

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



**PROPAGACION IN VITRO DE PAPAYA
(Carica papaya L.)**

TESINA

Que para obtener el título de ingeniero agrónomo horticultor
Presenta

PABLO PAZ GUTIERREZ

Director de tesina: **MC. DANIEL MUNRO OLMOS**

Asesora: **DRA. CELIA ROCHA GARCIA**

Apatzingán, Michoacan., Mayo de 2016.

INDICE

Índice.....	i
Índice de figuras.....	iii
Índice de cuadros.....	iv
Resumen.....	v
I. INTRODUCCION.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
III. REVISION DE LITERATURA.....	5
3.1. Taxonomía y nomenclatura de la papaya (<i>carica papaya</i> L.).....	5
3.2. Origen y distribución.....	6
3.3. Tipos de planta de la papaya.....	6
3.3.1. Plantas femeninas o hembras.....	7
3.3.2. Plantas machos o masculinas.....	7
3.3.3. Plantas hermafroditas.....	8
3.4. Micropropagación.....	9
3.4.1. La totipotencialidad celular en plantas.....	10
3.4.2. Aplicaciones de cultivo <i>in vitro</i>	10
3.5. Asepsia en explantes de papaya.....	11
3.6. Reguladores de crecimiento.....	11
3.6.1. Auxinas.....	12
3.6.2. Giberelinas.....	13
3.6.3. Citocininas.....	14
3.6.4. Acido abscísico.....	15

3.6.5. Etileno.....	15
3.7. El explante.....	15
3.7.1. Características de la planta donante.....	17
3.7.2. Tipos de explante utilizados en papaya.....	17
3.8. Medios de cultivo para la técnica <i>in vitro</i>	19
3.8.1. Composición de medios de cultivos para la técnica <i>in vitro</i>	19
3.8.2. Preparación del medio de cultivo.....	23
3.8.3. Medios de cultivo utilizados para papaya <i>in vitro</i>	24
3.9. Condiciones ambientales de incubación para papaya <i>in vitro</i>	25
3.10. Embriogénesis somática.....	26
3.10.1. Organogénesis o embriogénesis directa.....	27
3.10.2. Organogénesis o embriogénesis indirecta.....	27
3.10.2.1 Callo.....	28
3.10.3. Métodos de reproducción <i>in vitro</i> de papaya.....	28
3.11. Desarrollo radicular <i>in vitro</i>	29
3.11.1. Resultados de enraizamiento <i>in vitro</i> de papaya.....	29
IV. MATERIALES Y METODOS.....	31
V. CONCLUSIONES.....	32
VI. BIBLIOGRAFIA.....	33

INDICE DE FIGURAS

Figura	Titulo	Pagina
1.	a) Flor femenina de <i>C. papaya</i> ; b) detalle del estigma.....	7
2.	Flor estaminada de <i>C. papaya</i> : a) corte longitudinal del gineceo; b) corte transversal.....	8
3.	a) Flor hermafrodita de <i>C. papaya</i> ; b) Detalle de estambres de flor hermafrodita.....	9
4.	Explantes fenolizados.....	17
5.	Propagación vegetativa por embriogénesis somática.....	26
6.	Vía de multiplicación directa de cultivo <i>in vitro</i>	27
7.	Vía de multiplicación indirecta de cultivo <i>in vitro</i>	27
8.	Tipos de callos.....	28

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Titulo	Pagina
1.	Medio de cultivo NH.....	20
2.	Medio de cultivo Murashige.....	21
3.	Medio de cultivo B5.....	21
4.	Medio de cultivo N6.....	22
5.	Medio de cultivo Shenk y Hildebrand.....	22

RESUMEN

El presente trabajo reúne los resultados de las principales investigaciones de la propagación in vitro de papaya (*Carica papaya* L.), abarcando cada una de las etapas de la micropropagación y concluyendo que el explante más utilizado es la yema axilar o meristemo axilar con excelentes resultados en la obtención de callos o brotes meristemáticos. El proceso de asepsia de los explantes, más adecuado fue alcohol al 70% durante 30 segundos y enjuagar tres veces con agua destilada estéril, luego sumergir en hipoclorito de sodio 1% - 4% durante 10 minutos. De acuerdo a la revisión se puede concluir que tanto la embriogénesis directa como indirecta son utilizados para la propagación de la papaya y ambos llegan a producir una plántula de papaya. La obtención de la raíz y proliferación de la misma se da con auxinas como IBA, BAP y ANA.

ABSTRACT

This paper brings together the results of major investigations in vitro of papaya (*Carica papaya* L.) spread, covering each of the stages of micropropagation and concluding that the explant most commonly used is the axillary bud or axillary meristem with excellent results in obtaining calluses or meristematic buds. The process asepsis explant was more suitable 70% alcohol for 30 seconds and rinsed three times with sterile distilled water, then immersed in 1% sodium hypochlorite - 4% for 10 minutes. According to the review it can be concluded that both direct and indirect embryogenesis are used for propagation of papaya and both come to produce a seedling papaya. Obtaining root and proliferation of the same occurs with auxin like IBA, BAP and ANA.

Palabras clave: Papaya, propagación, explante, asepsia, in vitro.

I. INTRODUCCION

La papaya (*Carica papaya* L.) es una especie frutal de importancia económica y social en las principales regiones tropicales y subtropicales de nuestro país y del mundo (Vargas *et al.*, 2004). La producción del cultivo está concentrada en los países del tercer mundo o en desarrollo, como México, Brasil, Nigeria, Tanzania y Zaire. Los niveles de producción se han venido incrementando en los últimos años, siendo Brasil y México los principales productores de América. Esto es un reto para ellos, ya que deben desarrollar tecnologías de producción que permitan crear híbridos resistentes a plagas y enfermedades, que sean de porte bajo con grandes producciones y poder establecer un dominio en el mercado mundial (ASERCA, 1991).

En México, la superficie sembrada en el 2014 fue de 16,055.52 hectáreas con una producción de 836,370.48 toneladas, el rendimiento por hectárea es de 57.55 toneladas, un precio de mercadeo de \$4,306.30 por tonelada, lo que dio un valor de la producción de \$3,601,659.84 pesos (SIAP, 2014).

Según reportes de SIAP (2014), en México hay más de siete mil productores que cultivan y cosechan la papaya en 17 estados, de los cuales destacan Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Chiapas y Colima, con una superficie sembrada superior a las 200 hectáreas, les siguen los estados de Guerrero, Campeche, Yucatán, Jalisco, Morelos, Nayarit, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco y Tamaulipas. La fruta producida genera una derrama económica de 580 millones de dólares y la generación de 68 mil empleos directos (SAGARPA, 2009; SIAP, 2014).

El cultivo de la papaya presenta algunos problemas como la variabilidad en la forma del fruto, debido a la presencia de plantas hermafroditas y plantas hembra, que producen frutos alargados y redondos, respectivamente. Las hermafroditas son las de mayor demanda porque el fruto alargado tiene mayor demanda y ocupa un menor espacio por unidad de volumen, lo que representa un ahorro en el flete, sobre todo en operaciones de gran desplazamiento de fruta como los mercados de exportación.

Por esta razón se propone su micropropagación, lo que garantiza la obtención de plantas con las mismas características genéticas y por tanto la uniformidad en producción de frutos alargados (Mroginski and Roca, 1991).

Este método de producción de plantas se puede realizar directamente de los explantes (Solís *et al.*, 2011; Sulvarán, 2015), callos (Romero *et al.*, 2007; García, 2013), organogénesis o la embriogénesis somática (Litz, y Jarret, 1991). Con ello se soluciona la necesidad de regenerar plantas a partir de células selectas, como también la insuficiencia de establecer métodos genéticos celulares aplicables en el mejoramiento de las plantas y en la recuperación de variantes somaclonales.

Las investigaciones realizadas del cultivo *in vitro* de papaya que existen actualmente son innumerables. En dichos estudios se han reproducido plantas idénticas a la planta madre, es decir con las características deseadas de la fruta y la resistencia a enfermedades. En lo referente a la micropropagación de plantas hermafroditas de papaya Red Lady, Guzmán y Manzo (2003) mencionan que es posible la micropropagación de plantas hermafroditas de papaya Red Lady, a partir de ápices de brotes axilares de plantas en producción. Por su parte, Vegas *et al.* (2015) llevaron un ensayo donde obtuvieron plantas en recipientes de inmersión temporal a partir de brotes axilares, así lograron establecer un sistema continuo de producción de plantas hermafroditas de lechosa cv. Maradol, cuyas características fueron tipo elongata, sanas. Esto último fue logrado mediante la estandarización de los procedimientos de iniciación, multiplicación, enraizamiento y aclimatización de plantas producidas a partir de brotes axilares *in vitro*. Además se llevaron a cabo pruebas moleculares (Amplificación de ADN de brotes de lechosa cv. Maradol hermafrodita por RAPD) e inmunológicas ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) donde se garantizó la estabilidad genética y la sanidad.

Con los ejemplos antes mencionados podemos ver que el cultivo *in vitro* de papaya es una opción para lograr la uniformidad en el fruto y reproducir plantas de campo con resistencia a virus y enfermedades. En este trabajo se concentran los principales

métodos de reproducción in vitro de papaya, describiendo cada una de las etapas que intervienen en ella, con la finalidad de proveer información relacionada con esta técnica de reproducción.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Proveer un revisión sobre la propagación *in vitro* de papaya.

Objetivos específicos

Determinar el proceso adecuado para la asepsia de explantes en papaya.

Identificar el explante con mejor respuesta para el establecimiento de cultivo *in vitro*.

Determinar el método de propagación *in vitro* más conveniente.

Concluir cual es el método de enraizamiento más efectivo

III. REVISION DE LITERATURA

3.1. Taxonomía y nomenclatura de la papaya (*Carica papaya* L.)

REINO: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Brassicales

Familia: Caricáceae

Género: *Carica*

Especie: *papaya*

La papaya cultivada pertenece a la familia de las Caricaceae y es el único miembro del género *Carica*. Caricaceae es una pequeña familia de las plantas dicotiledóneas con seis géneros; cuatro de origen americano tropical (*Carica*, *Jarilla*, *Jacaratia*, *Vasconcella*) y una, *Cylicomorpha*, de África ecuatorial. Las especies pertenecientes a la familia Caricaceae han sido ubicadas en familias tales como Cucurbitaceae, Passifloraceae, Bixaceae y Papataceae. Aproximadamente 71 especies han sido descritas a través de Badillo, (1993, 2000) reduciendo el número a 32 especies, con la siguiente distribución; *Carica*, 1 especie, *Cylicomorpha*, 2 especies, *Jacaratia*, 5 especies, *Jarilla*, 3 especies, *Vasconcella*, 20 especies, y *Horovitzia*, 1 especie.

La papaya (*C. papaya* L.) es la especie de mayor importancia económica en Caricaceae. Las especies de *Carica* y *Vasconcella* son dioicas, excepto por las monoica *Vasconcella monoica* (Desf.) y algunas como *Vasconcella pubescens* y la polígama *C. papaya*. La mayoría de las especies son herbáceas, tallo simple y erecto. Como la *C. papaya*, las especies comestibles son *Vasconcella candamarcensis* Hook. F., *V. monoica* Desf., *Vasconcella erythrocarpa* Heilborn, *Vasconcella goudotiana* Solms-Laubach y *Vasconcella quercifolia* Benth Hook. (Storey, 1969).

3.2. Origen y distribución

C. papaya no ha sido encontrada en forma silvestre en la naturaleza y esta solo relacionada de lejos con la especie *Vasconcella*, lo cual fue concluido con un análisis en isoenzimas y AFLP. La gran diversidad en *C. papaya* existe en el área de Yucatán, San Ignacio, San Pedro, Rio Motagua de América Central. La población en esta área tiene la más grande diversidad de las poblaciones domesticadas (Van Droogenbroeck *et al.*, 2002). Los orígenes de la papaya son muy inciertos, pero hay algunos acuerdos entre botánicos que se originó en las tierras bajas de América central, entre el sureste de México y Nicaragua. La primera distribución fue sobre una amplia región geográfica en América Central y Sudamérica, ayudada por la abundancia de semillas en los frutos y semillas de larga viabilidad. Los recuentos de los viajeros y botánicos del siglo XVIII indican que las semillas de la papaya han sido tomadas del Caribe de Malacca y en la India (Storey, 1941). De Malacca o las Filipinas, la distribución continuo a través de Asia a la región del Sur del pacifico. Don Francisco Marín, un español explorador y horticultor, es acreditado con la introducción de papaya dentro de Hawaii en las Islas Marquesas durante los principios de 1800. En la actualidad la papaya está creciendo en todos los países tropicales y en muchas regiones subtropicales del mundo (Paull and Duarte, 2011).

3.3. Tipos de planta de la papaya

Existen tres tipos de plantas en el cultivo de la papaya; femeninas, hermafroditas y masculinas. El tipo de planta depende del tipo sexual de sus flores y a su vez una forma de fruto determinado. Las flores femeninas y las hermafroditas pentandrias producen frutos redondeados-globosos y las hermafroditas elongatas frutos alargados (Jones y Storey, 1941; Vargas, *et al.*, 2004; Gil y Miranda, 2005).

Conocer la forma del fruto que produce cada tipo de flor tiene una importancia relevante, ya que a través de esto se pueden eliminar las plantas no deseadas y dejar las flores que producirán frutos alargados (elongata), que son los de

preferencia para el mercado internacional y el que alcanza un mejor precio (Vargas *et al.*, 2004). Estas características son transmitidas de una generación a otra por medio de la semilla, lo cual las vuelve aptas para poder regenerarlas en cultivo *in vitro*.

3.3.1. Plantas femeninas o hembras

Presentan inflorescencias con pocas flores unisexuales pistiladas. Morfológicamente tienen el cáliz corto, de cinco sépalos. Los cinco pétalos blancos son completamente libres y no hay estambres. El pistilo está constituido por un ovario elipsoidal liso, formado por cinco carpelos unidos; el estigma es muy grande y recortado (Fig. 1). Genotípicamente son estables y muy productivas; sus frutos no son de preferencia para exportación, pero aceptadas en el mercado local a un precio más bajo (Vargas *et al.*, 2004; Gil y Miranda, 2005).

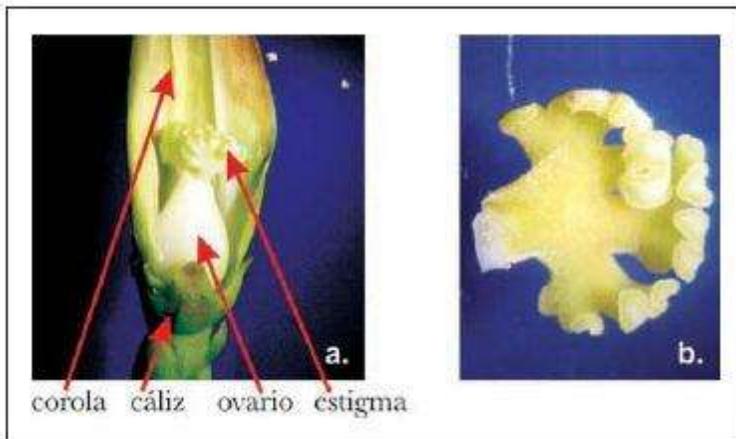


Figura 1. a) Flor femenina de *C. papaya*; b) detalle del estigma. (Gil y Miranda, 2005).

3.3.2. Plantas machos o masculinas

Presenta muchas flores estaminadas, pequeñas, delgadas, largas, gamopétalas, con pedúnculos largos, con el tubo muy elongado y cinco pétalos cortos. Hay 10 estambres y un pistilo rudimentario. Al realizar un corte longitudinal y uno transversal al gineceo, se observa el haz vascular dorsal, los cinco carpelos longitudinales, que

se hacen evidentes en el fruto desarrollado, y la amplia cavidad central en donde las numerosas semillas se desarrollan (Fig. 2). No producen fruto, es importante mantener un determinado número de esta forma sexual en la plantación como fuente de polen. (Vargas *et al.*, 2004; Gil y Miranda, 2005).

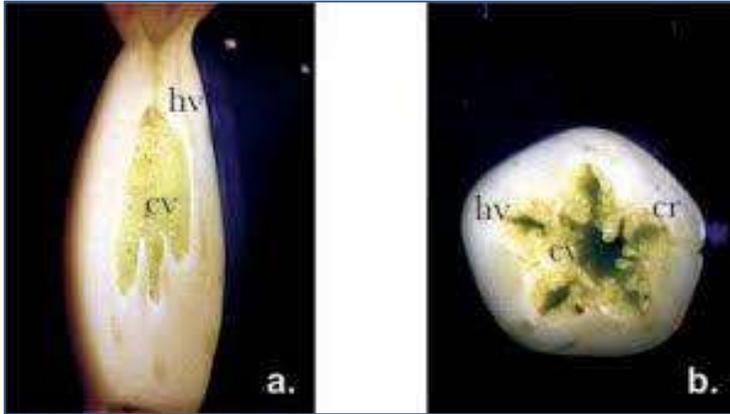


Figura 2. Flor estaminada de *C. papaya*: a) corte longitudinal del gineceo; b) corte transversal. Siglas: hv, haz vascular dorsal; cr, carpelo; cv, cavidad central. (Gil y Miranda, 2005)

3.3.3. Plantas hermafroditas

Presentan flores con los dos sexos (gineceo y androceo). En este tipo sexual se presentan dos tipos de plantas: hermafroditas continuamente fértiles y hermafroditas estériles de verano. Los tipos de flores que se presentan en estas plantas son: flores tipo elongata son la más común en las flores andromonóicas, flores pentandrias, flor hermafrodita intermedia, flores estériles de verano, flores estériles o “cornetilla”. Los pétalos están unidos en más de un tercio, hay 10 estambres situados al final del tubo de la corola, en dos series de cinco: los primeros, casi sésiles y opuestos a los pétalos; los segundos, con filamento corto, salen del borde de los pétalos (figura 3). El pistilo tiene el ovario alargado. Los frutos obtenidos de las flores tipo enlogata son los preferidos por el mercado internacional (Vargas *et al.*, 2004; Gil y Miranda, 2005).

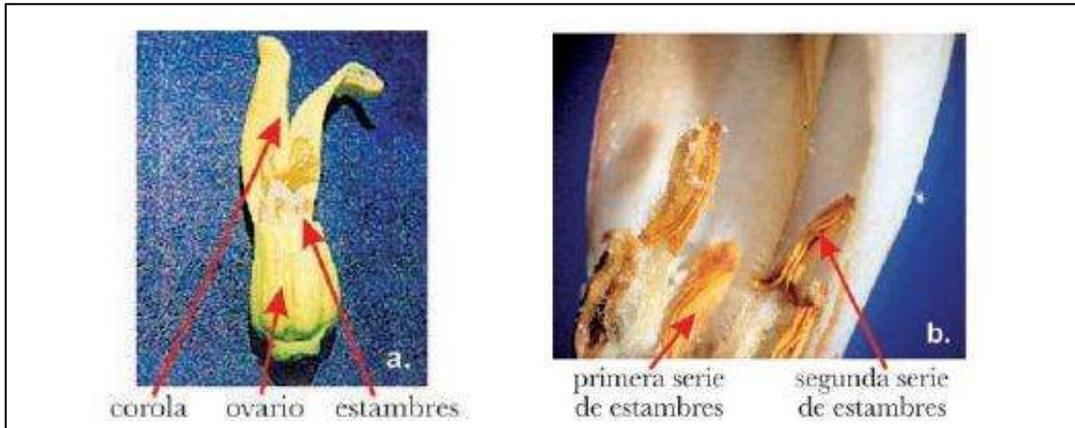


Figura 3. a) Flor hermafrodita de *C. papaya* (adaptado de La semilla del Caribe, 2000); b) Detalle de estambres de flor hermafrodita. (Gil y Miranda, 2005).

3.4. Micropropagación

La micropropagación es una técnica que ha sido aceptada rápidamente en la industria tanto para especies hortícolas, ornamentales y leñosas. Esta forma de cultivo de tejidos *in vitro* incrementa rápidamente el número de plantas a partir de explantes, que bajo ciertas condiciones, como nutrientes y reguladores de crecimiento, minerales, vitaminas, fuentes de carbono, agente gelificante, agua; también otros factores, permiten la micropropagación como la luz, temperatura, pH, intercambio de gases. Esta técnica permite que se realice la producción de plántulas en una superficie reducida y en un tiempo económicamente costeable (Mroginski y Roca, 1991; Abdelnour y Vincent, 1994; Guzmán y Manzo, 2003). El proceso de regeneración de plantas se lleva a cabo aprovechando la totipotencia de las células (Segura, 2008; Olmos *et al.*, 2010).

La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas. Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. En el caso de la embriogénesis somática, el enraizamiento es reemplazado por una etapa de maduración y germinación de los embriones para la diferenciación de los ápices

Caulinar y radicular. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantos para el establecimiento (Olmos *et al.*, 2010).

3.4.1. La totipotencialidad celular en plantas

La micropogación se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa. Esta propiedad es característica de un grupo de células vegetales conocidas como células meristemáticas, presentes en los distintos órganos de la planta. Estas células meristemáticas tienen la capacidad de reproducirse asexualmente, por lo tanto la producción de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias a que, en general, varias células de un individuo vegetal poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo completo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametas (Fert y Paul 2000; Azcón *et al.*, 2008; Segura, 2008; Olmos *et al.*, 2010).

3.4.2. Aplicaciones del cultivo *in vitro*

La micropropagación se ha convertido en una herramienta fundamental en la biotecnología, en especial la vegetal. El cultivo *in vitro* de plantas es utilizada especialmente en especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción, clonación de individuos de características agronómicas muy deseables durante todo el año, obtención de plantas libres de virus, producción de semillas sintéticas, conservación de germoplasma, obtención de metabolitos secundarios , producción de nuevos híbridos , mejora genética de plantas (incluyendo obtención de plantas transgénicas), germinación de semillas, producción de haploides, y estudios fisiológicos diversos. Además se tiene mayor control sanitario del material que se propaga, mayor uniformidad genética y facilidad de transporte (*in vitro*), de un país a otro y con menos restricciones aduaneras (Mroginski and Roca, 1991; Abdelnour y Vincent, 1994).

3.5. Asepsia en explantes de papaya

La asepsia en la micropagación de papaya es la fase inicial y una de las más importantes ya que si no se realiza adecuadamente se puede contaminar de hongos o bacterias que afectarían drásticamente el establecimiento y desarrollo del explante. En la Propagación In Vitro de *Carica Papaya* para la desinfección, los brotes son reducidos en tamaño a 1 cm aproximadamente y serán lavados con abundante agua y jabón para eliminar los restos de polvo, insectos y posibles residuos vegetales, seguidos de 3 enjuagues con agua destilada. Después los explantes serán transportados a la cámara de flujo laminar en donde serán sumergidos en alcohol al 70% durante 30 segundos y enjuagados tres veces con agua destilada estéril, luego estarán sumergidos en hipoclorito de sodio 1% - 4% durante 10 minutos o calcio y cloruro de mercurio; la penetración del agente desinfectante en superficies rugosas o vellosas del tejido vegetal se puede incrementar con la adición de agentes tensoactivos como el Tween 20. Posteriormente enjuagarlos tres veces con agua destilada estéril. (Webster, 1966; Romero *et al.*, 2007; Guzmán y Manzo, 2003, Posada *et al.*, 2004; Solís *et al.*, 2011). Otros autores como Vegas *et al.* (2015) obtuvieron una desinfección efectiva de explantes usando alcohol (70%) durante 30 segundos y NaOCl (1%) durante 10 minutos.

3.6. Reguladores de crecimiento

Las fitohormonas son las encargadas de establecer comunicación química en las plantas y pueden conducir a la formación de brotes, raíces o la proliferación de masas celulares indiferenciadas. Los compuestos denominados reguladores de crecimiento pueden ser de naturaleza química y pueden desarrollar efectos como los de hormonas endógenas naturales (Jordán y Casaretto, 2006; Segura, 2008).

Las fitohormonas más importantes son las auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscisico, que constituyen los cinco grupos hormonales clásicos. Pero se han descubierto una serie de sustancias que por sus efectos sobre el desarrollo de las plantas también pueden clasificarse como hormonas, incluyendo brasinoesteroides,

Jasmonatos, poliaminas, salicilatos, oligopeptidos, oxido nítrico, oligosacarinas y la glucosa (Jordán y Casaretto, 2006; Azcón *et al.*, 2008; Segura, 2008).

La presencia de hormonas en diferentes niveles en las plantas y sus células, permite que éstas desarrollen caminos morfogénicos alternativos muy distintos, los cuales pueden darse todos de acuerdo al grado de ontogenia. Lo más general es que las células en crecimiento por acción de varias hormonas expresen división y elongación celular; sin embargo, y especialmente bajo condiciones *in vitro*, se ha observado que tales células inician procesos de diferenciación bajo ciertos niveles hormonales, por ejemplo, generación de elementos xilemáticos. Si se combinan diferentes niveles de auxinas y citocininas pueden darse varias respuestas alternativas: la presencia de niveles relativamente altos de ambas hormonas conduce solo a una multiplicación celular con escasa diferenciación. Si existiese un nivel relativamente alto de citocininas vs. auxinas, el tejido manifiesta la formación de nuevos brotes a cambio de la intensa proliferación celular vista antes. Si por el contrario, los niveles de ambas hormonas se invierten de manera de tener una relación más alta de auxinas vs. citocininas, la expresión del tejido cambia y se originan raíces. De manera que, las células vegetales que cuentan con núcleo y tienen un grado de diferenciación relativo, pueden bajo ciertas condiciones revertir a su estado meristemático y expresar luego diferentes respuestas conducentes todas a la generación de órganos y plantas (Jordán y Casaretto, 2006).

En algunos casos se obtienen en los cultivos *in vitro* las respuestas deseadas mediante el empleo del medio básico sin reguladores de crecimiento, sin embargo, en la mayoría de los casos se hace necesario agregar al medio sustancias reguladoras de crecimiento, generalmente del tipo de las auxinas o las citocininas (Mroginski y Roca, 1991; Solís *et al.*, 2011).

3.6.1. Auxinas

Las auxinas son un grupo de hormonas que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento en plantas. Su síntesis ocurre mayormente en meristemas apicales y tejidos jóvenes de donde son transportadas al resto de la planta. Entre las principales

funciones, las auxinas promueven la elongación celular en el coleóptilo, inhiben el crecimiento de raíces primarias y el desarrollo de raíces adventicias, en hojas y tallos cortados, median la respuesta a tropismos, reprimen la abscisión de órganos e inducen el desarrollo floral y de frutos; y en presencia de citoquininas inducen la división celular en cultivos de callos (Jordán y Casaretto, 2006; Taiz y Zeiger, 2006).

Los tipos de auxinas más empleados son IBA, 2,4-D, AIA, ANA y picloram. El rango de concentración empleado varía con el regulador del crecimiento, así es que el 2,4-D, por ejemplo se utiliza en concentraciones de 4-35 μM mientras que otra auxina como el IBA, tiene un rango de 0,1 a 2 μM (Jordán y Casaretto, 2006).

En *Carica papaya* L. se logró la formación de raíces y fueron exitosamente transferidas en campo con la aplicación de las auxinas: ANA a 0.1, 3 y 0.5 mg L^{-1} (Guzmán Y Manzo, 2003, Romero *et al.*, 2007; Solís *et al.*, 2011) Sulvaran (2015) y Reuveni *et al* (1990) aplicaron 0,1 mg/l y desarrollaron mejor los microesquejes sin producción de callo esto de interés para la micropropagación por microesquejes, IBA a 0.1, 2.0 mgL^{-1} y 3 mgL^{-1} (Mondal, 1994; Romero *et al.*, 2007), AIA a 0.3 y 0.5 mg.L^{-1} (Solís, R., 2011), IAA, NAA, 2,4-D a una concentración de 2.0 mg.L^{-1} (Mondal, 1994).

3.6.2. Giberelinas

Las giberelinas son una familia de hormonas que regulan positivamente el crecimiento de la planta, especialmente la elongación de tallos (delgados y largos) y hojas. También promueven la movilización de reservas y germinación de semillas, así como el desarrollo floral y de frutos y un incremento notable del crecimiento de los brotes (Raven *et al.*, 1992; Jordán y Casaretto, 2006).

Se presentan en cantidades variables en todos los órganos de la planta, pero las mayores concentraciones se encuentran en las semillas inmaduras. La más estudiada del grupo es la GA3 (ácido giberélico), (Raven *et al.*, 1992).

El ácido giberélico ha sido estudiado en *Carica papaya* L. a una concentración de 0,3 mg L⁻¹ de AG31 dando excelentes resultados en la producción de brotes en los esquejes de papaya (Posada *et al*, 2004; Solís, 2011).

3.6.3. Citocininas

La etapa de multiplicación generalmente comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. La segunda etapa requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular. En este caso el sistema es más dependiente de reguladores del tipo de las citocininas (Olmos *et al.*, 2010).

Las citocininas son hormonas que estimulan la división celular, activan la brotación de yemas laterales, inducen organogénesis y retardan la senescencia. El tratamiento de yemas laterales con citocininas a menudo provoca un crecimiento de estas yemas, aun en presencia de auxinas, modificando así la dominancia apical. La adición de cinetina, junto a AIA (aunque no cinetina sola), hace que las células sean meristemáticas. La cinetina y la purina 6-bencilamina (BAP) son las citocininas sintéticas más utilizadas sin embargo hay otras empleadas como son BA, CIN, ZEA, Zip y TDZ (Raven *et al.*, 1992; Jordán y Casaretto, 2006).

La multiplicación de brotes de papaya adicionando citocininas ha sido exitosa con 0.5 mg.L⁻¹ y 2.0 mg.L⁻¹ de BAP, 0.1- 0.5mg/l BA, 0.5 mg/l de BAP, 0,2 mg.l⁻¹ de cinetina y Acido indol-3 butírico (Reuveni *et al*, 1990; Mondal, 1994; Guzmán y Manzo, 2003; Posada *et al*, 2004; Romero *et al.*, 2007; Solís *et al.*, 2011; Vegas *et al*, 2015).

3.6.4. Ácido abscísico

Es una hormona reguladora del crecimiento con funciones inhibitorias, es capaz de acelerar la abscisión en hojas y frutos. El ácido abscísico (ABA) se obtiene de las partes inferiores de los frutos, de la base del ovario. El ABA que se produce en las células centrales de la caliptra de la raíz está implicado en la respuesta de las raíces a la gravedad. Con la aplicación del ABA a las yemas vegetativas pasan a ser invernantes (Raven *et al.*, 1992). Esta hormona no ha sido utilizada en la micropropagación de la papaya.

3.6.5. Etileno

Etileno es la única hormona vegetal gaseosa, simple y pequeña, presente en angiospermas y gimnospermas, Siendo un gas puede moverse rápidamente por los tejidos, no tanto por transporte sino por difusión. Los efectos fisiológicos del etileno comprenden: expansión celular, epinastia, quiebre de la dormancia en semillas y yemas, inducción de floración, maduración de frutos, aceleración de la senescencia y caída de hojas y de flores, regulación de floración y germinación (Jordán y Casaretto, 2006). El etileno no se ha utilizado en la producción de papaya *in vitro*.

3.7. El explante

La correcta elección y preparación del explante incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante (Olmos *et al*, 2010).

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. Si el objetivo final es la producción de callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantes que, cultivados en condiciones apropiadas, permiten la proliferación callosa. Es muy

frecuente la utilización de ápices, o meristemos caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras, e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos. Esta facilidad para la proliferación callosa puede hacerse extensiva a células y protoplastos (Mroginski and Roca, 1991).

Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: el tipo de órgano que sirve como explante, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante (Olmos *et al.*, 2010; Mrogiski, 1975). Así la obtención de plantas haploides por cultivo de anteras depende en gran medida de su estado de desarrollo al momento de su cultivo (Mrogiski, 1975). Otro aspecto que se debe tomar en cuenta es el tamaño del explante, cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación callosa, esto es importante cuando se lleva a cabo el cultivo de meristemos, anteras, suspensiones celulares, embriones y protoplastos (Mroginski and Roca, 1991).

Se deben tomar en cuenta la incidencia de otros factores que pueden alterar las respuestas del explante cultivado, como son época del año, pretratamientos a los explantes y condiciones de crecimiento de las plantas donantes (Mrogisky, 1975).

El explante bajo condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen el desarrollo hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones. Los callos obtenidos mediante este procedimiento pueden subcultivarse para su mantenimiento y propagación o inducir su diferenciación para formar órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis) o pasarse a un medio de cultivo líquido para obtener células y pequeños agregados en suspensión (Calva y Pérez, 2005).



Figura 4. Explantes fenolizados

3.7.1. Características de la planta donante

La planta donante debe elegirse en base a una selección masal positiva para las características agronómicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de explante a establecer en condiciones *in vitro*. En general, los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos. El empleo de explantes que se encuentran expuestos a bajos niveles de patógenos puede resolver el problema de la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro* (Olmos *et al*, 2010). El problema de patógenos se elimina si el explante es previamente tratado para eliminar todo organismo que se encuentre en su superficie (desinfestación) (Calva y Pérez, 2005).

3.7.2. Tipos de explante utilizados en papaya

Mondal, (1994) utilizó explantes de lámina foliar, peciolo, tallo y raíz de plántulas *in vitro* para desarrollar técnicas para la producción de callos y regeneración de *Carica papaya* L. y como resultado obtuvieron que los explantes de raíz dan mejores resultados para la producción de callos. Otro autor que probó la utilización de lámina foliar como explante fue Teixeira da Silva (2013), con la diferencia que él no quiso producir brotes o callos embriogénicos sino más bien inducir artificialmente

rizogénesis *in vitro* y con ello proporcionó un protocolo para el desarrollo de la raíz de papaya, un tema inexplorado para esta planta tropical.

En plantas cultivadas en invernadero Jordán and Veloz (1995) utilizaron yemas axilares como explante para mejorar la embriogénesis somática en suspensiones celulares y obtuvieron brotación preformada de las yemas axilares y la formación de callos en el extremo basal del explante y por lo tanto una embriogénesis somática. Por su parte, Reuveni y Shlesinger (1989), utilizaron yemas axilares para describir un procedimiento para la propagación *in vitro* de clones de papaya dioicas y obtuvieron una alta tasa de éxito en el establecimiento del cultivo *in vitro*. En el estudio de la micropropagación de plantas de lechosa en recipientes de inmersión temporal a partir de yemas axilares llevado a cabo por Vegas *et al* (2015), quienes vieron que todas las yemas axilares se diferenciaron y formaron nuevos brotes. Otros autores que utilizaron como explante los meristemos axilares y obtuvieron excelentes resultados fueron Guzmán y Manzo (2003).

También Romero *et al.* (2007) utilizaron como explante yemas axilares pero agregaron explantes de yemas apicales de plántulas de 4 meses producidas *in vitro* en un estudio de germinación *in vitro* y propagación clonal de papaya maradol y observaron que las yemas axilares tuvieron mayor cantidad de brotes que las yemas apicales.

En el experimento de Propagación *in vitro* de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemos apicales, los cuales fueron extraídos de plantas de 45 días provenientes de invernadero. Los explantes se cultivaron con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. Se realizaron siete tratamientos, de los cuales tres lograron el 100% de diferenciación, dos tratamientos lograron el 93.7% de diferenciación y los otros dos un 87.5% de meristemos diferenciados. Lo que nos permite observar la gran viabilidad de los meristemos apicales como opción para explante (Solís *et al.*, 2011).

3.8. Medios de cultivo para la técnica *in vitro*

Un medio de cultivo *in vitro* no sólo debe de hacer que las células crezcan y se dividan rápidamente sino también que la mayor parte de ellas expresen su capacidad de rediferenciación y biosíntesis para una o varias sustancias de interés. En varios de los estudios sobre cultivos de células y tejidos vegetales esto se ha tratado de resolver variando los componentes de los medios de cultivo (Martin 1980, Yasuda *et al* 1972, Calva y Ríos, 1999) y las condiciones físicas y fisicoquímicas de los procesos (Fowler, 1982, Rhodes *et al.*, 1987), aprovechando las ventajas que ofrece la rápida respuesta de las células *in vitro* ante pequeños cambios en su medio ambiente con respecto a las plantas crecidas por métodos tradicionales (Calva y Pérez, 2005).

Generalmente, las células en crecimiento pueden fabricar sus proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos suministradas por el medio de cultivo; sin embargo, existe además una cantidad de sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son muy activas en el crecimiento (Krikorian, 1991).

El primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrientes minerales en concentraciones adecuadas. Se deben incluir los macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg) y los microelementos (B, Zn, MN, Cu, Mo, Fe, Cl); además, existe evidencia de que se debería añadir níquel en la lista (Eskew *et al.*, 1984).

3.8.1. Composición de medios de cultivo para la técnica *in vitro*

Los primeros medios utilizados en cultivo de células y tejidos vegetales fueron semisintéticos. Frecuentemente contenían extractos o complejos orgánicos como agua de coco, hidrolizado de caseína y extracto de levadura. Actualmente, la mayoría de los medios son de composición conocida (cuadros 1, 2, 3, 4 y 5) (Calva y Pérez, 2005; Mroginski and Roca, 1991), estando constituidos básicamente por cinco grupos de ingredientes: nutrientes inorgánicos, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, vitaminas y reguladores del crecimiento que *in vivo* son sintetizados por

una parte u órgano de la planta para luego ser transportados a otros órganos donde se metabolizan y/o acumulan (Seabrook, 1980). Las fuentes de nitrógeno más comunes son el nitrato y amonio, pero también se han utilizado urea, hidrolizado de caseína, extracto de levadura y aminoácidos, entre otros. La fuente de carbono más empleada es la sacarosa o glucosa y en menor grado la maltosa, galactosa, almidón y melaza. Los micronutrientes, generalmente adicionados al medio de cultivo en forma de sales, son utilizados por las células como cofactores enzimáticos, como el molibdeno para la nitrato reductasa y el magnesio para algunas cinasas (Murashige y Skoog 1962, Schenk y Hildebrandt 1972).

Cuadro 1. Medio de Cultivo Nh (White, 1943).

Nomenclatura	Formula	Mg/litro
Nitrato de potasio	KNO_3	80
Sulfato de magnesio + agua	$Mg (PO)_4 + 7H_2O$	737
Nitrato de calcio + agua	$Ca(NO_3)_2 + 4H_2O$	288
Bifosfato de sodio +agua	$NaH_2PO + 4H_2O$	19
Kilocalorías	Kcal	65
Sulfato de sodio	Na_2SO_4	200
Yoduro de potasio	KI	0.75
Acido troxobórico	H_3BO_3	1.50
Sulfato de sodio + agua	$MnSO_4 + 4H_2O$	6.65
Sulfato de zinc + agua	$ZnSO_4 + 7H_2O$	2.67
Acido tetraoxomolibdico	H_2MoO_4	0.001
Sulfato de cobre + agua	$CuSO_4 + 5H_2O$	0.01
Sulfato férrico	$Fe_2(SO_4)_3$	2.50
Glicina	NH_2CH_2COOH	3.00
Tiamina-HCL	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	0.10
Piridocina-HCL	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	0.10
Acido nicotínico	$C_6H_5NO_2$	0.50
Mioinositol	$C_6H_{12}O_6$	100.00
Sacarosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	20,000
PH 5.5		

Cuadro 2. Medio de Cultivo Murashige (Murashige et al., 1962)

Nomenclatura	Formula	Mg/litro
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	1650
Nitrato de Potasio	KNO_3	1900
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	170
Cloruro de calcio + agua	$\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	440
Sulfato de sodio + agua	$\text{MnSO}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$	370
Yoduro de potasio	KI	0.83
Ácido trioxobórico	H_3BO_3	6.20
Sulfato de sodio + agua	$\text{MnSO}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
Sulfato de zinc + agua	$\text{ZnSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	8.60
Molibdato Sódico Dihidrato	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Sulfato de cobre + agua	$\text{CuSO}_4 + 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Sulfato de Hierro + agua	$\text{FeSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	27.80
EDTA disódico	Na_2EDTA	37.30
Cloruro de Cobalto + agua	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Glicina	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	2.00
Tiamina-HCl	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$	0.10
Piridoxina-HCl	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	0.50
Acido nicotínico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0.50
Mioinositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	100.00
Sacarosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	30,000
PH 5.7		

Cuadro 3. Medio de Cultivo B5 (Gamborg et al., 1968)

Nomenclatura	Formula	Mg/litro
Nitrato de Potasio	KNO_3	2500
Cloruro de calcio + agua	$\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	150
Sulfato de magnesio + agua	$\text{Mg}(\text{PO})_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	250
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134
Tripolifosfato de sodio + agua	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150
Yoduro de potasio	KI	0.75
Ácido trioxobórico	H_3BO_3	3.00
Sulfato de manganeso + agua	$\text{MnSO}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$	10.00
Sulfato de zinc + agua	$\text{ZnSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	2.00
Molibdato Sódico Dihidrato	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 + 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Sulfato de fierro	$\text{FeSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	27.80
EDTA disódico	Na_2EDTA	37.30
Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Tiamina-HCl	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$	10.00
Piridoxina-HCl	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	1.00
Acidonicotínico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	1.00
Mioinositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	100.00
Sacarosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	20,000
PH 5.5		

Cuadro 4. Medio de Cultivo N6 (Chu et al., 1975)

Nomenclatura	Formula	Mg/litro
Nitrato de Potasio	KNO ₃	2830
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	400
Cloruro de calcio	CaCl ₂ 2H ₂ O	166
Sulfato de magnesio + agua	MgSO ₄ 7H ₂ O	185
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	463
Yoduro de potasio	KI	0.80
Ácido trioxobórico	H ₃ BO ₃	1.60
Sulfato de manganeso + agua	MnSO ₄ 4H ₂ O	4.40
Sulfato de zinc + agua	ZnSO ₄ 7H ₂ O	1.50
Sulfato de fierro + agua	FeSO ₄ 7H ₂ O	27.85
EDTA disodico	Na ₂ EDTA	37.25
Glicina	NH ₂ CH ₂ COOH	2.00
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS·HCl	1.00
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	0.50
Acido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0.50
Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	50,000
PH 5.8		

Cuadro 5. Medio de Cultivo Shenk y Hildebrandt (1972)

Nomenclatura	formula	Concentración
		mM
Macronutrientes		
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	25.0
Nitrato de Potasio	KNO ₃	1.4
Cloruro de calcio + agua	CaCl ₂ + 2H ₂ O	1.6
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	1.25
Fosfato monoamónico	NH ₄ H ₂ PO ₄	2.6
		µM
Micronutrientes		
Yoduro de potasio	KI	6.0
Ácido trioxobórico	H ₃ BO ₃	80.0
Sulfato de magnesio + agua	MnSO ₄ + H ₂ O	60
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ + 7H ₂ O	3.5
Molibdato Sódico Dihidrato	Na ₂ MoO ₄ + 2H ₂ O	0.4
Sulfato de cobre	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.8
EDTA disódico	Na ₂ EDTA	55.0
Sulfato de fierro	FeSO ₄ + 7H ₂ O	55.0
		µM
Componente orgánico		
Myo-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	5500.0
Acido Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	40.6
PiridoxinaHCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	2.4
Tiamina HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	14.8

(Mroginski y Roca, 1991).

3.8.2. Preparación del medio de cultivo

Es necesario preparar el medio utilizando agua biodestilada o agua desmineralizada-destilada (H₂O, DD). Se debe evitar el almacenamiento prolongado del medio para evitar la acumulación de contaminantes; todas las sustancias químicas usadas para su preparación deben ser de alto grado de pureza.

El procedimiento para la preparación de los medios dependerá, en primera instancia, del tipo de medio, de su consistencia y de la presencia de componentes termolábiles,

En general, se pueden distinguir:

- a) Medios semisólidos sin sustancias termolábiles; su preparación consta de los siguientes pasos: Incorporación de los compuestos que pueden ser esterilizados en el autoclave (tanto los del MB como los reguladores de crecimiento u otros compuestos), ajuste del pH, adición y disolución del agar, distribución en los recipientes de cultivo (tubos de ensayo, cajas Petri, etc.) y esterilización en el autoclave.
- b) Medios líquidos con o sin sustancias termolábiles. Para su preparación se sigue el mismo procedimiento de los medios semisólidos sin sustancias termolábiles, pero sin adicionar agar, y haciendo la esterilización por filtración en el caso de medios que contenga sustancias termolábiles.
- c) Medios semisólidos con una o más sustancias termolábiles; para su preparación se sugieren las siguientes operaciones: incorporación de los compuestos que pueden ser esterilizados en el autoclave (tanto los del MB como los reguladores de crecimiento u otros compuestos), el ajuste del pH, adición y disolución del agar, esterilización en la autoclave, incorporación (operando en la cámara de transferencia) de las sustancias termolábiles, previamente esterilizadas por filtración. Los componentes esterilizados se deben mantener a una temperatura entre 40 y 50 °C; la distribución (operando en la cámara de transferencia) del medio en los recipientes de cultivo (tubos de ensayo, cajas Petri, etc.) previamente esterilizados en el autoclave (Mroginski y Roca, 1991).

3.8.3. Medios de cultivo utilizados para papaya *in vitro*

Una vez conocida la composición de los principales medios de cultivo, nos enfocaremos a valorar los utilizados en la reproducción *in vitro* para la papaya.

Con el fin de desarrollar técnicas para la producción de callos eficientemente y la regeneración de *Carica papaya* en plántulas *in vitro* se cultivaron en medio suplementado MS y modificado con 0, 5 mg / l IBA y de 1 a 2 mg / l de cinetina. Posteriormente cada sesión de callo regenerado se subcultivan utilizando un medio de multiplicación. Con este medio MS modificado se formaron los callos de manera eficiente a partir de explantes de raíz (Mondal, 1994).

Las yemas axilares de 3 años de edad, *Carica pubescens*, cultivadas en el invernadero se desarrollaron en medio NN suplementado con diferentes reguladores de crecimiento (naftalenacético y ácido indolacético en combinación con zeatina, benciladenina, kinetina y tidiazurón. Con el medio NN suplementado se observaron múltiples brotes desde los 2-3 meses (Jordán y veloz, 1995).

Reuveni y Shlesinger (1989) pusieron los propágulos en agitación con la incorporación de 50 mg l⁻¹ en el medio. Murashige & Skoog (MS) medio basal suplementado con 0.5 mg.l⁻¹ 6-benciladenina y 0.1 mg.l⁻¹ naftalenacético y con ello se logró el establecimiento y proliferación. La adición de sulfato de adenina 160 mg.l⁻¹ mejoró la multiplicación y crecimiento de los brotes. Una etapa de elongación en medio MS suplementado con 1.0 mg.l⁻¹ kinetina y 0.05 mg.l⁻¹ naftalenacético, fue necesario antes de enraizamiento. En el enraizamiento se obtuvieron excelentes resultados con el medio MS suplementado con 1.0 mg.l⁻¹ ácido indol-3-butírico. Ya existen parcelas comerciales de plantas de papaya obtenidos mediante este procedimiento. A diferencia de Reuveni *et al*, Fitch en 1993 utilizó el medio Murashige y Skoog complementado con bencil amino purina (BAP) (0.2 mg.l⁻¹) y cinetina (0.1 mg.l⁻¹) de igual forma obtuvo buenos resultados para el establecimiento y crecimiento de los brotes de papaya.

En la Propagación *in vitro* de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemas apicales, para determinar el medio de cultivo más adecuado para la multiplicación de

las plántulas. Solís *et al* (2011) utilizaron el medio de cultivo base MS con diferentes concentraciones de BAP, KIN, ANA, AIA, AG3 y adenina. En esta investigación se utilizó siempre el medio básico MS al 100%. De manera semejante, Romero *et al.*, (2007) utilizaron el medio MS en germinación de semillas a diferentes concentraciones con buenos resultados. También se puede mencionar que Teixeira, 2013, con el objetivo de inducir artificialmente rizogénesis *in vitro* en hojas jóvenes aplicó un medio basal MS expuesto a 5 concentraciones (0, 1, 2, 4 o 8 mg / l) de auxinas (2,4, ácido 5-triclorofenoxiacético, 2,4,5-T; ácido indol acético-3-, IAA; ácido indol-3-butírico, IBA; α -naftalenacético ácido, NAA; ácido beta-naftoxiacético, BNOA) o floriglucinol.

El medio MS también fue utilizado por Anandan *et al* (2012), quienes desarrollaron un protocolo eficiente para la regeneración de la planta de *Carica papaya* a través de la embriogénesis somática indirecta. Inicialmente, se indujeron callos embriogénicos friables (75,12%) en medio MS a diferentes concentraciones. El mayor número de embriones cotiledones se produjo en mitad de la concentración de líquido medio MS con 10.5 mg.l⁻¹ ABA y 10.0 g. l⁻¹ de sacarosa. Los embriones somáticos en la etapa de los cotiledones se transfirieron a medio MS complementado con 0.4 mg.l⁻¹ BAP (6-bencilaminopurina) y 0.02 mg.l⁻¹ NAA (ácido α -naftalenacético) demostraron la eficiencia de regeneración de hasta 62.32%.

En la micropropagación de plantas hermafroditas de papaya Red Lady, para el cultivo *in vitro* se utilizó el medio de cultivo Drew y Smith (DS), compuesto por minerales, vitaminas, sacarosa y agar como medio de soporte, y complementado con los fitoreguladores BAP (bencilaminopurina) y ANA (ácido naftalenacético). Al observar los resultados, se concluyó que el uso del medio MS es eficiente para dar soporte al explante durante el cultivo y subcultivo (Guzmán y Manzo, 2003).

3.9. Condiciones ambientales de incubación para papaya *in vitro*

Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura (Mroginski *et al.*, 1991). Las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación

(Martín, 1980; Hughes, 1981), así como por la calidad, intensidad y duración de la luz (Seibert *et al.*, 1980; Hughes, 1981).

Para propósitos generales se sugiere utilizar, en el establecimiento de los cultivos, una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes (del tipo 'luz del día') y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperíodo/ escotoperíodo de 16/8 h. En general, temperaturas entre 25 y 28 °C son adecuadas para el establecimiento de los cultivos.

3.10. Embriogénesis somática

Según Freire (2003), 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 de crecimiento.

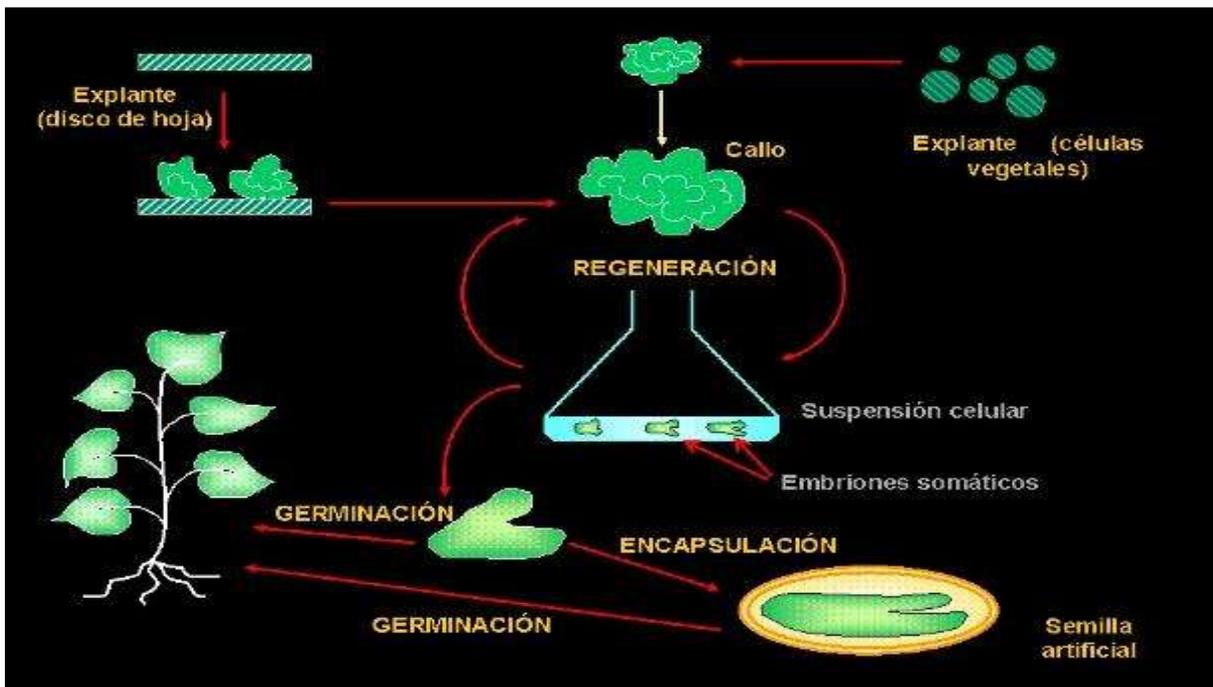


Figura 5. Propagación vegetativa por embriogénesis somática (Mercedes, 2011).

Las células vegetales crecidas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden dividirse y dar dos tipos de respuesta: embriogénesis indirecta y embriogénesis directa (Mroginski, y Roca, 1991).

3.10.1. Organogénesis o embriogénesis directa.

Se obtienen embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callo. Este desarrollo dirección es debido a la acción realizada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante (Alulema, 2013).

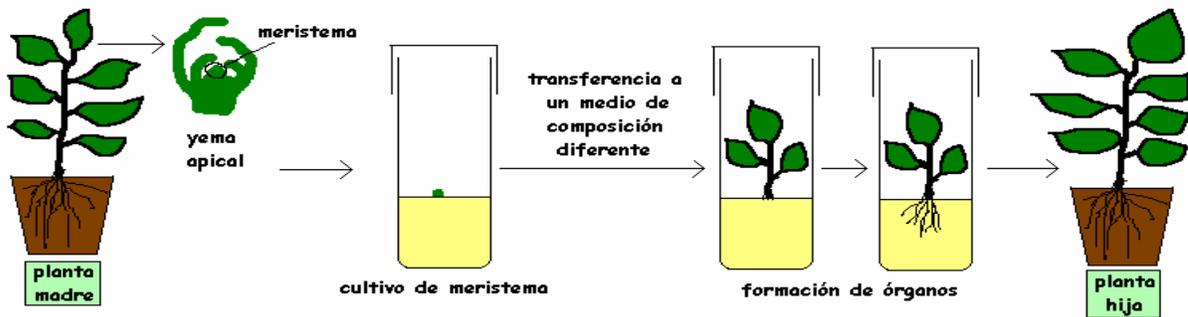


Figura 6. Vía de multiplicación directa de cultivo *in vitro* (Muñoz, M. 2012).

3.10.2. Organogénesis o embriogénesis indirecta

Tisserat, citado por Calva y Pérez, (2005) indica que la vía indirecta, requiere una fase intermedia de callo formado por un conjunto de diferentes tipos de células no organizadas y que conservan la capacidad de dividirse. Una vez organizado el callo este prolifera. La formación de pro-embriones, se inicia usualmente en un medio de cultivo con altas concentraciones de auxinas y luego se transfieren los callos a un medio de cultivo con menores concentraciones de reguladores de crecimiento para inducir la formación de los embriones somáticos a partir de pro-embriones iniciales.

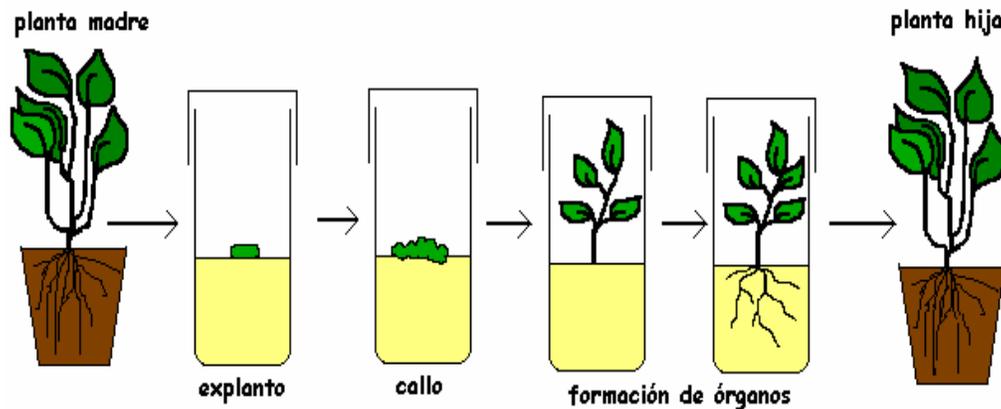


Figura 7. Vía de multiplicación de cultivos *in vitro* (Muñoz, M. 2012).

3.10.2.1. Callo

Es una masa amorfa surgida de la proliferación de células del parénquima. Frecuentemente es el resultado de una herida, la misma que puede ser localizada en un tallo, raíz y hoja.

Los callos no tienen patrones predecibles de organización, y una característica importante es su irregular crecimiento, teniendo el potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que forman plántulas (Lallana y Lallana, 2003).

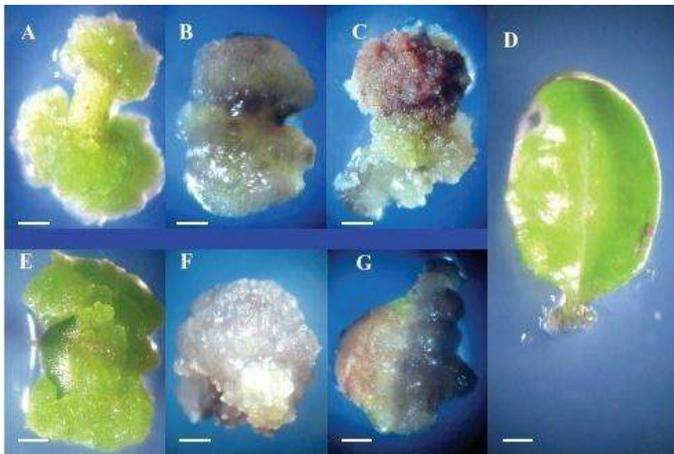


Figura 8. Tipos de callos. (A) Callo verde testigo. (B) Callo compacto (C) Callo fenólico (D) Callo verde (E) Callo verde testigo (F) Callos (G) Callo fenólico (Rodríguez *et al.*, 2014).

3.10.3 Métodos de reproducción in vitro en papaya

En cuanto a los métodos de reproducción en el cultivo de papaya se utiliza los dos tipos de reproducción *in vitro*. La embriogénesis directa (Reuveni y Shlesinger, 1989; Solís *et al.*, 2011; Vegas *et al.*, 2015) donde se obtuvieron formación de embriones somáticos de manera exitosa y la embriogénesis indirecta (Mondal, 1994; Jordán and Veloz, 1995; Romero *et al.*, 2007; Anandan *et al.*, 2012) con la obtención de formación de callos a partir de los explantes.

3.11. Desarrollo radicular *in vitro*

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas resulta más complicada por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas), para promover la rizogénesis (Mroginski, y Roca, 1991).

Comúnmente, a fin de proceder a su enraizamiento, los vástagos de buen tamaño proveniente de la etapa de multiplicación y provisto de al menos 4-5 yemas, se colocan durante periodos cortos en soluciones con concentraciones elevadas de auxinas. La auxina más utilizada es el IBA, que puede utilizarse a concentraciones de 1-10 μM durante pocas horas. Alternativamente se pueden emplear niveles más bajos de auxinas (0.1 a 1 μM), pero manteniendo la inducción por un periodo más prolongado (3 a 7 días). Luego los vástagos se transfieren a un medio de cultivo basal desprovisto de reguladores de crecimiento para permitir el desarrollo de las raíces. Aproximadamente 20 días después del tratamiento de inducción, es posible la obtención de una adecuada cantidad de raíces funcionales que permitan continuar hacia la etapa de aclimatización (Olmos *et al.*, 2010).

3.11.1 Resultados de enraizamiento *in vitro* de papaya

El enraizamiento *in vitro* de papaya ha sido poco estudiado en *Carica papaya* L. Sin embargo una de las investigaciones la llevaron a cabo (Solís *et al.*, 2011). En donde determinaron el medio de cultivo adecuado para el enraizamiento de las plántulas con diferentes concentraciones de IBA, BAP, ANA y adenina. Así el tratamiento TM4 que posee MS + 3 mg.l^{-1} de IBA + 5 mg.l^{-1} de adenina permitió obtener un mayor porcentaje de enraizamiento (83.33%).

Bermúdez, *et al.*, (2013) en su investigación comentaron que el enraizamiento de plántulas *in vitro* es una de las etapas más importantes en el proceso de micropropagación en *C. papaya*. Este proceso ha sido una de las principales limitantes, obteniéndose porcentajes de sobrevivencia inferiores al 50%. Con el propósito de inducir un sistema radicular eficiente, se evaluaron brotes de papaya var. "Maradol" con la auxina, los brotes se subcultivaron en medio líquido MS con 0, 1, 2, 3, 4 y 5 μM de AIB. El 100% de los brotes tratados con AIB a una concentración de 3 μM formaron raíces.

Teixeira, (2013) investigó un método sin explorar, la rizogénesis. El objetivo de su investigación fue inducir artificialmente rizogénesis *in vitro*. Las hojas jóvenes fueron colocados en medio basal MS expuesto a 5 concentraciones (0, 1, 2, 4 o 8 mg / l) de auxinas (2,4, ácido 5-triclorofenoxiacético, 2, 4, 5-T; ácido indol acético-3-, IAA; ácido indol-3-butírico, IBA; α -naftalenacético ácido, NAA; ácido beta-naftoxiacético, BNOA) o floroglucinol. Todas las auxinas indujeron raíces adventicias y el NAA (2 mg / l) indujo las raíces en la mayoría de los explantes (23 / explante).

IV. MATERIALES Y METODOS

Revisión sistemática de artículos científicos, tesis y libros consultando las bases de datos de google académico, base de datos adquirida por el Colegio de Postgraduados y la universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, sin restricción de fecha, en los idiomas español e inglés.

Las bases de datos consultadas fueron SCIENCE AAASS, PORTAL, ACS, ACSESS, ISHS, AMS, ANNUAL REVIEWS, American society of plantbiologist, BIONE, EBSCO, MICROBIOLOGY, SOCIETY, JSTOR, PNAS, PROQUEST, INTERSICIENCE, SCIENCE DIRECT ELSERVIER, SPRINGERLINK.

La revisión se realizó sin restricciones en cuanto a temas generales y a temas específicos fueron enfocadas hacia la reproducción in vitro de *Carica papaya*. Se revisaron los abstracts y en los casos necesarios los artículos completos, tesis completas, capítulos de libros y folletos. Posteriormente se redactó la tesina por Capítulos y temas prosiguiendo de lo general a lo particular.

V. CONCLUSIONES

El explante más utilizado es la yema axilar o meristemo axilar con excelentes resultados en la obtención de callos o brotes meristemáticos.

El proceso de asepsia de los explantes más adecuado fue alcohol al 70% durante 30 segundos y enjuagar tres veces con agua destilada estéril, luego sumergir en hipoclorito de sodio 1% - 4% durante 10 minutos

De acuerdo a la revisión se puede concluir que tanto la embriogénesis directa como indirecta son utilizados para la propagación de la papaya y ambos llegan a producir una plántula de papaya.

La obtención de la raíz y proliferación de la misma se da con auxinas como IBA, BAP y ANA.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abdelnour, E., y Vincent, E. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico de Investigaciones y Enseñanza. 1-17.
- Alulema Flores A. C.(2013). Establecimiento de un protocolo para la obtención de proembriones a partir de callos desarrollados de tejido foliar de vitroplantas de mora de castilla (*Rubusglaucus* Benth). Tesis ingeniería en Biotecnología. 76 p.
- Anandan, R., D. Sudhakar, P. Balasubramanian, A. Gutiérrez-Mora. (2012). In vitro somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. Scientia Horticulturae. 136: 43-49.
- ASERCA. (1991). De Nuestra Cosecha. *Claridades Agropecuarias*, número 44.
- Azcón, J., Talón, M., Bonilla, I., Gárate, A. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal Editores: McGraw-Hill Interamericana de España Universitat de Barcelona, Servicio de Publicaciones. 2ª Edición. 370 p.
- Badillo, V. M. (1993). *Caricaceae*. Segundo esquema. Revista de la Facultad de Agronomía (UCV). Alcance 43. 111 p.
- Badillo, V. M. (2000). *Carica* L. vs. *Vasconcella* St.-Hil. (*Caricaceae*) con la rehabilitación de este último. *Ernstia* 10(2): 74-79.
- Bermúdez, M., Valadez, R., Buenrostro, N., Manzo, Sánchez., Guzmán, G. (2013). Inducción in vitro de raíces de *Carica papaya* mediante *Agrobacterium rhizogenes* y ácido 3-indolbutírico.

- Calva, G., Pérez, P. (2005). Cultivo De Células Y Tejidos Vegetales: Fuente De Alimentos Para El Futuro. *Revista Digital Universitaria*. 6 (11)1-16.
- Calva, C. G., Ríos L. E. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. pp 267-301.
- Fowler M. W. (1982). The largescalecultivation of plantcells. *Progr. Ind. Microb.* 16: 207-229.
- Freire, M. (2003). Aspectos Básicos De La Embriogénesis Somática. *Biotecnología Vegetal* 3 (4): 195 – 209.
- Ferl, R., Paul, A. L. (2000). Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.
- García, D. (2013). Acción del análogo de brasinoesteroides MH5 y la kinetina en la formación de biomasa en callos de *Coffeacanephoravar*. *Robusta.Cultivos Tropicales*, 21(3), 39-45.
- Gil, A., y Miranda, D. (2005). Morfología de la flor y de la semilla de papaya (*Carica papaya* L.): variedad Maradol e híbridoTainung-1. *Agronomía Colombiana*. 23: 217-222.
- Guzmán, S., Manzo, G. (2003). Micropropagación de plantas hermafroditas de papaya Red Lady. Folleto Informativo-Colima-Enero. 12 p.
- Hughes, K. W. (1981). In vitro ecology; exogenousfactorsaffectinggrowth and morphogenesis in plant culture systems. *Env. Exp. Bot.* 21:281-288.

- Jones, W. W., and Storey, W. B. (1941). Propagation and culture of the papaya. Papaya production in the Hawaiian Islands. Univ Hi AgricExpStaBul, 87, 23-31.
- Jordán, M., Casaretto J. (2006). Fisiología Vegetal. Capítulo XV. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. Ediciones Universales de La Serena, Chile. 15: 1-28.
- Jordán M. and Veloz J. (1995). Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 189-194.
- Krikorian, A. D. (1991). Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación, p. 41-77. En: W.M. Roca y L.A. Mroginski (Eds). Cultivo de ejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Departamento de bioquímica. Universidad estatal de Nueva York. Nueva York E.U. 969 p.
- Lallana, V. H. y Lallana Ma. del C. (2003). Manual de prácticas de Fisiología Vegetal. Edición digital. UNER. PP. 81 Extraído el 20 de Febrero, 2012. Disponible en: http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/fisiologiaveg/m_didactico/manual_practicas/BDesarrolloED.pdf.
- Litz, R., Jarret, R. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. In: Roca, William M.; Mroginski, Luis A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 143-172.
- Martin, S. M. (1980). Mass culture systems for plant cell suspensions. En: Staba E. J. (Ed.) Plant tissue culture as a source of biochemicals. C.R.C. Press. Inc. Boca Raton. Florida., U.S.A. pp. 149-166.
- Mondal M. 1994. Callus culture and plantlet production in *Carica papaya* (Var. Honey Dew). Plant Cell Reports 13:390-393b

- Morshidi, M. (1996). Genetic variability in *Carica papaya* and its related taxa. Dissertation submitted to the University of Hawaii, Honolulu. 282 p.
- Mroginski, L. A. (1975). Plantas haploides de *Nicotiana* spp. Obtenidas por cultivo en vitro de anteras. En: Memorias de las Segunda Reunión Nacional técnica de tabaco. Corrientes, Argentina 1:97-111.
- Mroginski, L. and Roca, W. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. Capítulo 2. Cultivo de tejidos en la agricultura. Págs. 26-27.
- Muñoz, M. (2012). Biotecnología. 2a edición. Capítulo 7 Editorial Bernal: Universidad Nacional de Quilmes, 448 páginas.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid grow and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:497-497.
- Olmos, S., Luciani, G., Galdeano, E. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II Parte IV, Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Capítulo 1 Micropropagación. Página 353 – 362.
- Posada, L., Gómez, R., Gallardo, J., Reyes, M., Herrera, I. (2004). Establecimiento in vitro de ápices de plantas de campo del híbrido cubano de Papaya IBP 42-99. *Biotecnología Vegetal* 4 (3): 153-158.
- Paull, R. E. and Duarte O. (2011). Papaya. In *Tropical Fruits*, 2nd Edition. Wallingford, Oxon, GBR. Vol. 1. Pag. 291-336.
- Raven P.H.; Evert R.F. & S.E.Eichhorn. (1992). *Biology of Plants*, 5th ed. Worth Publishers. 777 p.

- Reuveni, O., and Shlesinger, D. R. (1989). Rapid vegetative propagation of papaya plants by cuttings. In International Symposium on the Culture of Subtropical and Tropical Fruits and Crops 275 (pp. 301-306).
- Reuveni, O, Shlesinger DR, Lavi U. (1990). *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20: 41-46
- Rhodes M. J. C., Robins R. J., Parra. J., Hamill J. (1987). Secondary product formation in plant cell cultures. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 105S-114S.
- Rodríguez, A., Posada, L., Kosky, R., Reyes, M., Tejeda, M. (2009). Aclimatización de plantas de *Carica papaya* var. Maradol roja obtenidas por embriogénesis somática. Artículo Científico.
- Romero, J., Rangel, J., Rodríguez, R., Chablé, F., Alvarado, E., Rojas, M. (2007). Germinación *in vitro* Y propagación clonal de papaya Maradol. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Rodríguez, B., Latsague, V., Mirtha I, Chacón Fuentes, Manuel A, & Astorga Brevis, Pamela K. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugnimolinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 111-118.
- SAGARPA. (2009). Estudio de oportunidades de mercado e inteligencia comercial internacional de la papaya mexicana e identificación de necesidades de infraestructura logística.
- Seabrook, J. E. A. (1980). Laboratory culture, En: Staba, E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca ratón, Florida, E. U. p. 1-20.

- Segura, J. (2008). Introducción al desarrollo, concepto de hormona vegetal. (Capítulo 18, pp. 349-376). En: Azcón-Bieto, J. y M. Talón (eds.). Fundamentos de Fisiología Vegetal. España: McGraw-Hill Interamericana. 651p.
- Seibert, M. and Kadkade, P. G. (1980). Environmental factors; A: Light. En: Staba E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Raton, Florida, E. U. p. 123-141.
- Schenk, R.U. and Hildebrandt A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany. 50(1): 199-204.
- SIAP. (2014). Anuario estadístico de la producción agrícola. (En línea). Recuperado el 13 de Febrero de 2014. Obtenido de SIAP: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>.
- Solís, R., Olivera J., La Rosa, R. (2011). Propagación in vitro de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemas apicales. Revista peruana biología 343 – 347.
- Storey, B. W. (1941). The botany and sex relations of the papaya. In: Storey, W. B.; Jones, W. V. eds. Papaya production in the Hawaiian Islands, Part I., Hawaii: agricultural experiment Station. p 5-22.
- Storey, W. B. (1969). Papaya (*Carica papaya*). In Out lines of Perennial Crop Breeding in the Tropics. Eds. F. P. Fererda and F. Wit. The Netherlands: Wageningen, 389-407.
- Sulvarán, J. A. R. (2015). Efecto de los factores determinantes para el establecimiento de microesquejes de papaya (*Carica papaya* L.). Respuestas, 15 (1), 5-12.

- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. Plant physiology. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 764 p.
- Teixeira, da Silva, J. A. (2013). In vitro rhizogenesis in papaya (*Carica papaya* L.). Journal of plant development, 2051-55.
- VanDroogenbroeck, B., P. Breyne, P. Goetghebeur, E. Romeijn-Peeters, T. Kyndt, G. Gheysen. 2002. Theoretical and Applied Genetics 105 (2-3): 289.
- Vegas, A., Sandrea, Y., González, O., Díaz, A., Albarran, J., Schmidt, A., Salazar, E., Mujica, Y., Casado, R., Fernández, J., Marín C. (2015). Micropropagación de plantas de lechosa en recipientes de inmersión temporal a partir de brotes axilares. Revista Colombiana Biotecnología Volumen XVII No. 1. Págs. 70-78.
- Vargas, E., Munro, D., Rico, H., Díaz, G., Garza, J., González, C. (2004). Nuevos cultivares de papaya (*Carica papaya* L.) para el trópico seco de México. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, campo experimental valle de Apatzingán. Folleto técnico número 4. 42 pp.
- Yasuda, S., K. Satoh T., Ishii, Furuya T. (1972). Studies on the cultural conditions of plant cell suspension culture. En: Terui G. (Ed.) Ferment. Technol. Today. Proc. Int. Ferm. Symp. 4th. Soc. Ferm. Tech. Kyoto, Japan. pp 697-703.
- Webster, J. M. (1966). Production of oat callus and its susceptibility to a plant parasitic nematode. Nature 212(5069):1472.