

Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la papaya

Laisyn Posada Pérez

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba CP 54 830. e-mail: laisyn@ibp.co.cu, laisynpp@yahoo.es

RESUMEN

La papaya (*Carica papaya* L.) es una de las principales frutas que se consumen a nivel mundial. El uso de la biotecnología como una herramienta en la propagación de plantas élite de este cultivo puede ser una vía alternativa para su rápida multiplicación, así como la introducción a escala comercial de nuevas variedades o híbridos. Este trabajo persiguió como objetivo abordar de manera general las principales consideraciones científicas sobre el uso de la biotecnología vegetal como herramienta para la propagación y conservación *in vitro* de la papaya. Se reflejan, además, algunas experiencias del colectivo de investigadores del Instituto de Biotecnología de las Plantas lo que brinda un complemento práctico a la reseña.

Palabras clave: *Carica papaya*, conservación *in vitro*, embriogénesis somática, híbrido IBP 42-99, micropropagación

ABSTRACT

The papaya (*Carica papaya* L.) is one of the most world wide consumed fruit. The use of the biotechnology as a tool in the micropropagation of elite plant in this specie can be an alternative to accelerate its multiplication, as well as the commercial scale introduction of new varieties and hybrids. This work has as objective to approach a general overview of the principal scientific considerations about the plant biotechnology use as a tool for the papaya *in vitro* propagation and conservation. Also, in this work, are showed some experience of the researchers from the Institute of Plants Biotechnology, that have a practical complement to this review.

Key words: *Carica papaya*, hybrid IBP 42-99, *in vitro* preservation, micropropagation, somatic embryogenesis

INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es originaria de América Central y su cultivo se caracteriza por ser productivo en corto tiempo y de forma continua durante todo un año. En el mundo en el 2005 la producción ascendió a 6 708 551 toneladas (FAO, 2005). Cada día está cobrando una mayor 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, además por su contenido de nutrientes. También posee un gran potencial de industrialización en el área farmacéutica, culinaria, médica, industria cervecera y bebidas no alcohólicas (Acuña, 2005).

Los 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).

En Cuba se han utilizado diferentes variedades que se han distinguido unas de las otras por su porte, su susceptibilidad a plagas y enfermedades, por la composición de las inflorescencias (masculinas, femeninas y hermafroditas), forma, tamaño, color, sabor y consistencia de los frutos.

Según el Ministerio de la Agricultura (MINAGRI, 2005) las variedades comerciales que se utilizan en Cuba son: Maradol Roja, NICA III y Criolla y se estudian otras variedades introducidas tales como Tainung No.1, Tainung No.2, Tainung No.3, Know You y el híbrido Red Lady.

La papaya se propaga tradicionalmente por semillas y esquejes. Sin embargo, los híbridos resultantes de los trabajos de mejoramiento genético para aumentar la calidad de las producciones pueden tener problemas en su

propagación y conservación a través de semillas certificadas, por lo tanto estos tienen que ser multiplicados vegetativamente.

Las técnicas de cultivo de tejidos como la micropropagación (Fitch *et al.*, 2005) y la embriogénesis somática (Banerjee, 2002) se han puesto a punto para la propagación *in vitro* de esta especie. No obstante, Drew y Manshardt (1997) refieren que la multiplicación *in vitro* de la papaya solo se justifica económicamente si la misma se realiza para un genotipo híbrido.

En el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas se ha obtenido un híbrido (IBP 42-99) que presenta frutos más pequeños que la variedad Maradol Roja y un alto brix (Posada *et al.*, 1999). El mismo se ha micropropagado y se encuentra en fase de evaluación frente a otros genotipos de papaya.

El desarrollo de nuevas técnicas de conservación, sobre todo en aquellas especies en las que los procedimientos tradicionales no son adecuados, permiten preservar de un modo más satisfactorio los recursos genéticos de plantas cultivadas, entre otros cultivos importantes para países en vías de desarrollo (Ortiz, 2000).

A nivel internacional se han empleado diversos métodos y técnicas para la conservación *in vitro* de papaya a mediano y largo plazo. Por ejemplo, es el caso de Suksa *et al.* (1997) en la disminución del crecimiento de ápices. En la crioconservación de ápices por vitrificación (Ashmore *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005). Buerhing (2003) elaboró una técnica para criopreservación de cultivos embriogénicos.

Este trabajo persiguió como objetivo abordar de manera general las principales consideraciones científicas sobre el uso de la biotecnología vegetal como herramienta para la propagación y conservación *in vitro* de la papaya. Se reflejan, además, algunas experiencias del colectivo de investigadores del Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, lo que brinda un complemento práctico a la reseña.

ORIGEN, CLASIFICACIÓN Y CULTIVO DE LA PAPAYA

Origen

La Papaya es una planta propia de América tropical (Reyes, 1983). La descripción más antigua es la del cronista Oviedo en 1535, que señala su origen en la región de Panamá (Muñoz, 1983). Según Van Leare (1959) su origen estaba en el centro y sur de México, sin embargo Litz (1983) señaló que todas las especies de *Carica* son del norte y sur de

América. En Cuba se le conoce desde épocas muy remotas, se tiene la seguridad de que existía desde el siglo XIX y adquirió importancia en las décadas del treinta y cuarenta del siglo XX Martínez 1983 (citado por Pedroso, 1990). Este frutal se ha difundido ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales, debido a la gran variedad de sus semillas.

Clasificación

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliosida*

Subclase: *Dilleniidae*

Orden: *Violales*

Familia: *Caricaceae*

Género: *Carica*

Especie: *Carica papaya* L.

Las *Caricaceae* son una pequeña familia de plantas dicotiledóneas con cuatro géneros: tres con un origen en América tropical (*Carica*, *Jarilla*, *Jacaratia*) y uno *Cylicomorfa* de África ecuatorial. Las *Caricaceae* han sido clasificadas en varias ocasiones en familias tales como: *Cucurbitaceae*, *Passifloraceae*, *Bixaceae*, y *Papayaceae*. Han sido descritas aproximadamente 71 especies, sin embargo Badillo (1993) redujo el número a 30 especies con la siguiente distribución: *Carica* 21 especies, *Cylicomorfa* dos especies, *Jacaratia* seis especies, y *Jarilla* una especie.

La Papaya (*Carica papaya*) es la más importante desde el punto de vista económico de las 21 especies de *Carica*. Entre sus nombres comunes encontramos Papaya, Papaw o Pawpaw, *Papayer* (francés), *Melonenbaum* (alemán), Lechosa (español), *Mamao*, *Mamoeiro* (portugués) y *Mugua* (chino). El género *Carica* comprende plantas dioicas, exceptuando una que es monoica *Carica monoica* (Desf.) y algunas *Carica pubescens* y polígama *C. papaya*.

Características generales

Es una planta herbácea arborescente, inerme, laticífera, erguida. El sistema radical lo componen unas pocas raíces grandes, poco profundas, provistas de numerosas raicillas absorbentes. El tallo es carnoso, firme más o menos permanente, es único, recto cilíndrico y hueco; presenta cicatrices evidentes de las hojas caídas, entrenudos cortos, y las hojas se agrupan densamente hacia su ápice. Las hojas son grandes, palmadas, simples, alternas, lisas, con peciolos largos y ascendentes, más anchos en su inserción. A medida que la planta crece, las hojas viejas se caen, cediendo lugar a las inflorescencias y frutos (Mederos, 1988).

Es un árbol de rápido crecimiento con períodos juveniles de cinco a seis meses y vida de hasta

veinticinco años (Litz 1983), no obstante, su eficiencia productiva como fruta fresca no va más allá de los cinco años. Se alcanzan rendimientos de 50 000 kg de fruta fresca por hectárea en el primer año de producción. Su atractivo además de fruta cosechable está en su alto contenido de enzimas proteolíticas, obtenidas del látex de frutos tiernos (Knight, 1980; Litz, 1983; Muñoz y Oliva, 1985). Por su parte Lima (1991) señaló que el cultivo requiere de una correcta aplicación de medidas fitotécnicas lo que permite una mayor y mejor explotación, aún cuando se continúe sembrando en áreas afectadas por virus.

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 carpeloidia 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).

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 masculinos o semillas procedentes de árboles femeninos y hermafroditas (Tabla 1) (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).

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.

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 pueden 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).

Tabla 1. Proporciones y resultados de cruzamientos y auto polinización de formas sexuales de *Carica papaya*.

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

F : Femenina

M: Masculina

H: Hermafrodita

Fuente: Ronse y Smets (1999).

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).

Cultivo de tejidos y micropropagación

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).

Con el estudio de los procesos que ocurren en el cultivo de tejidos de la papaya se han desarrollado novedosas técnicas de propagación de plantas que han permitido la multiplicación asexual de materiales vegetales élite; la conservación *in vitro* de germoplasma; el rescate de embriones híbridos en cruces interespecíficos; la producción de plantas homocigóticas; el saneamiento a enfermedades virales y fungosas; la producción de variantes somaclonales así como la transformación genética (Stiles *et al.*, 1993).

Micropropagación vía organogénesis. Aplicación en la propagación del híbrido IBP 42-99

En la micropropagación de la papaya al igual que en otras especies de plantas existen las cinco fases de la micropropagación tradicional, no obstante la misma tiene sus particularidades, pues se incluye la fase de elongación por las características *in vitro* de este cultivo, que hacen que sea clave para obtener altos porcentajes de supervivencia en condiciones *ex vitro*.

Fases 0 y I. Preparativa y Establecimiento

En el caso de la propagación *in vitro* la obtención de explantes a partir de plantas de campo ha sido y es uno de las etapas críticas de cualquier metodología en papaya. En esta especie uno de los grandes problemas que tiene la fase de establecimiento, cuando se emplean como explantes iniciales ápices o meristemas de plantas adultas cultivadas en campo es el alto porcentaje de contaminación microbiana (bacterias y hongos) (Brar y Khush, 1994; Wilson, 1996). Se han

establecido varios protocolos para la propagación *in vitro* de este cultivo, sin embargo todos emplean como explante inicial yemas tomadas de plantas cultivadas en casas de cultivo (Rajeevan y Pandey, 1986; Drew, 1988; Arrieta *et al.*, 1996).

Las principales dificultades que se presentan para el establecimiento *in vitro* a partir de plantas de campo en el cultivo de la papaya son:

- Obtención de yemas laterales de un adecuado tamaño debido a una fuerte dominancia apical (Reuveni y Shlesinger, 1990).
- Descontaminación de yemas laterales de plantas de campo (Arrieta *et al.*, 1996).
- Lento coeficiente de multiplicación inicial de las yemas laterales (Fitch *et al.*, 1997).

Para lograr la multiplicación *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99, durante la fase de establecimiento de los ápices *in vitro* se emplearon ápices de plantas adultas, con 11 meses de plantadas en campo. A las mismas se les aplicaron foliarmente dos reguladores del crecimiento (500mg.l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y 1 000mg.l⁻¹ de ácido giberélico (AG₃) para estimular el crecimiento y desarrollo de las yemas de la zona apical de los árboles. Para la desinfección de estos explantes se utilizaron diferentes sustancias, solas o en combinación: hipoclorito de sodio en concentraciones (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0%), alcohol al 70% y una mezcla de antibióticos aplicada después del hipoclorito de sodio (Sulfato de Gentamicina 50mg.l⁻¹, Estreptomina 25mg.l⁻¹ y Cefotaxima 50mg.l⁻¹), además se seleccionaron brotes apicales con dos meses de edad. Se comprobó que el decapitado de la zona apical no era determinante en la inducción de nuevos brotes de papaya cuando se le realizaban aplicaciones de reguladores del crecimiento. Se obtuvieron entre 63 y 68 brotes por planta a las cuatro semanas después de la última aplicación de 6-BAP y AG₃. La desinfección se logró al utilizar hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos y luego sumergiendo los explantes en la solución de antibióticos por 30 minutos. Se alcanzó un porcentaje de establecimiento de los ápices *in vitro* del 68% en el medio de cultivo líquido con soporte de papel (Posada *et al.*, 2004).

Fase II. Multiplicación

En la fase de multiplicación se han estudiado varios reguladores del crecimiento dentro de ellos, la kinetina, el isopenteniladenina (2iP) y el 6-BAP (Islam *et al.*, 1993) sin embargo, la citoquinina más efectiva en todos los casos ha sido el 6-BAP en combinación con el ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones entre 0.5 y 0.1 mg.l⁻¹ para ambos reguladores del crecimiento. Con ello se han alcanzando coeficientes de multiplicación entre 7.50 y 9.87 (Gallardo, 2002). También el

tidiazuron (TDZ) ha sido empleado en diferentes concentraciones en los medios de cultivo (0.25 - 1 mg.l⁻¹).

El uso de frascos de cultivo de vidrio (250ml) para esta fase de la micropropagación ha permitido obtener resultados superiores a los logrados con tubos de ensayo. De igual forma, los medios de cultivo líquidos han sido utilizados en esta fase y se han obtenido brotes sanos, de color verde intenso y más elongados que los que estaban en medio de cultivo semisólido (Banerjee, 2002).

En esta fase juega un papel fundamental la concentración de etileno dentro del frasco según informan Lai *et al.* (2000). Estos autores alcanzaron un máximo de 19 nuevos brotes por frasco de cultivo y señalaron que existió correlación entre la concentración de etileno y la proliferación de los brotes durante 3 semanas de cultivo. Ellos lograron cambios positivos en la multiplicación de los brotes de papaya al aplicar inhibidores de la biosíntesis del etileno tales como amino-etoxivinilglicina (AVG) y CoCl₂. La adición al medio de cultivo de CoCl₂ tiene un efecto persistente sobre las yemas múltiples de papaya que otros tratamientos con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxil (ACC). El efecto promovido en la biosíntesis del etileno por las bajas concentraciones de CoCl₂ puede ser debido al rol de este micronutriente (Co²⁺) en el medio de cultivo.

La multiplicación *in vitro* de los ápices ya establecidos del híbrido IBP 42-99, se realizó en el medio de cultivo compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y reguladores de crecimiento, al colocar cinco explantes en cada frasco de cultivo con capacidad de 250 ml que contenían 30ml de medio de cultivo cada uno. Los frascos de cultivo fueron colocados en cámaras de crecimiento con luz solar con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) 50-62.5 μmol m⁻² s⁻¹ y temperatura de 25 ± 2°C. El subcultivo se realizó a los 24 días de cultivo. Transcurrido este tiempo se individualizó cada brote obtenido para ser subcultivado nuevamente en un medio de cultivo fresco, además se eliminaron los restos del gelificante y el callo que pudo formarse en determinados casos. El suplemento de la riboflavina en los medios de cultivo en concentraciones entre 1.1 y 1.3 mg. l⁻¹ evita la formación de callos en la base de las plantas *in vitro* (Gallardo *et al.*, 2004a).

A las 3 semanas de cultivo se obtienen plántulas con una altura entre 2-4 cm y más de 4 hojas trilobadas.

Varios autores informan sobre problemas con la presencia de bacterias endógenas en el cultivo *in*

vitro de la papaya. Pinzón (2003) hace referencia al empleo de medios de cultivo sin sacarosa en diferentes variedades de papaya, para ayudar a reducir las pérdidas por bacterias y refieren buenos resultados. También Fitch *et al.* (2005) señalaron el desarrollo de medios de cultivo fotoautotróficos con este fin, con la eliminación de la sacarosa del medio de cultivo, previo a una descontaminación de los explantes con carbenicilina 500 mg.l⁻¹ y cefotaxima 200 mg.l⁻¹ en el medio de cultivo de multiplicación durante un mes.

Fase III. Elongación

El desarrollo de una fase de elongación ha sido importante en el micropropagación de la papaya previa a la fase de enraizamiento.

Luego de realizados varios subcultivos en el medio de cultivo de multiplicación será necesario transferir los brotes a un medio de cultivo de elongación ya que la altura óptima de los mismos para ser enraizados debe ser superior a 3.0cm.

Esta elongación en las plantas *in vitro* ha sido alcanzada con el suplemento al medio de cultivo de ácido giberélico (AG₃) en concentraciones entre 1- 5.0 mg.l⁻¹ durante 15 días de cultivo (Banerjee, 2002). Las plantas han llegado a alcanzar una altura entre los 3.0 a 3.8 cm, con un 92 % de brotes elongados. Los frascos de cultivo se colocan igualmente en cámaras de crecimiento con luz solar con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) 50-62.5 μmol m⁻² s⁻¹ y temperatura de 25± 2°C durante 24 días.

Fase IV. Enraizamiento

El enraizamiento en la micropropagación de la papaya puede ser logrado en condiciones *in vitro* y *ex vitro*. Para el enraizamiento *in vitro* las plantas bien formadas con 3 a 4 hojas 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 el 50% de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y concentraciones entre 3 y 5 mg.l⁻¹ de ácido indol butírico (AIB). En este medio de cultivo deben permanecer 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 por espacio de 20 días más. Al final de este período el 80% de las plántulas formarán raíces con pelos absorbentes y estarán listas para ser trasladadas a condiciones ambientales de aclimatización.

Gallardo *et al.* (2004b) obtuvieron resultados satisfactorios en el enraizamiento del híbrido IBP 42-99 al emplear frascos de cultivo con 30ml de medio de cultivo y colocar cinco plantas por frasco

así como condiciones de cultivo de luz solar ($48-62.5 \text{ mol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y una temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en las cámaras de crecimiento.

Otra variante que también puede ser empleada es el enraizamiento *ex vitro*. Para esto una vez obtenidas las plántulas con tres o más hojas y 4 cm de altura (provenientes del medio de cultivo de elongación), deben lavarse en su base con abundante agua corriente para eliminar restos de medio de cultivo y posteriormente colocarse durante 24 horas en bandejas con una solución enraizadora, la cual puede estar compuesta por ácido indol-acético (AIA) 10 mg.l^{-1} y AIB 8.0 mg.l^{-1} previo a la aclimatización.

Fase V. Aclimatización

La fase de aclimatización de las plantas *in vitro* es una de las etapas críticas de cualquier protocolo de propagación en este cultivo. Una humedad relativa entre el 95 al 100 % es necesaria durante los primeros 15 días. La supervivencia puede alcanzar valores entre 65-85 % en estas condiciones durante los primeros 7 días de 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 (cámara húmeda) 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 polietileno 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 trasplante 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:

- 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 (10 g.l^{-1}) de forma foliar, toman una consistencia vigorosa y desarrollan hojas de color verde intenso.

La propagación *in vitro* del híbrido (IBP 42-99) resultante de los trabajos de cruzamientos en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas, demuestra el potencial del cultivo de tejidos para la propagación masiva de genotipos élite donde otras formas de reproducción y multiplicación serían desventajosas para mantener las potencialidades genéticas del cultivo.

Cultivo en campo de plantas de papaya obtenidas por organogénesis

Fitch (2005) refiere que las plantas de papaya obtenidas por micropropagación tuvieron frutos de tamaño comercializable de 1 a 3 meses más temprano que las plantas obtenidas por semillas. Además, presentaron una menor altura que las obtenidas por semillas lo cual facilita su cosecha y las hace menos vulnerables a los fuertes vientos.

La preparación del suelo, la plantación y las técnicas culturales deben ser realizadas de acuerdo con las prácticas tradicionales para el cultivo. Después de 9 meses las plantas de papaya comienzan a florecer y formar frutos normales (Van Minh y Tuong, 2001). Al respecto Chan y Teo (2002) señalan que las evaluaciones en campo de plantas de seis variedades de papaya mostraron un rendimiento uniforme y una alta calidad de los frutos similares a sus plantas madre. Solo encontraron pequeñas variaciones en la altura de las plantas, el número, peso y forma de los frutos, así como el contenido de azúcar.

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática ofrece mayores posibilidades de obtener volúmenes de producción superiores en un menor período de tiempo, lo cual la convierte en un método más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Villalobos y Torpe, 1991). Como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas entre las que se encuentran una enorme capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente. Todos estos conocimientos tienen su aplicación en la propagación y mejora genética de plantas, en el saneamiento de patógenos, en el intercambio y conservación de germoplasma y en ingeniería genética.

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).

En el género *Carica* muchos de los autores realizan todo el proceso de embriogénesis somática en ausencia de iluminación (Posada, 1995; Mahon *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 1999; Del Sol *et al.*, 2001; Banerjee, 2002) sin embargo, otros desarrollan la fase de formación de callos en presencia de luz (Hossain, *et al.*, 1993; Jordan y Velozo, 1996).

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. A continuación se describen brevemente las principales características de cada una.

Embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros (Posada, 1995)

Como material vegetal inicial deben emplearse frutos inmaduros (obtenidos de flores hermafroditas elongatas) entre 90-120 días después de la anthesis de plantas de campo.

En el laboratorio primeramente son lavados con una solución de detergente comercial y luego se colocan 30 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% con dos o tres gotas de Tween 80 por litro de solución. Posteriormente se lavan 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.

Obtención y multiplicación de los embriones somáticos

Para la obtención de los embriones somáticos inmaduros se colocan cinco embriones cigóticos por frasco de cultivo de 250 ml de capacidad, a los cuales previamente se les adicionan 30 ml de medio de cultivo semisólido. Alrededor de los 12-15 días los embriones cigóticos comienzan a abrir las hojas cotiledonales y de la zona apical se forman los embriones somáticos, los cuales se encuentran en etapa globular, presentan una coloración amarillo claro y alcanzan un número de 50-100 por explante a las 6 semanas de cultivo. Esta es una embriogénesis somática directa de alta frecuencia. Las condiciones de cultivo son oscuridad y temperatura de 27±2 °C.

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.

Si se pretende continuar con la multiplicación secundaria de los embriones somáticos, estos son separados en pequeños grupos de entre 5 y 12 (masa fresca de aproximadamente 50 mg (MF)) que se colocan en el medio de cultivo a razón de cinco grupos por frasco (250ml) y posteriormente en oscuridad y temperatura de 27±2 °C. Este proceso de multiplicación puede ser realizado durante 5 - 6 subcultivos (5 semanas cada uno). Se obtiene una embriogénesis secundaria de los embriones somáticos y se llegan a formar grupos de 200-250 embriones somáticos en etapa globular (100%) con un coeficiente de multiplicación de 12.5 a las 5 semanas de cultivo.

El medio de cultivo utilizado debe contener la mitad de las sales MS y 2 mg.l⁻¹ de 2,4-D.

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.

Germinación de los embriones somáticos

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.

Los embriones somáticos provenientes del medio de cultivo de multiplicación son separados, también en pequeños grupos antes de colocarlos en el medio de cultivo. 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.

Las plantas *in vitro* se desarrollan completamente y forman varias hojas verdaderas. Debido a que en esta especie la germinación de los embriones somáticos ocurre de forma parcial (Posada, 1995), se hace necesario utilizar un medio de cultivo para elongar las plantas *in vitro* y posteriormente que las mismas enraícen.

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, 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. Posterior a las cuatro semanas de cultivo y con una altura promedio superior a los 3 cm, las plantas *in vitro* se colocan en un medio de cultivo MS suplementado con 5 mg.l⁻¹ de AIB para inducir el enraizamiento, donde permanecen por espacio de 10 días y luego se colocan en medio de cultivo MS libre de reguladores de crecimiento para que emitan las raíces.

Enraizamiento de las plantas obtenidas a partir de embriones

Los explantes provenientes del medio de cultivo de elongación se transfieren a un medio de cultivo de enraizamiento, compuesto por el 50% de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y suplementadas con 5 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 pasarán 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 plantas *in vitro* formarán raíces con pelos absorbentes, listas para ser trasladadas a condiciones ambientales de aclimatización.

Durante esta fase es necesario eliminar el callo basal formado durante las fases anteriores para lograr el enraizamiento de las plantas *in vitro*.

Las condiciones de cultivo para esta fase son 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.

Otra variante que también puede ser empleada es el enraizamiento *ex vitro*. Para ello debe seguirse un procedimiento similar al descrito para las plantas obtenidas por organogénesis.

Embriogénesis somática a partir de plantas *in vitro* (Gallardo *et al.*, 2004a y b)

Otro método para el desarrollo de la embriogénesis somática puede ser el uso de plantas *in vitro* como explantes iniciales para inducir la formación de callos.

Formación de callos

Para lograr la formación de callos a partir secciones de tallo de plantas *in vitro* del híbrido de papaya, se debe emplear el segmento 1 (ápice de 5.0 mm de longitud al que se le elimina el meristemo) en el medio de cultivo Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con 1.5 mg.l⁻¹ de AIA y 1.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP. Se logra obtener callos compactos, secos y grumosos. La mayoría de los investigadores tanto en papaya como en otras especies no emplean AIA para formar callos u obtener embriones somáticos, las auxinas más utilizadas son 2,4-D y ANA. Sin embargo, sobre la base de los resultados obtenidos se pudo concluir, que con el empleo del AIA combinado con 6-BAP se obtienen callos con mejores características en cuanto a consistencia y aspectos morfológicos en el híbrido IBP 42-99.

Según Parrot (1993) el tipo, estado fisiológico y los niveles de diferenciación y polarización de los tejidos utilizados como explantes iniciales son algunos de los factores que favorecen o interfieren la formación de callos. Hossain *et al.* (1993) obtuvieron callos a partir de peciolo de hojas de papaya al combinar 6-BAP con ANA y lograron regenerar plantas de los mismos. Estos autores señalaron la formación de los callos a partir de los extremos del explante donde se le había realizado el corte.

Formación de embriones somáticos

Se logra obtener una embriogénesis somática de alta frecuencia a partir de los callos obtenidos de secciones de tallo, al emplear el medio de cultivo compuesto por la mitad de las sales MS suplementadas con 5.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D.

Al igual que al utilizar como explante inicial embriones cigóticos inmaduros al emplear el 2,4-D en concentraciones entre 5 – 15 mg.l⁻¹ se desarrolla la embriogénesis somática. Primeramente los callos toman una coloración parda más oscura y a las 6 semanas se observa la presencia de los embriones somáticos.

Otros autores emplean 2,4-D para obtener embriones somáticos en papaya variedad INIVIT 2000 a partir de embriones cigóticos y obtienen los mejores resultados con concentraciones de 4.7 mg.l⁻¹ (Del Sol *et al.*, 2001).

Por su parte Banerjee (2002) para obtener embriones somáticos de papaya emplea concentraciones de 2,4-D desde 2 hasta 25 mg.l⁻¹ e informa que a partir de 15 mg.l⁻¹ existe una disminución significativa en cuanto al número de embriones y al porcentaje de explantes con embriones.

Multiplicación secundaria de los embriones somáticos

Se alcanza el mayor número de embriones somáticos en etapa globular durante la embriogénesis secundaria o repetitiva al emplear como medio de cultivo la mitad de las sales MS suplementadas con 5 mg.l⁻¹ de 2,4-D.

La utilización del 2,4-D en el medio de cultivo en diferentes concentraciones, permitió el desarrollo de la embriogénesis secundaria o repetitiva en los embriones somáticos del híbrido de papaya IBP 42-99. Con el uso de 5 y 8 mg.l⁻¹ de 2,4-D se logran los mayores porcentajes de embriones somáticos en etapa globular, 98 y 100 % respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos, pero significativamente superiores a cuando se utilizan 2 mg.l⁻¹. Con el empleo de 2 mg.l⁻¹ existe un mayor porcentaje de diferenciación de los embriones somáticos y se observan embriones con tendencia a germinar pues toman una coloración verde en su extremo superior, esto se debe a un rápido agotamiento del regulador de crecimiento en el medio de cultivo durante este período, al estar la auxina en más baja concentración. Según Parrot (2002) los tejidos embriogénicos son capaces de formar embriones globulares aún cuando los niveles de auxina exógena disminuyen hasta cierto umbral, pero en ausencia de esta la histodiferenciación ocurre normalmente.

La embriogénesis somática o repetitiva es de mucha importancia en los programas de mejoramiento genético de especies vegetales y en especial el desarrollo de embriones somáticos en etapa globular, pues es la etapa del proceso de histodiferenciación de los embriones somáticos adecuada para la transformación genética por biobalística en el caso de la papaya (Más *et al.*, 2002).

Germinación de los embriones somáticos

Se logra el 100% de germinación de los embriones somáticos de plantas *in vitro* al emplear 0.15 mg.l⁻¹ de 6-BAP. Se observa un alargamiento del tallo (eje hipocotilo) y el desarrollo del primer par de hojas verdaderas muy pequeñas, esto está dado por los niveles endógenos de auxina, que al emplear baja concentración de la citoquinina la relación auxina/citoquinina se favorece para la primera y esto provoca el alargamiento celular. Según Vázquez y Torres (1995) cuando el balance auxina/citoquinina

está por encima de uno favorece el alargamiento y la división celular.

Para completar y lograr el desarrollo de plantas bien formadas se les realiza a los explantes un segundo subcultivo en el mismo medio de cultivo. De forma general se observa un aumento en los porcentajes de germinación, además de un mayor desarrollo de las plantas *in vitro* ya formadas. Durante este período se evidencia un mayor desarrollo de las estructuras formadas y se elongan ligeramente las plantas *in vitro* las cuales ya han formado pequeñas hojas, pero sin mucho desarrollo del tallo.

Debido a que en esta especie la germinación de los embriones somáticos ocurre de forma parcial (Posada, 1995), es necesario utilizar un medio de cultivo para elongar las plantas *in vitro* y posteriormente que las mismas enraizaran, al igual que las obtenidas a partir de embriones cigóticos inmaduros.

Elongación y enraizamiento de las plantas obtenidas a partir de embriones

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 presentan una consistencia robusta y como promedio cuatro pares de hojas. Por otra parte existe un desarrollo de las yemas laterales, lo que debe estar dado por la pérdida de la dominancia apical, por ambos subcultivos en medio de cultivo de germinación con citoquininas. Se logra el enraizamiento de las plantas *in vitro*, al ser colocadas en el medio de cultivo de enraizamiento propuesto por Posada (1995). Las raíces presentan una coloración blanca y alcanzan una longitud de 5cm como promedio, además, presentan una amplia ramificación de raíces secundarias. Debido a las características de esta fase donde se colocan los explantes 10 días en medio de cultivo con auxina (AIB) y luego se subcultivan a medio de cultivo sin regulador de crecimiento por un período de 30 días, le permite a las plantas *in vitro* que alcancen un mayor tamaño.

Al igual que para las plantas obtenidas por organogénesis o por embriogénesis a partir de embriones cigóticos, el enraizamiento puede realizarse *ex vitro*. Para ello debe seguirse un procedimiento similar al descrito para las plantas obtenidas por organogénesis.

La embriogénesis somática como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas: una enorme capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente.

Todos estos conocimientos tienen su aplicación en propagación y mejora de plantas, en saneamiento de patógenos, intercambio y conservación de germoplasma y en ingeniería genética y selección de especímenes transformados.

CONSERVACIÓN *IN VITRO*

Con el desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* ha sido posible establecer métodos de micropropagación para muchas especies vegetales. Estas colecciones activas constituyen una nueva categoría, pero el material vegetal en crecimiento continuo no puede ser almacenado a largo plazo, ya que presenta los problemas prácticos de la manipulación (subcultivos periódicos a medio de cultivo fresco) y la inestabilidad genética por el cultivo de tejidos prolongado (Withers, 1987).

Para evitar estos riesgos se han implementado dos estrategias de conservación *in vitro*; la primera contempla, la limitación del crecimiento (crecimiento mínimo) y con ello se garantiza la conservación a corto y mediano plazo. La segunda, consiste en la paralización total del crecimiento y sólo es factible aplicando las técnicas de crioconservación o almacenamiento a ultra baja temperatura (-196 °C) en nitrógeno líquido. Esto permite conservar germoplasma por tiempo indefinido, en un espacio reducido, con bajos costos de mantenimiento y sin inestabilidad genética (Hirai y Sakai, 2003). Este método ha sido aplicado en muchas especies para la conservación de polen, ápices, embriones cigóticos y somáticos, suspensiones celulares (Huarte y Rigato, 2001).

La conservación *in vitro* es un auxiliar valioso de la conservación en bancos de semilla y de campo, ya que permite tener duplicados seguros en espacios reducidos y conservar especies de que mantenerse en semillas o en el campo se podrían perder. Ofrece además, la posibilidad de utilizar un amplio número y variedad de muestras, y facilita el acceso a ellas para su evaluación e intercambio. Sus condiciones asépticas garantizan mayor sanidad de las muestras y en consecuencia incrementan el intercambio de materiales vegetales sanos.

El principal objetivo de los bancos *in vitro* es conservar las plantas con semillas recalcitrantes o cultivos de propagación vegetativa o clonal, otros que son altamente heterocigóticos y requieren ser propagados vegetativamente para conservar su integridad genética. También se incluyen raíces y tubérculos con vida corta en el almacenamiento, como la papa, la batata y la yuca (Frankel, 1995).

Suksa *et al.* (1997), lograron altos porcentajes de supervivencia en ápices de papaya *in vitro*, después de 12 meses de conservación, a 16 °C de temperatura y comprobaron que la adición de ABA 5mM influyó

satisfactoriamente en la disminución del crecimiento de los ápices. Además, informaron una severa suculencia de los ápices de papaya conservados en medio de cultivo que contenía manitol. Por otra parte, comprobaron que la adición de altas concentraciones de sacarosa no mejoró la resistencia al frío de los ápices.

Ashmore *et al.* (2000) desarrollaron técnicas y procedimientos para la conservación *in vitro* y crioconservación de brotes axilares y yemas apicales de plantas *in vitro* de papaya; este último a través de un simple protocolo de vitrificación.

En el empleo de técnicas de crioconservación de recursos fitogenéticos en papaya; Buerhing (2003), desarrolló un protocolo de crioconservación para el suministro continuo de cultivos embriogénicos de líneas de papaya para transformación.

Por su parte Wang *et al.* (2005) emplearon ápices de 4 a 6 semanas de edad de plantas cultivadas *in vitro* de seis variedades de papaya para ser crioconservados por vitrificación. Los ápices fueron tratados en un criotubo de 2 ml de capacidad con una solución de 2M glicerol y 0.4 M de sacarosa a 25 °C por 20 min, luego deshidratados con 1 ml de solución vitrificación pre-enfriada a 4 °C por 60 min.

La conservación del híbrido de papaya IBP 42-99 es muy importante para los programas de mejora genética y la propagación *in vitro* del mismo. Al aplicar el método de crecimiento mínimo (sales MS 100% y una concentración de 10 g.l⁻¹ de manitol) se logró que plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99 fueran conservadas durante 170 días. Además, fue posible la crioconservación de brotes apicales de plantas *in vitro* con el empleo de la solución de vitrificación PVS2 con un tiempo de inmersión de 40 minutos a 0°C, el precultivo de las plantas donantes por 14 días en 50 g.l⁻¹ de sacarosa y una longitud de los explantes de 2.0 mm incluyendo la presencia de 2-3 primordios foliares. La recuperación se logró con la incorporación de los ápices a la multiplicación *in vitro* y el número de brotes por ápice crioconservado se alcanzó a los 90 días de restablecidas las condiciones de cultivo.

El uso de la biotecnología vegetal constituye una herramienta para la propagación y conservación *in vitro* de la papaya así como para el mejoramiento genético. Cada una de estas ramas se interrelacionan. Para obtener plantas transgénicas en cualquier especie vegetal es necesario contar con metodologías eficientes de transformación y regeneración de plantas por cultivo de tejidos. Los resultados incluidos en este trabajo demuestran que en la especie *Carica papaya* los protocolos de regeneración de plantas por embriogénesis somática y organogénesis desarrollados pueden ser empleados para este fin.

REFERENCIAS

- Acuña, L E (2005) El cultivo de Mamón (*Carica papaya*) [en línea] En: <http://www.inta.gov.ar/montecarlo/info/documentos/alternativos/cultivo_mamon.pdf> [consulta: 6 de febrero de 2005]
- Agronegocios (2005) Guía técnica del cultivo de papaya [en línea] En: <<http://www.agronegocios.gob.sv/comoproducir/guias/papaya.pdf>> [consulta: 8 de marzo de 2005]
- Ashmore, SE, Saunders R, Drew R (2000) *In vitro* conservation and cryopreservation of papaya. En: Engelman F y Takagi H (eds.) Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application, p. 453. Plant Genetic Resources Institute, Rome
- 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.
- Badillo, VM (1993) *Caricaceae*, Segundo Esquema. Rev. Fac. Agron. Univ. Cent. Venezuela, Alcance 43: 111-116
- 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
- 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
- Buerhing, G (2003) Cryopreservation Studies in *Carica papaya*. Effect of some cryoprotectants on regrowth and somatic embryogenesis in Sunrise Sola papaya. *In vitro* Cell. Dev. Biol-Plant 39: 54-60
- 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
- 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
- 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
- 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
- Castillo, B, Smith MAL, Yadava U L (1998) Liquid system scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73 (3):307-311
- 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
- Castillo, B, Smith M, Madhavi D y Yadava U (1998) Estimation of the proteolytic enzyme activity of *Carica papaya* L. somatic embryos in liquid system. *Inter. J. Agric* 15 (1-4): 45-51
- Cruz, G S, Canhoto J M, Abreu M (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. *Plant Science* 66: 263-270
- Chan, LK, 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
- 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, García J (2001) Efficient plant regeneration from somatic embryogenesis in papaya cv. INIVIT-2000. *Biotecnología Vegetal y Agricultura Sostenible Resúmenes evento*, 133 – 215. INIVIT. Santo Domingo.
- Drew, R.A. (1988). Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field-grown trees. *HortScience* 23: 609-611
- 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
- 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 marzo de 2005]
- 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.
- 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
- Frankel OH (1995) Genetic perspectives of germplasm conservation. En: WK Arber, K Ilmensee, WJ Peacock y D Starlinger (Eds.), *Genetic Manipulations: Impact on man and society*, pp. 161-170. Cambridge University Press. Cambridge
- Gallardo, J, Posada L, Kosky R, Más L, Reyes M, Herrera I (2002) Micropropagación del híbrido Cubano de Papaya IBP 42-99. *Biotecnología Vegetal* 2(4): 211-215
- Gallardo, J, Kosky R, Tejada 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. *Biotecnología Vegetal* 4(4): 213-216
- Gallardo, J, Kosky R, Herrera I, Tejada M, Posada L, Chong B, Reyes M y Freire M (2004b) Regeneración de plantas de un híbrido de papaya (IBP 42-99) a partir de callos obtenidos de ápices de plantas *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 4(3): 159-163
- González, G, Alemán S, Barredo F y Robert M L (2002) Embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem. *Biotecnología vegetal* 2 (1): 3–8
- Hirai D, Sakai A (2003) Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam) by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Report* 21(10): 961-966
- 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
- Huarte D, Rigato A (2001) Crioconservación de variedades nativas de *Solanum tuberosum* ssp andigena [en línea] 2001. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/ResumenesPG/PGPV2002/resudiglio.htm>. [Consulta 17 de Septiembre de 2004].
- Islam, R, Rahman SM, Hossain M, Joarder OI (1993) *In vitro* clonal propagation of papaya (*Carica papaya* L.). *Pakistan Journal of Botany* 25 (2): 189-192

- Jordan, M, Velozo J (1996) Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 189-194
- Khan, S A, Iqbal J (2000) Polyclonal-antibody-mediated insolubilization and stabilization of papain. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 32(2): 89-94
- Knight, R J (1980) Origin and world importance of tropical and subtropical fruits. En: Nagy S, Shaw Ph E (Eds.) *Tropical and subtropical fruits*. Avi Publishing, Westport.
- 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
- Lima, H (1991) Resultados obtenidos en la investigación de las estaciones nacionales de frutales. Laboratorio de cultivo *in vitro* y diagnóstico del Instituto de Investigación de Cítricos y otros frutales. pp. 15-18. La Habana.
- Litz, RE (1983) Papaya. Handbook of plant cell culture. Tropical and Subtropical fruits 2. Florida
- Mahan, R E, Bateson M F, Chamberlain DA, Higgins C M, Drew R A, Dale J L (1996) Transformation of an Australian variety of *Carica papaya* L. using microprojectile bombardment. *Aust. Plant Physiol.* 23: 679-685
- Mas, L, Chong B, Gómez R, Gallardo J, Herrera I y Reyes M (2002) Parámetros óptimos en la transformación de embriones somáticos de papaya empleando una pistola de genes de baja presión. *Biociencia* 2(2): 101-105
- Mauren, M, Fitch M (1993) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32: 205 – 212
- Mederos, E (1988) Fruticultura. Cultivo de la fruta bomba, pp.94-103. Ed. Pueblo y Educación. La Habana.
- MINAGRI (2005) Instructivo técnico para la producción de semillas de papaya en Cuba. La Habana.
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 437-497
- Muñoz, S (1983) Programa de mejoramiento genético de la fruta bomba *Carica papaya* L. *Ciencia y Técnica en la agricultura. Cítricos y otros frutales* 6(1): 79-81
- Muñoz, S, Oliva H (1985) Diferentes variedades que afectan el rendimiento en látex de los frutos de *Carica papaya* L. *Ciencia y Técnica en la agricultura. Cítricos y otros frutales.* 8(4): 86-87
- Nitsch, J P, Nitsch C (1969) Haploid plant from pollen grains. *Science* 169: 85-93
- Ortiz, R (2000) Conservación de células, tejidos y órganos vegetales a bajas temperaturas: Crioconservación [en línea] 2000. Disponible en: <http://www.hannover2000.net/expo2000hannover/es/tecnología/proyectos/crioconservación/largo.htm>. [Consulta 20 de septiembre de 2004]
- Otero (2003) Maradol Roja certificada [en línea] en: <http://www.semilladelcaribe.com.mx/paginas/tecno.htm> [consulta: 8 febrero de 2005].
- Parrot, T W (1993) Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP. San José, Costa Rica. Proceedings. INIBAP
- Parrot, W (2002) La embriogénesis somática en las angiospermas. Resúmenes. VI Simposio Internacional en Biociencia Vegetal. IBP. Santa Clara.
- Papaya Seed Co (2001) <http://www.papaya-seeds.com/>
- Pedroso A F (1990) Estudio de algunas fases de la micropropagación de la fruta bomba (*Carica papaya* L.). Trabajo de Diploma. UCLV. Fac. Ciencias Agropecuarias. Santa Clara
- 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.
- Pires de Almeida, E, Pedroso de Oliveira R, Loyola Dantas J L (2001) Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. *Sci. Agric.* 58 (1): 25-31
- Posada, L (1995) Desarrollo de la embriogénesis somática en la fruta bomba (*Carica papaya* L.). Trabajo de Diploma. UCLV. Santa Clara.
- Posada L, Gómez R, Reyes M, Pérez J, González N (1999) Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas de dos nuevos híbridos cubanos de papaya (*Carica papaya* L.). V Coloquio Internacional de Biociencia Vegetal. Libro de reportes cortos. IBP. Santa Clara
- 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. *Biociencia Vegetal* 4(3): 153-158
- 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
- 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
- Reuveni, O, DR Shlesinger (1990) Rapid vegetative propagation of papaya plants by cuttings. *Acta Horticulturae* 275: 301-305
- Reyes, RD (1983) Manual Técnico de producción de papaya. Ed. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Panamá
- Sierra, S (2003) Cultivo de papayo [en línea] En: <<http://www.infojardin.com/Frutales/fichas/papayos-cultivo-papayo.htm>> [consulta: 6 de enero de 2005]
- 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
- 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
- Stiles J, Lemme S, Sondur M, Morshidi, M, Manshardt R (1993) Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theor. Appl. Genetic* 85: 697-701
- Shu, W, Loh C S (1991) Secondary embryogenesis from thin cell layers of *Brassica* ssp. *Olivifera*. *New phytol.* 119: 427 – 432
- Suksa PA, Kataoka I, Fujime Y, Subhadrabandhu S (1997) Effect of temperature, growth retardants and osmotic potential on growth of Papaya shoots conserved *in vitro*. *Tropical Agriculture* 41: 1: 7-13
- Van Leare, R (1959) Le Papayer. Ed. Publication de la Direction de 1 Agriculture des Forest et de e Elevage. Bruselas
- Vázquez E, Torrez S (1995) Fisiología Vegetal. Ed. Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana.

- 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
- Villalobos VM, Engelmann F (1995) *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. World journal of microbiology and Biotechnology 11(4): 375 - 382
- 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
- Wang, YL, Fan MJ, Liaw SI (2005) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. Botanical Bulletin of Academia Sínica 46: 29-34
- 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
- Withers LA (1987) The low temperature preservation of plant cell, tissue and organ cultures and seed for genetic conservation and improved agriculture practice. En: Grout BWW, Morris GJ (eds.). The effects of low temperature on biological systems, pp. 389-409. Edward Arnold Ltd, London
- 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
- Zhu, 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