



TRABAJO FIN DE MÁSTER

“Protocolo para la propagación in vitro de *Carica papaya* var. Sweet sense”

Autor: Jose Miguel Perals Fernandez

Tutores: Maria Trinidad Angosto Trillo
Fernando J. Yuste Lisbona

MASTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA.

ESPECIALIDAD: BIOAGRONOMÍA Y BIOTECNOLOGÍA DE LOS

ALIMENTOS

Facultad de Ciencias Experimentales
UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
Curso Académico: 2017/2018

Almería, Septiembre de 2018



RESUMEN

La papaya es una especie trióica, donde encontramos individuos con flores masculinas, femeninas o hermafroditas, siendo estas últimas las de mayor valor comercial. La variedad Sweet sense, de gran importancia económica, ha incrementado su producción en los últimos años en el sudeste español. Su progresiva evolución ha hecho necesaria la obtención de un gran número de plantas hermafroditas. La multiplicación vegetativa vía organogénesis directa es una herramienta que se puede utilizar para obtener un gran número de plantas con el mismo sexo. El objetivo de este estudio es la elaboración de un protocolo para la multiplicación de *Carica papaya* var. Sweet sense, abordando las dificultades que se encuentran en la obtención del material vegetal, su desinfección y posterior introducción en el medio de cultivo y fase de enraizamiento. Se evaluó la influencia que tiene el decapitado y la aplicación de una mezcla de fitohormonas (500 mgL⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y 1000 mgL⁻¹ de ácido giberélico) en la obtención de brotes axilares de plantas madre, el efecto de una mezcla de antibióticos (Sulfato de Gentamicina a 50 mgL⁻¹, Estreptomycin 25 mgL⁻¹ y Cefotaxima 50 mgL⁻¹) en el proceso de descontaminación, el efecto de la sacarosa en la introducción y enraizamiento de explantes y la composición hormonal del medio de cultivo para conseguir explantes enraizados. No se observó influencia en el decapitado en la obtención de brotes axilares. El uso de la mezcla de antibióticos no mejoro el proceso de desinfección. La ausencia de la sacarosa del medio de cultivo mejoró el porcentaje de explantes introducidos, pero no se consiguió la formación de raíz en los explantes. El mejor porcentaje de enraizamiento (70%) fue obtenido en el tratamiento E1, basado en medio de cultivo MS suplementado con sacarosa y AIB con una concentración de 3 mgL⁻¹

1. REVISION BIBLIOGRÁFICA

1.1. La papaya (*Carica papaya* L.)

La papaya es una especie de origen tropical domesticada por la calidad organoléptica y el valor nutricional de sus frutos, que se recolectan y consumen una vez ya estén maduros.

Es una planta arborescente perennifolia, de 2 hasta 10 metros de altura con un diámetro a la altura de la copa de 6 hasta 30 centímetros, con un olor acre distintivo.

Tiene hojas grandes de pecíolo largo, de 0,7 a 1 metro, ligeramente gruesas y carnosas. La lámina de la hoja es palmeada de 7 a 9 lóbulos, y éstos a su vez se dividen en lóbulos más pequeños. Las hojas superiores están erectas y extendidas, y las inferiores colgantes.

El tronco es erguido, cilíndrico, más grueso en su base y hueco excepto en los nudos; sin ramas y con las características cicatrices que dejan las hojas al caer. Su crecimiento es monopódico cuando es juvenil y al madurar se ramifica. La corteza es verde grisácea, con manchas pardas, oscuras, o bien raramente pardo pálidas, de forma irregular, leticales pequeñas o ausentes, cicatrices semicirculares a todo lo largo del tronco. El exudado de su corteza es blanco. Su sistema radical es pivotante.

Las flores son pistiladas, estaminadas y bisexuales, con el cáliz tubular de 8 a 10 milímetros de largo y verdoso. La corola es tubular de 10 a 20 milímetros de largo, blancuzca o amarilla pálida. Flores femeninas solitarias o en grupos de 5 ó 6 en la base de una hoja. Las flores masculinas se presentan en panículas delgadas con 15 hasta 100 florecillas por inflorescencia. Las flores femeninas son mucho más grandes que las masculinas.

Los frutos son bayas elipsoides (Fig. 1), tornándose de verdes a anaranjadas en la madurez, con pulpa blanda y jugo lechoso. Se apiñan alrededor del tronco. Tiene una tamaño de 4 hasta 50 centímetros de largo y de 3 a 4,5 centímetros de ancho. Cada fruto tiene un contenido de entre 200 a 400 semillas. Estas tienen un tamaño de 3,7 a 4,5 milímetros de largo, de 2 a 2,8 milímetros de ancho y de 2 a 2,5 milímetros de grueso. Son esféricas, cubiertas por una capa mucilaginoso (sarcotesta); la endotesta es pardo negruzca y arrugada, con endospermo presente (Linneo, 1753).



Figura 1. Cultivo de papaya en invernadero en la Estación Experimental Cajamar Las Palmerillas.

1.2. Clasificación taxonómica

La siguiente taxonomía ha sido extraída del ITIS Report (Integrated Taxonomic information system of North America):

Reino: *Plantae*

División: *Tracheophyta*

Subdivisión: *Spermatophytina*

Clase: *Magnoliopsida*

Superorden: *Rosanae*

Orden: *Brasicales*

Familia: *Caricaceae*

Género: *Carica* L.

Especie: *Carica papaya* L.

1.3. Sexo y tipos florales de la papaya

Se trata de una especie polígama (tríoica), que presenta individuos con tres tipos sexuales bien diferenciados: femenino, hermafrodita y masculino (Fig. 2). Los pies femeninos (gínoicos) presentan flores femeninas o pistiladas. Los pies masculinos (androicos) presentan flores masculinas o estaminadas, con estambres y un pistilo rudimentario. Los pies hermafroditas presentan flores bisexuales, con estambres y pistilos (Hueso *et al.*, 2015), siendo las que dan lugar a frutos que tienen un mayor valor comercial (Ming *et al.*, 2005).



Figura 2. Tipos sexuales presentes en papaya, caracterizados por la presencia de flores femeninas, masculinas o hermafroditas. (Adaptado de Hueso *et al.*, 2015).

El sexo de la papaya está controlado genéticamente por un sistema de cromosomas X/Y. La presencia del cromosoma Y determina el desarrollo de flores masculinas, el cromosoma Y^h , ligeramente distinto al Y, determina el desarrollo de flores bisexuales. La presencia de dos cromosomas X determinará la formación de flores femeninas (Yu *et al.*, 2008).

Las flores de la papaya se pueden clasificar en cinco tipos básicos (Storey, 1941):

Tipo I (femeninas): Son flores pistiladas, que carecen de estambres, con un ovario ovoide de forma cónica que termina en un estigma pentalobulados. Esta flor no produce polen, por lo que para su fecundación requiere polen procedente de pies con flores hermafroditas o masculinas. Sin embargo los frutos tienen potencial partenocarpico.

Tipo II (pentándrica): Son flores hermafroditas de forma también cónica con cinco estambres funcionales situados en la base de la flor y un ovario globoso con cinco surcos bien marcados y distribuidos regularmente. Este tipo de flor da lugar a frutos globosos y asurcados. Estos frutos son poco apreciados comercialmente (Fig. 3).

Tipo III (carpeloide): Son flores hermafroditas deformes, con entre 6 y 9 estambres funcionales y un ovario regularmente rugoso. Los pétalos están soldados hasta un tercio de su longitud, formando un tubo. El fruto derivado de

esta flor tiene en el tercio basal un tronco de cono y el resto es una media esfera o hueco con lóbulos o surcos longitudinales que le dan un aspecto característico de "cara de gato". Estos frutos no son comerciales (Fig. 3).

Tipo IV (elongata): Son flores hermafroditas con diez estambres funcionales dispuestos en dos series fusionados en la base y con un ovario liso y alargado, no cónico, lo que resulta en flores tubulares de menor diámetro con un estrechamiento en la zona media. En esta flor los pétalos se sueldan en más de un tercio de su longitud, formando una corola gamopétala regular, con un limbo de cinco lóbulos libres del pistilo, excepto en la base. Aparecen siempre en racimos con pedúnculos cortos. Los frutos procedentes de estas flores son los más demandados por el mercado (Fig. 3).

Tipo IV+ (pitillos): Son flores hermafroditas que tiene diez estambre funcionales pero con un pistilo rudimentario y sin estigma, por lo que no producen frutos y generan huecos productivos (Fig. 3).



Figura 3. Flores y frutos de papaya procedentes de las diferentes tipologías florales en plantas hermafroditas (adaptado de Hueso *et al.*, 2015).



Las flores hermafroditas son en su mayoría autógamas, es decir, las anteras son dehiscentes y liberan el polen sobre su propio estigma efectuando la autopolinización, y no requieren, por ello, de vectores de polinización. En el caso de las flores femeninas, el viento y las mariposas nocturnas (esfíngidos) pueden actuar como vectores de polinización.

1.4. Origen e historia

La primera vez que fue descrita la papaya fue en 1526 en la Historia Natural y General de las Indias donde se decía haber encontrado este árbol en las costas de Panamá y Colombia. Actualmente se considera que América Central es el centro del origen de la papaya especialmente entre el sur de México y el norte de Nicaragua (Knight, 1980).

Fue justo durante el periodo de la conquista de América, que navegantes españoles y portugueses expandieron la fama y la presencia de esta planta y su fruto, llevándola a las Antillas y al sur de América. Posteriormente, a finales del siglo XVI y a principios del siglo XVII, el cultivo se difundió en Filipinas, Malasia, Sur de China, Ceilán y Hawái. Finalmente, durante el siglo XVIII, su distribución se expandió al resto del mundo tropical (Badillo, 1971).

1.5. Importancia económica del cultivo

Los datos de producción mundial que proporciona la FAO señalan a la papaya (*Carica papaya* L.) como la tercera fruta tropical más producida después del mango y la piña. La superficie de cultivo de esta especie en el mundo ha experimentado una evolución progresiva al alza desde el año 1961 hasta el año 2014, último año del que se dispone de datos estadísticos (FAOSTAT, 2014), llegando actualmente a superar las 400.000 hectáreas (Fig. 4). Este incremento de la superficie, junto con las mejoras de las condiciones de cultivo, ha supuesto que actualmente la producción global de papaya supere los 12 millones de toneladas.

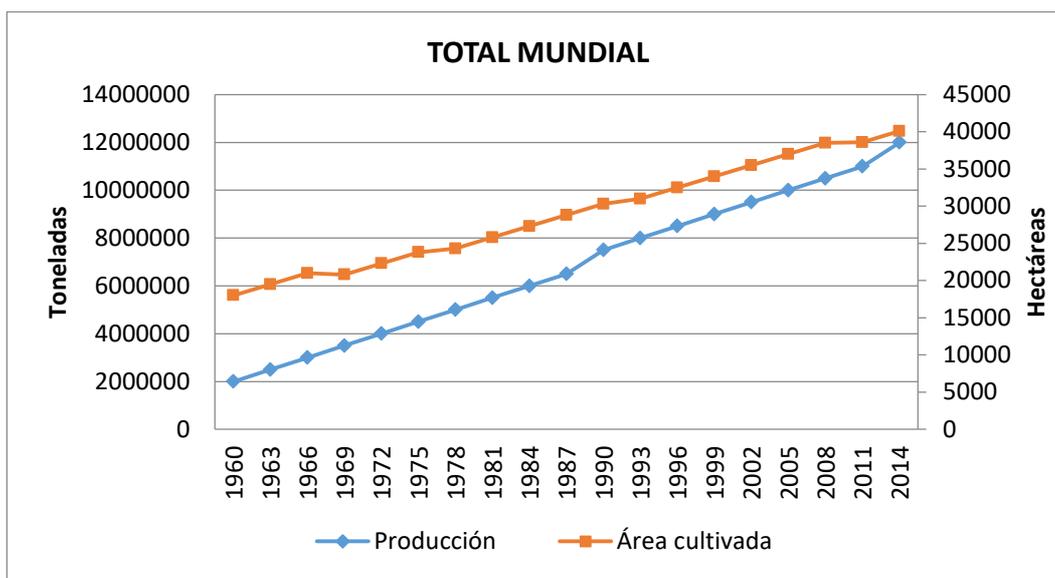


Figura 4. Evolución de la superficie en hectáreas y producción de papaya en toneladas en el mundo (datos FAOSTAT, 2014).

Si bien India y Brasil son los principales productores de papaya, con más de 5,6 y 1,6 millones de toneladas respectivamente en 2014, la mayor parte de esta producción la destinan al autoconsumo. También destacan como productores Nigeria, Indonesia y México (Fig. 5). El dominador del mercado mundial de las exportaciones de papaya es México, país que exporta más de 200.000 toneladas a los dos países principales consumidores de papaya en el mundo, que son Estados Unidos seguido de Canadá. En la Unión Europea, el Reino Unido, Holanda y Alemania importan alrededor de 8.000 toneladas anuales cada uno, mientras que España supera las 5.000 toneladas anuales. Merece señalar que la demanda de esta fruta por parte del mercado europeo está en constante crecimiento, y sólo entre 2013 y 2014 se ha incrementado en un 30%.

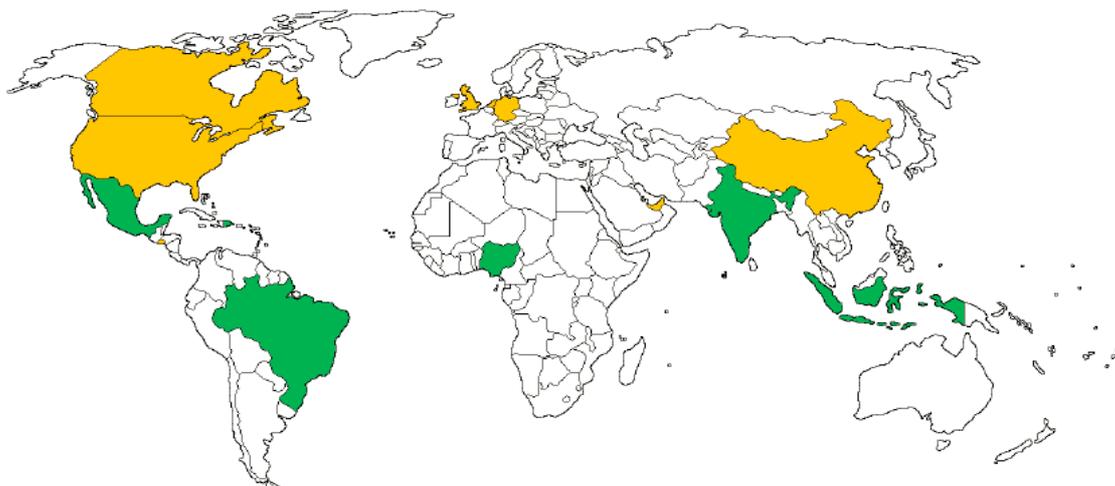


Figura 5. Principales países productores (verde) e importadores (naranja) de papaya (datos FAOSTAT, 2014).

España es el primer productor de frutos tropicales de la UE con más de 15.000 hectáreas de aguacates, 5.000 hectáreas de mangos y 3.000 hectáreas de chirimoyas. El cultivo de la papaya se concentra en las Islas Canarias, donde ha experimentado un desarrollo importante en los últimos años. Así, el cultivo de la papaya ha pasado de 138 hectáreas en 2004 a unas 350 en 2016, con una producción que ronda las 16.000 toneladas. Recientemente, la papaya se ha introducido en el sureste de España, en las costas de Málaga, Granada, Murcia y, sobre todo en Almería. Se estima que actualmente se cultivan unas 50 hectáreas de papaya en invernadero bajo plástico en el sudeste almeriense. El crecimiento de la superficie de papaya en España obedece a dos razones fundamentales, por una parte, por la necesidad de buscar alternativas que contribuyan a diversificar la producción agrícola e incrementar la oferta de productos exportados a la UE, y por otra, al creciente consumo de frutas tropicales y los resultados satisfactorios obtenidos con la introducción de algunas variedades de papaya en nuestras condiciones de cultivo.

A las razones antes expuestas, hay que añadir las propiedades nutricionales de la papaya, y en particular el contenido en vitaminas A, B, B2 y C y el reducido aporte calórico que deriva de su bajo contenido en grasa y la ausencia de carbohidratos tipo almidón. Por su aceptación por los consumidores, y como ingrediente fundamental en dietas saludables, la papaya se está introduciendo con rapidez en la dieta occidental, motivo por el cual, se estima que el cultivo de esta especie puede llegar a ser uno de los más relevantes en los próximos años. La cercanía al mercado europeo, la alta tecnificación y los altos estándares de calidad ofrecidos en la agricultura protegida del sudeste español son los principales factores para posicionar la producción de este cultivo frente a las importaciones extracomunitarias. Si las expectativas se cumplen, a la papaya le podría pasar como al mango, que a finales de los 80 contaba con algo más de 300 hectáreas y hoy día suma más de 5.000 hectáreas, concentradas principalmente en la Costa Tropical de Granada y Málaga y en expansión por el sudeste desde Almería, Murcia y hasta el sur de Alicante, donde las condiciones climáticas son favorables para este cultivo.

1.6. Propagación de la papaya

La propagación de la planta consiste en efectuar una multiplicación de la misma, tanto de manera asexual como sexual. La manera tradicional es la multiplicación mediante semillas. Otra vía de propagación tradicional es el uso de esquejes obtenidos de las ramificaciones del árbol. Se trata de una técnica forzada, ya que esta planta tiene una fuerte dominancia apical que no le permite ramificarse hasta que alcanza la edad de tres o cuatro años. Por tanto para logra que ramifique se realiza un pinzamiento del meristemo apical. (Ronse y Smets, 1999).

1.6.1. Propagación por semillas y esquejes

La forma típica para su propagación, por su eficiencia, ha sido la reproducción sexual vía semillas. Se obtienen semillas, de diferentes resultados en función del cruzamiento que se haga.

Para obtener el mayor número de semillas hermafroditas, los cruzamientos deben de hacerse entre plantas hermafroditas para así obtener un 66% de las mismas y un 33% de femeninas. De esta manera evitas la aparición de papayas macho, las cuales no dan fruto con potencial económico.

El poder germinativo de la semilla es corto, por lo que deben sembrarse en fechas próximas a su recolección o aplicar un tratamiento post-cosecha para mantener su vida útil. La siembra puede realizarse directamente en campo o en semillero.

La primera opción es poco viable ya que las plántulas de papaya tienen un sistema radicular muy sensible, por tanto se recomienda siempre la siembra en semillero.

En los últimos años los semilleros ofrecen el servicio de sexado temprano de plántulas de papaya (Fig. 6). Se trata de una operación laboriosa, pero que reduce considerablemente el número de plántulas que el agricultor necesita para llevar a cabo su plantación.

Esta tarea se lleva a cabo en un laboratorio, donde mediante marcadores moleculares determinan el sexo de la planta. Se trata de un proceso de rigurosidad y precisión extrema. A la hora de muestrear y de interpretar los resultados, un pequeño fallo puede suponer la elección de la plántula del sexo equivocado, repercutiendo en pérdidas económicas tanto para el agricultor como para el semillero. Por último cabe destacar que hay un aprovechamiento final del 55% de semillas.



Figura 6. Sistema de producción de plántulas de papaya en semillero. En la izquierda se encuentran las plántulas antes del proceso de sexado, mientras que en la derecha encontramos las plantas hermafroditas seleccionadas en el proceso de sexado.

El uso de esquejes como método de propagación vegetativa no brinda los efectos deseados debido que tiene un desarrollo extremadamente lento (Posada *et al.*, 2005). Para la producción de plántulas mediante esqueje se usa como material vegetal brotes de unos 25-30 cm que se cortan y cauterizan con agua estéril calentada a 50°C. Los esquejes son introducidos entre 3 y 5 cm en una maceta rellena con sustrato orgánico. Estas macetas son colocadas en áreas de cultivo sin luz solar, con una humedad ambiental superior al 80% y una temperatura de aproximadamente 25°C. 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 (Reyes, 1983).

1.6.2. Cultivo de tejidos y micropropagación

Hasta la fecha con el estudio de procesos que ocurren en el cultivo de tejidos de papaya se han desarrollado diferentes métodos de propagación a partir del cultivo de tejidos tanto por organogénesis (Hossain *et al.*, 1993; Alvarado, 1992; Baca, 2002; Gallardo *et al.*, 2002; Solis *et al.*, 2011) como por embriogénesis somática (Posada, 1995; Del Sol *et al.*, 2001; Gallardo *et al.*, 2004).

1.6.2. a. Micropropagación vía organogénesis

La organogénesis es un evento morfogenético que se caracteriza por la formación de un primordio unipolar a partir de una yema, con el subsecuente desarrollo de un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de la radícula y el subsecuente enraizamiento final. En la organogénesis directa, los brotes se forman directamente del explante y en la organogénesis indirecta lo hacen a partir de la formación de callos (Jiménez, 1998).

La regeneración *in vitro* de plantas mediante organogénesis directa (es decir, sin la formación previa de callo) es altamente importante en los trabajos de micropropagación y conservación de germoplasma en frutales (Scocchi *et al.*, 2004).

Al igual que con otras especies en la papaya existen las cinco fases tradicionales de la micropropagación vía organogénesis (Fig. 7).

Fase 0 y 1. Preparativa y Establecimiento.

El objetivo de esta fase es garantizar un banco de plantas donantes de alta calidad genética y fitosanitaria, para disminuir los niveles de contaminantes

microbianos visibles durante las siguientes fases del cultivo *in vitro* (Mroginski *et al.*, 2004).

Se trata de una etapa crítica en el proceso de propagación *in vitro*. Las principales dificultades que encontramos en el establecimiento de los explantes son la obtención de una cantidad yemas laterales de un tamaño adecuado debido a la fuerte dominancia apical de la especie (Reuveni y Shlesinger, 1990) y a su lento coeficiente de multiplicación (Fitch *et al.*, 1997). Otro problema existente es el alto porcentaje de contaminación microbiana tras la desinfección del material vegetal obtenido del exterior (Brar y Khush, 1994; Wilson, 1996) o de invernadero (Drew, 1988; Arrieta-Espinosa, 1996; Solis *et al.*, 2011).

Con el fin de obtener la cantidad necesaria de yemas laterales con el tamaño óptimo para su establecimiento es necesario la aplicación foliar de dos reguladores de crecimiento (500 mgL^{-1} de 6 bencilaminopurina (6-BAP) y 1000 mgL^{-1} de ácido giberélico (AG^3) para estimular el crecimiento y desarrollo de las yemas laterales de la planta.

Para la desinfección de estos explantes existen diversos protocolos, donde se utilizan diferentes sustancias solas o en combinación: hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones (desde 0,5 a 3%), alcohol al 70% y en algunos casos también se aplica una mezcla de antibióticos (Sulfato de Gentamicina 50 mgL^{-1} , Estreptomycin 25 mgL^{-1} y Cefoxatima 50 mgL^{-1}) (Posada *et al.*, 2004)

Una vez desinfectadas la yemas con la ayuda del microscopio se eliminan los primordios foliares hasta dejar el meristemo al descubierto. Para la diferenciación de estos meristemas se usa el medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962) con diferentes concentraciones de BAP, ANA, AIA AG^3 y adenina (Alvarado, 1992; Baca, 2002).

Fase II. Multiplicación

El objetivo de esta etapa es incrementar el número de brotes a partir de explantes ya establecidos *in vitro*, sin comprometer la calidad genética de las plantas generadas. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio de cultivo mediante divisiones y resiembras en recipientes adecuados. De esta forma, aumenta el número de plantas en cada subcultivo (Castillo, 2008).

En la fase de multiplicación se han estudiado varios reguladores del crecimiento dentro de ellos, la kinetina, el isopenteniladenina (2iP), tidiazuron (TDZ) y el 6-BAP (Islam *et al.*, 1993); sin embargo, la citoquinina más efectiva en todos los casos ha sido el 6-BAP (Gallardo, 2002).

En esta fase el punto crítico lo encontramos en la concentración de etileno que se genera dentro del frasco (Lai *et al.*, 2000). Existe una correlación entre la

concentración de etileno y la proliferación de nuevos brotes durante su cultivo. Con la aplicación de inhibidores de la biosíntesis de etileno, tales como aminoetoxivinilglicina (AVG) y CoCl_2 , se consigue un aumento en la tasa de multiplicación de los explantes de papaya.

La multiplicación *in vitro* se suele realizar sobre medio de cultivo compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento por separado o en conjunto. Para evitar problemas con la presencia de bacterias endógenas en el cultivo *in vitro* de la papaya, algunos autores emplean medios de cultivo fotoautotróficos, eliminando la sacarosa del medio de cultivo (Pinzon, 2003; Fitch *et al.*, 2005).

Fase III. Elongación

Se trata de una fase clave en el proceso de micropropagación. Para conseguir un correcto enraizamiento es necesario que los brotes obtenidos de la fase de multiplicación alcancen al menos los 3 cm de altura. Esta elongación se consigue introduciendo los explantes en un medio de cultivo suplementado con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y ácido giberélico (AG^3) como regulador de crecimiento, en concentraciones entre $1\text{-}5\text{ mgL}^{-1}$ durante 15 días (Banerjee, 2002).

Fase IV. Enraizamiento

El enraizamiento es la fase más voluminosa de todo el proceso, cada brote formado en fases posteriores, debe ser cultivado y manipulado para que además de crecer y desarrollar un tallo con las primeras hojas, forme y desarrolle varias raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al trasplantarse a un sustrato orgánico (Orellana, 1998).

Esta fase puede desarrollarse abordando diversas estrategias tanto *in vitro* como *ex vitro*. Para el enraizamiento *in vitro* las plantas con las primeras hojas desarrolladas y una altura superior a los 3-4 cm provenientes del medio de cultivo de elongación se subcultivan a un medio de cultivo de enraizamiento, compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y concentraciones entre 1 y 5 mgL^{-1} de ácido indolbutírico (AIB). En este medio de cultivo solo estará durante 10 días para inducir la formación de raíces, luego se transfieren a un medio de cultivo compuesto por sales MS sin reguladores de crecimiento durante otros 20 días más (Gallardo *et al.*, 2004; Posada, 2005).

Otra variante se desarrolla sobre medio de cultivo suplementado con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y diferentes auxinas (AIB, AIA y ANA) y citoquininas (6-BAP) como reguladores de crecimiento, solos o combinados. El AIB, en concentraciones de 1 a 5 mgL^{-1} , es el que mejor resultado ha dado. En esta variante los brotes permanecen en este medio de cultivo hasta que se

formen las raíces, con una duración aproximada de la fase de 21 días (Reuveni *et al.*, 1990; Alvarado, 1992; Baca, 2002; Solis *et al.*, 2011).

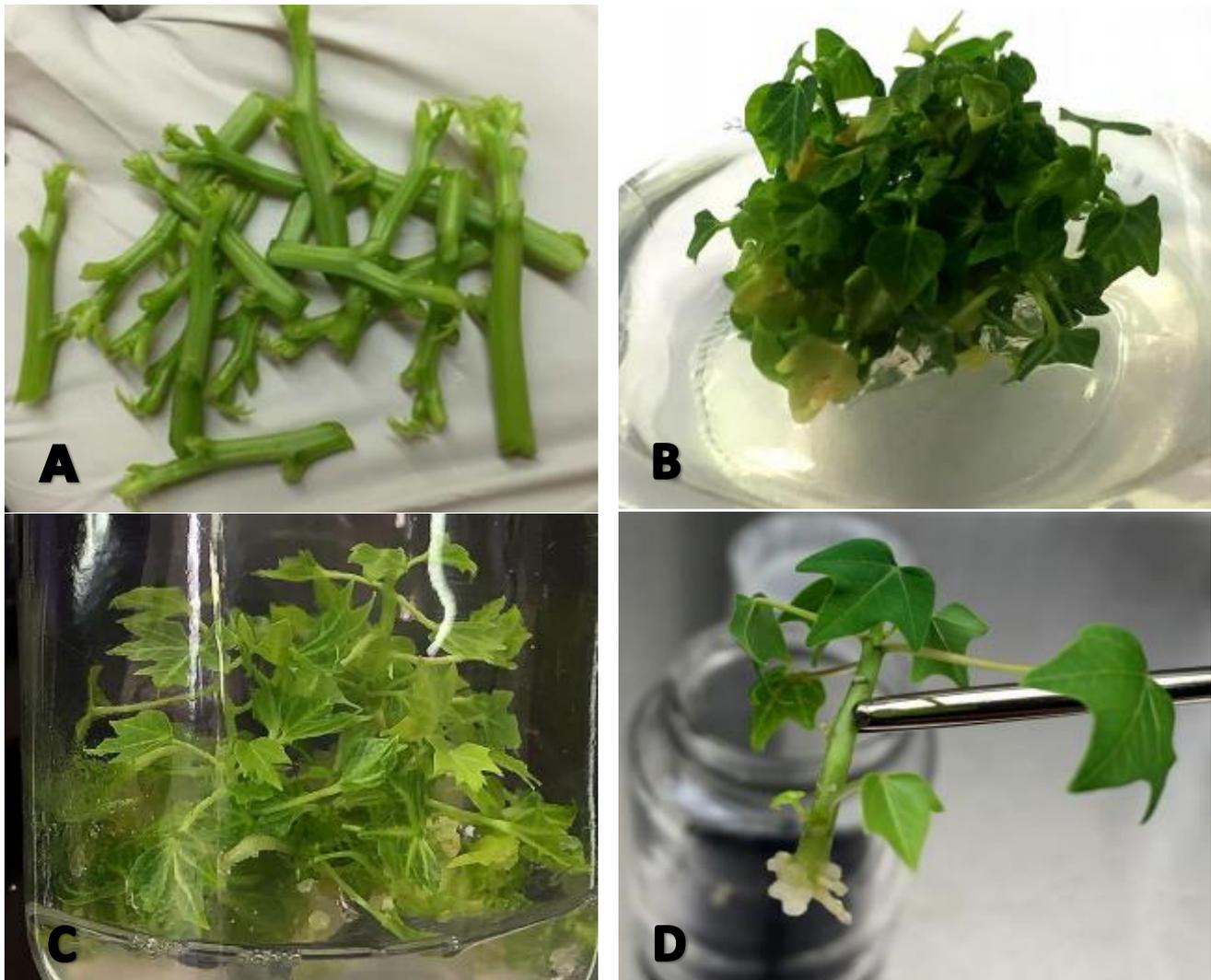


Figura 7. Diferentes fases en el proceso de propagación de la papaya vía organogénesis (Adaptado de Adam y Kheng, 2016). A: Preparación. B: Multiplicación. C: Elongación. D: Enraizamiento.

Fase V. Aclimatación

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 (cámara húmeda) para lograr mayor éxito en la adaptación a las condiciones ambientales.

En esta fase la humedad relativa necesaria es entre 95 y 100% de humedad relativa durante los primeros 15 días. Gallardo *et al.* (2002), para conseguir

este propósito, cubrieron individualmente las plantas con frascos de vidrio (250 ml) durante cuatro semanas.

Cultivo en campo de plantas de papaya obtenidas por organogénesis

La preparación del terreno y el manejo del cultivo deben realizarse según las técnicas culturales tradicionales del cultivo. Al cabo de 9 meses las plantas florecen y dan lugar a frutos comerciales normales (Van Minh y Tuong, 2001).

Chan y Teo (2002) durante la evaluación en campo de plantas obtenidas por vía organogénesis mostraron un rendimiento uniforme y una alta calidad de los frutos, similares a plantas que proceden de semillas. Solo encontraron pequeñas variaciones en la altura de las plantas.

Fitch (2005) expone que el cultivo, realizado con plantas obtenidas mediante micropropagación, da frutos con tamaño comercial de 1 a 3 meses antes que el cultivo realizado con plantas obtenidas mediante semillas. Otra ventaja que presenta esta planta es su menor tamaño respecto a las que proceden de semillas, por lo que facilitan la labor de recolección de frutos.

1.7.2. b. Embriogénesis somática

Con esta técnica se busca la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). La embriogénesis somática *in vitro* es posible ya que virtualmente cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión (totipotencia) a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento.

Los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática dependen de si el tejido del explante consiste en:

- Células somáticas determinadas preembriogénicamente: aquellas células de embriones cigóticos de plantas, las cuales siempre expresan un programa de expresión de los genes embriogénicos. En estas células un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de un embrión somático a partir del tejido del explante. Este proceso es llamado embriogénesis somática directa, o sea, la formación de embriones somáticos directamente desde una estructura organizada tales como segmentos de embriones cigóticos o embriones cigóticos completos y/o tallos (Williams y Maheswaran, 1986).
- Célula somática no embriogénica: son células de las partes de las plantas que no expresan genes embriogénicos. Las células del tejido deben sufrir varias divisiones mitóticas en presencia de una auxina durante la inducción del estado de célula embriogénica. Estas divisiones mitóticas

dan lugar a un callo, a partir del cual se pueden obtener embriones somáticos. Este proceso es llamado embriogénesis somática indirecta y es usado para indicar que una fase se interpone entre el explante original y la aparición de embriones somáticos.

Varias metodologías de regeneración de plantas por embriogénesis somática 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 estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente como semillas artificiales. (Yeung *et al.*, 1996)

El explante más utilizado en esta vía, independiente de la variedad, es el embrión cigótico (Del Sol *et al.*, 2001). También se han utilizado otros tipos de explantes como: discos de hojas (Arrieta-Espinoza, 1996), segmentos de hipocótilo (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.*, 2004).

El desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye las siguientes etapas:

Etapas 1. Formación de callos:

Se trata de la etapa previa a la formación de los embriones somáticos cuando se usan células somáticas no embrionarias. Para lograr la formación del callo, los explantes son introducidos en medio de cultivo Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con una combinación de 6-BAP con diferentes auxinas. Las más utilizadas son 2,4-D, AIA y ANA (Hossain *et al.*, 1993).

Etapas 2. Obtención y multiplicación de los embriones somáticos:

Para la obtención de los embriones somáticos inmaduros se colocan los embriones cigóticos o los callos en un medio de cultivo semisólido. Este medio debe estar compuesto por la mitad de las sales MS y 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) como regulador del crecimiento, a una concentración entre 5 y 10 mgL⁻¹.

Si se pretende continuar con la multiplicación secundaria de los embriones somáticos, estos son separados en pequeños grupos, con una masa fresca de aproximadamente 50 mg que se colocan en el medio de cultivo y posteriormente en oscuridad y temperatura de 27±2 °C. Este proceso de multiplicación puede ser realizado durante 5 - 6 subcultivos (Posada, 1995).

Etapas 3. Germinación de los embriones somáticos:

La germinación de los embriones somáticos se caracteriza por la elongación del hipocótilo, desarrollo de color verde de los cotiledones y la elongación de la radícula (Alemanno *et al.*, 1997; Canhoto *et al.*, 1996; Salomao y Mundim, 2000).

Diferentes autores utilizan para la germinación de embriones somáticos de papaya dos y hasta tres subcultivos en un medio de cultivo de germinación para completar y lograr el desarrollo de las plantas (Posada, 1995).

A los embriones somáticos, que ya alcanzaron las últimas fases del desarrollo embrionario, se les realizan dos subcultivos en medio de cultivo MS con 6-BAP en concentraciones entre 0.15 y 0.5 mgL⁻¹ (Posada, 1995). Otro regulador usado en la germinación de los embriones es la Kinetina a una concentración de 5 mgL⁻¹ (Mauren *et al.*, 1993).

Etapas 4. Elongación de las plantas obtenidas a partir de embriones

Las plantas *in vitro* bien formadas obtenidas a partir de la germinación de los embriones somáticos, presentan una consistencia robusta y como promedio cuatro pares de hojas. También se desarrollan las yemas laterales, provocado por la pérdida de la dominancia apical, por los subcultivos realizados en medio de cultivo de germinación con citoquininas.

Esta elongación se obtiene introduciendo las plantas germinadas *in vitro* en medio de cultivo MS suplementado con combinaciones de BA y ANA, a concentraciones de 0.1 a 0,25 mgL⁻¹ (Posada, 1995; Bhattacharya, 2002).

Las siguientes etapas en la embriogénesis somática coinciden con las fases de enraizamiento y aclimatación del proceso de organogénesis antes descrito.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El desarrollo de una metodología de micropropagación a partir de brotes axilares es importante para conocer el comportamiento *in vitro* de esta variedad y apoyar la multiplicación de plantas elite de sexo hermafrodita seleccionadas en campo por sus características fenotípicas especiales; además se puede realizar una cuidadosa selección de materiales genéticos, manejar grandes volúmenes de plántulas en espacios reducidos y mantener un stock de plantas libres de enfermedades.

Varios protocolos para la propagación *in vitro* de plántulas de *Carica papaya* vía organogénesis han sido descritos, pero ninguno se ha llevado a cabo para la variedad Sweet sense. Se trata de un híbrido especial, que además de contar con una dulzura de entre 11 y 14 °Brix, cuenta con un agradable perfume, el

cual es diferente a cualquier material en el mercado. Resalta su exquisito sabor, el cual cuenta con aceptación total en el mercado Europeo por su diferenciación por sobre otros materiales de papaya.

En esta especie existen diferentes problemas en los protocolos de propagación vía organogénesis, los principales se encuentran en la fase preparativa. Por una parte tenemos la dificultad de obtener el número suficiente de yemas laterales del tamaño adecuado de las plantas seleccionadas como donadoras del material vegetal. Por otro lado tenemos el alto porcentaje de contaminación *in vitro* en la fase de introducción del material vegetal cuando se emplean como explantes iniciales ápices o meristemos de plantas adultas cultivadas en campo. Además, otra de las fases clave para la obtención de plántulas es la formación de un sistema radicular a partir del cual puedan absorber nutrientes.

Con estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo es la obtención de un protocolo para la propagación *in vitro* de plántulas de *Carica papaya* Var. Sweet sense vía organogénesis.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Obtención del material vegetal

En el presente estudio se han utilizado brotes vegetativos obtenidos tanto de meristemos apicales como axilares.

Los brotes apicales se recolectaron de plántulas de papaya con 4 meses de edad, criadas en bandejas de cultivo de 384 alveolos en un invernadero multitunel de un semillero del campo de Níjar. Las plántulas tenían un tamaño de 8 centímetros desde la base del tallo y al menos 4 hojas verdaderas (Fig. 8).



Figura 8. Plántulas de papaya criadas en bandejas de cultivo de 384 alveolos.

Para la obtención de brotes axilares adecuados para su introducción *in vitro* fue necesario el uso de plantas madre de 11 meses de edad, criadas en maceteros de 1,2 litros en el mismo semillero. Se realizó una aplicación foliar de una solución compuesta por dos reguladores de crecimiento (500 mgL^{-1} de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y 1000 mgL^{-1} de ácido giberélico) semanalmente, durante un periodo de tres semanas consecutivas para inducir la pérdida de la dominancia apical y el desarrollo de las yemas laterales (Posada *et al.*, 2004).

Se utilizaron un total de 8 plantas madre, que se dividieron en dos grupos. A uno de los grupos se les eliminó el brote apical, con el objetivo de mostrar la influencia del decapitado en la dominancia apical (Experimento 1) para obtener más brotes axilares. La evaluación del número de brotes axilares obtenidos por planta se realizó a los 30 días de la última aplicación de los reguladores de crecimiento. Los resultados fueron procesados mediante una ANOVA simple de un factor con el programa estadístico Statgraphics Centurión.

3.2. Desinfección del material vegetal y establecimiento *in vitro*.

En este apartado, los brotes obtenidos fueron cortados con un tamaño de aproximadamente 5 cm, se les eliminó las hojas de mayor tamaño y se introdujeron en frascos con agua estéril para evitar la deshidratación del material vegetal (Fig. 9).

Con el objetivo de ver la influencia del uso de antibióticos en la desinfección del material vegetal se realizaron dos tratamientos de desinfección diferentes.



Figura 9. Explante preparado para la desinfección.

Tratamiento 1. Sin presencia de antibióticos: La desinfección se llevó a cabo en un recipiente con alcohol al 70% durante 30 segundos, posteriormente los explantes se introdujeron en otro recipiente que contenía hipoclorito sódico al 30% y una gota de detergente Tritón X-100 durante 10 minutos. Como último paso, se realizó un triple enjuague con agua esterilizada en el que los explantes permanecieron en cada uno de los recipientes 2 minutos.

Tratamiento 2. En presencia de antibióticos: La desinfección se realizó de la misma forma, añadiendo un paso extra. Antes del triple enjuagado, los explantes fueron introducidos durante 30 minutos en un recipiente que contenía una disolución compuesta por tres antibióticos: Sulfato de Gentamicina a 50 mgL^{-1} , Estreptomycin a 25 mgL^{-1} y Cefotaxima 50 mgL^{-1} (Posada *et al.*, 2004).

Por otra parte, para comparar la influencia de la sacarosa en el medio de cultivo, los explantes desinfectados se introdujeron en medios de cultivo con concentraciones diferenciales de sacarosa. Uno de los medios contenía sales MS

y sacarosa al 30% mientras que el otro medio de cultivo solo contenía las sales MS.

Para la realización del experimento se utilizaron 15 repeticiones por tratamiento, realizándose 4 réplicas de cada experimento. La evaluación de los resultados fue realizada a los 15 días, identificando explantes contaminados, muertos e introducidos con éxito. Los resultados fueron procesados mediante una ANOVA simple de un factor con el programa estadístico Statgraphics Centurion.

3.3. Fase de enraizamiento. Preparación de medios de cultivo e influencia hormonal

Con el objetivo de reducir costes y tiempo en la obtención de plántulas enraizadas se realizaron introducciones directamente en medios de cultivo que inducen el enraizamiento de los explantes, evitando así las fases de establecimiento y multiplicación de meristemos.

Para determinar un medio de cultivo adecuado que nos permita la formación de raíces en nuestros explantes, se formularon diversos tratamientos considerando los resultados obtenidos por Alvarado (1992), Baca (2002) y Solis *et al.*, (2011), empleando el medio de cultivo basal Murashige y Skoog (MS 1962) con diferentes concentraciones de BAP, ANA, AIA y AIB (Tabla 1). Todos los medios fueron suplementados con sacarosa a 30 gL⁻¹; posteriormente se ajustó el pH a 5,8, se añadió agar al 0,8% y se esterilizaron en autoclave a 1,08 Kg/cm² durante 15 minutos.

Los explantes, en su medio de cultivo, se colocaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 18 horas de luz, una temperatura de 25 ± 2°C y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de 50-62.5 μmol m⁻² s⁻¹.

Tabla 1. Medios de cultivo y concentraciones hormonales propuestas en diferentes tratamientos para inducir *in vitro* la formación del sistema radicular en explantes de *Carica papaya* Var. Sweet sense

Tratamiento	Medio + Hormonas
E0	MS
E1	MS + AIB 3 mg/L
E2	MS + AIB 3 mg/L + ANA 0.5 mg/L
E3	MS + AIB 3 mg/L + Adenina 5 mg/L
E4	MS + ANA 1 mg/L
E5	MS + AIB 2 mg/L + BAP 0.5 mg/L + AIA 0.5 mg/L
E6	MS + AIB 2 mg/L + BAP 0.5 mg/L + AIA 0.5 mg/L

Ya que la contaminación bacteriana es un problema real para la obtención de plántulas enraizadas libres de patógenos, se realizó otra prueba en la que se modificó la concentración de azúcar de los medios de cultivo descritos en la Tabla 1. De este modo, durante la elaboración de los medios de cultivo no se adicionó sacarosa, con el objetivo de ver la influencia de este azúcar en el desarrollo radicular de los explantes.

Para la realización de los experimentos de esta fase, se utilizaron 15 repeticiones por tratamiento y dos replicas por experimento. La evaluación de los resultados se realizó a los 35 días, evaluando el porcentaje de explantes enraizados y el número de raíces formadas por explante. Los resultados fueron procesados mediante una ANOVA simple de un factor con el programa estadístico Statgraphics Centurión.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto del decapitado en la obtención del material vegetal

La distribución en gradiente de auxinas, que va desde el ápice primario hacia la base de la planta reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo así lo que se denomina como dominancia apical. El decapitado de la planta favorece un menor flujo de auxinas hacia la base del tallo, estimulando así el desarrollo de los brotes axilares.

Por otra parte, la presencia de hormonas en diferentes niveles en las plantas y sus células, permite que éstas desarrollen caminos morfogénicos alternativos. Si existiese un nivel relativamente alto de citoquininas vs. auxinas, el tejido manifiesta la formación de nuevos brotes (Fig. 10; Thimann, 1977).



Figura 10. Formación de brotes axilares en una planta madre de *Carica papaya* Var. Sweet sense.

Tabla 2. Efecto del decapitado apical y aplicación de reguladores de crecimiento (BAP 500mgL⁻¹ y AG³ 1000mgL⁻¹) en la pérdida de la dominancia apical y la formación de brotes axilares en plantas madre de *Carica papaya* var. Sweet sense.

Tratamiento	Nº de plantas madre	Nº de brotes	Coefficiente de multiplicación
Decapitada	4	42	10,5
Sin decapitar	4	39	9,75

Valores con (*) indica que los datos difieren estadísticamente para p<0.05

Tras la última aplicación de reguladores de crecimiento en las plantas madres no decapitadas (Fig. 11A) se obtuvieron un total de 39 brotes mientras que en las no decapitadas (Fig. 11B) el número de brotes obtenidos fue de 42, por lo que no existe diferencia significativa en el coeficiente de multiplicación para cada tratamiento (Tabla 2). Estos resultados sugieren que el decapitado no elimina la dominancia apical, por lo que no se induce la formación de brotes laterales. Sin embargo, la aplicación de los reguladores de crecimiento tanto en plantas decapitadas como no decapitadas, si tuvo un efecto positivo en la formación de nuevos brotes axilares, de acuerdo con los resultados previos obtenidos por Thimann (1977), Reuveni y Shlesinger (1990), Arrieta *et al.* (1995) y Posada *et al.* (2004).



Figura 11. Plantas madre antes de la formación de nuevos brotes para la introducción *in vitro* tras la aplicación foliar de reguladores de crecimiento. A: Plantas sin decapitar. B: Plantas decapitadas.

4.2. Influencia del uso de antibióticos en la desinfección del material vegetal.

Los antibióticos son una alternativa para el control de la contaminación en los procesos de propagación *in vitro* de varias especies vegetales (Guerrero *et al.*, 2016). En algunos casos, el uso de antibióticos en el cultivo *in vitro* pueden llegar a provocar fitotoxicidad. Esta depende de la concentración a la que se ha expuesto el tejido y de la tolerancia de la especie tratada (Okkels y Pedersen, 1988).

Algunos autores indican que para reducir la fitotoxicidad de los antibióticos estos deben ser aplicados sobre las plantas madre de las que se van a recolectar los explantes y no incorporar tales sustancias a los medios de cultivo ya que se modifica su composición y pueden ser metabolizados por los tejidos (Duhem *et al.*, 1988; Roca y Mogrinski, 1993; Falkier, 1996).

En la Tabla 3 se observa el porcentaje de ápices establecidos a los 15 días de su introducción. Además se presenta el porcentaje de ápices muertos y de contaminaciones para cada tratamiento realizado.

Tabla 3. Efecto de una mezcla de antibióticos en el proceso de desinfección de explantes apicales de *Carica papaya* var. Sweet sense

Tratamiento	Contaminaciones (%)	Ápices muertos (%)	Ápices establecidos (%)
Sin antibióticos	33,3	6,7*	60,0
Con antibióticos	36,7	0,0	63,3

Medias con (*) indica que los datos difieren estadísticamente para $p < 0.05$

El análisis estadístico de los resultados indicó que los brotes desinfectados con el tratamiento con antibióticos no mejoró el porcentaje de explantes introducidos con éxito. De este modo, el porcentaje de ápices establecidos no presentó diferencias significativas entre ambos tratamientos, siendo estos porcentajes del 60% y 63,3% en el tratamiento de desinfección sin y con antibióticos, respectivamente.

El porcentaje de contaminación tampoco mostró diferencias significativas entre los tratamientos realizados. En el tratamiento sin antibióticos se obtuvo un 33,3% de contaminación microbiana, mientras que en el tratamiento con antibióticos el porcentaje de contaminación fue del 36,7% (Tabla 3).

Únicamente existieron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de ápices muertos (Tabla 3). El tratamiento de desinfección con antibióticos no presentó ápices muertos, mientras que en el tratamiento sin antibióticos se obtuvieron un 6,7% de ápices muertos. Este resultado podría explicarse por la presencia de contaminantes bacterianos crípticos presentes en los ápices, que

no se eliminan sólo por la desinfección con hipoclorito, requiriendo del efecto de los antibióticos para su eliminación.

Los resultados obtenidos para el porcentaje de ápices establecidos con éxito fue similar a los obtenidos por Posada *et al.*, 2004, aunque en su caso el tratamiento con antibióticos durante la desinfección si mejoró respecto al tratamiento sin antibióticos. Sin embargo, Singh *et al.* (1997) y Wu *et al.* (2012) obtuvieron un 78% de introducciones exitosas utilizando diferentes antibióticos en el proceso de desinfección.

Que no existiesen explantes muertos en el tratamiento con antibióticos, evidencia que no hay síntomas de fitotoxicidad en la desinfección del material vegetal con antibióticos. Con los mismos antibióticos e iguales concentraciones Posada *et al.* (2004) tampoco observaron síntomas de fitotoxicidad.

4.3. Influencia del uso sacarosa en la introducción del material vegetal

La sacarosa se adiciona al medio de cultivo de las plantas *in vitro* para permitir un rápido crecimiento heterotrófico ya que la producción de energía y carbohidratos por la fotosíntesis *in vitro* es muy poca debido a que los niveles de iluminación en las habitaciones destinadas a su crecimiento generalmente son bajos y no garantizan un desarrollo adecuado de la planta (Leifert *et al.*, 1995).

Estos mismos autores han expresado que por la adición de azúcares y otras sustancias orgánicas a los medios de cultivo de las plantas *in vitro* estos se convierten en un buen sustrato para el crecimiento de algunas especies de bacterias que han sido aisladas como contaminantes.

En la búsqueda de vías para la detección temprana de los contaminantes bacterianos o métodos para su control se han realizado diferentes estudios. Algunos de los cuales incluyen la evaluación del efecto de la sacarosa sobre el crecimiento de los contaminantes bacterianos (Pinzón, 2003).

Tabla 4. Efecto de la sacarosa en la introducción de explantes de *Carica papaya* var. Sweet sense

Tratamientos	Contaminaciones (%)	Ápices muertos (%)	Ápices establecidos (%)
Sin sacarosa	10,5	18,1	71,4
Con sacarosa	37,1*	4,8*	58,1*

Medias con (*) indica que los datos difieren estadísticamente para $p < 0.05$

Los resultados obtenidos (Tabla 4) muestran que el tratamiento al cual se le elimina la sacarosa del medio de cultivo consigue un 71,4% de ápices establecidos, superándose los 58,1% obtenidos para el tratamiento en el que los medios de cultivo se suplementan con sacarosa (3 gr/L).

En el tratamiento sin uso de sacarosa en el medio de cultivo, también se reduce significativamente el porcentaje de explantes contaminados. Utilizando medios de cultivo sin sacarosa, se obtuvo un 10,5% de contaminaciones respecto al 37,1% del tratamiento con sacarosa (Tabla 4).

Respecto al porcentaje de ápices muertos, el tratamiento con sacarosa obtuvo mejores resultados. El 4,8% de los ápices murieron tras la introducción en el medio de cultivo que contenía sacarosa, mientras que en el tratamiento sin sacarosa el porcentaje de ápices muertos fue del 18,1% (Tabla 4).

Pinzon 2003 y Fitch *et al.* (2005) también emplearon medios de cultivo sin sacarosa en diferentes variedades de papaya, para ayudar a reducir las pérdidas por bacterias obteniendo resultados satisfactorios. Esto es debido a que en el medio de cultivo no existe una fuente de carbohidratos, como es la sacarosa, a través de la cual el agente contaminante lleve a cabo sus funciones metabólicas, dando lugar a contaminación.

Sin embargo existen agentes contaminantes, como los que aparecen en el tratamiento sin sacarosa, que no necesitan de manera imprescindible este carbohidrato para realizar su metabolismo, ya que fueron capaces de crecer en ausencia de sacarosa, quizás a expensas de fuentes de nitrógeno que se encuentran en algunas de las sales MS (Leifert *et al.*, 1995)

Es factible pensar que en los medios de cultivo sin sacarosa el mayor número de ápices muertos respecto al tratamiento con sacarosa esté influenciado por la falta de absorción y asimilación de los carbohidratos por parte de la planta, ya que la fotosíntesis en estas condiciones de cultivo, suele ser insuficiente para satisfacer la demanda de carbono de la planta. (Grout y Aston, 1977).

4.4. Efecto hormonal en la inducción de la formación de raíces

Previamente al análisis estadístico, se observó que los tratamientos E0, E3, E4, E5 y E6 no dieron lugar a explantes enraizados. En la tabla 5, se presentan los porcentajes de enraizamiento y número de raíces que se obtuvieron en los tratamientos donde la inducción del sistema radicular fue efectiva (Fig. 12).

Tabla 5. Influencia de distintas concentraciones hormonales en la inducción de la formación de raíces.

Tratamiento	% de enraizamiento	Nº de raíces
E1	70*	9
E2	43	8.5

Medias con (*) indica que los datos difieren estadísticamente para $p < 0.05$

El tratamiento E1, con un 70% de plantas enraizadas, fue el que mejor porcentaje de enraizamiento obtuvo, encontrándose diferencias significativas con el tratamiento E2, que obtuvo un 43% de explantes enraizados (Fig. 13). En cuanto al número de raíces formadas en cada tratamiento, no se encontraron diferencias significativas, obteniéndose 9 y 8,5 raíces por explante en los tratamientos E1 y E2 respectivamente (Tabla 5).

Diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB) han sido utilizadas para la obtención de plántulas enraizadas. Reuveni *et al.* (1990) lograron enraizar plantas *in vitro* usando un medio MS que contenía 1 mgL^{-1} de AIB mientras que Alvarado (1992) lo realizó con un medio de cultivo MS suplementado con 5 mgL^{-1} de AIB. Posada (2005) y Solis *et al.* (2011) consiguieron resultados próximos al 70% de enraizamiento usando medios de cultivo suplementados con AIB a 3 mgL^{-1} , coincidiendo con los resultados obtenidos en nuestro tratamiento E1 a esa misma concentración. Sin embargo, Bermúdez *et al.* (2013) consiguieron un 100% de explantes enraizados en estas mismas condiciones.

La presencia ANA en el tratamiento E2, con una concentración de $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ junto con AIB a la misma concentración que en el tratamiento E1 no mejoró el porcentaje de enraizamiento. Resultados similares han sido obtenidos por Solis *et al.* (2011), con un 50% de explantes enraizados con ese mismo tratamiento.



Figura 12. Inicio de la formación de raíces



Figura 13. Explante con sistema radicular completo.

En la actualidad, se emplean varios métodos para el enraizamiento de papaya en condiciones *in vitro*. Todo ellos tiene en común la presencia de auxinas para inducir la formación de raíces. Siendo el AIB el que mejores resultados ha dado, aunque hay variaciones respecto a la concentración hormonal añadida al medio de cultivo. Sin embargo, este regulador del crecimiento en el medio de cultivo estimula la formación de un callo basal (Fig. 14) que impide la formación de

raíces o las hace disfuncionales, por no tener conexión con el tallo (Kumar *et al.*, 2013 y Posada *et al.*, 2007).

En nuestro caso, los tratamientos E5 y E6 dieron lugar a la formación de un callo en la parte basal del explante. Los tratamientos E5 y E6 incluían IBA en una concentración de 2 mgL^{-1} , mientras que las auxinas AIA y ANA estaban a una concentración de 0.5 mgL^{-1} . Además, estos tratamientos contenían 0.5 mgL^{-1} de BAP como citoquinina, existiendo una descompensación entre la relación de auxinas y citoquininas.

La formación de estos callos se debe a que niveles bajos de citoquininas y/o conjuntamente niveles altos de auxinas, propician la formación de masas celulares no organizadas (Skoog y Miller, 1965).

Este callo también apareció en el tratamiento E3 que contenía el medio MS suplementado con AIB a 3 mgL^{-1} y adenina a 5 mgL^{-1} . La formación de dicho callo puede deberse a que la adenina actúa como precursor para la formación de citoquininas (Bantawa *et al.*, 2009; Nandagopal y Kumari 2006), provocando el mismo efecto que en los tratamientos E5 y E6.

Por otra parte, la presencia de citoquininas en los medios de cultivo de los tratamientos E5 y E6 promovió el crecimiento de brotes axilares en los explantes introducidos en estos tratamientos (Figura 15).



Figura 14. Formación de callo basal en el explante.



Figura 15. Crecimiento axilar y formación de callo basal.

En las introducciones realizadas sobre los medios modificados de la Tabla 1, en los que durante su elaboración no se suplementó el medio de cultivo con azúcar, no se han encontrado tratamientos con explantes que hayan desarrollado sistema radicular. Esto indica que la presencia de la sacarosa en el medio de cultivo es esencial para el desarrollo de una planta *in vitro* (Pierik 1990) debido a que la fotosíntesis en estas condiciones de cultivo suele ser

insuficiente para satisfacer la demanda de carbono de la planta. Este hecho podría explicarse debido a que los tejidos verdes *in vitro* no son suficientemente autotróficos, a que la concentración de CO² en la atmósfera del tubo de cultivo no es siempre la más adecuada (Gibson 1967) y a causa de una iluminación insuficiente. En consecuencia, la planta *in vitro* necesita tomar carbono del medio de cultivo para satisfacer sus necesidades.

5. CONCLUSIONES

Durante la realización de este trabajo se evaluaron diferentes estrategias usadas en la formación de brotes axilares, en la desinfección del material vegetal y en la utilización de diferentes fitohormonas durante la fase de enraizamiento del proceso de micropropagación. De este modo, el trabajo realizado ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. Para la obtención de brotes axilares, la decapitación de los brotes apicales no afectó a la dominancia apical de la planta madre, por lo que no se incrementó el número de brotes axilares formados por cada planta.
2. En la descontaminación de los brotes, el uso de antibióticos no mejoró el número de explantes introducidos con éxito, aunque si la supervivencia de los ápices aislados.
3. Durante la introducción del material vegetal, la utilización de medios de cultivo desprovistos de sacarosa reduce considerablemente la contaminación de explantes en el proceso de micropropagación.
4. En la fase de enraizamiento, sólo los medios de cultivo suplementados con sacarosa formaron raíces, proceso fundamental para su micropropagación.
5. El tratamiento E1, basado en medio de cultivo MS suplementado con AIB a 3 mgL⁻¹, fue el que obtuvo mayor porcentaje de enraizamiento (70%).

6. BIBLIOGRAFÍA

Adam D. y Kheng T. 2016. Micropropagation of Hermaphrodite *Carica papaya* L. 'Rainbow' Seedlings via Axillary Bud Pathway. College of Tropical Agriculture and Huma Resourceres. University of Hawaii at Mānoa. BIO-12



- Alemanno L., Berthouly M. y Michaux-Ferreiere N. 1997. Embryogenese somatique du cacaoya a partir de pieces florales. *Plantation Recherche. Developpment* 3 (4) : 225-237.
- Alvarado M. 1992. Propagación vegetativa in vitro del papayo (*Carica papaya* L.). Tesis Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 60 pp.
- Arrieta G., Guevara E. y Sancho G. 1995. Cultivo in vitro de yemas axilares de papaya (*Carica papaya* L.) II. Determinación de las condiciones para la regeneración y multiplicación in vitro de Tallos. *Boltec.* 28 (2): 13-27
- 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.
- Baca A. 2002. Optimización de la micropropagación in vitro de *Carica papaya* L. Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 107 pp.
- Badillo V.M. 1971. Monografía de la familia *Caricaceae*. Publicada por la Asociacion de Profesores, Venezuela, Univ. Centr. Venez, p 220
- 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
- Bantawa P., Roy O.S., Ghosh P. y Mondal T.K. 2009. Effect of bavistin and adenine sulphate on in vitro shoot multiplication of *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell.: an endangered medicinal plant of Indo China Himalayan regions. *Plant Tissue Culture & Biotechnology* 19:237-245
- Bermúdez Guzmán M.J., Valadez-Ramírez P., Buenrostro-Nava M. T., Manzo Sánchez G. y Guzmán González S. 2013. In vitro induction of *Carica papaya* roots through *Agrobacterium rhizogenes* and 3-indolebutyric acid
- Bhattacharya B.J. 2002. Tesis doctoral. University of Pune. Pune. India.
- Brar D.S. y 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.
- Canhoto J.M. y Cruz G.S. 1996. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). *Protoplasma.* 191: 34 - 45.
- Castillo A. 2008. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA, p 8.
- 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 and Biotechnology* 73 (3):307-311



- Chan L.K. y Teo C.K.H. 2002. Micropropagation of Eksotika, a Malaysian papaya cultivar and the field performance of the tissue culture derived clones. *Acta Hort.* 575: 99-105
- Del Sol L., García M., Gálvez D., Rodríguez S., Torres Y., Medero V., López J., Ventura J., Cabrera M., Rodríguez S., Álvarez M., Bauta M. y García J. 2001. Efficient plant regeneration from somatic embryogenesis in papaya cv. INIVIT-2000. *Biotecnología Vegetal y Agricultura Sostenible Resúmenes evento*, 133 –
- Drew R. A. 1988. Rapid clonal propagation of papaya in vitro from mature field grown trees. *HortScience* 23:609-611.
- Duhem K., Le Mercier N. y Boxus P. H. 1988. Difficulties in the establishment of axenic in vitro cultures of field collected coffee and cacao germoplasm. *Acta Horticulturae* 225: 67 – 75
- Falkier F. 1996. Antibiotic in plant tissue culture and micropropagation. En: Cassells, A C & Hayes, B (eds), *Abstracts of the Second International Symposium on Bacteria and Bacteria contaminants of plants tissue cultures*. University College, Cork.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2014. FAOSTAT Producción agrícola [online].
- Fitch M., Moore P. y 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
- Fitch M.M., Leong T., Akashi L., Yeh A., White S., De la Cruz A., Santo L., Ferreira S. y Moore P. H. 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.
- Gallardo J., Posada R. y Gómez L. 2002. Micropropagación del híbrido cubano de Papaya IBP 42-99. *Biotecnología Vegetal*. 2 (4): 211-215.
- Gallardo J., Kosky R., Tejeda M., Posada L., Herrera I., Reyes M., García L. y Freire M. 2004. Empleo de secciones de tallo de plantas in vitro de papaya (híbrido IBP 42-99) para obtener callos con estructuras embriogénicas. *Biotecnología Vegetal* 4(4): 213-216
- Gidson. 1967 *Austr. J Biol. Sci.* 20: 189-191.
- Grout B. y Aston M. 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res*, 17, 1-7
- Guerrero M. J., Karem Basantez K., Rafael Gómez-Kosky R. y Bermudez-Carabaloso I. 2016. Establecimiento in vitro de brotes de *Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo. *Biotecnología Vegetal*, [S.l.], v. 16, n. 2, ISSN 2074-8647.



- Hossain M., Rahman N., Islam S. y Joarder O. 1993. High efficient plant regeneration from petiole explants of *Carica papaya* L. through organogenesis. *Plant Cell Reports* 13: 99-102
- Hueso J. J., Salinas I. y Cuevas J. 2015. El cultivo de la papaya. Ficha de Transferencia. Cajamar ADN Agro.
- Jiménez E. 1998. Cultivo de ápices y meristemos. En J. Pérez (Ed.), *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología* (pp. 45-56). Cuba. Ediciones GEO.
- Knight R. J. 1980. Origin and world importance of tropical and subtropical fruits. En: Nagy S, Shaw Ph E (Eds.) *Tropical and subtropical fruits*. Av Publishing, Westport.
- Kumar R. P., Kumar R. S. y Lokman H. M. "Propagation of papaya (*Carica papaya* L.) cv. Shahi through in vitro culture". *Bangladesh Journal of Botany*, vol. 41, no. 2, 22 de enero de 2013, pp. 191-195, ISSN 2079-9926, 0253-5416, DOI 10.3329/bjb.v41i2.13448.
- Lai C. C. y Yeh S. D. 2000. Enhancement of papaya axillary shoot proliferation in vitro by controlling the available ethylene. *Botanical Bulletin of Academia Sinica Taipei* 41(3): 203-212
- Leifert C., Murphy K. P. y Lumsden P.J. 1995. Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(2): 83-109
- Linneo C. 1753. *Carica papaya* L. *Species Plantarum* 1753; 470(1): 201-204.
- Mauren M. y Fitch M. 1993. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32: 205 - 212
- Ming R., Van Droogenbroeck B., Moore P. H., Zee F. T., Kyndt T., Scheldeman X., Sekioka T. y Gheysen G. 2005. Molecular diversity of *Carica papaya* and related species. In: Sharma AK, Sharma A (eds) *Plant genome: biodiversity and evolution*, vol. vol 1B. Science Publishers, New Hampshire, pp 229-254
- Mroginski L., Sansberro P. y Flaschland E. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Parte V Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: Echenique, V, Rubinsten C y Mroginski L (Eds) *Biología y Mejoramiento Vegetal*, pp. 35-42, editorial INTA Buenos Aires.
- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology plantarum*. 15: 473-497.
- Nandagopal S. y Kumari B. D. R. 2006. Adenine sulphate induced high frequency shoot organogenesis in callus and in vitro flowering of *Cichorium intybus* L. cv. Focus - a potent medicinal plant. *Acta Agriculturae Slovenica* 87:415-425.



- Nitsch J. P. y Nitsch C. 1969. Haploid plant from pollen grains. *Science* 169: 85-93
- Okkels F.T. y Pedersen M.G. 1988. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. *Acta Horticulturae*, Wageningen, (225):199-207, 1988.
- Orellana P. 1998. Propagación vía organogénesis. En J. Pérez (Ed.), *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología* (pp. 151-178). Cuba. Ediciones GEO
- Pierik R.L.M. 1990. Cultivo "in vitro" de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. TRONCOSO, A., VILLEGAS, A. and CANTOS, M. (1990). Growth and mineral composition of grape-vine rootstock cultured in vitro with different levels of ammonium nitrate. *Plant Nutrition, Physiology and Applications*. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp 581-584
- Pinzón A. 2003. Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cuatro selecciones colombianas de *Carica papaya* L. Resúmenes de trabajos de grado meritorios. Volumen 8 No. 1. Bogotá.
- Posada L. 1995. Desarrollo de la embriogénesis somática en la fruta bomba (*Carica papaya* L). Trabajo de Diploma. UCLV. Santa Clara.
- Posada L. 2005. Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la papaya. *Biotecnología Vegetal*. 5 (2): 67-79.
- Posada L., Gómez R., Gallardo J., Reyes M. y 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
- Posada L., Kosky R. G. y Reyes M. "Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. var. Maradol rojo". *Biotecnología vegetal*, vol. 7, no. 3, 2007, pp. 131-138, ISSN 1609-1841.
- Reuveni O. y Shlesinger D.R. 1990. Rapid vegetative propagation
- Reuveni O., Shlesinger D.R. y Lavi U. 1990. In vitro clonal propagation of dioecious *Carica papaya* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2: 41-46
- Reyes R. D. 1983. Manual Técnico de producción de papaya. Ed. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Panamá
- Roca W. M. y Mogrinski L. A. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT.
- Ronse D. L. P. y Smets E. F. 1999. The floral development and anatomy of *Carica papaya* (*Caricaceae*). *Canada Journal of Botany* 77(4): 582-598
- 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 Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil 35(5): 904-906.



- Scocchi D. N., Mroginski A. y Mroginski E. Organogénesis directa a partir de segmentos de hojas cotiledonares de *Citrus sinensis* (L.). En: Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste, 2004.
- Skoog F. y Miller C.O. 1965. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In: Molecular and Cellular Aspects of Development., E. Bell ed., Harper and Row, New York, pp. 481-494.
- Solis Reinaldo L., Julio Olivera S. y Rafael S. La Rosa L. 2011. Propagación in vitro de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemos apicales. Rev. peru biol. [online]. 2011, vol.18, n.3 [citado 2018-06-18], pp.343-348.
- Storey W. 1941. The botany and sex relations of the papaya. Papaya production in the Hawaii Island, Honolulu, Hawaii: Hawaii Agr. Exp. St., Bulletin 87; 5-22 pp.
- Thimann K.V. 1977. Hormone action in the whole life of plants. Amherst: University of Massachusetts Press.
- Tisserat B. 1979 Propagación de la palmera datilera (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. J Exp Bot30: 1275-1283
- Van Minh T. y 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
- Williams E. G. y Maheswaran G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. Ann.Bot., 57, 443-462
- 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.
- Wu, K., Zeng S., Chen, Z. y and Duan J. 2012. In vitro mass propagation of hermaphroditic *Carica papaya* cv. Meizhonghong. Pakistan Journal of Botany, 44(5): 1.
- Yeung E., Rahman H. y Thorpe T. 1996. Comparative Development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. cv Topas. I. Histodifferentiation Int. J. Plant Sci. 157(1): 27-39
- Yu Q., Navajas-Pérez R. y Tong E. 2008. Recent origin of dioecious and gynodioecious Y chromosomes in papaya. Trop Plant Biol. 1:49-57.
- Yu T.A., Yeh S.D. y Yang J.S. 2001. Effect of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. Bot. Bull. Acad. Sin 42: 281-286



Zhu Y.J., Agbayani P. y Moore H. 2004. Green Fluorescent protein as a visual selection marker for papaya (*Carica papaya* L) transformation. Plant Cell Rep. 22: 660-667