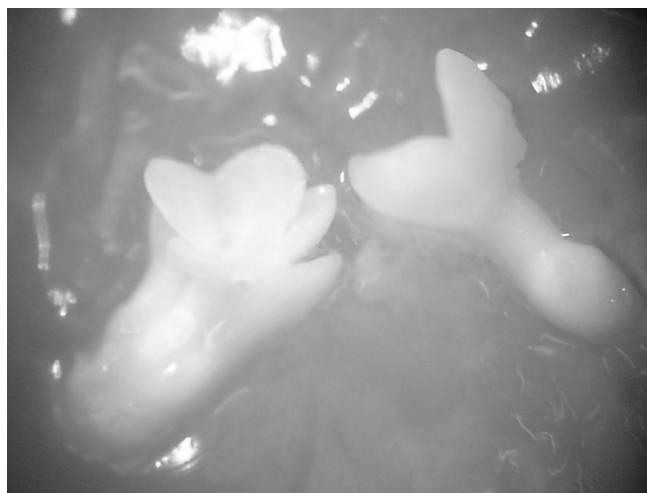


Figura 2. Tipos de embriones somáticos empleados en el experimento de germinación.

Los embriones se colocaron en un medio de cultivo que contenía el 50% de las sales MS, vitaminas MS, 0.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP, 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, 20 g.l⁻¹ de sacarosa, 0.06 mg.l⁻¹ de vitamina B₂, y 5 g.l⁻¹ de Agargel. En este experimento se realizó un segundo subcultivo a los 30 días, colocándolos en el mismo medio de cultivo.

A los 60 días de cultivo se evaluó:

- ❖ Numero de embriones somáticos que germinaron.

Este experimento se realizó tres veces en el tiempo y se utilizaron 40 repeticiones por tratamientos. Los datos fueron procesados en el paquete estadístico Statistix ver 1.0 a los que se les realizó una prueba de proporciones.

Las plántulas obtenidas a partir de la germinación de los embriones somáticos, se colocaron en medio de cultivo de elongación, el cual contiene las sales MS suplementadas con 0.25 mg.l⁻¹ de ANA y 0.25 mg.l⁻¹ de 6-BAP. Posterior a las cuatro semanas de cultivo y con una altura promedio superior a los 3.0 cm, las mismas se transfirieron a un medio de cultivo de

enraizamiento, compuesto por el 50% de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y suplementadas con 5.0 mg.l⁻¹ de AIB, en este medio de cultivo permanecerán durante 10 días para inducir la formación de raíces, pues a partir de este tiempo ocurre una caída casi total de las hojas. Luego se subcultivaron a un medio de cultivo compuesto por sales MS sin reguladores de crecimiento por espacio de 20 días. Las condiciones de cultivo para esta fase fueron luz solar con un flujo de fotones de 48-62.5 mol.m⁻²s⁻¹ en las cámaras de crecimiento y una temperatura de 27±2 °C. las cuatro semanas, las plantas fueron llevadas a condiciones *ex vitro* en casa de cultivo.

3. 4. Conversión.

3.4.1. Influencia del tipo de cobertor en la conversión.

La conversión fue definida por Stuart y Strickland (1984) al referirse a la supervivencia y desarrollo de las plantas obtenidas de los embriones cigóticos en condiciones ambientales *ex vitro*

Los experimentos de conversión se realizaron en la casa de cultivo del IBP. Con el objetivo de sustituir el frasco de vidrio encima de las plantas de papaya, colocado para lograr condiciones de alta humedad relativa y temperatura que permitieran su adaptación a condiciones *ex vitro*. Cuestión esta imposible de realizar para la propagación a nivel comercial, se confeccionó un cobertor de nylon y malla antiáfido con las siguientes dimensiones, 127 cm de ancho, 240 cm de largo, y 110 cm de altura (Figura 3), dentro del cual fueron plantadas las plantas de papaya. Se utilizó para el control de la intensidad de los fotones fotosintéticos una malla plástica de color negro (zarán), que permitía el paso del 30% de la luz solar. Se emplearon bandejas de polieturano de 70 alveolos con 120 cm³ de volumen cada uno, y un sustrato compuesto por una mezcla de materia orgánica (70%) y zeolita (30%) y este fue desinfectado antes de realizar la plantación de las vitroplantas.



Figura 3: Cobertor de nylon y malla donde fueron plantadas las plantas cultivadas *in vitro* de papaya obtenidas de los embriones somáticos.

El riego se realizó por microaspersión, con aspersores de baja presión (dos bares y un caudal de 122 l/h). Durante los primeros diez días se le aplicó a las plantas un riego de 5 segundos cada 30 minutos y posteriormente un riego al día que se hizo coincidir con las aplicaciones de fertilizantes y fungicidas. Para el transplante se utilizaron bolsa plásticas de color negro, agujereadas, de 15 cm de alto, 7 cm de diámetro. Las condiciones de cultivo fue humedad relativa promedio de 80% y temperatura en un rango de 26 a 30 °C. La temperatura y la humedad relativa dentro del cobertor se midieron con un Termo-Higrómetro electrónico. A las plantas se le realizó a partir del séptimo día una aplicación de fungicidas, los cuales fueron: 1.6 g.l⁻¹ de Fundazol, 1.6 g.l⁻¹ de Marcozeb, 3.2g.l⁻¹ de Oxiclورو de Cobre.

Las plantas de papaya con más de 1cm de longitud fueron lavadas en su base para eliminar los restos de gelificante del medio de cultivo y trasladadas en recipientes con agua desionizada estéril para la plantación inmediata

Como control se empleó la metodología propuesta por (Gallardo *et al.*, 2002).

Este experimento se realizó tres veces en el tiempo y se plantaron 50 plantas por tratamiento.

A los 30 días se evaluó:

- ❖ Supervivencia
- ❖ Altura de la planta (cm), medida desde la base hasta la inserción de la última hoja
- ❖ Número de hojas
- ❖ Número de raíces
- ❖ Longitud de la raíz
- ❖ Presencia de raíz pivotante.

Estos experimentos se realizaron tres veces en el tiempo y se emplearon 40 replicas por tratamientos. Los datos fueron procesados en los programas estadísticos computacionales SPSS ver. 15.0 , STATGRAPHICS Centurium XV y Statistix ver 1.0, a los que se les realizó una ANOVA simple y para determinar la diferencia entre las medias se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan y para los valores expresados en porcentaje se empleo una prueba de proporciones.

3.4.2. Influencia de la altura de plantas *in vitro* en la conversión.

Con el objetivo de evaluar la influencia de la altura de las plantas de papaya regeneradas a partir de embriones somáticos durante la conversión en casa de cultivo, se transfirieron al ambiente *ex vitro*, plantas de 1, 2 y 3 cm de altura.

Las condiciones para la aclimatización fueron iguales a las señaladas en el acápite anterior.

A los 30 días se evaluó:

- ❖ Número de plantas vivas

- ❖ Altura de la planta (cm), medida desde la base hasta la inserción de la última hoja
- ❖ Número de hojas
- ❖ Presencia o no de raíces
- ❖ Presencia de raíz pivotante

Estos experimentos se realizaron tres veces en el tiempo y se emplearon 30 replicas por tratamientos. Los datos fueron procesados en los programas estadísticos computacionales SPSS ver. 15.0 , STATGRAPHICS Centurium XV y Statistix ver 1.0, a los que se les realizó una ANOVA simple y para determinar la diferencia entre las medias se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan y para los valores expresados en porcentaje se empleo una prueba de proporciones.

4. Resultados y discusión

4.1. Formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos.

4.1.1. Influencia de la época del año

Como resultado se encontró que la época del año no influyó en la formación de embriones somático ya que no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de formación de embriones en los cuatro meses en los que se realizó la implantación *in vitro* de los embriones cigóticos inmaduros (Figura 1).

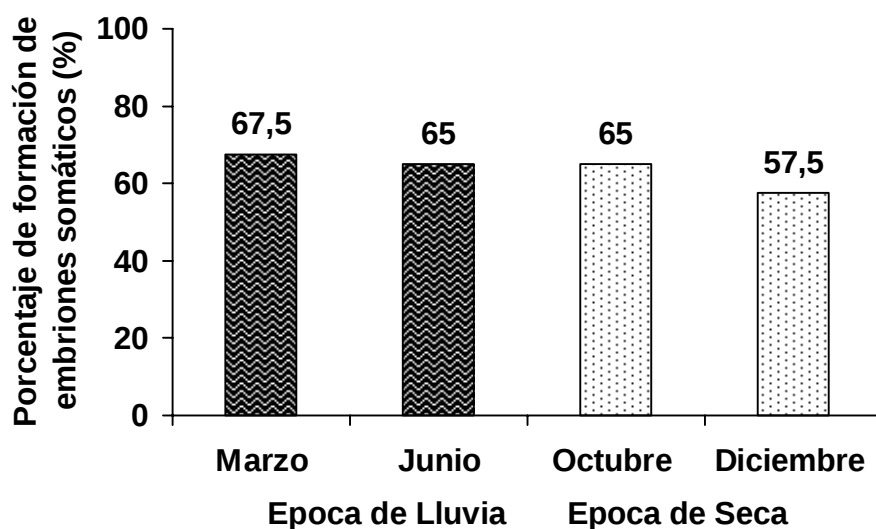


Figura 1. Influencia de la época del año en la formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos inmaduros en papaya variedad Maradol rojo a los 45 días de cultivo

Es importante destacar que a los 5 días de cultivo los embriones cigóticos comenzaron a abrir las hojas cotiledonales y a partir de los 20 días se observaron embriones somáticos en la zona apical de los mismos (Figura 2). Los embriones formados se encontraban en etapa globular y presentaron una coloración amarillo claro. Se obtuvo una embriogénesis somática directa, de

alta frecuencia, sin la formación de callo, con lo que se reduce el riesgo de la variabilidad genética en las plantas regeneradas. Estos resultados avalan los obtenidos por Posada (1995).

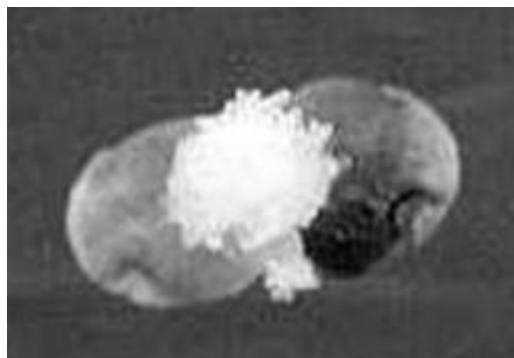


Figura 2. Embriones somáticos obtenidos a partir de embriones cigóticos de papaya variedad Maradol rojo a los 45 días de cultivo.

El estudio realizado mostró que no obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la influencia de la época del año en la formación de embriones somáticos a partir de los embriones cigóticos inmaduros en papaya variedad Maradol rojo (Figura 1). Esto se correspondió con que las principales pérdidas por contaminación durante la formación de embriones fueron provocadas por la aparición de contaminantes microbianos tales como bacterias y hongos en el medio de cultivo y alejados del explante y no por la época en que se realizó la implantación *in vitro* de los embriones cigóticos. Estos resultados evidenciaron que la contaminación ocurrida fue introducida durante la manipulación de los explantes en la cabina de flujo laminar y no causada por microorganismos endógenos visibles (Tabla 1).

Tabla 1. Pérdidas producidas durante la fase de formación de embriones somáticos en la variedad de papaya Maradol rojo en los distintos meses de año a los 45 días de cultivo.

Época del año/mes	Frascos contaminados (%)	
	Hongo	Bacteria
Lluvia/Marzo	1.51	3.02
Lluvia/Junio	1.02	2.84
Seca/Octubre	1.01	1.45
Seca/Diciembre	1.36	2.03

En el caso de la papaya no se encontraron publicaciones que refieran estudios al respecto en este cultivo. Se conoce que el cambio estacional es uno de los factores a considerar en la respuesta embriogénica de diversos cultivos ya que las variaciones de temperatura, humedad y precipitaciones provocan fluctuaciones en las plantas, que influyen en la respuesta *in vitro* de los explantes. González (2005) trabajando la influencia de la época del año en la respuesta morfogénica y bioquímica de explantes foliares de *Coffea canephora* P. var. Robusta empleados para la formación de callos, planteó, que la época del año en que se tomaron los explantes ejerció un marcado efecto en su respuesta morfogénica y bioquímica en los genotipos evaluados, y comprobó que los períodos mayo - junio, enero - febrero y noviembre- diciembre resultaron más favorable dado un elevado porcentaje de formación de callos, bajos índices de actividad enzimática peroxidasa, oxidación fenólica y contaminación fúngica, así como un mayor contenido de proteínas totales.

Sin embargo, el resultado obtenido en este experimento pudo estar dado porque los frutos seleccionados procedían de un banco de semilla donde las condiciones de riego, fertilización y sanidad del cultivo estaban bien controladas y por lo tanto, dichos factores influyeron similarmente en todos los tratamientos evaluados independientemente de la época y de las condiciones del clima. Es de señalar que cuando se inicia el proceso de embriogénesis

somática a partir de embriones cigóticos como sus células están predeterminadas embriogénicamente el factor que más influye, es la etapa de desarrollo de los embriones cigóticos para obtener una mayor o menor respuesta embriogénica.

En los últimos años se ha publicado poco sobre esta temática y aunque los resultados obtenidos muestran que la época del año no influyó en la formación de embriones somáticos en este cultivo, cabe señalar, que estos aspectos se deben tener presente en la propagación masiva, ya que al considerar estos factores desde las etapas tempranas del proceso, se contribuye a garantizar una mayor eficiencia en la multiplicación.

4.1.2. Influencia del tipo de frasco de cultivo.

En todos los frascos de cultivos empleados se logró formar embriones somáticos a partir de los embriones cigóticos. Sin embargo los mejores resultados se lograron en los frascos de vidrio de 250 ml de capacidad, con diferencia significativa, con respecto a las placas de Petri y a los frascos plásticos, donde en estos últimos se formó la menor cantidad de embriones somáticos. (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del tipo de frasco de cultivo en la formación de embriones somáticos a partir de los embriones cigóticos inmaduros de papaya variedad Maradol rojo a los 45 días de cultivo.

Tipos de frascos	Número de Embriones cigóticos que formaron Es (%)
Vidrio (250ml)	63.7 a
Plástico (500 ml)	18.7 c
Placas de Petri de 94 x 16 mm.	50.6 b
EE	±3.6

*Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según prueba de proporciones para $p \leq 0.05$

Se conoce que la atmosfera gaseosa es un factor determinante en los procesos morfogénicos y

está condicionada por el tipo y tamaño del envase seleccionado así como también el sistema de cobertura del mismo. Las tapas usadas en cultivo *in vitro* varían desde el tapón de algodón, papel de aluminio, película de resinite transparente o tapas rígidas de polipropileno. El intercambio gaseoso es diferente para cada tipo de tapa; en consecuencia, la atmósfera interna también sufrirá variaciones (Radice 2004).

Esta diferencia estadística entre los tratamientos estudiados debe estar influenciada por la capacidad total de los frascos, o sea el ambiente interno que proporciona cada uno de ellos durante el periodo de cultivo. Por esta razón, existen diferencias entre acumulación de sustancias gaseosas O_2 y CO_2 (oxígeno y dióxido de carbono) y al intercambio gaseoso de los mismos.

Muchos de los efectos del CO_2 y O_2 han sido descritos para el crecimiento de plantas *in vitro*, pero poco se conoce sobre la influencia de la atmósfera gaseosa sobre el proceso de embriogénesis somática (Shimazu y Kurata, 1999). Ziv (1998) refiere que la composición del gas en el frasco de cultivo esta influenciado por el volumen del vaso de cultivo y la magnitud de la ventilación.

El O_2 y el CO_2 son de importancia tanto para la embriogénesis cigótica como para la embriogénesis somática en algunas especies (Kvaalen y von Arnold, 1991). Kessel y Carr (1972) demostraron que en suspensiones celulares de zanahoria existía un desarrollo de la embriogénesis si la presión parcial de O_2 (pO_2) disminuía, mientras que la embriogénesis del cultivo de anteras podía ser inducida con elevadas concentraciones de CO_2 . Este gas a pesar de su conocido efecto positivo en la fotosíntesis de las plantas, también promueve el crecimiento en suspensiones celulares heterotróficas de *Caranthus roseus* (Ducos *et al.*, 1993). Johansson y Eriksson (1984) informaron que elevadas concentraciones del CO_2 es posible que se promueva la fijación en la oscuridad y mejore por esta vía el desarrollo de la embriogénesis somática en microsporas de *Papaver*, lo cual pudo también ocurrir en el

presente experimento. También estos autores señalaron que en la especie *Clematis venticela* se estimuló la embriogénesis somática en cultivos de anteras cuando el tejido fue incubado a una concentración de dióxido de carbono de 2.0%, y se obtuvo un mayor rendimiento del número de embriones somáticos por explantes en medios de cultivo semisólido, al mantener el material durante 60 días bajo el efecto del CO₂ con respecto a otros explantes con un menor tiempo de cultivo.

Los resultados obtenidos en este experimento pudieron estar dados por la mayor hermeticidad de los frascos y placas de Petri de vidrio (tratamientos 1 y 3) con respecto a los frascos plásticos (tratamiento 2), o pudo estar relacionado con la capacidad del frasco, los cuales permitieron una mayor concentración de CO₂ en la atmosfera interna del frasco de cultivo, lo cual pudo haber determinado la mayor formación de embriones somáticos. Barbón (2002) en *Coffea arábica* demostró que la concentración de CO₂ influye positivamente en la formación y multiplicación de embriones somáticos. Otra posible explicación a los resultados obtenidos, es que el CO₂ pudo estimular de forma directa la formación de los embriones somáticos, lo cual condujo a una modificación de los patrones de pH del medio de cultivo o de forma indirecta al producir cambios en el comportamiento del pH que favorecieron el proceso de embriogénesis somática.

El tipo de frasco de cultivo empleado, tuvo una influencia sobre el número de embriones que se obtienen a partir de los embriones cigóticos utilizados como explante inicial y que es necesario realizar otros estudios que permitan dilucidar la influencia de la atmosfera gaseosa específicamente el CO₂, sobre el proceso de embriogénesis somática en la fase de formación de embriones somáticos de papaya.

4.2. Multiplicación secundaria de los embriones somáticos.

4.2.1. Efecto de la auxina 2,4-D

Al adicionar 2,4-D en el medio de cultivo en diferentes concentraciones, se logró la embriogénesis secundaria o repetitiva en los embriones somáticos de papaya (Tabla 3).

Cuando se utilizó 5 mg.l⁻¹ de 2,4-D se lograron los mayores coeficientes de multiplicación de embriones somáticos en etapa globular (figura 3a), con diferencias significativas respecto al tratamiento de 2 y 8 mg.l⁻¹ de 2,4-D (Tabla 3). Con el empleo de una mayor concentración de auxina 8 mg.l⁻¹ aunque se logró la multiplicación de los embriones somáticos se mostró una disminución en el número de embriones por grupo y del coeficiente de multiplicación con respecto al tratamiento con 5 mg.l⁻¹ de 2,4-D (Figura 3c). Cuando los niveles de auxina exógenos se elevan a un punto, los embriones somáticos no pasan más allá de la etapa globular, donde cesa su desarrollo y forman embriones nuevos a partir de estos (Parrot, 2002).

Tabla 3. Influencia del 2,4-D en la multiplicación de los embriones somáticos de papaya variedad Maradol rojo a los 30 días de cultivo

Concentración de 2,4 -D (mg.l ⁻¹)	Número de embriones somáticos por grupo	Coeficiente de multiplicación
2	64.6 b	4.9 b
5	193.5 a	12.8 a
8	127.8 c	7.8 c
EE	±2.7	±0.2

*Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según prueba de rangos múltiples de Duncan para $p \leq 0.05$

Al utilizar 2 mg.l^{-1} de 2,4-D, los embriones comenzaron también a diferenciarse y pasaron de la etapa globular a otras etapas de desarrollo (Figura 3 b). Esto provocó una disminución de la multiplicación de los embriones somáticos, y por tanto una disminución del coeficiente de multiplicación con respecto a los tratamientos con 5 y 8 mg.l^{-1} de 2,4-D, quienes mostraron los mejores resultados con un mayor número de embriones somáticos formados a partir de los utilizados como explante inicial.

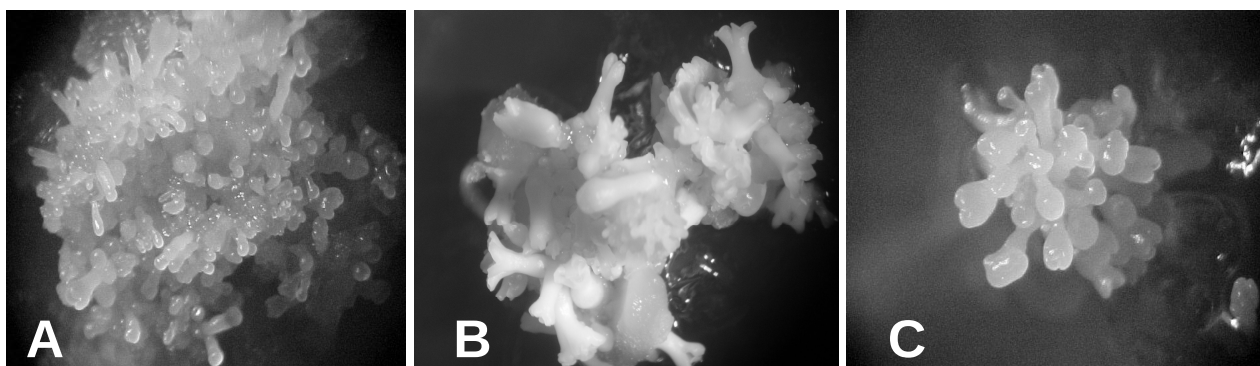


Figura 3. Embriones somáticos de papaya (*Carica papaya* L.) variedad Maradol rojo, a las 4 semanas de cultivo en un medio de cultivo con el 50 % de las sales MS suplementadas con 2,4-D: **(A)** Embriones somáticos obtenidos en medio de cultivo con 5 mg.l^{-1} de 2,4-D. **(B)** Embriones somáticos obtenidos en medio de cultivo con 2 mg.l^{-1} de 2,4-D. **(C)** Embriones somáticos obtenidos en medio de cultivo con 8 mg.l^{-1} de 2,4-D. EL aumento en todos los casos fue de 6X.

Con la adición al medio de cultivo de 2 mg.l^{-1} de auxina existió un mayor porcentaje de diferenciación de los embriones somáticos y se observaron embriones con tendencia a germinar al final del tiempo de cultivo (30 días), pues tomaron una coloración verde en su extremo superior, esto debió estar dado por un rápido agotamiento del regulador de crecimiento en el medio de cultivo durante este periodo, al estar en una más baja concentración que el tratamientos anterior. Según Parrot (2002) los tejidos embriogénicos son capaces de formar embriones globulares aun cuando los niveles de auxina exógena bajan hasta cierto umbral, pero en ausencia de esta la histodiferenciación ocurre normalmente.

Por tanto, se toma el tratamiento donde el medio de cultivo estuvo suplementado con 5 mg.l⁻¹ de 2,4-D, como el de mejores resultados debido a que con esta concentración de la auxina se logra sincronizar en su mayoría los embriones somáticos y se alcanzan los mayores valores en el coeficiente de multiplicación. Resultados similares obtuvieron autores como Posada (1995) quien desarrolló la embriogénesis somática en papaya a partir de embriones cigóticos inmaduros y utilizó concentraciones de 2,4-D similares a las del presente trabajo para lograr la multiplicación secundaria de los embriones somáticos, e informa disminución del número de embriones somáticos al aumentar las concentraciones de la auxina superiores a 5 mg.l⁻¹. Gallardo (2006) para multiplicar embriones de papaya utilizando como explante inicial secciones de tallo de plantas *in vitro* empleó concentraciones de 2,4-D desde 2 hasta 8 mg.l⁻¹ e informó que con la concentración de 5 mg.l⁻¹ de 2,4-D se lograron obtener los mejores resultados en cuanto a porcentajes de embriones somáticos en etapa globular, así como la mayor multiplicación de los mismos. Estos resultados coinciden con los alcanzados en el presente trabajo.

4.2.2. Influencia del número de grupos de embriones por frasco.

En todos los tratamientos estudiados (6, 8, y 10 grupo de embriones por frasco de cultivo), se logró la multiplicación secundaria de los embriones somáticos. Sin embargo, hubo diferencias entre los tratamientos estudiados. Cuando se utilizaron seis y ocho grupos de embriones somáticos por frascos de cultivo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al coeficiente de multiplicación, pero tuvieron diferencias significativas con el tratamiento donde se habían empleado 10 grupos de embriones por frascos (Tabla 4).

Para la multiplicación de los embriones somáticos es necesario considerar varios factores como: densidad de inóculo, regulador del crecimiento, fuente de O₂, CO₂, nitrógeno etc., algunos de los cuales podrían ser controlados durante el proceso de cultivo y algunos no están definidos (Yemets *et al.*, 2002).

Para el caso de la densidad de inóculo (Higashi *et al*, 1998) plantearon que la influencia de la densidad celular sobre la embriogénesis somática es a través de cambios en la concentración de factores celulares los cuales son literalmente adicionados al medio de cultivo por parte de las células y los embriones. Cambios en la cantidad de nutrientes o gases disponibles por el consumo individual de células o embriones y estrés físico causado por el incremento del contacto físico entre los embriones cuando la densidad es incrementada.

Tabla 4. Influencia del número de embriones somáticos por frasco de cultivo en la multiplicación secundaria de los embriones de la variedad de papaya Maradol rojo

Número de grupos de embriones por frasco de cultivo	Número de embriones formado por cada grupo	Número Total de embriones por frasco de cultivo	Coefficiente de multiplicación
6	65.4 a	396.8 c	4.36 a
8	64.4 a	515.6 a	4.29 a
10	43.4 b	434.5 b	2.89 b
EE	±0.5	±2.1	±0.05

*Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según Duncan para $p \leq 0.05$

Al emplear 10 grupo de embriones somáticos por recipiente de 250 ml de capacidad, se obtuvo como resultado una disminución del número de embriones y por tanto del coeficiente de multiplicación, con respecto al tratamiento con 6 y 8 grupo de embriones somáticos por frascos de cultivo, los cuales mostraron los mejores resultados, al obtenerse mayor número de embriones a partir de los utilizados como explante inicial. Este comportamiento puede estar relacionado entre otras causas por la disponibilidad de nutrientes y reguladores de crecimiento en las concentraciones demandadas por los embriones en cada momento.

En la utilización de 10 grupo de embriones somáticos por frasco en la multiplicación de los embriones somáticos, la relación medio de cultivo por embrión somático fue de 0.3 ml, mientras que en el tratamiento inoculado con 8 grupo de embriones somáticos, esta relación fue de 0.5

ml por embrión somático, lo que permitió una mayor disponibilidad de nutrientes y con ello una mayor multiplicación de estos embriones somáticos.

De manera general se propone colocar 8 explantes por frascos de cultivo ya que no hubo diferencias significativas con respecto a 6 explantes por frasco y por tanto este resultado contribuye a un ahorro en cuanto a medio de cultivo y frascos a utilizar, lo que a su vez representa una disminución de los costos y un incremento de la capacidad de las cámaras de cultivo *in vitro*. Cabe señalar que en cualquier proceso productivo es de gran importancia tener en cuenta lo relacionado con los gastos y los costos durante el proceso.

En la literatura científica consultada no se encontró artículo alguno que hiciera referencia a este tipo de estudio en el cultivo de la papaya y es casi nulo en el caso de otros cultivos por la vía de la embriogénesis somática en medio de cultivo semisólido.

Con este experimento se demostró que el número de explantes por frasco de cultivo constituye un parámetro importante a tener en cuenta para mejorar la respuesta de los embriones somáticos de papaya en fase de multiplicación, ya que se obtuvo como resultado que a medida que este aumentó disminuyó el coeficiente de multiplicación.

4.3. Germinación de los embriones somáticos

4.3.1. Influencia del tipo de frasco

Se logró la germinación de los embriones somáticos de papaya variedad Maradol rojo en ambos tratamientos, sin embargo, el mejor resultado se alcanzó en frascos de cristal alcanzándose diferencias significativas con relación a los frascos de plástico (Tabla 5).

Tabla 5. Influencia del tipo de frasco de cultivo en la germinación de los embriones somáticos de papaya variedad Maradol rojo, a los 30 días de cultivo.

Tipos de frasco de cultivo	Embriones germinados (%)
Cristal (250 ml)	90.7 a
Plástico (500 ml)	58.2 b
EE	±1.6

*Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según prueba de proporciones para $p \leq 0.05$

En el tratamiento donde se emplearon frascos de cultivo de cristal la germinación de los embriones somáticos se estimuló progresivamente, siendo el número de embriones somáticos germinados mayores que en los frascos de plástico. A los 10 días de cultivo comenzaron a observarse en los frascos de vidrio embriones somáticos con una coloración verde clara y elongación del eje hipocotilo, mientras que en los frascos de plástico demoró 20 días para que comenzara el proceso de germinación (Figura 4).

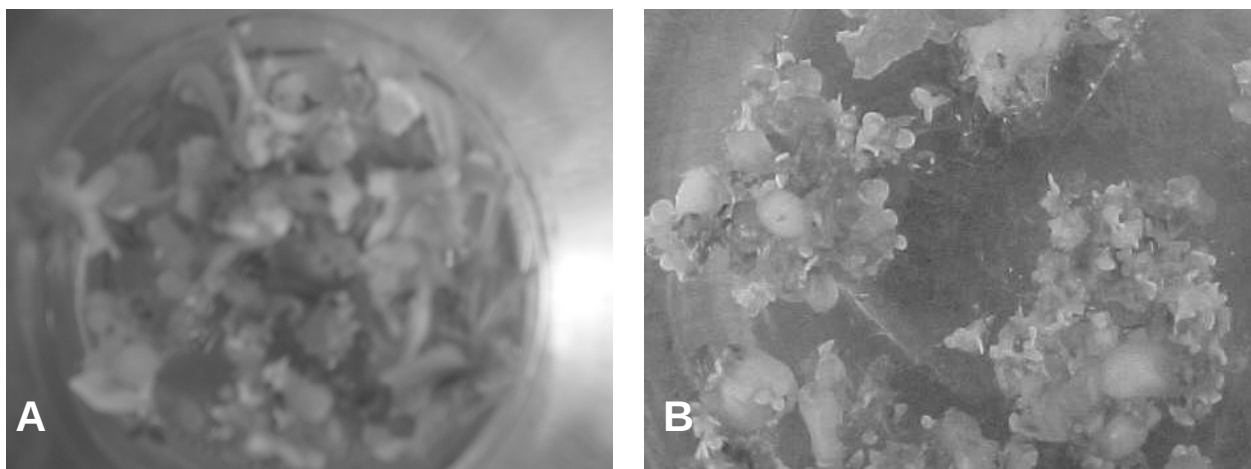


Figura 4: Respuesta de los embriones somáticos de papaya (*Carica papaya* L.) variedad Maradol rojo en medio de cultivo de germinación. (A) Embriones somáticos germinando en frascos de cristal de 250 ml de capacidad. (B) Embriones somáticos germinando en frascos de plástico de 500 ml de capacidad.

Este comportamiento puede ser explicado entre otras, por dos razones, la primera relacionada con la incidencia de la intensidad luminosa sobre el frasco de cultivo, donde los frascos de

plástico son menos transparentes y la luz incide con menor intensidad hacia el interior del mismo, lo que provocó la disminución del porcentaje de germinación de los embriones somáticos en los frascos de plástico con respecto a los frascos de cristal que mostraron los mejores resultados. La segunda razón por la posible influencia favorable de la atmósfera gaseosa en el interior de los frascos de vidrio que propició el mayor porcentaje de germinación de embriones somáticos. Este resultado fue referido también por Barbón (2002), quien demostró el efecto positivo del CO₂ sobre la germinación de los embriones somáticos pero de *Coffea arabica*.

Cabe señalar que durante el desarrollo de este experimento fue necesario realizar un segundo subcultivo en el mismo medio de cultivo de germinación, para completar el desarrollo de los embriones somáticos germinados y aumentar el porcentaje con la germinación de los embriones somáticos que no habían germinados. Se evidenció que en el caso de los frascos de vidrio, las plantas *in vitro* se elongaron ligeramente y hubo un mayor desarrollo de las estructuras formadas donde se observó la formación de pequeñas hojas pero sin mucho desarrollo del tallo (Figura 5). Resultados similares obtuvieron Posada (1995) y Gallardo *et al.* (2004) quienes refirieron haber realizados hasta tres subcultivos para lograr la germinación completa de los embriones somáticos.

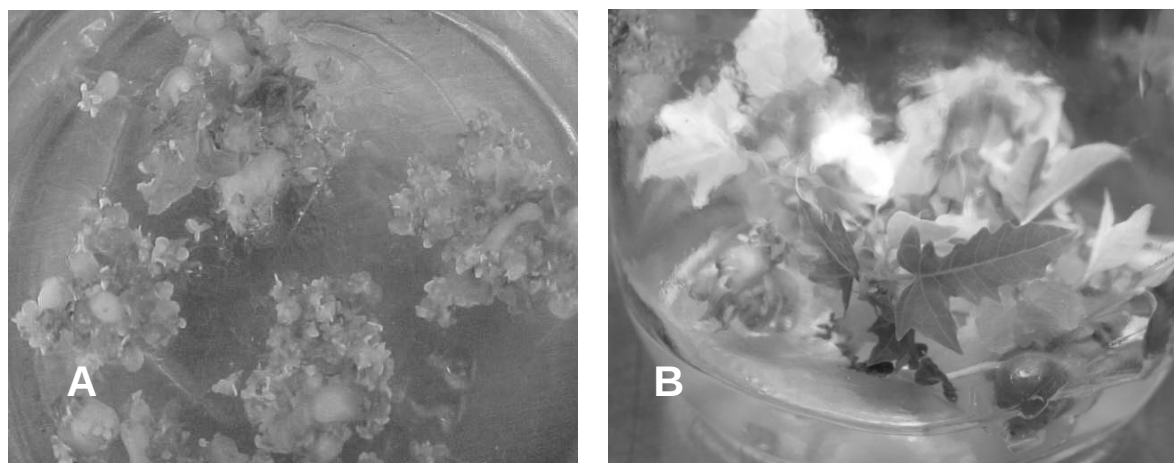


Figura 5. Respuesta de los embriones somáticos de papaya (*Carica papaya* L.) variedad Maradol rojo en medio de cultivo de germinación. (A) Embriones germinando en primer subcultivo (30 días de cultivo). (B) plántulas formadas en segundo subcultivo (60 días de cultivo).

En los frascos de vidrio las plantas *in vitro* se desarrollaron completamente, formando varias hojas verdaderas bien formadas (Figura 6), por lo que se tomó este tipo del frasco como el de mejores resultados.



Figura 6. Planta *in vitro* de papaya variedad Maradol rojo obtenida por embriogénesis somática en medio de cultivo de germinación.

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 7a). Por otra parte existió un desarrollo 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 7b). Debido a las características de esta fase donde se colocaron los explantes 10 días en medio de cultivo con auxina (AIB) y luego se subcultivaron a medio de cultivo sin regulador de crecimiento por un período de 20 días, le permitió a las plantas *in vitro* que alcanzaran un mayor tamaño (3-4 cm).

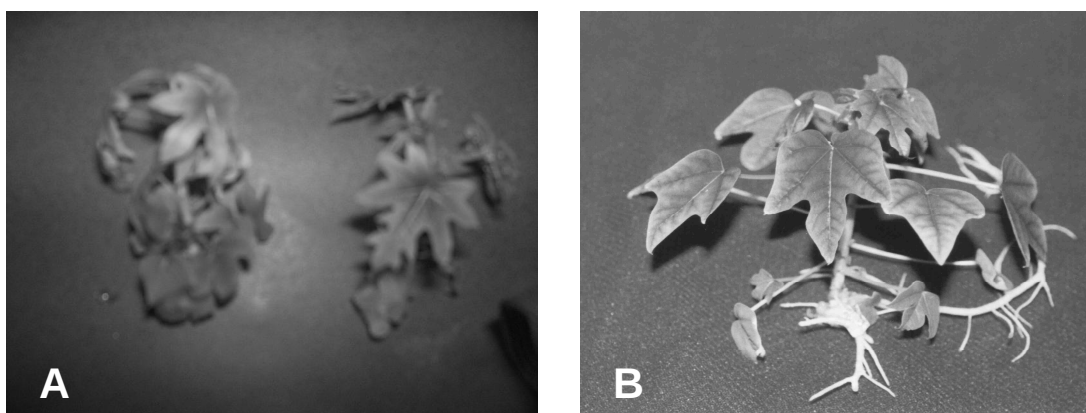


Figura 7. Plantas *in vitro* de papaya variedad Maradol rojo obtenidas a partir de embriones somáticos. (A) Plantas *in vitro* con 30 días de cultivo en medio de cultivo de crecimiento (B) Planta *in vitro* enraizada.

4.4. Conversión

4.4.1. Influencia del tipo de cobertor en la conversión.

Se logró la aclimatización de las plantas de papaya procedentes del cultivo *in vitro*, en ambas condiciones a los 30 días de cultivo. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos tanto en el número de hojas, como en el largo y número de las raíces. Al evaluar la supervivencia de las plantas se observó que no existieron diferencias significativas en cuanto a esta variable en ambas condiciones de aclimatización, obteniéndose porcentajes de 80 y 82%(Tabla 6).

Tabla 6. Respuesta de las plantas de papaya variedad Maradol rojo obtenidas a partir de embriones somáticos dos condiciones de aclimatización después de 30 días de cultivo.

Variables evaluadas	Cobertores		EE
	Frasco de cristal (250 ml)	Nylon y malla (1:100)	
Supervivencia (%)	82	80	
Número de hojas x planta	6.4 a	5.4 b	±0.15
Plantas con raíces	98 a	93 b	±1.1
Número de raíces x planta	4.3 b	6.3 a	±0.2
Presencia de raíz pivotante (%)	65.0	55.0	±0.16
Longitud de la raíz pivotante	2.8 b	3.7 a	

(1:100) Número de poro por cm²

*Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según prueba de proporciones para los datos expresados en por ciento y prueba de Duncan para número de hojas y raíces y longitud de la raíz principal para $p \leq 0.05$

Chen (1991) logró un 72% de supervivencia de las plántulas obtenidas de embriones somáticos. Gallardo (2003) logró un 71% de plantas aclimatizadas en condiciones de casa de cultivo, ambos autores utilizaron frascos invertidos sobre cada una de las plantas manteniendo los mismos durante los períodos de riego. Sin embargo cuando realizaron el estudio con las plantas sin cubrir con los frascos solo lograron que un 7.0 % superviviera. En la papaya resulta

fundamental y merece mayor atención mantener una alta humedad relativa (cámara húmeda) para lograr mayor éxito en la adaptación a las condiciones ambientales, estos autores refieren que con la utilización de los frascos encima de cada planta se logra que solo se humedezca el sustrato y de esta forma aumentar los porcentajes de plantas aclimatizadas.

Cuando se emplearon frascos de cristal como cobertor sobre las plantas de papaya se logró que el 98% de estas formaran raíces con diferencias significativas, con el tratamiento donde se empleó el cobertor de nylon, donde existió un 5.0 % de plantas que en el mismo período no desarrollaron raíces. A pesar de este resultado las plantas bajo cobertor de nylon y malla tuvieron igual porcentaje de supervivencia que las plantas cubiertas con el frasco de vidrio, es importante señalar que durante este período existieron plantas que se mantuvieron vivas aun sin la presencia de raíces, lo cual indica que las condiciones debajo del cobertor de nylon son factibles para la aclimatización en esta especie de plantas propagadas *in vitro*.

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a los valores de plantas con emisión de raíz pivotante. Lo fundamental en esta fase es que las plantas formen un buen sistema radical, debido a que su nutrición dependerá durante mucho tiempo y en gran parte de la efectividad de sus raíces, la presencia de raíces es fundamental en cualquier especie vegetal para lograr la supervivencia de las plantas cultivadas *in vitro* a condiciones de campo.

En las plantas de papaya independientemente de las condiciones de aclimatización se encontraron plantas que formaron raíz pivotante a lo largo del crecimiento. La papaya es una especie que presenta normalmente raíz pivotante, por lo cual la presencia de plantas con este tipo de raíz es muy importante ya que le permita un buen anclaje y lograr una buena conexión entre los ases vasculares de la raíz y del tallo (Figura 8).

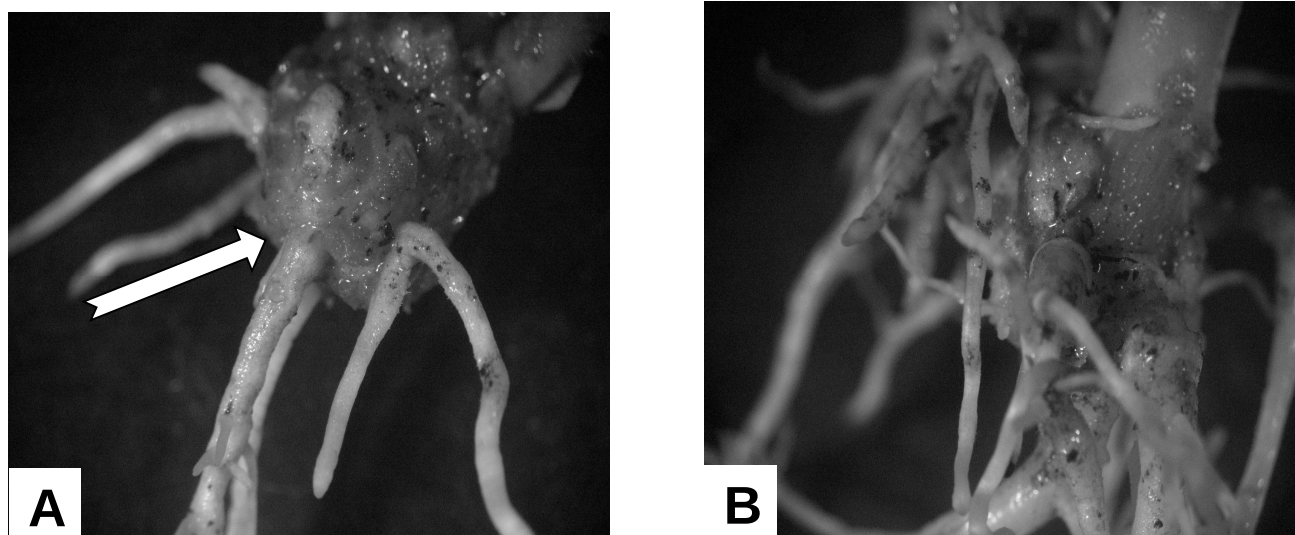


Figura 8. Sistema radicular de las plantas aclimatizadas en condiciones de casas de cultivo. (A) Planta con un sistema radicular con emisión de raíz pivotante. (B) Planta con un sistema radicular sin emisión de raíz pivotante definida.

Aunque existieron diferencias significativas entre el número de hojas, número de raíces por plantas y longitud de la raíz principal, entre las plantas aclimatizadas bajo frascos de cristal y en el cobertor de nylon y malla, estos factores no influyeron de forma significativa en los porcentajes de supervivencia.

Al comparar los resultados teniendo en cuenta las plantas que habían desarrollado raíz pivotante con las que no la formaron, se determinó que las plantas con emisión de este tipo de raíz tuvieron diferencia significativa en todas las variables evaluadas respecto a las plantas que no formaron este tipo de raíz (Tabla 7). Esto es algo positivo debido a que demuestra que las plantas que emitieron raíz pivotante lograron una mejor conexión entre los aces vasculares de la raíz y del tallo, permitiéndole a estas que lograran un mayor desarrollo de la parte aérea, logrando con ello que las plantas alcancen las condiciones requeridas para su transplante a campo en menor tiempo, ya que esto permite una mejor adsorción del agua por las raíces y su llegada a la parte foliar de la planta (Kataska, 1994).

Tabla 7. Respuesta de las plantas aclimatizadas en condiciones de casas de cultivo en cuanto a la emisión o no de raíz pivotante a los 30 días de cultivo.

Tipo de raíz	Altura de las plantas	Numero de hojas	Numero de raíces secundarias
Pivotante	3.1 a	6.8 a	6.4 a
Secundarias	2.4 b	4.9 b	4.1 b
EE ±	0.08	0.1	0.2

*Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según Duncan para $p \leq 0.05$

Se determinó que las plantas de papaya cultivadas *in vitro* lograron la aclimatización empleando un cobertor de nylon y malla que le permitió la supervivencia al inicio de la aclimatización aun sin la emisión de raíces, lo que demuestra que bajo estas condiciones pueden ser aclimatizadas las plantas de papaya sin la utilización del frasco encima de cada una de ellas.

Durante el desarrollo de las plantas en la fase de aclimatización hasta los 60 días (Figura 9), no se observaron cambios morfológicos, tales como, cambio de coloración de las hojas y el tallo. Esto no excluye la existencia de variación genética en estas plantas, sino que en esta fase no fue posible detectarla. Por otra parte, las plantas que emitieron raíz pivotante tuvieron un mayor desarrollo del área foliar dado por los factores evaluados (altura de la planta, numero de hojas y número de raíces secundarias).

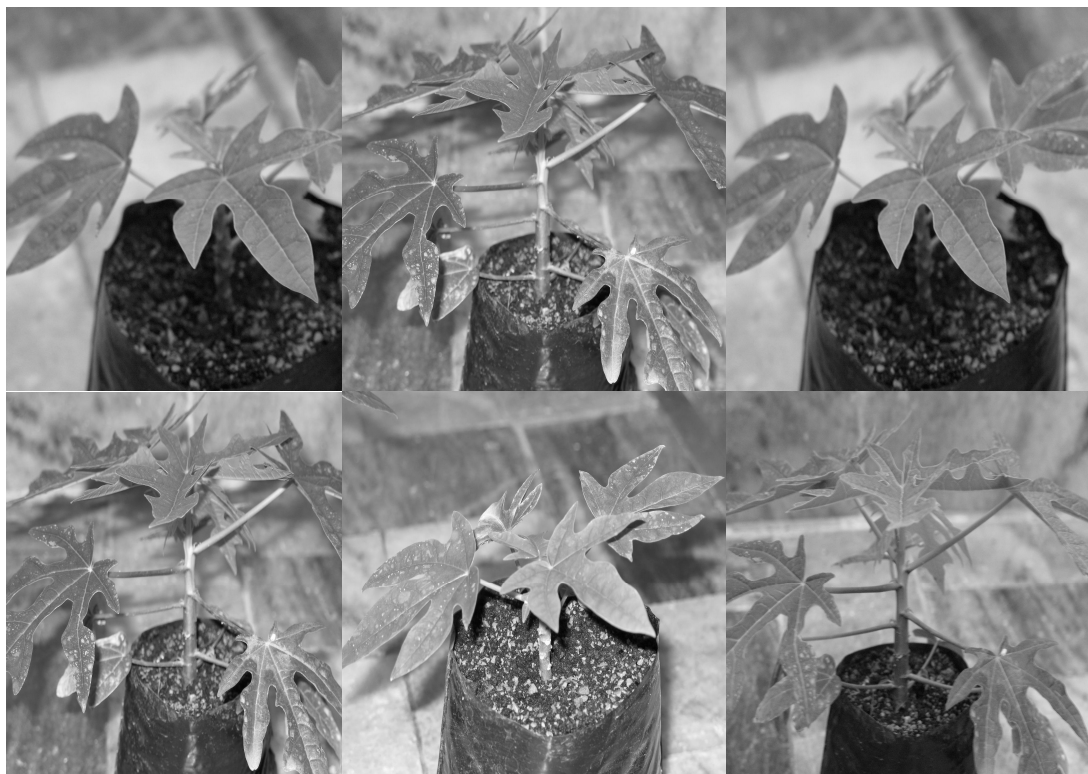


Figura 9.Aspecto de las plantas de papaya variedad Maradol rojo procedentes de la embriogénesis somática, a los 60 días de plantadas en la fase de aclimatización.

4.4.1. Influencia de la altura de las plantas *in vitro* en la conversión.

La altura de las plantas tuvo efecto significativo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro* en condiciones de casa de cultivo, existiendo diferencias significativas en cuanto a todas las variables morfológicas evaluadas (altura de la planta, número de hojas, y presencia de raíz pivotante). El tratamiento donde se obtuvieron los mejores resultados fue al utilizar plantas con 3 cm de altura (tabla 8), lo cual indicó que es de gran importancia que las plantas *in vitro* tengan un adecuado tamaño para el buen desarrollo de las mismas durante la fase de aclimatización (Singha *et al.*, 1995; Dottin, 2000; Gnanam, 2004).

Tabla 8. Influencia de la altura de las plantas *in vitro* en la aclimatización de plantas de papaya vía embriogénesis somática de la variedad Maradol rojo a los 60 días de cultivo.

Altura de las Plantas (cm)	Supervivencia (%)	Altura de las plantas	Número de hojas	Presencia de raíz (%)	Presencia de raíz pivotante
1	25 c	1.24 c	3.0 c	20.0 c	0.0 c
2	60 b	2.56 b	3.9 b	75.0 b	77.7 b
3	85 a	5.2 a	5.0 a	88.2 a	93.3 a
EE±	4.8	0.05	0.1	4.5	3.2

*Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según prueba de proporciones para los datos expresados en por ciento y prueba de Duncan para número de hojas altura de la planta para $p \leq 0.05$.

En relación con el porcentaje de supervivencia las plantas con 3 cm de altura alcanzaron el mayor valor (85%), las cuales se diferenciaron significativamente de las plantas con 2 cm de altura (60%) y estas a su vez con las de 1 cm que alcanzaron el menor valor (25%). Este aspecto se hace particularmente importante en este cultivo, ya que esta fase es considerada como la etapa más crítica en el proceso de propagación *in vitro* de estas especies. Al respecto, Palhares *et al.* (2004) señalaron que la calidad del material vegetal *in vitro* tiene gran influencia en el porcentaje de supervivencia *ex vitro*. Gallardo (2003) logró un 72% de supervivencia de las plántulas obtenidas de embriones somáticos, resultados inferiores a los del presente trabajo y en su caso utilizó un frasco de vidrio invertido sobre cada planta, para mantener la humedad relativa alta.

Con respecto a la altura que alcanzaron las plantas a los 60 días de cultivo, también se observaron diferencias significativas entre las diferentes plantas evaluadas, obteniéndose los mayores valores en las plantas que poseían un mayor tamaño procedentes del cultivo *in vitro* (Figura 10)

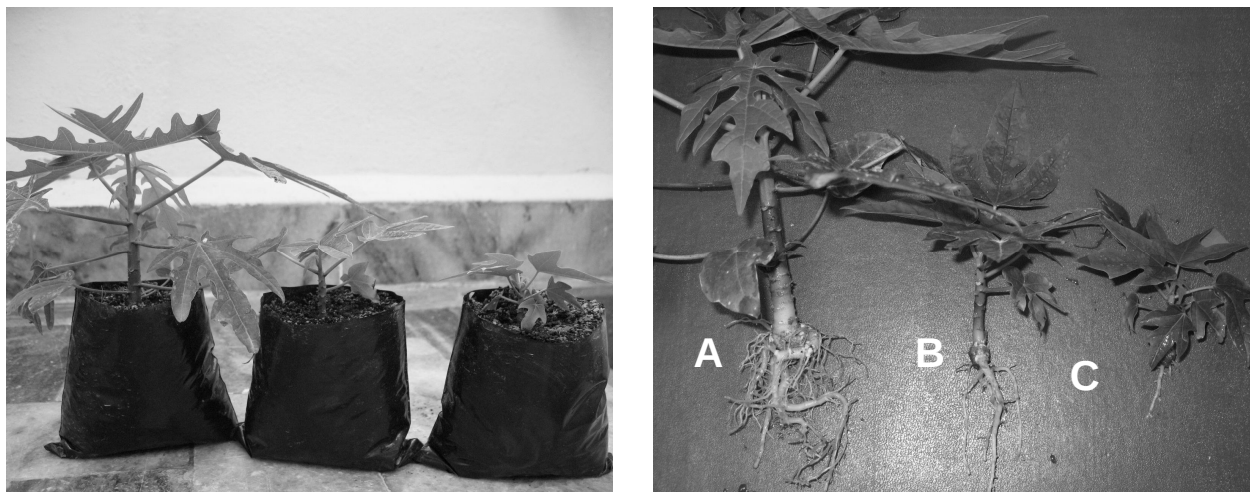


Figura 10. Aspecto de las plantas de papaya obtenidas de embriogénesis somática variedad Maradol rojo a los 60 días de cultivo en la fase de aclimatización. (A) Plantas cultivadas *in vitro* que iniciaron la aclimatización con 3 cm, (B) plantadas con 2 cm y (C) plantadas con 1 cm.

Al evaluar el número de hojas por plantas y el número de plantas enraizadas también se observaron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados, se obtuvo el mejor resultado en las plantas que poseían 3 cm de altura, lográndose una media de 5 hojas por plantas y un 88.2% de plantas con raíces respectivamente, aspecto que repercutió al final del proceso (Figura 10). Estos resultados avalan los obtenidos por (Gallardo, 2004; Cruz, 2007) quienes lograron más del 85% de plantas de papaya enraizadas empleando plantas con 3-5 hojas en crecimiento activo y altura promedio de 3 cm, pero utilizando como cobertor frascos de cristal encima de las plantas.

Las plantas que fueron trasferidas a la fase de aclimatización con 3cm de altura, a los 60 días alcanzaron una altura de 10-12 cm y emitieron de 5-7 hojas, estando listas para el transplante a condiciones de campo según Posada (1995) quien utiliza como vía de propagación la embriogénesis somática y certifica las plantas listas para su traslado a campo con características similares (Figura 11). Las plantas con menos de 3cm de altura aunque sobrevivieron y enraizaron, a los 60 días de cultivo no se encontraban listas para ser trasferidas a campo. Las plantas respondieron muy bien a la aplicación de la fertilización de forma foliar,

tomando una consistencia vigorosa y mostrando hojas de color verde intenso. Resultados similares obtuvo Gallardo (2003), en la aclimatización del híbrido cubano de Papaya IBP 42-99 pero utilizando frascos de vidrio encima de las plantas de papaya.



Figura11. Planta de papaya variedad Maradol rojo lista para ser trasladada a campo a los 60 días de cultivo.

Con este experimento se demostró que la altura de las plantas *in vitro* tienen influencia en el desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro*, por lo cual debe tenerse en cuenta este parámetro y que sean seleccionadas las plantas *in vitro* con la altura promedio adecuada en la fase anterior, para ser transferidas a la fase de aclimatización.

Los diferentes estudios realizados con el cultivo de la papaya variedad Maradol rojo y los correspondientes resultados obtenidos en esta investigación permiten proponer un protocolo para la embriogénesis somática a partir de las embriones cigóticos inmaduros (ver anexo 1). Este protocolo puede ser aplicado como una alternativa para la propagación masiva de este cultivo.

Conclusiones

- ❖ Se demostró que la época del año para la colecta de los frutos inmaduros no tuvo influencia en la formación de embriones somáticos, sin embargo al emplear frascos de vidrio se alcanzó un 63.7% de embriones cigóticos que desarrollaron embriones somáticos en papaya variedad Maradol rojo.
- ❖ Fue posible lograr los mayores valores (12.8 ± 0.2) en el coeficiente de multiplicación de los embriones somáticos obtenidos al emplear como medio de cultivo el 50% las sales MS suplementadas con 5 mg.l^{-1} de 2,4-D y utilizando ocho grupos de embriones somáticos por frascos de cultivos.
- ❖ Se alcanzó un 90.7% de germinación de los embriones somáticos al emplear frascos de cultivo de vidrio a los 30 días de cultivo
- ❖ Se determinó que las plantas de papaya cultivadas *in vitro* lograron la aclimatización empleando un cobertor de nylon y malla que les permitió alcanzar un 80% de supervivencia al inicio de esta fase aun sin la emisión de raíces.
- ❖ Se comprobó que la altura de las plantas *in vitro* (mayores de 3 cm) y la presencia de raíz pivotante tienen influencia en el desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro*, por lo cual debe tenerse en cuenta estos parámetros en la selección de las plantas *in vitro* para ser transferidas a la fase de aclimatización.
- ❖ Se estandarizó un protocolo para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros en papaya variedad Maradol rojo.

6. Recomendaciones

- ❖ Emplear el protocolo de trabajo estandarizado como una vía alternativa para la propagación masiva de plantas de papaya variedad Maradol rojo.
- ❖ Realizar otros estudios que permitan dilucidar la influencia de la atmosfera gaseosa específicamente el CO₂, sobre el proceso de embriogénesis somática en la fase de formación de embriones somáticos de papaya.
- ❖ Evaluar la respuesta en condiciones de campo de las vitroplantas procedentes de embriones somáticos.

7. Bibliografía

1. 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.
2. Acuña LE. (2005) El cultivo de Mamón (*Carica papaya*) [en línea]
3. 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]
4. 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
5. Ammirato; P.V.1993.Embryogenesis,S.In:Evans, D. A.; Sharp,.W. R.; Ammirato,P V.;Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant dell culture. Vol. 1: Techniques for propagation and breeding. Macmilland Publishing Co. New York, Collier Macimilland Publishers London. Pp.182-123.
6. 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.
7. 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
8. 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,
 9. Banergee, 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
 10. 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
 11. Biddington, N.L 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Reg.* 11:173-187
 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. Brar, DS, Khush G S (1994) Cell and tissue culture for plant improvement. En: Basra, A (ed.) *Mechanisms of plant growth and improved productivity: Modern approaches*, pp. 229-278. Marcel Dekker. New York
 14. Borbón, R (2003) Aspectos relacionados con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* Vol. 3. No.4:211-221
 15. Cabrera-Ponce J L, Vegas-García A, 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

16. Cabrera-Ponce, J, Vegas A, Herrera L (1995) Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Report* 15: 1-7
17. Cai, W, Gonsalves C, Tennant P, Fermin G, Souza M, Sarindu N, Jan FJ, Zhu HY, Gonsalves D (1999) A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 35: 61-69
18. Canhoto, J M, López M L y CruzG S (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L). *Plant Cell Tiss. Org. cult* 57: 13-21.
19. Caro, Y, Villeneuve P (2000) Investigation of crude latex from various *Carica papaya* varieties for lipid bioconversions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77(8): 891-901
20. 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.
21. Castillo, B, Smith M A L, Yadava U L (1998) Liquid system scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73 (3):307-311
22. Castillo, B, Smith M A L, Yadava U L (1998) Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. *Plant Cell Reports* 17: 172-176
23. Cabrera (2004) Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la multiplicación de segmentos nodales de *Dioscorea alata* L. en el clon 'Pacala Duclos'. *Biotecnología Vegetal* Vol. 4. No.1.2004.
24. 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.

25. Chan, L.K., Teo CKH (2002) Micropropagation of Eksotika, a Malaysian papaya cultivar and the field performance of the tissue culture derived clones. *Acta Hort.* 575: 99-105
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. Cruz, (2007) Evaluación de la respuesta a la inoculación con el Virus de la Mancha Anular de la Papaya de plantas transgénicas de papaya (*Carica papaya* L.) variedad Maradol roja en condiciones semicontroladas. Tesis presentada al título académico de Magíster Scientiae Agricultura Sostenible Mención Sanidad Vegetal.
28. 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. *Biotechnología vegetal y Agricultura sostenible Resúmenes evento*, 133 - 215. *Culture*, Dordrecht, 12(3): 305-310.
29. Drew, R.A. (1988). Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field-grown trees. *HortScience* 23: 609-611
30. Elder, R J, 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*. 40(5): 739-746
31. Ducos, J.P.; Zamarripa, A.; Eskes, A.; Pétiard, V. 1993. Production of somatic embryos of coffee in a bioreactor. In: 15^{ème} Colloq. Sci. Int. Café. Montpellier, 6-11 june. ASIC Paris: 86-96
32. Dottin, MP (2000) Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schoff) Tesis presentada en opción al grado científico de doctor

- en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 119 p.
33. Elizondo A (2002) Mercado Internacional de la Papaya. BOLETIN N° 1. [en línea] En: <http://www.mercanet.cnp.go.cr> [Consulta: 8 de abril 2005]
34. En: http://www.inta.gov.ar/montecarlo/info/documentos/alternativos/cultivo_mamon.pdf [consulta: 6 de Diciembre 2005]
35. 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.
36. FAO (2005) 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].
37. 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.
38. Fitch, M, Moore P, Leong T (1997) Progress in transgenic papaya research: transformation for broader resistance among cultivars and micropropagating selected hybrid transgenic plants. Proceedings of Int. Symp. Biotechnology of Tropical and Subtropical species. Queensland, Australia. 29 september–3 october.
39. Fitch, MM, Leong T, Akashi L., Yeh A., White S., De la Cruz A, Santo, L, Ferreira S, Moore PH (2005) Growth and yield of clonally propagated and seedling-derived papayas. i. growth. ii yield. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 40(5): 1283-1290

40. 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.
41. Fujit, S D, Olsen R, Ruzin S y Redenbough K (1990) Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Science* 72: 93-97.
42. Gallardo J, Posada L, Gómez R, Más L, Reyes M y Herrera I. (2002) Micropropagación del híbrido cubano de papaya IBP 42-99. *Biotechnología vegetal* 2(4):211-215.
43. Gallardo, J, Kosky R, Tejeda M, Posada L, Herrera I, Reyes M, García L, Freire M (2004a) Empleo de secciones de tallo de plantas *in vitro* de papaya (híbrido IBP 42-99) para obtener callos con estructuras embriogénicas. *Biotechnología Vegetal* 4(4): 213-216
44. Gómez, R K (1997) Curso teórico-práctico de propagación masiva de plantas. Instituto de Biotechnología de Las Plantas. Cuba.
45. González, G, Alemán S, Barredo F y Robert M L (2002) Embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem. *Biotechnología vegetal*. Vol. 2: 3–8.
46. 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.
47. González, ME,(2005) Influencia de la época del año y el genotipo en la respuesta morfológica y bioquímica de explantes foliares de *Coffea canephora* P. var. Robusta empleados para la formación de callos. *Biotechnología Vegetal* Vol. 5. No.2: 121 - 119
48. 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.

49. Gnaman, R (2004) Micropropagation of mulberry using shoot tip (or) nodal segments. Proceedings of Indian Academy.
<http://tnau.ac.in/cpps/productive/sericulture/0105.htm>
50. 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.
51. 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.
52. Guerra, M P, Pescador R, Dal Vesco L L, Nodari R O y Duccroquet J P (1997) *In vitro* morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: Somatic embryogenesis and plant regeneration. Acta Horticulturae, 452:27-36.
53. Hossain, M, Rahman N, Islam S, Joarder O (1993) High efficient plant regeneration from petiole explants of *Carica papaya* L. through organogenesis. Plant Cell Reports 13: 99-102
54. hu, YJ, Agbayani P, Moore H (2004) Green Fluorescent protein as a visual selection marker for papaya (*Carica papaya* L) transformation. Plant Cell Rep. 22: 660-667
55. 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.
56. Jordan, M y Velozo J (1996) Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 44: 189-194.

57. Jordan, M, Velozo J (1996) Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 44: 189-194
58. Kataoka I e Inoue H (1987) Studies on the clonal propagation for tropical and subtropical fruit trees by tissue culture. I. *In vitro* propagation of papaya. *Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kagawa University.* 38:7-10
59. Khan, S A y Iqbal J (2000) Polyclonal-antibody-mediated insolubilization and stabilization of papain. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* Departament of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Aligarh Muslim University. India. 32(2): 89-94.
60. Kitto, S L (1997) Commercial micropropagation. *Hort. Science.* Vol. 32(6):310-325.
61. 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.
62. Kozai T, Kitoya Y, Kubota C, Kobayashi R, Watanabe S (1996) Optimization of photoautotrophic micropropagation conditions for sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) plantlets. *Acta Hort.* 440: 566-569
63. Lai, C C, Yeh S D (2000) Enhancement of papaya axillary shoot proliferation *in vitro* by controlling the available ethylene. *Botanical Bulletin of Academia Sinica Taipei.* 41(3): 203-212
64. 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.

65. Mahan, R E, Bateson M F, Chamberlain D A, Higgins C M, Drew R A, Dale J L (1996) Transformation of an Australian variety of *Carica papaya* L. using microprojectile bombardment. Aust. Plant Physiol23: 679-685
66. 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
67. McCown B (1988) Adventitious rooting of tissue cultured plants. P. 289-302. In: Adventitious root formation in cutting. (Davis, T. D., Haissig, B. E. and Sankhla,
68. 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
69. Merkle, S. A.; Parrot, W. A.; Flinn, B. S. 1995. Morphogenic aspect of somatic embryogenesis. In. Thorpe, T. A.(ed), In vitro embryogenesis in plants:155-230.
70. MINAGRI (2005) Instructivo técnico para la producción de semillas de papaya en Cuba. La Habana.
71. Micropropagación del híbrido Cubano de Papaya IBP 42-99. Biotecnología Vegetal Vol. 2. No.4.2003.
72. Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 437-497
73. Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 437-497.
74. Nash, D T y Davies M E (1972) Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet rose cell suspensions. J. Exp. Bot.23: 75-91.
75. Nitsch, J P y Nitsch C (1969) Haploid plant from pollen grains. Science 169: 85-93. N. eds.). Dioscorides press. Oregon. US.

76. Otero (2003) Maradol Roja certificada [en linea] en:
<http://www.semilladelcaribe.com.mx/paginas/tecno.htm>> [consulta: 8 diciembre 2005].
77. Otero (2003) Maradol Roja certificada [en linea] en:
<http://www.semilladelcaribe.com.mx/paginas/tecno.htm>> [consulta: 8 diciembre 2005].
78. Parrot, T W (1993) Biotechnology applications for banana and plantain impruvment. Reunión INIBAP. San José, Costa Rica. Proceedings.INIBAP
79. Parrot, W (1993) Cell culture techniques. En: Proceedings of the worshop on biotechnology applications for banano and plantain improvement. Reunion INIBAP (1992, San José, Costa Rica) Montpellier, France.Pp: 183-191.
80. Parrot, W (2002) La embriogénesis somática en las angiospermas. Resúmenes. VI Simposio Internacional en Biotecnología Vegetal. IBP.
81. Pahlares, GA, R Rodríguez, M Cid, D Pina y JL González (2004) Efecto de un análogo de brasinosteroides (MH5) en la propagación de *Eucalyptus urograndis* en biorreactores de inmersión temporal. Cultivos Tropicales. 25(1): 39-44
82. Pestano, B (2001) El cultivo de la papaya [en linea] En:
<<http://www.gacicuba.net/Pestano6.htm>> [consulta: 6 diciembre 2005].
83. 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.
84. Pons, M (2001) Transformación genética de papaya (*Carica papaya* L.) mediante biobalística. Tesis en opción al grado academico de magíster Scientiae. IBP. UCLV. Cuba.

85. Posada L, Gómez R, Gallardo J, Reyes M, Herrera I (2004) Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas de campo del híbrido cubano de Papaya IBP 42-99. *Biotecnología Vegetal* 4(3): 153-158
86. Posada, L (1995) Desarrollo de la embriogénesis somática en la fruta bomba (*Carica papaya* L). Trabajo de Diploma. UCLV. Santa Clara.
87. Posada L (2007) Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la papaya (*Carica papaya* L.) *Biotecnología Vegetal* 7(2)
88. Pires de Almeida E, Pedroso de Oliveira R, Loyola J. (2000) Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 35(10):2017-2024
89. Rajeevan, S M y Pandey, R M (1986) Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ culture* 6: 181-188
90. Radice S, 2004, *Morfogénesis in vitro*. En Echeniqye V, Rubinstein C, Mroginski L, *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Buenos Aires: Ediciones INTA, 2004. 446p.
91. 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.
92. Redembaugh, H (1986) Analogs of botanic seeds. United States Patent. 4: 562-568
93. Reinert, J (1958) Über die konholle der morphogenesis und die induction von adventiven bryomen und gewebeulturen aus kastofel. *Planta* 58: 318-333.
94. Reuveni, O, DR Shlesinger, U Lavi (1990) *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2: 41-46

95. 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.
96. Rodríguez, M, Galán, V, Espino de Paz, Ana I (1995a) Técnicas de cultivo de la papaya en Canarias. En: Cuaderno de divulgación de la Consejería de Agricultura y Alimentación de Canarias, pp. 3-23. LITOMAYPE S.A. España
97. Ronse, D L P, Smets E F (1999) The floral development and anatomy of *Carica papaya* (Caricaceae). Canadian Journal of Botany. 77(4): 582-598
98. 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.
99. Schoof, H (1997) the original of embryogenic cell in musa. Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium. P: 257.
100. Schoof, H (1997) the original of embryogenic cell in musa. Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium. P: 257.
101. Senaratha, t, Makersie B y Bowlerly S (1990) Artificial seeds of alfalfa *medicago sativa* L. induction of desiccation tolerance in somatic embryos. In vitro Cell Dev. Biol. 3: 16-85.
102. Sharp, W, Evens D, Ammirato P y Yamada Y (1983) Plant Cell and Tissue culture. Principles and Applications. Ohio State University.Press. p: 892.
103. Sierra, S (2003) Cultivo de papayo [en línea] En: <<http://www.infojardin.com/Frutales/fichas/papayos-cultivo-papayo.htm>> [consulta: 6 de Diciembre 2005]
104. Steward, FC, Mapes MO y Smith J (1958) Growth and organized development of culture cells. American journal of Botany 45: 693-704.

105. Stuart D.A. Y Strickland, S. G(1984) Somatic embryogenesis from cell culture of *Medicago sativa* 2. The interaction of amino acids. *Plant Sci. Lett.* 34. 175.
106. Van Minh, T, Tuong B T (2001) Manipulation of embryogenesis and organogenesis culture for papaya (*Carica papaya* L.) improvement and development in Vietnam: mass seedlings micropropagation via organogenesis culture. Plant and Animal Genome. IX Conference. January 13-17, 2001. Town y Country Hotel, San Diego, CA
107. 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.
108. Vasil, I K (1994) Automatic in plantpropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 39 (2): 105-108.
109. 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.
110. 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.
111. Villalobos, V, Thorpe T (1991) Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca WM, Mroginski LA (Eds) *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, pp. 127-141. CIAT, Cali
112. Wilson, J P (1996) Multiplication rates *in vitro* and by stem cutting propagation, and clonal development from *Eucalyptus globulus* seeding. *Forest Science* 42: 415 – 418
113. Winnaar W (1998) Clonal Propagation of papaya *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ*

114. 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.
115. Yu, T A, Yeh S D, 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

ANEXO 1

PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE LA PAPAYA VARIEDAD MARADOL ROJO A PARTIR DE EMBRIONES CIGOTICOS INMADUROS.

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE TRABAJO.

MATERIAL VEGETAL

Como material vegetal inicial se emplean frutos inmaduros (90-120 días después de la antesis) de la variedad de papaya Maradol rojo procedentes de flores hermafroditas elongatas, obtenidos a partir de plantas de campo, la toma de los frutos puede realizarse durante todo el año.

1. FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Los frutos son lavaron dos veces con agua destilada estéril, se secan en la cabina de flujo laminar y se procede a abrirlos con ayuda de una cuchilla, se extraen las semillas y se cortan con el auxilio de bisturí No. 11 y pinzas curvas para obtener los embriones cigóticos inmaduros (Figura 1).

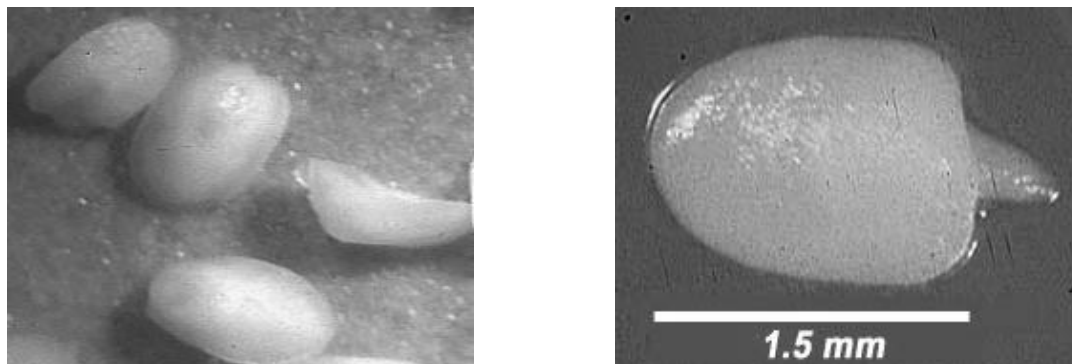


Figura 1. Semillas y embrión cigótico inmaduro de papaya variedad Maradol rojo.

Estos son colocados en frascos de cultivo de vidrio de 250 ml de capacidad, implantando cuatro embriones por frasco de cultivo, el cual contiene 30 ml de medio de cultivo semisólido compuesto por el 50% de las sales MS, suplementadas con 5 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 30 g.l⁻¹ de sacarosa. Los frascos de cultivo con los embriones se colocan en cámara de cultivo en oscuridad total y temperatura de 27±2 °C. A los 5

días de cultivo los embriones cigóticos comienzan a abrir las hojas cotiledonales y a partir de los 20 días se observan embriones somáticos en la zona apical de los mismos. Los embriones somáticos formados se encuentran en etapa globular y presentan una coloración amarillo claro (Figura 2).

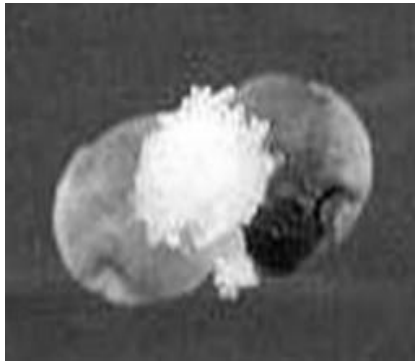


Figura 2. Embriones somáticos obtenidos a partir de embriones cigóticos de papaya variedad Maradol rojo a los 45 días de cultivo.

2. MULTIPLICACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS

Para esta fase se emplea el medio de cultivo compuesto por el 50 % de las sales MS, 5 mg.l⁻¹ de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 60 g. l⁻¹ sacarosa. El medio de cultivo es solidificado con agargel a razón de 5 g.l⁻¹.

Manejo del material:

Se toman pequeñas masas de embriones somáticos en etapa globular, formadas por grupos de 10 – 15 embriones somáticos y se colocan en frascos de cultivo de vidrio de 250 ml de capacidad. Se deben colocar los explantes en los frascos de cultivo de acuerdo a la cantidad añadida de medio de cultivo por explante (0.5 ml/embrión), en frascos de cristal de 250 ml con 30 ml de medio de cultivo deben colocarse 8 grupo de embriones somáticos, en dependencia de las dimensiones del frasco se puede incrementar o disminuir la densidad de explantes por frasco.

- Los subcultivos se realizarán cada 30 días.
- Los frascos de cultivo se colocarán en cámara de cultivo en oscuridad total y temperatura de 27 ± 2 °C.
- El coeficiente de multiplicación esperado es: 5.0 - 12.0. (Figura 3)

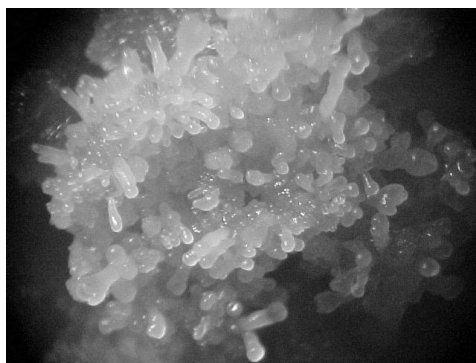


Figura 3. Embriones somáticos de papaya en medio de cultivo para la multiplicación a los 30 días de cultivo

3. GERMINACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS

Para la fase de germinación se emplea el medio de cultivo compuesto por el 50% de las sales MS, 0.5 mg.l^{-1} de 6-BAP, 0.06 mg.l^{-1} de vitamina B₂, 20 g.l^{-1} de sacarosa y 5 g.l^{-1} de agargel.

Los embriones somáticos en etapa torpedo y cotiledonal se colocan en frascos de cultivo de vidrio de 250 ml de capacidad (Figura 4). Los mismos son colocados sobre la superficie del medio de cultivo.

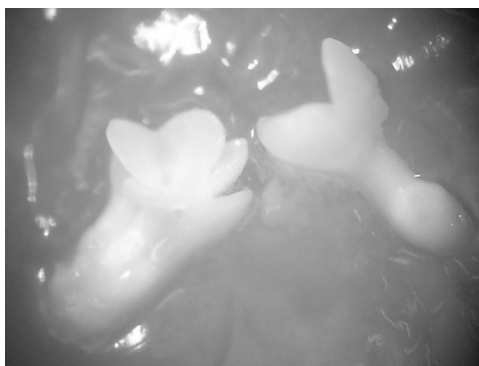


Figura 4. Tipos de embriones somáticos empleados para la germinación

A los 10 días de cultivo comienzan a observarse embriones somáticos con una coloración verde clara y elongación del eje hipocotilo (Figura 5)

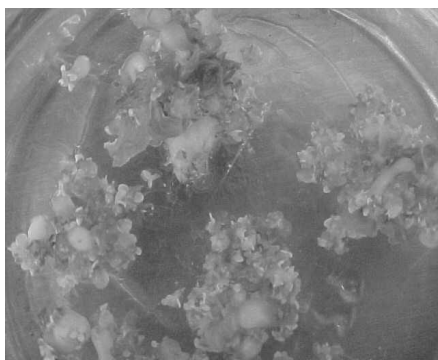


Figura 5. Embriones somáticos en medio de cultivo para la germinación (primer subcultivo)

- Deben colocarse 10 embriones por frasco de cultivo de vidrio de 250 ml de capacidad.
- Con el objetivo de terminar el crecimiento y desarrollo de las plantas ya formadas, a las 4 semanas es necesario realizar un segundo subcultivo, en el mismo medio de cultivo, separando los embriones que no han germinado o que tienen un pequeño desarrollo de la plántula. Es necesario eliminar el callo basal formado antes de ser colocadas en el medio de cultivo fresco, ya que dicho callo impide el normal desarrollo de las plántulas (Figura6)
- Los subcultivos se realizarán cada 30 días (2 y hasta 3 subcultivo)
- Se colocarán en cámara de cultivo con luz solar con un flujo de fotones de $48\text{--}62.5 \text{ mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y duración máxima y mínima del período luminoso de 13 horas y 34 minutos y 10 horas y 41 minutos respectivamente y una temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- El porcentaje de germinación esperado está: 90.0 – 95.0%



Figura 6. Plántulas de papaya a los 60 días de cultivo en medio de germinación

4. ELONGACIÓN DE LAS PLANTULAS OBTENIDAS DE LOS EMBRIONES CIGÓTICOS

Las plantas obtenidas a partir de la germinación de los embriones somáticos, se colocan en medio de cultivo de elongación, el cual contiene las sales MS suplementadas con 0.25 mg.l^{-1} de ANA y 0.25 mg.l^{-1} de 6-BAP. Se adiciona 30 ml de medio de cultivo por frasco de cultivo de vidrio de 250 ml de capacidad. Posteriormente las plántulas son colocadas de forma individual a razón de 5 por frasco. Las condiciones de cultivo son cámaras de luz solar con un flujo de fotones de $48\text{-}62.5 \text{ mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y duración máxima y mínima del período luminoso de 13 horas y 34 minutos y 10 horas y 41 minutos respectivamente y una temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Obteniéndose plántulas a las 3 semanas con una altura entre 2-4 cms y más de 4 hojas trilobadas.

5. ENRAIZAMIENTO DE LAS PLANTULAS.

Posterior a las cuatro semanas de cultivo las plantas se transfieren a un medio de cultivo de enraizamiento, compuesto por el 50% de las sales MS y suplementadas con 5 mg.l^{-1} de AIB, se adiciona 30 ml de medio de cultivo por frasco y se colocan 5 plantas por cada uno, a las cuales es necesario quitar el callo basal para que puedan enraizar, en este medio de cultivo permanecen durante 10 días para inducir la formación de raíces, pues a partir de este tiempo ocurre una caída casi total de las hojas. Luego se subcultivan a un medio de cultivo compuesto por sales MS sin reguladores de crecimiento por espacio de 20 días. A las 4 semanas más del 80% de las plántulas formarán raíces con pelos absorbentes, estando listas para ser transferidas a

condiciones ambientales de aclimatización. Las raíces presentan una coloración blanca y alcanzan una longitud de 5 cm como promedio, Además, presentan una amplia ramificación de raíces secundarias (Figura 7).

- Los subcultivos se realizarán cada 30 días.
- Las condiciones de cultivo son cámaras de luz solar con un flujo de fotones de $48-62.5 \text{ mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y duración máxima y mínima del período luminoso de 13 horas y 34 minutos y 10 horas y 41 minuto respectivamente y una temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

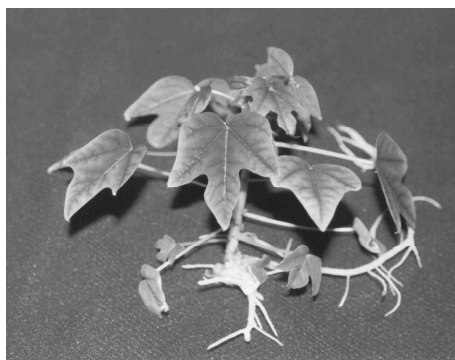


Figura 7. Planta *in vitro* de papaya variedad Maradol Rojo enraizada a los 30 días de cultivo.

6. CONVERSIÓN.

Las plantas deben ser trasferidas a condiciones de casa de cultivo con no menos de 3 cm de longitud

Contenedores: Bandejas de polieturano de 70 alvéolos con 120 cm^3 de volumen cada una.

Sustrato: 70% de MO y 30% de zeolita, desinfectada antes de realizar la plantación de las vitroplantas

Sistema de Riego: Por aspersión

- Riego de 5 segundos de duración con una frecuencia de 10 minutos durante los primeros siete días
- A partir del séptimo día se le aplica un riego de 5 segundos de duración con una frecuencia de 30 minutos durante diez días.
- Riego de 30 segundos una vez al día(10 AM)

Trasplante: A los 30 días de cultivo se realiza el trasplante a bolsa plásticas de color negro, agujereadas, de 15 cm de alto, 7 cm de diámetro.

Temperaturas: De 26 a 30 °C

Humedad relativa promedio: 80%

Atenciones culturales y control fitosanitario.

Fertilización: Se efectuó con fórmula completa 8-13-21 con una concentración de 1g por cada 1 litro de agua de riego.

Control de hongos y bacterias: Se realizaron aplicaciones diarias de fungicidas a una concentración de 1.6 g.l⁻¹ de Fundazol, 1.6 g.l⁻¹ de Marcozeb, 3.2g.l⁻¹ de Chupaflor después del último riego. Estas aplicaciones se realizaron de forma preventiva.



Figura 8. Plantas de papaya obtenidas de embriones somáticos en condiciones de casa de cultivo con 60 días de crecimiento listas para su plantación en campo.