

CENTRO UNIVERSITARIO DE LAS TUNAS

“Vladimir I. Lenin”

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**OBTENCIÓN DE POSTURAS DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) cv. MARADOL ROJA POR
CULTIVO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODALES DE PLANTAS JÓVENES**

Autores: Ariannys Yolanda Roque López

Eduardo Héctor Ardisana

Las Tunas

2006

RESUMEN

La poca duración de las plantaciones de papaya (*Carica papaya* L.) ocasionada por el aumento de las afectaciones fitosanitarias, trae consigo la necesidad de un suministro constante de semillas para sustituir las áreas infestadas. Dentro de las variedades presentes en Cuba la Maradol Roja es la más ampliamente difundida. No obstante, en algunas provincias existe una gran demanda de semillas de esta variedad que en general no se satisface. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer una metodología de propagación *in vitro* por segmentos nodales de la variedad Maradol Roja de papaya, determinar la estabilidad genética de las plantas obtenidas por la metodología y su comportamiento agrobiológico en dos áreas de producción. Se seleccionaron explantes de plantas jóvenes de dos, tres y cuatro meses de edad para determinar las condiciones para la multiplicación *in vitro* y aclimatización. Se determinó la estabilidad genética de las plantas con los descriptores a través del análisis multivariado, la ayuda del marcador AFLP, y los caracteres agrobiológicos en condiciones de producción en dos agroecosistemas. Con los resultados se estableció una metodología para la propagación *in vitro* de la papaya cv. Maradol Roja, por segmentos nodales a partir de plantas jóvenes de dos meses de edad. Los mejores resultados se obtuvieron en el medio de cultivo MS modificado suplementado en la fase de establecimiento con kinetina $2.32 \mu\text{mol.L}^{-1}$, en la de multiplicación con kinetina $2.32 \mu\text{mol.L}^{-1}$ y GA_3 $2.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$, en la de enraizamiento (subfase 1 para la elongación) con AIB $9.84 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en medio de cultivo semisólido y subfase 2 (de enraizamiento) en medio de cultivo líquido y libre de reguladores del crecimiento, y la aclimatización con un sustrato que contenía el suelo Ferralítico Rojo Típico Eútrico y 30 % de cachaza como materia orgánica, en la cual se alcanzó 80 % de supervivencia. El empleo de la sustancia bioactiva BB-6 $0.02 \mu\text{mol.L}^{-1}$ o el Pectimorf $0.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en las fases de establecimiento y multiplicación *in vitro* de la papaya hasta el octavo subcultivo, sustituye totalmente la kinetina como regulador del crecimiento. Con el análisis multivariado y las evaluaciones agrobiológicas en condiciones de campo se demostró que las plantas de papaya cv. Maradol Roja mantuvieron características agrobiológicas similares a las obtenidas por semilla, con un aumento del rendimiento de 9.0 t.ha^{-1} respecto al alcanzado por la vía tradicional. Se corroboró la similitud de los patrones de las plantas donantes y plantas obtenidas, mediante el uso de AFLP con las combinaciones de cebadores empleadas.

INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.), también llamada fruta bomba o pawpaw, pertenece a la familia *Caricaceae*. Este fruto es de gran aceptación por su contenido en vitaminas A y C, por lo que se encuentra entre los de mayor importancia en el mundo. Se consume como fruta fresca y en conserva. También se cultiva para su utilización en la extracción de la papaína, una enzima proteolítica de amplio uso en la industria de las carnes, alimenticia y cervecera, la cual se obtiene del látex de los frutos inmaduros. Además se emplea como purgativo y vermífugo (Villarreal, 2002).

La papaya se produce mundialmente en varios países, entre los cuales se encuentran Brasil, Indonesia, México y Nigeria, aunque se cultiva con éxito en Costa Rica, Santo Domingo, Estados Unidos, Puerto Rico, Venezuela, Perú, China, Filipinas, Trinidad y Tobago, Tailandia, India y Hawai (FAO, 2003).

En Cuba, en los últimos años, se incrementó el área de cultivo de 3 442 ha en 1998 a 6 688 ha en 2003 (FAO, 2004), en respuesta a la política del Estado con vistas a incrementar las plantaciones de frutales y entre ellos la papaya, como fruta de elevado contenido nutritivo en la alimentación humana (MINAGRI, 2000). No obstante, los rendimientos disminuyeron de 19.73 t.ha⁻¹ en 1998 a 17.95 t.ha⁻¹ en 2003 (FAO, 2004), principalmente por afectaciones de enfermedades, las cuales pueden dañar entre el 50 – 100 % de las plantaciones (Arocha *et al.*, 2003). Para evitar estas pérdidas los productores emplean intensivamente plaguicidas, sobre todo químicos, que perjudican el medio ambiente y elevan los costos de producción del cultivo.

Las afectaciones fitosanitarias provocan riesgos permanentes debido a la pérdida de las plantaciones, por lo cual su mantenimiento resulta económicamente costoso, y por lo tanto surge la necesidad de un suministro constante de semillas certificadas para sustituirlas.

Entre las variedades de papaya presentes en Cuba, la Maradol Roja ha sido la de mayor difusión. Sin embargo, en las provincias de La Habana y Ciudad de La Habana existe una gran demanda de semillas de esta variedad que no se logra satisfacer por la vía de la producción tradicional. Gran parte de las semillas certificadas se exportan a países como México y Colombia (Rodríguez, 2000). Ante tal situación, los productores utilizan semillas no certificadas, procedimiento que provoca que el nivel de segregación de las descendencias aumente y consecuentemente exista degeneración genética.

Otra alternativa de producción de “semillas” es mediante el cultivo *in vitro*, que a pesar de ser un método más costoso, puede asegurar una semilla certificada genéticamente, libre de enfermedades, y se ha convertido en otra vía para resolver la demanda de semillas para los productores (Pandey, 2002).

La variedad Maradol Roja presenta características muy distintivas, tanto por las formas de su fruto como por el número de plantas hermafroditas *elongatas* que se obtienen. Está demostrado que a partir de semillas certificadas se originan 66 % de plantas hermafroditas, 33 % de femeninas y 0 %, o muy bajo porcentaje de plantas machos, pues las semillas se obtienen de la previa selección del fruto (Rodríguez, 2000). La cualidad de la Maradol Roja de garantizar la no existencia de plantas machos a partir de semillas certificadas, hace posible la selección de los explantes a partir de plantas jóvenes; otra ventaja del empleo de plantas jóvenes como material donante es que están menos tiempo expuestas a la incidencia de microorganismos contaminantes, lo que acelera el proceso de inicio de la micropropagación con respecto a las adultas, en las que habría que esperar a que la planta alcance una edad promedio de 6 meses o más para tomar el material vegetal de partida (Gil *et al.*, 1998).

La provincia de La Habana cuenta con la infraestructura de una Biofábrica y con el personal calificado para producir de 2 a 4 millones de plantas anuales, lo que pudiera apoyar la producción de posturas de papaya a través del cultivo *in vitro*, incrementar la producción de manera sostenible y contribuir a la seguridad alimentaria en las provincias habaneras.

Los primeros resultados del cultivo de tejidos en esta especie fueron publicados por Mehdi y Hogan (1976). A partir de esa fecha varios investigadores han obtenido respuestas favorables al aplicar estas técnicas. Entre estos autores se destacan Drew *et al.* (1993); Drew (1998), que establecieron metodologías para la micropropagación de variedades silvestres con resultados alentadores.

En Cuba, en las provincias centrales, se han elaborado protocolos para el cultivo *in vitro* de la papaya en diferentes variedades, entre ellas la Criolla (Ortega, 1992), INIVIT 2000 (Del Sol, 2000) y Maradol Roja (García *et al.*, 2003), a partir de yemas apicales de plantas adultas. También, en esta última variedad, en las provincias habaneras se intentó el establecimiento *in vitro* de explantes a partir de plantas adultas y semillas germinadas *in vitro*, pero estos materiales de partida mostraron muy bajos coeficientes de establecimiento (Roque *et al.*, 2001), por lo que es preciso continuar los estudios hasta que se logre suficiente material aséptico para el proceso de micropropagación si se pretende emplearlo para la obtención de posturas.

En la papaya NICA III, se empleó otra variante con gran éxito, la cual consistió en la obtención de explantes a partir de plantas jóvenes para la micropropagación (Enríquez, 1992), por lo que esta se convierte en una posible vía de obtención de explantes en la papaya cv. Maradol Roja.

Recientemente, en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) se logró la obtención de varios híbridos, y se puso a punto la tecnología de producción de embriones somáticos de papaya, con el empleo del Sistema de Inmersión Temporal (Posada *et al.*, 2002), los que se encuentran en estudios de campo.

La diversidad de cultivares que existen en esta especie ha propiciado que se hagan estudios en los requerimientos específicos de cada uno para la micropropagación, fundamentalmente en la respuesta de los explantes ante determinado regulador del crecimiento (Sancho y Guevara, 1991). Por otra parte, la mayoría de los reguladores del crecimiento se importan de otros países, por lo que en Cuba en varias especies se evalúan sustancias bioactivas (entre ellas BB-6 y Pectimorf) que presentan determinada acción biológica en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Núñez, 1996 y Cabrera *et al.*, 2000). Ello constituye una alternativa de sustitución de los reguladores del crecimiento tradicionales por estos productos.

La variabilidad generada por el tipo de técnica de multiplicación que se emplee es uno de los problemas de la aplicación del cultivo de tejidos para la propagación masiva de plantas. Con el apoyo de los descriptores y los marcadores moleculares de ADN es posible detectar la variabilidad o estabilidad genética del material micropropagado (Vargas *et al.*, 2002a). Por otra parte, las metodologías de micropropagación establecidas por determinada técnica necesitan de su validación con el estudio de las plantas en la fase de campo, indicador de gran importancia para lograr su aceptación por los productores (Peña, 2002).

A partir de lo referido, se puede concluir que no existe una metodología integral para la propagación *in vitro* a partir de segmentos nodales de plantas jóvenes en la papaya cv. Maradol Roja.

Teniendo en cuenta estos antecedentes en la investigación se plantean los siguientes objetivos:

1. Establecer una metodología de propagación *in vitro* por segmentos nodales de plantas jóvenes en la papaya cv. Maradol Roja.
2. Determinar la estabilidad genética de las plantas obtenidas con el empleo de los descriptores y el auxilio de marcadores moleculares.
3. Determinar el comportamiento agrobiológico de las plantas obtenidas en condiciones de producción.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía en la Universidad Agraria de La Habana, ubicada en el municipio de San José de las Lajas en la provincia de La Habana, durante el período comprendido entre abril de 1998 a enero del 2004.

Material vegetal

Se empleó como material vegetal la variedad de papaya Maradol Roja por ser la más cultivada en estos momentos en Cuba, preferida por los productores en el país y en el área de América Central.

Las semillas certificadas se adquirieron en el Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical (INIFAT) en su forma comercial previamente seleccionadas de los frutos hermafrodita *elongata*. El certificado que las acredita plantea un 99 % de pureza genética, lo cual garantiza un 66 % de flores hermafroditas *elongata*, 33 % de flores femeninas y 1 % de posibles flores hermafroditas intermedias, estériles, pentandrias y machos.

Procedimientos generales utilizados

La esterilización de los medios de cultivo y agua destilada se realizó con una autoclave regulada a 110 °C y 1.5 kg.cm⁻² de presión durante periodos de tiempo que variaron en dependencia del volumen de medio de cultivo a esterilizar, según lo recomendado por SIGMA (1991). Las placas Petri, embudos de vidrio, pipetas y otros utensilios de vidrio se esterilizaron en la estufa a 180 °C durante dos horas. Los medios de cultivo en estado semisólido se dosificaron en frascos de vidrio con capacidad total de 250 mL a los que se les adicionaron 25 mL de medio de cultivo. El agente gelificante empleado fue el Agar Agar (7 g.L⁻¹) y el pH se ajustó a 5.8 antes de la esterilización por vapor en la autoclave. El instrumental (pinzas, espátulas y bisturí) se desinfectó en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0.1 % durante diez minutos y posteriormente se colocó en Alcohol 70 % durante el tiempo de trabajo en el flujo laminar, y se flameó con mechero de gas después de cada corte.

Para los experimentos en que se emplearon antibióticos se utilizaron micropipetas modelo Nichipet Ex, de 20 a 200 µL de volumen y puntas amarillas estériles. Las condiciones de incubación en los cuartos de crecimiento se regularon con luz solar y lámparas fluorescentes, temperatura de 27± 2.0 °C, densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de 50-62.5 µmol m⁻² s⁻¹, y un fotoperíodo de 16 h.

Las plantas donadoras se seleccionaron con una altura de de 15 – 20 cm. En horas tempranas de la mañana (7:00 a 8:00) se colectaron esquejes de aproximadamente 10 cm de longitud, que contenían los primeros 5 - 8 segmentos nodales del ápice a la base. A los esquejes se les eliminaron las hojas, se lavaron con agua corriente y detergente, se cepillaron, se enjuagaron con abundante agua destilada y se agitaron por un minuto en alcohol al 70 %.

El procesamiento estadístico de los datos se efectuó mediante los paquetes: *STATGRAPHICS Plus* 4.1 (1999) y *STATISTICA*. Las medias se compararon con la prueba de Tukey con $p < 0.05$. En cada experimento se detallan los diseños estadísticos realizados. Se comprobó la normalidad de los datos por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas por la de Bartlett. En los datos que se necesitó transformar se empleó $\sqrt{x+1}$, y los porcentajes se transformaron por $2 \arcsin \sqrt{p}$. Todos los experimentos se repitieron tres veces en diferentes momentos bajo las mismas condiciones y se tomaron los datos de los valores medios entre las tres observaciones. El diagrama de flujo experimental se presenta en la Figura 1.

Fase de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales

Efecto de la edad de las plantas y el tiempo de exposición al NaOCl en el proceso de desinfección

Con el objetivo de seleccionar la mejor fuente de explantes y establecer el proceso de desinfección adecuado, se utilizaron explantes provenientes de plantas jóvenes de dos, tres y cuatro meses de edad, obtenidas de semillas certificadas germinadas *ex vitro*.

Para la germinación *ex vitro* de las semillas certificadas se prepararon 40 bolsas de polietileno (23.00 cm x 8.00 cm), con una mezcla de suelo Ferralítico Rojo Típico Eútrico (Instituto de Suelos, 1999) y cachaza (4:1) como fuente de materia orgánica (Anexo 1). Las semillas se remojaron previamente durante 24 horas en agua corriente para facilitar la germinación y luego se sembraron dos semillas por bolsa, las cuales se ubicaron en una casa de cultivo como banco de donantes. Posteriormente se emplearon diferentes concentraciones y tiempos de exposición al NaOCl con una doble desinfección y un tratamiento control sin desinfección.

Los diez últimos minutos de los procesos de desinfección se realizaron en la cabina de flujo laminar con un lavado tres veces en agua destilada estéril. Para la desinfección en todos los casos se añadió TWEEN 80 como humectante (tres gotas/100ml). Los esquejes se seccionaron hasta formar segmentos nodales de 0.5 -1.0 cm de largo con una yema axilar para su implantación en un medio de cultivo que contenía Agar (7.0 g.L^{-1}), las sales MS y sacarosa (30 g.L^{-1}) y se colocó un explante por tubo de ensayo.

A los 30 días se evaluó el tipo de contaminación microbiana visible y se calcularon las variables porcentaje de desinfección y supervivencia. Para el porcentaje de desinfección se tuvo en cuenta los explantes libres de contaminación microbiana visible con relación al total del material vegetal y para el porcentaje de supervivencia los explantes libres de contaminación microbiana visible, despigmentación, clorosis y necrosis celular respecto al total.

En el experimento se empleó un diseño completamente al azar, con 50 explantes por tratamiento y se realizaron 10 repeticiones por tratamiento con cinco explantes cada una. Para el análisis de los datos se aplicó un ANOVA con arreglo de tratamiento bifactorial (tratamientos de desinfección y edad de las plantas).

Efecto del sulfato de gentamicina sobre el control de la contaminación bacteriana endógena

Para realizar el presente experimento se colectaron esquejes de plantas con dos meses de edad, a los cuales se les realizó una doble desinfección con NaOCl (0.1 %) durante 24 horas y NaOCl (0.01 %) durante 30 minutos. Los últimos diez minutos de desinfección se realizaron en la cabina de flujo laminar, donde se enjuagaron finalmente los explantes tres veces con agua destilada estéril. Al NaOCl, se añadió TWEEN 80 (tres gotas/100 ml). En la cabina de flujo laminar se seccionaron los segmentos nodales de 0.5 - 1.0 cm portando una yema axilar y se implantaron en un medio de cultivo que contenía las sales MS, Agar (7.0 g.L^{-1}) y sacarosa (30 g.L^{-1}); se colocó un explante por tubo de ensayo.

Para el control de la contaminación bacteriana endógena en los explantes se emplearon diferentes concentraciones y formas de aplicación de sulfato de gentamicina de 20, 30 y 40 mg.L^{-1} añadido al medio de cultivo, por inmersión 4 horas y la combinación de estas dos variantes, teniendo en cuenta además las metodologías propuestas por Vianna *et al.* (1997) y Singh *et al.* (1999) y el resultado del antibiograma realizado por el método de Kinby *et al.* (1966).

A los 30 días se calcularon las variables porcentaje de desinfección bacteriana y porcentaje de supervivencia de los explantes. En el porcentaje de desinfección bacteriana se tuvo en cuenta la observación visual de la presencia de bacterias endógenas respecto al total de explantes, y para el porcentaje de supervivencia los explantes libres de contaminación microbiana visible, despigmentación, clorosis y necrosis celular con relación al total.

En el experimento se empleó un diseño completamente aleatorizado y para el análisis de los resultados se aplicó un ANOVA de clasificación simple. Se implantaron 100 explantes por tratamiento y se realizaron 20 repeticiones con cinco explantes cada una.

Determinación de requerimientos nutricionales y reguladores del crecimiento para el establecimiento *in vitro*

Evaluación de la influencia de la composición basal y estado físico del medio de cultivo

En este experimento la procedencia de los explantes y desinfección inicial coinciden con lo descrito en el acápite 3.1.2. Para el control de la contaminación bacteriana endógena se colocaron los esquejes en inmersión durante 4 horas con sulfato de gentamicina (20 mg.L^{-1}) en la cabina de flujo laminar, donde se enjuagaron finalmente los explantes tres veces con agua destilada estéril.

Se tomaron como explantes segmentos nodales de 0.5 – 1.0 cm de longitud con una yema axilar, los cuales fueron establecidos en diferentes medios de cultivo con las composiciones basales de Murashige y Skoog (1962), Drew y Smith (1986), y Murashige y Skoog (1962) modificado con un incremento de la concentración de ioduro de potasio (MS modificado, Anexo 3) y un tratamiento control. Como estados físicos del medio de cultivo se ensayaron el líquido y el semisólido. Para el medio de cultivo líquido se emplearon como soporte puentes de papel de filtro y para el semisólido Agar (7.0 g.L⁻¹). Se colocó un explante por tubo de ensayo. Se añadió en todos los casos sacarosa 30 g.L⁻¹. A los 30 días de establecidos los segmentos nodales se calculó el porcentaje de brotación de los explantes.

Se realizó un diseño completamente aleatorizado, con 50 explantes por tratamiento y se realizaron 10 repeticiones por tratamiento con cinco explantes por cada una. Para el análisis de los resultados se hizo un ANOVA para un arreglo bifactorial (medio de cultivo y estado físico del medio de cultivo).

Influencia de los reguladores del crecimiento

Influencia de la 6-BAP y la kinetina

Con el objetivo de evaluar la influencia de la 6-BAP y la kinetina en el establecimiento *in vitro*, se realizó la toma de los explantes y el proceso de desinfección como se describe en el acápite anterior

Los explantes se establecieron en el medio de cultivo MS modificado, suplementado con diferentes concentraciones de 6-BAP y kinetina. Se tuvieron en cuenta además, las concentraciones propuestas por Palboolya (1984) y Mondal *et al.* (1990). A los 30 días se evaluaron las variables número de brotes axilares por explante, número de hojas del brote principal por explante y altura del brote principal por explante. Además, se determinó el coeficiente de multiplicación, el cual está dado por el número de segmentos nodales seccionables por explante. Se consideraron segmentos seccionables a aquellos que presentaron un tamaño igual o superior a 0.5 cm.

En el experimento se empleó un diseño completamente aleatorizado donde se colocaron 100 explantes por tratamiento, con un explante por tubo de ensayo. Se realizaron 20 repeticiones por tratamiento con cinco explantes cada una. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de clasificación simple.

Fase de multiplicación *in vitro*

Evaluación de la influencia de los reguladores del crecimiento

Para evaluar el efecto de los reguladores del crecimiento en la fase de multiplicación se tomaron segmentos nodales que provenían de brotes de la fase de establecimiento implantados en el medio de cultivo MS modificado, suplementado con 2.32 µmol.L⁻¹ Kinetina.

Se diseñaron seis tratamientos con las concentraciones de citoquininas que mostraron los mejores comportamientos en la fase de establecimiento y la adición sola o combinada del GA₃. Se añadieron además las concentraciones descritas por Perea y Navarro (1988) y Mondal *et al.* (1990).

Los explantes se seccionaron separando los segmentos nodales de 0.5 cm o más de longitud, para su implantación posterior en el medio de cultivo MS modificado, suplementado con las concentraciones de reguladores del crecimiento en los diferentes tratamientos. A los 30 días se evaluaron las variables número de brotes por explante, número de hojas del brote principal por explante y altura del brote principal por explante. Además se calculó el coeficiente de multiplicación. Para el análisis estadístico se empleó un diseño completamente aleatorizado de 120 explantes por tratamiento (cinco por frasco de cultivo) y se hicieron 24 repeticiones.

Los datos se analizaron por un ANOVA de clasificación simple. Se realizó un análisis de regresión del número de segmentos nodales seccionables (Y, variable dependiente) sobre el número de brotes totales (X), con el empleo del programa MINITAB versión 13.2 (1998) para “Windows” con 100 pares de datos. Para graficar la curva de regresión se empleó el paquete de ajustes de curvas Curve Expert, versión 1.34 (1997).

Efecto del número de subcultivos

En este experimento se tomaron 100 segmentos nodales de 0.5 cm o más de longitud portando una yema axilar provenientes de brotes previamente establecidos en el medio de cultivo MS modificado, suplementado con 2.32 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Kinetina.

Posteriormente se subcultivaron en un medio de cultivo que contenía MS modificado suplementado con 2.32 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Kinetina y 2.88 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de GA₃. Después de 30 días en la fase de multiplicación se transfirieron para el mismo medio de cultivo. Esta operación se repitió hasta los quince subcultivos. Las variables que se evaluaron fueron número de brotes por explante, número de hojas del brote principal por explante y altura del brote principal por explante. Además se calculó el coeficiente de multiplicación. Los datos se procesaron por un ANOVA de clasificación simple, se evaluaron 50 plantas al azar por cada subcultivo (10 repeticiones con cinco plantas cada una).

Fase de enraizamiento *in vitro*

Efecto de diferentes auxinas y el estado físico del medio de cultivo sobre la elongación y el enraizamiento *in vitro* (subfase 1)

Para analizar el efecto de las auxinas y el estado físico del medio de cultivo en la elongación y enraizamiento se tomaron brotes de 1.5 - 2.0 cm de altura provenientes de la fase de multiplicación (subcultivo 12) colocados en un medio de cultivo que contenía MS modificado, suplementado con 2.32

$\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Kinetina y $2.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de GA_3 . Se probaron tres concentraciones de las auxinas AIA, ANA y AIB en medio de cultivo semisólido con Agar (7.0 g.L^{-1}) y medio de cultivo líquido.

A los 30 días se evaluaron las variables número de raíces por brote, longitud de la raíz principal, número de hojas por brote y altura de las plantas. Además se calculó el porcentaje de brotes que formaron callos en la base del tallo.

Para el análisis estadístico se empleó un diseño completamente aleatorizado donde se colocaron 200 explantes por tratamiento (40 repeticiones con cinco plantas cada una). Cada frasco contenía cinco plantas. Los datos se analizaron por un ANOVA con arreglo bifactorial para las concentraciones de las auxinas y el estado físico del medio de cultivo.

Efecto de la procedencia de las plantas y el estado físico del medio de cultivo sobre la elongación y el enraizamiento *in vitro* (subfase 2)

A los 30 días de colocadas las plantas en los diferentes tratamientos con auxinas en la subfase 1, se seccionó la base del tallo de las plantas y se pasaron al medio de cultivo MS modificado en estado físico semisólido y líquido, sin reguladores del crecimiento (subfase 2) manteniéndose la identificación de los tratamientos anteriores con las auxinas; después de 30 días se evaluaron las mismas variables (número de raíces por brote, longitud de la raíz principal, número de hojas por brote y altura de la plántula).

Para el análisis estadístico se empleó un diseño completamente aleatorizado donde se colocaron 200 explantes por tratamiento (40 repeticiones con cinco plantas cada una). Cada frasco contenía cinco plantas. Los datos se analizaron por un ANOVA con arreglo bifactorial para las concentraciones de las auxinas de las que provenían las plantas en la subfase 1 y el estado físico del medio de cultivo.

Aclimatización

En este experimento se utilizaron plantas provenientes de la fase de enraizamiento *in vitro* en un medio de cultivo que contenía MS modificado y sacarosa 30 g.L^{-1} . La altura de las plantas fluctuó entre 2-3 cm. Las plantas se lavaron con agua destilada, se sumergieron en una solución de Ridomil al 1 % (25 % PH) durante 30 minutos para evitar la contaminación fúngica y se colocaron en dos sustratos diferentes con suelo y materia orgánica 30 % y suelo y materia orgánica 60 %. Las plantas se colocaron en bandejas de polieturano de 70 orificios con un volumen de 162 cm^3 .

El suelo (Ferralítico Rojo Típico Eútrico) se esterilizó con formol al 10 % durante cuatro horas y se prepararon mezclas con materia orgánica (cachaza) a partir de lo recomendado por Rodríguez *et al.* (1999). Las características del suelo y la cachaza como fuente de materia orgánica se muestran en los anexos 1 y 4.

Las plantas se cubrieron con una malla sombreadora negra, la cual logra una reducción de la intensidad luminosa del 70 %, con la que se alcanzó un flujo de fotones fotosintéticos de $352.62 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a las 12:00 del día en los meses de septiembre a octubre, período en que se debe realizar la aclimatización de la papaya cv. Maradol Roja para ser llevada a campo en los meses de noviembre a enero, por ser la época recomendada para evitar mayor incidencia de las plagas (Rodríguez, 2000).

La humedad necesaria se aseguró con el empleo de microaspersores mediante el sistema de microjet, con una entrega final de $1.0 - 1.5 \text{ L/m}^2$ por riego de dos minutos, y la frecuencia de 8 riegos diarios. Bajo estas condiciones se logró una humedad relativa de 85 - 90 %.

A los 30 días se calculó el porcentaje de supervivencia de las plantas y se evaluó el número de hojas por planta, número de raíces por planta, altura de las plantas y longitud de la raíz principal a un total de 125 plantas por tratamiento. Las plantas que sobrevivieron se trasplantaron a bolsas (1155.52 cm^3).

En este experimento se empleó un diseño completamente aleatorizado con 125 repeticiones por tratamiento. Para el análisis e interpretación de los resultados se aplicó la t-student.

Alternativa de sustitución de la Kinetina por el análogo de brasinoesteroide Biobras-6 (BB-6) o el oligopeptato Pectimorf

Influencia del BB-6 o el Pectimorf en la fase de establecimiento *in vitro*

Con el objetivo de evaluar la posible sustitución de la kinetina por el BB-6 o el Pectimorf o su efecto aditivo en el establecimiento *in vitro*, se colectaron esquejes y se desinfectaron según el procedimiento descrito anteriormente.

Los explantes fueron segmentos nodales de 0.5 – 1.0 cm de longitud con una yema axilar, los cuales se establecieron en el medio de cultivo MS modificado, suplementado con $2.32 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Kinetina y diferentes concentraciones de BB-6 o Pectimorf que sustituían totalmente o a la mitad la concentración de la kinetina. Se colocó un explante por tubo de ensayo. Las concentraciones ensayadas se tuvieron en cuenta según las empleadas para el cultivo *in vitro* del plátano (*Musa sp.*) por Rodríguez (1999). A los 30 días se evaluaron las variables número de brotes por explante, número de hojas del brote principal por explante y altura del brote principal por explante. Además se calculó el coeficiente de multiplicación.

Influencia del BB-6 o el Pectimorf en la fase de multiplicación *in vitro*

El experimento se realizó con el objetivo de evaluar la influencia de la sustitución total o el efecto aditivo a la mitad de la concentración de la kinetina por el BB-6 o el Pectimorf en la fase de multiplicación.

Se tomaron segmentos nodales que provenían de brotes obtenidos en la fase de establecimiento; los segmentos nodales para los tratamientos con BB-6 en el tratamiento 1 (control) provenían de brotes establecidos en el medio de cultivo MS modificado, suplementado con $2.32 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Kinetina, los de los tratamientos 2 y 3 provenían del mismo medio de cultivo pero suplementados con $0.02 \mu\text{mol.L}^{-1}$ BB-6 más $1.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Kinetina y $0.02 \mu\text{mol.L}^{-1}$ BB-6 respectivamente.

Para el Pectimorf los segmentos nodales en el tratamiento 1 (control) provenían de brotes establecidos en el medio de cultivo MS modificado, suplementado con $2.32 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Kinetina; los de los tratamientos 2 y 3 provenían del mismo medio de cultivo pero suplementados con $0.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Pectimorf más $1.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Kinetina y $0.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Pectimorf, respectivamente.

Se evaluó el efecto de las concentraciones de las sustancias bioactivas en la fase de multiplicación hasta el subcultivo 8. Se colocaron cinco explantes por frasco de medio de cultivo. Se realizaron tres tratamientos por cada producto. A los 30 días se evaluaron las variables número de brotes por explante, número de hojas del brote principal por explante y altura del brote principal por explante. Además se calculó el coeficiente de multiplicación.

En el experimento se empleó un diseño completamente aleatorizado donde se colocaron 50 explantes por tratamiento (10 repeticiones con cinco explantes cada una). Para el análisis de los datos se realizó un ANOVA de clasificación simple.

Validación

Evaluación de la estabilidad genética de las plantas de papaya cv. Maradol Roja

Empleo de los descriptores morfológicos para el estudio de la estabilidad genética de las plantas de papaya cv. Maradol Roja

Para evaluar la estabilidad genética de las plantas de papaya cv. Maradol Roja se emplearon los descriptores para la papaya del IBPGR (1988, Buró Internacional para los Recursos Genéticos de Plantas) y el específico para la variedad según Rodríguez (2000).

Se evaluaron 100 plantas en cada tratamiento, los cuales consistieron en plantas control provenientes de semilla y de los subcultivos 3 y 12 previamente enraizadas, aclimatizadas y plantadas en condiciones de producción en dos agroecosistemas, uno ubicado en la zona de San José de las Lajas (Provincia Habana), en un suelo Ferralítico Rojo Típico Eútrico y otro ubicado en la zona de Guanabacoa (Provincia Ciudad de La Habana), en un suelo Pardo Cálcico Carbonatado (Instituto de suelos, 1999).

Las condiciones agrotécnicas en cada agroecosistema se realizaron siguiendo la tecnología para el cultivo de la papaya del MINAGRI (2000). Las variables evaluadas fueron altura de la planta (cm),

número de hojas, diámetro del tallo (cm), número de frutos por planta, altura de los primeros frutos, masa de los frutos rendimiento por planta, flores hermafroditas *elongata*, flores femeninas, frutos de flores femeninas, frutos de flores hermafroditas *elongata*, inicio de la floración e inicio de la fructificación.

Todas las variables se evaluaron a los 12 meses de establecidas las plantaciones. Con el objetivo de conocer las variables de mayor contribución a la variabilidad de los clones estudiados, se efectuó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con ayuda del paquete estadístico STATISTICA.

Los agrupamientos de los genotipos se efectuaron basados en los valores de similitud entre todos los pares de clones con el algoritmo SAHN propuesto por Sneath y Sokal (1973). El método de agrupamiento utilizado fue el UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average), con el coeficiente de distancia euclidiana y mediante el paquete estadístico NTSys-pc versión 2.10j (2000) por presentar los valores cofenéticos más adecuados.

Empleo del marcador genético AFLP para el estudio de la estabilidad genética de plantas de papaya cv. Maradol Roja

Para evaluar la posible estabilidad genética del material micropropagado se empleó el marcador genético AFLP, con vistas a apoyar el estudio morfológico realizado con los descriptores de la papaya cv. Maradol Roja. En horas de 7:00 – 8:00 de la mañana se colectaron al azar diez muestras de plantas con 6 meses de edad provenientes de los subcultivos 3 y 12 y de semilla gámica (donante). Las muestras consistieron en hojas jóvenes que se limpiaron con un cepillo, se envolvieron en papel de aluminio y se conservaron en nitrógeno líquido. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Genómica Funcional de Plantas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

Para la extracción de ADN genómico que permitiera la obtención de ADN limpio de impurezas y amplificable se empleó el kit de extracción de ADN de la Promega Wizard® Purification DNA Genomic (Promega, 2002). El ADN total se visualizó en geles de agarosa al 0.8 % en TBE1X (Tris-ácido bórico-EDTA), teñidos con bromuro de etidio y mediante iluminación con luz ultravioleta. La corrida se hizo a 90 voltios.

Se empleó la técnica de los Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) descrita por Vos *et al.* (1995) modificada, para conocer la estabilidad genética de plantas de papaya (*C. Papaya*) cv. Maradol Roja. Las modificaciones consistieron en el empleo de las enzimas TaqI y AseI en lugar de la EcoRI y la MseI. Se usaron tres combinaciones de cebadores {TaqI / AseI (CA/TG, GA/CG, AC/GC)}. La enzima AseI se empleó a 20U (unidades) y la TaqI a 10U. Los resultados se visualizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (6.5 % y buffer de corrida de TBE0.5X, con 2000 voltios y 40 watt de potencia) en condiciones desnaturalizantes. La visualización de los productos

amplificados de ADN se realizó por medio de la tinción con nitrato de plata (utilizando el kit Silver sequence™ DNA Sequencing), (Promega 2002). Se empleó como marcador de peso molecular el Ladder de 100pb, (Promega 2002).

Validación en campo del comportamiento de las plantas en condiciones de producción

Con el objetivo de evaluar el comportamiento agroproduktivo y fitosanitario de las plantas obtenidas por el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de papaya cv. Maradol Roja, se plantaron posturas provenientes de los subcultivos 3 y 12 y plantas control obtenidas por semillas (donantes) en los dos agroecosistemas descritos anteriormente.

Para el análisis estadístico se tomaron muestras con un diseño de bloques al azar, con 6 replicas y 8 plantas por parcela o bloque. Se plantaron un total de 500 plantas en cada agroecosistema que ocupaban 0.31 ha en cada caso.

Las atenciones culturales y el seguimiento y evaluación de las mismas se realizaron por los productores que atienden las áreas antes mencionadas, siguiendo la tecnología para el cultivo de la papaya del MINAGRI (2000).

Las temperaturas promedios por meses y las precipitaciones se tomaron de las estaciones meteorológicas ubicadas en cada región (Anexos 5 y 6) para poder conocer el comportamiento de las plantas en el momento de las evaluaciones.

A los 12 meses de establecidas las plantaciones se realizaron las evaluaciones de la altura, número de hojas, diámetro del tallo (1 cm de la base del tallo), estado fitosanitario, color de las flores, disposición de las flores por nudo, porcentaje de floración y fructificación, tipo de flores y frutos, inicio de la floración y fructificación, número de frutos por planta, altura de los frutos, peso de los frutos, rendimiento por planta y por hectárea. Los criterios de referencia para las plantas fueron los descritos por el IBPGR (1988) y para este cultivar por Rodríguez (2000).

La caracterización de la forma de árboles según el tipo de flor se realizó según lo planteado por Rodríguez y Santo (1967) y Rodríguez, (2000).

Para determinar el estado fitosanitario de las plantas se evaluó el porcentaje de diseminación de las plagas en el cultivo a los 12 meses de plantadas según la Metodología para la Señalización y el Pronóstico de Plagas (Suárez, 1985). El diagnóstico de las enfermedades se realizó en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) según la metodología de Cronjé *et al.* (1998).

Para el análisis e interpretación de los resultados se aplicó en todas las variables un ANOVA de clasificación simple.

Valoración económica

Se elaboró la ficha de costo para la obtención de un millar de vitroplantas aclimatizadas, según los gastos materiales, indirectos y otros gastos incurridos en las etapas de la micropropagación.

Para validar la posible sustitución de la kinetina por el BB-6 y el Pectimorf, se realizó una valoración económica para la producción de un millón de vitroplantas en las fases de establecimiento y multiplicación según el costo de los productos y las concentraciones probadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales

Efecto de la edad de las plantas y tiempo de exposición al NaOCl en el proceso de desinfección

Los segmentos nodales de plantas de dos meses de edad fueron los de mejor comportamiento con 58 % de desinfección y 53.0 % de supervivencia. Por otra parte, la doble desinfección de los explantes con inmersión durante 24 horas en NaOCl (0.1 %) y 30 minutos en NaOCl (0.01 %) fue significativamente mejor, obteniéndose 64 % de desinfección y 61.0 % de supervivencia (Tabla 1). Los factores edad de las plantas y tratamientos de desinfección no presentaron interacción. En el tratamiento control se obtuvieron porcentajes de desinfección y supervivencia muy bajos (0.5 %).

Tabla 1. Influencia de la edad de las plántulas y de la forma de desinfección sobre el porcentaje de desinfección y la supervivencia de los explantes de plantas jóvenes de papaya cv. Maradol Roja provenientes de semillas germinadas *ex vitro*

Tratamientos	Porcentaje de desinfección		Porcentaje de supervivencia	
	R (%)	T	R (%)	T
Control	0.5	0.14 ^g	0.5	0.14 ^g
NaOCl (0.1% 6 horas y 0.05% 15 minutos)	12.0	0.70 ^f	9.0	0.60 ^f
NaOCl (0.1% 6 horas y 0.01% 30 minutos)	17.0	0.85 ^e	13.2	0.73 ^e
NaOCl (0.1% 12 horas y 0.05% 15 minutos)	23.0	1.00 ^d	20.1	0.92 ^d
NaOCl (0.1% 12 horas y 0.01% 30 minutos)	31.0	1.18 ^c	28.0	1.11 ^c
NaOCl (0.1% 24 horas y 0.05% 15 minutos)	54.0	1.65 ^b	50.0	1.57 ^b
NaOCl (0.1% 24 horas y 0.01% 30 minutos)	64.0	1.85 ^a	61.0	1.79 ^a
\bar{Sx}	-	0.01	-	0.02
CV	-	5.6%	-	6.1%
Edad de las plantas (meses)				
2	58.0	1.73 ^a	53.0	1.63 ^a
3	25.0	1.04 ^b	22.0	0.97 ^b
4	13.0	0.73 ^c	8.0	0.57 ^c
\bar{Sx}	-	0.03*	-	0.03*
CV	-	4.8%	-	5.0%

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente para Tukey con $p < 0.05$. R: datos reales, T: datos transformados

Los menores valores en los porcentajes de desinfección y supervivencia de los explantes que provenían de las plántulas de tres y cuatro meses de edad, pueden estar relacionados con un mayor tiempo de exposición de estas plantas a la incidencia de los microorganismos presentes

epifítica y endofíticamente en los tejidos de las plantas de mayor edad, aspecto que pudiera ser uno de los factores que determinan la eficiencia del establecimiento *in vitro*. Al mismo tiempo, los resultados en las plantas control corroboran la necesidad de efectuar las desinfecciones. Resultados similares, fueron observados por Drew y Smith (1986), los que al desinfectar explantes de papaya de dos y cuatro meses de edad, encontraron que los más jóvenes mostraron un 33 % de desinfección y 27 % de supervivencia, superando los explantes de mayor edad.

El conjunto de resultados aquí analizados permite recomendar como fuente de explantes a las plantas de dos meses de edad, provenientes de semillas certificadas germinadas *ex vitro*. El mejor método de desinfección a emplear sería la doble desinfección de NaOCl 0.1 % (24 horas) y 0.01 % (30 minutos).

En la evaluación visual del tipo de microorganismo contaminante, se pudo apreciar que los explantes que presentaban contaminación, eran del tipo bacteriano. Por la forma en que se desarrollaron las bacterias, formando un arilo blanquecino y transparente en el borde basal del explante introducido en el medio de cultivo, su procedencia pudiera tener origen endógeno en el material vegetal, lo que permite que este tipo de bacterias escape al proceso de desinfección superficial y no se elimine totalmente del segmento nodal establecido.

Resultados similares observaron Fitch *et al.* (2003), al realizar la micropropagación masiva de la *Carica papaya* L. a escala de producción, al encontrar incluso después de varios subcultivos la proliferación de bacterias endógenas que afectaron el proceso productivo.

Efecto del sulfato de gentamicina sobre el control de la contaminación bacteriana endógena

Al valorar los resultados de los procedimientos realizados para el control de la contaminación bacteriana con diferentes dosis y forma de aplicación de sulfato de gentamicina, se pudo constatar que las dosis de 20 y 30 mg.L⁻¹ de sulfato de gentamicina por inmersión de los explantes durante 4 horas fueron los mejores tratamientos, teniendo en cuenta que se logró en ellos un 60% de desinfección de los explantes y 70 % de supervivencia. Esta combinación logró un efecto favorable en el control de la contaminación bacteriana de los explantes; al parecer en la forma de inmersión el antibiótico logra penetrar en los espacios intercelulares y controlar las bacterias endógenas sin provocar daños en el tejido vegetal. Al respecto, García *et al.* (2000) observaron un 68 % de establecimiento con la combinación de hipoclorito de sodio y sulfato de gentamicina (50 mg.L⁻¹) en la desinfección de explantes de híbridos de papaya.

Determinación de requerimientos nutricionales y reguladores del crecimiento para el establecimiento *in vitro*

Evaluación de la influencia de la composición basal y estado físico del medio de cultivo

El porcentaje de brotación 84 % cuando se empleó el medio de cultivo MS modificado con incremento del contenido de potasio fue significativamente superior a los alcanzados con los demás medios de cultivo (Tabla 2). Por su parte, el estado semisólido del medio de cultivo proporcionó un porcentaje de brotación estadísticamente superior que el líquido con 57 %. No obstante, no hubo interacción entre la composición basal y el estado físico del medio de cultivo. Los explantes que no brotaron estuvieron libres de contaminación microbiana y mantuvieron sus características con una posible latencia de las yemas axilares en estado de conservación.

Tabla 2. Influencia de los medios de cultivo y el estado físico sobre el porcentaje de brotación de los explantes de papaya cv. Maradol Roja

Medios de cultivo	Porcentaje de brotación	
	R (%)	T
Control	17.0	0.85 ^c
MS	48.0	1.53 ^b
DS	14.0	0.76 ^d
MS mod.	84.0	2.31 ^a
\bar{Sx}	-	0.002
CV	-	1.12%
Líquido	48.0	1.53 ^b
Semisólido	57.0	1.71 ^a
\bar{Sx}	-	0.02*
CV	-	1.5%

MS: Murashige y Skoog (1962)

DS: Drew y Smith (1986)

MS modificado: Murashige y Skoog (1962) con incremento del doble de la concentración de ioduro de potasio.

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente para Tukey con $p < 0.05$. R: datos reales, T: datos transformados

El medio de cultivo DS presentó los menores porcentajes de brotación (14.0 %) lo cual pudo estar asociado a la ausencia de una fuente de Fe como microelemento esencial, principal aspecto que lo diferencia de los demás medios de cultivo empleados (Anexo 3), excepto para el tratamiento control. Entre los micronutrientes el Fe es el requerido en mayor cantidad; de hecho, para algunas plantas se le llega a considerar macronutriente (Azcón-Bieto y Talón, 2001).

Por otra parte el medio de cultivo DS, contiene más Na, lo que puede haber influido en que se presentara un porcentaje de brotación inferior al tratamiento control. El incremento del contenido de esta sal puede interferir en la absorción de K, un macroelemento esencial (Zhang, 2001), lo cual pudo haber provocado efectos desfavorables al proceso de brotación de los segmentos nodales.

De acuerdo con estos resultados, el incremento de la concentración de yoduro de potasio presente en el medio de cultivo MS modificado, al parecer tuvo un efecto favorable en los procesos fisiológicos de división y formación de órganos, característicos de dicha fase.

El efecto del potasio puede estar dado, ya sea como elemento esencial en la nutrición y metabolismo de las plantas o por un sinergismo con los reguladores del crecimiento endógenos, o ambos efectos. Resultados similares obtuvieron Reuveni y Schlesinger (1990), al micropropagar *Carica papaya* en el medio de cultivo MS con un incremento del 1.0 % del contenido de potasio.

Estos resultados corroboran el efecto favorable del potasio como macroelemento esencial en la nutrición de las plantas. En general, su concentración es de más del 1.0 % en la materia seca de los tejidos vegetales y desempeña un papel muy importante en la fotosíntesis, la respiración, el contenido de agua en las hojas, entre otras (Azcón-Bieto y Talón, 1996; Valdés y Balbín, 2000).

Por su parte el yodo (I) está ampliamente distribuido en la naturaleza pero en pequeñas cantidades. En las plantas Yágodin (1986) plantea que el contenido medio del yodo se encuentra en 1.10^{-5} (% másico) y que desde el punto de vista agronómico se debía prestar mayor atención a la investigación del yodo como microelemento esencial.

Más recientemente Rodríguez (2003) descubre un yodoforo denominado activador fisiológico Q-2000 que tiene como ingrediente activo al yodo y que participa en los procesos de síntesis de clorofila. Este autor encontró que la aplicación de una solución de yoduro de potasio al sustrato de 1: 20,000; 1: 200, 000 y 1: 4'000,000 ppm, incrementó las reservas de carbohidratos de repollos (*Brassica oleraceae* L.), rábanos (*Raphanus sativus* L.), remolacha (*Beta vulgaris* L.) y caña de azúcar (*Saccharum* sp.); mejoró el crecimiento y vigor de las plántulas de remolacha (*Beta vulgaris* L.), y mejoró el crecimiento y vigor del trigo (*Triticum* sp.). Estos resultados evidencian la importancia de profundizar en las investigaciones con respecto a los posibles efectos fisiológicos del yodo.

Por otra parte, en lo que corresponde a los efectos fisiológicos del yoduro de potasio en condiciones *in vitro* no se ha encontrado estudios que corroboren su tipo de actividad, por lo que resulta recomendable realizar estudios más profundos al respecto.

Varios autores han empleado el medio de cultivo semisólido para el establecimiento *in vitro* de explantes de *C. papaya* (Pandey y Rajeevan, 1982; Reuveni *et al.*, 1990; Enríquez, 1992), en diferentes protocolos donde se realiza la proliferación por yemas axilares.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el medio de cultivo MS semisólido modificado con el incremento del yoduro de potasio, parece ser el más adecuado para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de papaya cv. Maradol Roja.

Influencia de los reguladores del crecimiento

Influencia de la 6-BAP y la kinetina

Todas las concentraciones de kinetina ensayadas produjeron un número de brotes por explante, número de hojas del brote principal y el coeficiente de multiplicación significativamente superior que el alcanzado por los tratamientos con 6-BAP. En los tratamientos con kinetina se alcanzó un promedio de dos brotes por cada segmento nodal establecido, lo cual evidencia que fue posible la formación de brotes secundarios que procedían de yemas axilares de los primarios. El número de hojas presentó un promedio de dos hojas por planta. Los tratamientos con kinetina también ofrecieron mejores resultados en la altura del brote principal, y difirieron significativamente de los demás tratamientos. Entre ellos se destacaron el de 2.32 y 9.2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, en los cuales las plantas alcanzaron un promedio de 1.38 cm. El comportamiento del coeficiente de multiplicación se puede observar en la Figura 2. En esta variable la kinetina en las tres concentraciones empleadas (2.32, 4.6, 9.2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), fue el regulador del crecimiento que mostró los mejores resultados, sin diferir estadísticamente entre sí, por lo que la menor concentración resulta la más recomendable desde el punto de vista económico.

Este resultado demuestra la acción positiva de la kinetina sobre la formación de vástagos en los segmentos nodales de papaya cv. Maradol Roja. Por lo que es efectiva la adición de este regulador del crecimiento de forma exógena, que pudo haber provocado un balance favorable de los reguladores del crecimiento que a su vez desencadenaron el estímulo de los procesos de división mitótica celular, elongación y diferenciación de órganos.

Sin embargo, en otras variedades de papaya como la Sunrise y la Criolla la citoquinina 6- BAP ha sido más favorable para la formación de brotes axilares en estas mismas concentraciones probadas (Reuveni *et al.*, 1990; Ortega, 1992). Esto sugiere que puede existir influencia específica de los reguladores del crecimiento sobre los efectos fisiológicos tanto dentro de las especies como de las variedades. El balance auxina-citoquinina logrado en los explantes de una variedad o cultivar determinado, está influenciado por el contenido endógeno y exógeno de auxinas y citoquininas, que posibilita que se promueva un proceso fisiológico u otro, y en este caso es determinante además, la especificidad de la actividad fisiológica por el tipo de citoquinina empleada (Jesús *et al.*, 2001).

Fase de multiplicación *in vitro*

Evaluación de la influencia de los reguladores del crecimiento

En la fase de multiplicación, cuando se empleó únicamente el GA₃ (2.88 µmol.L⁻¹ GA₃) se observó una superioridad en las variables evaluadas y calculadas, excepto para el número de brotes por explante en la que no hubo diferencias entre el empleo del GA₃ y las citoquininas por sí solas (Tabla 3).

Por otra parte, el tratamiento que contenía la combinación de las concentraciones de 2.32 µmol.L⁻¹ de kinetina y 2.88 µmol.L⁻¹ de GA₃ superó a los que contenían solamente las citoquininas (2.32 µmol.L⁻¹ de Kinetina ó 17.7 µmol.L⁻¹ de 6-BAP), el GA₃ (2.88µmol.L⁻¹ GA₃), y la combinación de 17.7µmol.L⁻¹ 6-BAP y 2.88µmol.L⁻¹ GA₃ en las variables altura del brote principal (1.44 cm), coeficiente de multiplicación (2.04) y número de brotes por explante (4.50). Sin embargo, para el número de hojas del brote principal se obtuvo el mayor valor con 2.88 µmol.L⁻¹ de GA₃ al alcanzar 8.50 hojas por planta.

En la fase de multiplicación es importante determinar los requerimientos de los reguladores del crecimiento, pues es en ésta donde se determina el número de brotes por explante finales que pasaran a las fases de enraizamiento y aclimatización y por ende la producción final del proceso de propagación masiva *in vitro*.

Los resultados de la acción combinada de la kinetina y el GA₃ pudieran asociarse con cierto sinergismo entre ellas, dado por la actividad de las citoquininas en la división celular y del GA₃ en la elongación celular, pues el crecimiento del tallo, básicamente, es el resultado de la división y elongación celulares (Talón, 1996). Su aplicación combinada con 2.32 µmol.L⁻¹ de kinetina condujo a una mayor brotación y proliferación de las plantas de papaya, características estas de gran importancia en la fase de multiplicación, donde el balance de los reguladores del crecimiento es determinante para el estímulo de un proceso u otro.

La kinetina ha sido empleada con éxito en el cultivo de tejidos de la papaya (Sancho y Guevara, 1991) en el cultivar Sunrise, quienes emplearon el medio de cultivo MS con 5.1 µmol.L⁻¹ de kinetina para la brotación de yemas laterales con 1.83 brotes por explante. No obstante, Mondal *et al.* (1990), al combinar la kinetina (9.2 µmol.L⁻¹) con 2.88 µmol.L⁻¹ de GA₃ observaron hasta 2.59 brotes por explante en la proliferación de yemas axilares de papaya cv. Honey Dew, y posteriormente recomendaron este mismo medio de cultivo para la brotación en lámina de hoja, pecíolo, brotes y raíces (Mondal *et al.*, 1994). También el empleo del GA₃ en esta fase, ha sido

beneficioso (Orellana, 1998) en los cultivos cuyo sistema de propagación se basa en la elongación de brotes y la división por entrenudos, como en la papa (*Solanum tuberosum* L.).

Sobre la base de estos resultados, la combinación de MS mod. suplementado con $2.32 \mu\text{mol.L}^{-1}$ kinetina y $2.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$ GA₃, resultó la más conveniente para la multiplicación *in vitro* de la papaya cv. Maradol Roja.

El número de brotes por explante y el número de segmentos nodales seccionables de la papaya cv. Maradol Roja mostraron cierta dependencia, la que se ajustó a una ecuación polinomial como se muestra en la Figura 3.

De acuerdo con la curva de los 100 pares de datos incorporados al análisis, cuando hay un máximo del número de brotes por explante no ocurre un incremento del número de segmentos nodales seccionables (Figura 3), debido probablemente a una mayor competencia por los nutrientes del medio de cultivo, que provoca un crecimiento heterogéneo y los segmentos nodales que no tengan el tamaño adecuado para ser seccionados e independizados del explante madre, no contribuirán al aumento del coeficiente de multiplicación.

Se pudiera pensar que con el aumento del número de brotes por explante debe incrementar también el coeficiente de multiplicación. Sin embargo, con el método de propagación por el cultivo por segmentos nodales sólo aquellos brotes que aporten explantes con 0.5 cm o más pueden ser seccionados e incluidos en el coeficiente de multiplicación, por lo que no siempre puede ser proporcional el número de brotes por explante que se obtengan y el coeficiente de multiplicación. En otros cultivos como la menta (*Mentha* sp.), puede ser posible una relación directa entre estos dos indicadores, (Barrón y Héctor, 2000), porque sus características de crecimiento permite brotes de mayor tamaño.

Efecto del número de subcultivos

Con un solo subcultivo el número de brotes por explante fue de 1.00 por explante, pero se incrementaron hasta alcanzar el máximo valor en el octavo subcultivo, con una media de 6.11 brotes por explantes. Este valor final difirió significativamente de los demás subcultivos. Posteriormente, se redujo y se mantuvo estable entre 5.05 y 5.03 en los subcultivos del 9 - 12, y continuó reduciéndose hasta 3.00 brotes por explante en el subcultivo 15.

Se observó cierta concordancia con lo señalado por Jiménez (1995) en que a medida que aumenta el número de subcultivos tiende a incrementarse el número de brotes por explante y a aumentar la formación de yemas adventicias, aunque ambas variables tienden a disminuir con un número de subcultivos muy elevado. Estas disminuciones a partir del noveno subcultivo se pudieran atribuir a

cierto agotamiento de la capacidad de la totipotencia de las células, debido al continuo subcultivo del tejido vegetal, lo que provoca una disminución de la morfogénesis *in vitro*.

El comportamiento del número de hojas del brote principal fue similar al del número de brotes por explante. La cantidad de hojas fue menor en los tres primeros subcultivos (3.11, 4.05 y 3.10), después se incrementó hasta alcanzar el máximo valor en el octavo subcultivo con 12.3 hojas, el cual difirió estadísticamente de los restantes. Los subcultivos del 9 al 12 presentaron valores similares, alrededor de 11.0 hojas, pero disminuyeron a partir del subcultivo 13 hasta el 15 con 4.04 hojas, valor que no difirió del logrado en el segundo subcultivo.

La altura del brote principal se incrementó desde los primeros subcultivos hasta el doce, que mostró el mayor valor (2.9 cm) respecto a los demás subcultivos. En los subcultivos del 7 al 11 y del 13 al 15 los valores de la altura del brote principal fueron similares con un promedio de 2.1 a 2.4 cm sin diferencias estadísticas entre ellos.

El comportamiento del número de brotes por explante y el de hojas en los subcultivos del 9 al 15, pudiera estar dado por un fenómeno de habituación de los tejidos al crecimiento en medios de cultivo que contienen citoquininas, efecto encontrado en la caña de azúcar por Evans y Bravo, (1985) y en cafeto (*Coffea arabica* L.) por Rosales (2002).

La altura del brote principal respondió a la morfogénesis *in vitro* de forma diferente con respecto a las demás variables, pues presentó un comportamiento irregular, efecto que pudiera estar relacionado con la presencia del GA₃, regulador del crecimiento que se le atribuye su efecto fisiológico sobre la elongación de las plantas en esta fase. Este efecto se ha observado también en el cultivo *in vitro* del Nogal cafetero (*Cordia alliodora*) al realizar la micropropagación por elongación de las plantas y división por segmento nodal con 1.1 μmol.L⁻¹ kinetina y 2.88 μmol.L⁻¹ de GA₃ (Marulanda *et al.*, 2000).

El coeficiente de multiplicación en los primeros subcultivos se mantuvo estable hasta el séptimo subcultivo, sin diferencias estadísticas. Luego se produjo un incremento de los valores desde 3.53 hasta 3.88 segmentos nodales seccionables a partir del subcultivo 8 hasta el 12. Los mayores valores se observaron en los subcultivos 10, 11 y 12 con 3.84 a 3.88 segmentos nodales, sin diferencias estadísticas entre ellos, pero sí con los demás subcultivos, pues en el subcultivo 13 disminuyó bruscamente a 2.16 y se mantuvo estable hasta el subcultivo quince sin diferencias entre ellos (Figura 4).

El comportamiento de todas las variables evaluadas muestra que con la edad *in vitro* y el número de subcultivos, cambia el comportamiento de los explantes. Así, Ortega (1992), en papaya cv.

Criollo, obtuvieron resultados diferentes al subcultivar en medio de cultivo líquido, al presentar una disminución considerable del coeficiente de multiplicación de 5.25 en el primer subcultivo a 2.20 en el sexto, lo que fundamenta la importancia del estudio del comportamiento *in vitro* de cada especie para establecer un protocolo de propagación.

Los resultados sugieren que en la papaya cv. Maradol Roja, el número de brotes por explante y de hojas, la altura del brote principal y el coeficiente de multiplicación, son variables que están influenciadas por el número de subcultivos y la edad *in vitro*. Esto concuerda con lo encontrado en otras especies (Rosales, 2002; Castillo *et al.*, 2002), ya sea por la adecuación del tejido a los reguladores del crecimiento en los medios de cultivo, por los requerimientos específicos de cada especie o cultivar en estudio, o ambos factores.

Fase de enraizamiento *in vitro*

Las plantas de papaya cv. Maradol Roja que se obtuvieron en la fase de multiplicación se caracterizaron por ser pequeñas y desprovistas de raíces, por lo que fue necesario realizar una primera subfase que permitiera elongarlas y posteriormente una segunda subfase para enraizarlas.

Efecto de diferentes auxinas y el estado físico del medio de cultivo en la elongación y el enraizamiento *in vitro* (subfase 1)

Al evaluar el comportamiento de las diferentes variables no se encontró interacción entre las auxinas y el estado físico del medio de cultivo (Tabla 4). En esta fase, en que se pretende lograr la elongación de las plantas debe considerarse como variable más importante su altura.

Las plantas que se encontraban en el tratamiento que contenía $9.84 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AIB presentaron los valores significativamente mayores en todas las variables, con un promedio de 3.12 raíces por planta, y una longitud de las raíces de 1.82 cm, una altura de 3.28 cm y una media de 7.01 hojas.

En cuanto al estado físico (Tabla 4), el medio de cultivo líquido fue el más efectivo en el número y longitud de las raíces, pero el semisólido fue el mejor para la altura de la planta y el número de hojas.

Por observación visual se apreció que en la formación de las raíces, estas se emitían a partir de los callos en la base del tallo de las plantas y no directamente de éste y el mayor número de callos se observó en el medio de cultivo líquido.

En la bibliografía consultada, no se encontraron evaluaciones sobre el comportamiento de la longitud de las raíces en esta especie para la fase de enraizamiento; sin embargo, en el cultivo *in vitro* del plátano Gran enano, Rodríguez (1999) plantea la importancia de lograr longitudes de las

raíces entre 1.0 y 2.0 cm, que le sirvan de soporte a las plantas en la fase posterior de aclimatización.

La evaluación del número de hojas en esta fase, no se señala con profundidad en la bibliografía consultada, aun cuando debe existir una estrecha relación con la fase subsiguiente de aclimatización, en la que el aparato estomático y sus estructuras están poco funcionales, por lo que a mayor área fotosintética posible, mayor podría ser la supervivencia.

La auxina más recomendable para lograr la elongación de las plantas en esta subfase resulta ser el AIB ($9.84 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Estos resultados también permiten interpretar que según el estado físico del medio de cultivo la iniciación radical se facilita en el medio de cultivo líquido, y para el crecimiento y formación de hojas en el estado semisólido. Este conocimiento puede ser útil en esta primera subfase para lograr incrementos en la elongación de las plantas de papaya con el empleo del medio de cultivo semisólido.

Efecto de la procedencia de las plantas y el estado físico del medio de cultivo sobre la elongación y el enraizamiento *in vitro* (subfase 2)

En la subfase 2 no se observó la formación de callos, aspecto que pudo estar determinado por eliminar la base del tallo en la subfase anterior y no añadir las auxinas al medio de cultivo, pues todo indica que el suplemento de las auxinas en el medio de cultivo provoca un desbalance en el contenido endógeno de reguladores del crecimiento en las plantas, que induce la formación de las células indiferenciadas.

El análisis estadístico de las variables evaluadas en esta subfase no detectó interacción entre los factores (Tabla 5). Sin embargo, el medio de cultivo líquido promovió la formación de un número de raíces y longitud de las raíces significativamente mayor que en el medio de cultivo semisólido, y éste último estimuló la formación de un número de hojas y altura de las plantas significativamente mayor con respecto al medio de cultivo líquido.

El paso de un medio de cultivo con reguladores del crecimiento a otro sin ellos favoreció el comportamiento de las variables evaluadas. Las plantas que procedían del tratamiento con $9.84 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AIB formaron un número de raíces de 4.05, con una longitud de las raíces de 2.41 cm, valores significativamente superiores a los de los demás tratamientos. Las plantas que provenían de esta concentración presentaron una altura significativamente superior a las restantes con una media de 2.94 cm.

Por su parte, en el número de hojas las plantas que provenían de $14.7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AIB y $17.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AIA, fueron significativamente mayores con respecto a los demás tratamientos (Tabla 5).

El mejor comportamiento del medio de cultivo líquido en el número y longitud de las raíces pudo estar asociado a una mejor absorción de los nutrientes diluidos en este medio que en el semisólido. Otro aspecto favorable en el estado líquido es que le confiere mayor difusión a los compuestos tóxicos liberados por las plantas, propios de su metabolismo (Castillo *et al.*, 2002).

Resultados similares fueron obtenidos por Drew y Miller (1989), quienes eliminaron 1-2 mm de la base del tallo de brotes de papaya Honey Dew, para estimular la iniciación de las raíces en medio de cultivo líquido libre de reguladores del crecimiento.

En la longitud de las raíces los resultados reflejan que el AIB ($9.84 \mu\text{mol.L}^{-1}$) tiene efectos fisiológicos favorables en el comportamiento de las plantas al estimular la elongación celular para la inducción del sistema radical *in vitro* en papaya, al lograr un buen balance auxina - citoquinina con la adición de este regulador del crecimiento.

De forma general, todas las plantas que provenían de la subfase 1 con auxinas mostraron raíces en el medio de cultivo líquido en la subfase 2, factor que permite una mayor fijación a las plantas en la fase de aclimatización y ofrece mayores ventajas para la iniciación del crecimiento de las raíces.

Al valorar el efecto del pase de un medio de cultivo con reguladores del crecimiento a otro sin reguladores del crecimiento, se puede apreciar que favorece la formación de raíces; este efecto positivo ha sido observado por Drew *et al.* (1991) al estimular la iniciación radical de la papaya, en un medio de cultivo suplementado con $10 \mu\text{mol}$ de AIB por tres días y posteriormente transferir las plantas a un medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento.

Es en la fase de enraizamiento donde crecen y se desarrollan el tallo y las hojas de las plantas de papaya, por lo que su vigor debe llegar a la máxima expresión, para que además de éstos, forme y desarrolle varias raíces que permitan una buena iniciación en la fase de aclimatización y por ende llevar al campo plantas vigorosas. Por lo general se plantea que en los medios de cultivo semisólidos de enraizamiento hay un crecimiento pobre de las raíces en varias especies, debido a la poca difusión de sustancias tóxicas liberadas por el tejido en crecimiento, la poca aireación y la menor absorción de nutrientes, contrariamente. Estos aspectos se favorecen en mayor medida en el estado líquido del medio de cultivo (Drew, 1998).

Sobre la base de los resultados, se puede plantear que es necesario para el enraizamiento *in vitro* de brotes de papaya cv. Maradol Roja, una subfase de elongación con $9.84 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AIB y a los 30 días realizar un corte en la base del tallo antes de transferirlos a medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento para favorecer la iniciación radical.

Respecto al estado físico del medio de cultivo es recomendable realizar la primera subfase en estado semisólido para lograr elongación y la segunda subfase en estado líquido para favorecer la formación y crecimiento de las raíces.

Aclimatización

El porcentaje de supervivencia de las plantas alcanzó entre 65 y 80 % (Figura 5). Los valores de esta variable, así como del número de hojas y raíces, la longitud de las raíces y la altura de las plantas fueron mayores cuando el sustrato contenía 30% de cachaza que con 60 %, y en éste último incluso las plantas mostraron síntomas de clorosis y necrosis en los bordes de las hojas.

Enrique (1992) en la micropropagación de la papaya NICA III y Muñoz *et al.* (1995) en *Carica papaya* L. durante la aclimatización lograron supervivencias alrededor del 80 %.

Otro factor que puede haber favorecido la supervivencia de las plantas en la aclimatización, es haber logrado plantas en la subfase 1 de elongación que pudieron alcanzar hasta 3 cm de altura, y en la subfase 2 la inducción de raíces sin la presencia de callos en la base del tallo. Ello corrobora que el manejo que se realice en las condiciones *in vitro*, puede favorecer el éxito de la micropropagación en la fase de aclimatización (Rodríguez, 2005).

La supervivencia de las plantas en la fase de aclimatización es un indicador que ha sido planteado como muy determinante en los procesos de micropropagación, por ser ésta la última fase de la propagación acelerada de las plantas. Obtener una alta tasa de supervivencia y una buena calidad de las plantas, es importante para reducir el costo de la producción (Castillo *et al.*, 2002).

Las plantas crecidas en el sustrato con 60% de cachaza presentaron una senescencia precoz expresada en clorosis y necrosis, lo que podría atribuirse a antagonismo entre algunos de los componentes químicos del sustrato. La cantidad de materia orgánica aportada (26%) por la cachaza en este sustrato supera grandemente los contenidos recomendados (12-16%) para las condiciones tropicales por Rodríguez *et al.* (2002) para sistemas de casa de cultivo con plántulas en bandeja, lo que trae consigo un incremento excesivo del contenido de nutrientes en el sustrato, factores que pudieran haber afectado el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Al respecto Coyne (2000) plantea que hay límites en cuanto al contenido de materia orgánica para mejorar la calidad y productividad del suelo. Por su parte Zerega y Adams (1998) plantearon que

es importante regular los sustratos con valores de 50 – 100 % de cachaza, al evaluar el comportamiento de plantas de trigo (*Triticum sp.*) en invernaderos con sustratos que contenían 30, 50 y 100 % de cachaza, destacando que en los dos últimos no fue posible la supervivencia de las plántulas.

También en el sustrato que contenía 60 % de cachaza, se observó una mayor retención de la humedad en el sustrato, lo que puede haber favorecido de igual forma la senescencia precoz de las plantas que se encontraban en este tratamiento, como resultado de un estrés por exceso de agua.

Durante la aclimatización no se detectaron afectaciones por patógenos en las plantas a pesar de que *Phytophthora palmivora* es uno de los hongos que puede afectar a las plantas jóvenes de papaya en el vivero (Sharma y Skidmored, 1988; Guzmán, 1998).

Las plantas que se desarrollaron en el sustrato que contenía 30 % de cachaza fueron estadísticamente superiores en todas las variables evaluadas, las cuales se trasplantaron a bolsas a los 30 días y estuvieron listas para su trasplante al campo con 3-5 hojas y de 12-15 cm de altura a los 45 días.

Alternativa de sustitución de la Kinetina por el análogo de brasinoesteroide Biobras-6 (BB-6) o el oligopectato Pectimorf

Influencia del BB-6 o el Pectimorf en la fase de establecimiento *in vitro*

Las variables evaluadas en los tratamientos con BB-6 (número de brotes por explante y hojas, altura del brote principal y coeficiente de multiplicación), no difirieron estadísticamente con respecto al control. Al no existir diferencias estadísticas entre los tratamientos, es posible seleccionar la menor dosis aplicada, en este caso el tratamiento que contiene la menor dosis de BB-6 ($0.02 \mu\text{mol.L}^{-1}$ BB-6) en sustitución total de la kinetina.

Este comportamiento pudiera estar dado por la acción biorreguladora de esta sustancia bioactiva en los procesos de división celular para la formación de órganos, al actuar por sí sola o sinérgicamente con los reguladores del crecimiento endógenos o por una posible acción estimuladora para la síntesis de éstos, al regular a su vez enzimas y proteínas, que están relacionadas con la síntesis de reguladores del crecimiento endógenos. El efecto del BB-6 en la morfogénesis *in vitro* se ha observado en otros cultivos de interés económico como el plátano (Núñez, 1996), el ajo (Izquierdo, 1996) y la caña de azúcar (Benítez, 1998), con resultados satisfactorios en la sustitución total de reguladores del crecimiento.

El efecto fisiológico del Pectimorf por sí solo y en combinación con la kinetina en las concentraciones ensayadas no difirió estadísticamente del control. Este comportamiento no implica que necesariamente los oligogalacturónidos añadidos al medio de cultivo estén asociados a los mecanismos de regulación de estos procesos, pues sus efectos todavía son muy inciertos, estando asociada más probablemente su actividad biológica a la formación de un complejo oligopectato- Ca^{2+} que provoca respuestas fisiológicas localizadas en las paredes de las células vegetales (Cabrera *et al.*, 2000).

Los resultados sugieren que en la fase de establecimiento el Pectimorf o el BB-6, pueden sustituir indistintamente a la kinetina, lo que puede traer consigo una disminución de los costos del proceso de micropropagación al evitar gastos por importación de reguladores del crecimiento tradicionales.

Influencia del BB-6 o el Pectimorf en la fase de multiplicación *in vitro*

En la Figura 6 se puede observar el comportamiento de las variables evaluadas en los subcultivos con el empleo del BB-6. En el primer y el segundo subcultivo no existieron diferencias significativas entre los tratamientos. No obstante, en el tercer subcultivo el número de hojas del brote principal y la altura difirieron significativamente entre los tratamientos, con el mayor valor para el tratamiento control ($2.32 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de kinetina y $2.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$ GA_3) en la variable altura del brote principal, y el tratamiento que sustituye totalmente la kinetina ($0.02 \mu\text{mol.L}^{-1}$ BB-6 y $2.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$ GA_3), en la variable número de hojas del brote principal.

En los subcultivos del cuarto al octavo existieron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos para las variables número de brotes por explante, número de hojas del brote principal y altura, con los mayores valores para todas las variables en el tratamiento que sustituye totalmente la kinetina ($0.02 \mu\text{mol.L}^{-1}$ BB-6 y $2.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$ GA_3).

El coeficiente de multiplicación no presentó diferencias significativas entre los tratamientos durante los ocho subcultivos.

Estos resultados son de importancia al constituir una vía alternativa de sustitución total de la kinetina por el BB-6 a la concentración probada. Es posible que el BB-6 realice un efecto estimulador para la activación de los reguladores del crecimiento endógenos, o que actúe sinérgicamente con ellos, e inclusive ambos efectos. También, la concentración de $0.02 \mu\text{mol.L}^{-1}$ BB-6 pudiera estimular la división celular e inducir un mejor comportamiento de la morfogénesis *in vitro*. Sobre los efectos fisiológicos de los brasinoesteroides Zurek y Clouse (1994), plantean que

estimulan la activación de un gen que según se ha comprobado, participa en la elongación celular; además los genes que codifican para brasinoesteroides no lo hacen para las auxinas.

Según estos resultados, es posible la sustitución total de la kinetina por la combinación del BB-6 ($0.02 \mu\text{mol. L}^{-1}$) con el GA_3 ($2.88 \mu\text{mol. L}^{-1}$) para la multiplicación *in vitro* de la papaya cv. Maradol Roja.

Las evaluaciones realizadas en la fase de multiplicación con Pectimorf (Figura 7), mostraron que no hubo diferencias significativas entre las medias de los tratamientos para todas las variables evaluadas en el primer, segundo y tercer subcultivo. No obstante, a partir del cuarto subcultivo los valores obtenidos en el número de hojas del brote principal fueron significativamente mayores en los tratamientos con $2.32 \mu\text{mol.L}^{-1}$ kinetina + $2.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$ GA y $0.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Pectimorf y $2.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$ GA_3 y $1.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ kinetina hasta el séptimo subcultivo, para luego no existir diferencias significativas entre los tratamientos en el octavo subcultivo.

En la altura del brote principal para el cuarto y quinto subcultivo el tratamiento con $2.32 \mu\text{mol.L}^{-1}$ kinetina + $2.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$ GA_3 alcanzó un valor significativamente mayor con respecto a los demás tratamientos, para luego no diferir del tratamiento con $0.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Pectimorf y $2.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$ GA_3 y $1.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ kinetina en el sexto y séptimo subcultivos. Sin embargo, la mayor altura del brote principal se alcanzó en el octavo subcultivo en el tratamiento con $0.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Pectimorf y $2.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$ GA_3 .

Los valores alcanzados en el número de brotes por explante y coeficiente de multiplicación no difirieron estadísticamente entre los tratamientos. Estos resultados son muy favorables en la fase de multiplicación, pues sobre la actividad biológica de estos reguladores se plantea que son capaces de incrementar la actividad enzimática, la síntesis de proteínas, de ADN y ARN a bajas concentraciones (Rodríguez, 1999).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, es posible la sustitución de la kinetina por la combinación del Pectimorf ($0.4 \mu\text{mol. L}^{-1}$) con el GA_3 ($2.88 \mu\text{mol. L}^{-1}$) en la fase de multiplicación *in vitro* de las plantas de papaya cv. Maradol Roja.

Validación

Evaluación de la estabilidad genética de las plantas de papaya cv. Maradol Roja

Empleo de los descriptores morfológicos para el estudio de la estabilidad genética de las plantas de papaya cv. Maradol Roja

En el análisis de componentes principales que se realizó con los datos de las evaluaciones de las plantas control y micropropagadas en el agroecosistema de San José de Las Lajas las tres primeras permitieron extraer solamente el 51.76 % de la variabilidad total presente en la población estudiada, con las variables rendimiento por planta y número de frutos como las de mayor contribución a esta variabilidad en la componente I (23.6 %); los frutos de flores femeninas y las flores femeninas (F) en la segunda componente (18.3 %) y el diámetro del tallo en la componente III (9.7 %).

Esta baja variabilidad detectada se corroboró en la representación gráfica del análisis de componentes principales efectuado con las componentes I y II (Figura 8), por ser las de mayor porcentaje de varianza, la cual se caracterizó de forma general, por la ubicación alrededor del centro de los individuos evaluados, resultado indicativo de que los individuos micropropagados evaluados no mostraron diferencias cualitativamente importantes con respecto al control.

En el análisis de componentes principales con los datos del agroecosistema de Guanabacoa, las tres primeras componentes permitieron extraer solamente el 58.18% de la variabilidad total presente. La mayor contribución a la variabilidad en la primera componente (26.8 %) la realizaron las variables rendimiento por planta, inicio de la fructificación, inicio de la floración y masa de los frutos (kg); mientras que en la segunda componente (22.05 %), la mayor contribución correspondió a las variables: flores femeninas (F), flores hermafroditas *elongatas* (HE) y frutos de flores femeninas.

Al igual que en el agroecosistema de San José de Las Lajas no se observó la formación de grupos en la representación gráfica del análisis con las componentes I y II (Figura 9), con la tendencia similar de ubicación de los individuos alrededor del centro del gráfico, aspecto indicativo de la ausencia de diferencias cualitativamente importantes de los clones obtenidos por micropropagación con respecto al control.

El análisis de agrupamiento con las variables de mayor peso, resultante del análisis de componentes principales realizado anteriormente, en ambos agroecosistemas presentó la formación de un solo grupo, según las medias de los valores de la matriz de similitud (Tablas 6 y 7) en el cual se observó una alta estabilidad en el análisis de remuestreo (100%).

Los resultados de ambos tipos de análisis multivariados en los dos agroecosistemas estudiados permitieron comprobar la alta similitud existente entre los individuos de plantas micropropagadas y los clones controles. Lo cual pudo estar asociado con el método de propagación empleado, a partir de yemas axilares existentes en cada segmento nodal, pues se plantea que este método posibilita la mayor estabilidad genética en las plantas producidas (Orellana, 1998).

Varios autores coinciden en plantear que el empleo de los análisis multivariados resulta muy exitoso para la estimación de variabilidad o estabilidad genética en plantas (Baró y Alemany, 2000; Terrádez, 2002).

Empleo del marcador genético AFLP para el estudio de la estabilidad genética de plantas de papaya cv. Maradol Roja

La comprobación por electroforesis del ADN tuvo una resolución adecuada para su uso en los AFLPs. El empleo de ésta técnica permitió la comparación de los patrones de corrida de las 30 muestras evaluadas. Al observar las tres combinaciones de cebadores utilizadas {TaqI / AseI (ACA/ATG, AGA/ACG, AAC/AGC)} se puede constatar la presencia de aproximadamente 20 bandas en los perfiles de corrida por cada muestra, para un total de aproximadamente 600 bandas en las tres amplificaciones realizadas (Figuras 10, 11 y 12).

En los patrones de bandas obtenidos, todas las bandas están presentes en cada una de las réplicas examinadas del control y de los subcultivos 3 y 12, lo cual indica que dentro de los límites de resolución de la técnica los perfiles amplificados de los subcultivos 3 y 12 son similares a los de las plantas propagadas por semilla gámica. Este resultado, reafirma la alta uniformidad clonal existente entre los individuos obtenidos de los subcultivos y su donante; todo indica que hasta el subcultivo 12 las plantas micropropagadas muestran una alta estabilidad genética, lo que se corresponde con la uniformidad de agrupamiento obtenida a través de los análisis multivariados.

En la papaya los marcadores genéticos más empleados han sido el RAPD (Magdalita *et al.*, 1997; Macedo *et al.*, 2002) y la PCR (Davis *et al.*, 1998).

En la metodología propuesta se realizó la micropropagación por el cultivo de segmentos nodales, el cual se asocia generalmente con resistencia a los cambios genéticos que pueden ocurrir durante la división celular, por lo que el valor de la metodología está determinado por este aspecto, al garantizar la ausencia de variación genética del material micropropagado y por ende mantener la identidad genética del cultivar Maradol Rojo.

Varias estrategias se han utilizado para determinar la estabilidad genética de los clones *in vitro* y se ha encontrado que la técnica de Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) es muy sensible para la detección de variaciones entre individuos y entre especies; los marcadores AFLP han sido usados satisfactoriamente para evaluar la estabilidad genética en otros cultivos, como la papa (Vargas *et al.*, 2002) y el henequén (González, 2001); de aquí se deriva la importancia de la aplicación de este marcador en el estudio realizado. En la revisión bibliográfica realizada no se encontraron referencias sobre el estudio de la estabilidad genética de la papaya

con el empleo de AFLP, lo que sugiere la realización de estudios posteriores que amplíen estos conocimientos.

Validación del comportamiento de las plantas en condiciones de producción

De los caracteres evaluados en las plantas provenientes de los subcultivos 3 y 12 y el control en el campo para los dos agroecosistemas (Tablas 8 y 9), sólo se observaron diferencias significativas en la altura de las plantas para el agroecosistema de Guanabacoa, con un valor significativamente mayor en las plantas del subcultivo 3 con respecto a las del 12, pero ambas no difieren con respecto a la altura alcanzada por las plantas control (Tabla 8).

En las variables altura de los primeros frutos, masa de los frutos, rendimientos por planta y por hectárea en ambos agroecosistemas existieron valores significativamente mejores en las plantas micropropagadas con respecto a las del control.

La mayor altura en las plantas del subcultivo 3 (150.2 cm) con respecto al 12 (147.7 cm) en el agroecosistema de Guanabacoa pudiera estar asociada con cierta inestabilidad del material donante en los primeros pasos de la micropropagación que posteriormente se recupera, al no variar en ambos casos con respecto a las plantas control.

Los resultados de los caracteres de las plantas coinciden con los que aparecen en el descriptor para la papaya (IBPGR, 1988), y con las características descritas para el cultivar Maradol Roja por Rodríguez y Santo (1967), Mederos (1988) y Peña *et al.* (1996).

En otras especies, al realizar varios ciclos de propagación pueden aparecer cambios genéticos, como es el caso del cultivo de la fresa (*Fragaria sp.*) donde un número excesivo de subcultivos trae consigo serios desórdenes en las plantas transferidas al campo, tales como ausencia de raíces o pobre rizogénesis, número excesivo de flores, deformación o tamaño pequeño de los frutos y plantas heterogéneas (Pérez, 1998).

A partir de estos resultados se evidenció que existieron dos formas de árboles, el femenino o forma I y el hermafrodita o tipo IV con un 59 – 69 % de árboles de este último y un 68 – 86 % de frutos provenientes de flores hermafroditas *elongatas* a los 12 meses para los dos agroecosistemas. Es importante destacar la no presencia de la forma VI o masculino, rasgo característico de este cultivar (Rodríguez y Santo, 1967).

Otra de las ventajas que trae consigo la obtención de plántulas a partir del cultivo de tejidos, es el rejuvenecimiento que se produce en el tejido al ser separado de la planta madre (Pérez, 1998). En otras especies como el jengibre (*Zingiber officinale* R.) Freitez *et al.* (2000) observaron un comportamiento similar al comparar plantas provenientes de material *in vitro* e *in vivo*, con los

mejores valores en todos los indicadores evaluados para las plántulas provenientes del cultivo *in vitro*.

En nuestras condiciones en ambos agroecosistemas las condiciones climáticas fueron favorables con valores de las precipitaciones de hasta 300 y 400 mm para el mes de septiembre, siendo este el más lluvioso; las temperaturas tuvieron valores promedios entre 20 a 25°C (Anexos 5 y 6).

En los resultados de las evaluaciones fitosanitarias las plantas provenientes del cultivo *in vitro* presentaron porcentajes de incidencia de plagas significativamente menores con respecto al control para los dos agroecosistemas. Este resultado pudiera estar relacionado con las ventajas que brinda el cultivo de tejidos vegetales al lograr plantas con mayor vigor y sanidad para soportar en gran medida la incidencia de plagas que causan daños económicos al cultivo de la papaya. La disminución de la incidencia de estas plagas es un aspecto significativo que repercute en un mayor tiempo de vida y producción de las plantas en el campo, característica que se vio favorecida en las plantas que se logran por la metodología de micropropagación aquí propuesta y por tanto representan una vía de obtención de semilla certificada que permite incrementos de los rendimientos y beneficios económicos

En este sentido es importante resaltar que la plantación de los cultivos en las propias áreas de los productores constituye un método que garantiza la introducción de tecnologías por parte de los productores y a su vez un intercambio de conocimientos entre éstos y los especialistas, viendo al productor como un sujeto y no un objeto. Kolmans y Vásquez (1999) y Peña (2002), expresaron de manera general que se hace necesario trabajar no para los productores sino con los productores, si se quiere realmente alcanzar éxito y contribuir al desarrollo agrario de la región.

Valorando los resultados del estudio de la estabilidad genética con el análisis multivariado y los AFLP, en las variables fenotípicas, agroproductivas y fitosanitarias, es posible realizar la propagación *in vitro* del cv. Maradol Roja por segmentos nodales de plantas jóvenes, para obtener gran cantidad de posturas en períodos cortos de tiempo, estables genéticamente, con gran vigor, buen estado fitosanitario y con características fenotípicas acorde al cultivar.

Con los resultados de las evaluaciones en los dos agroecosistemas, la aceptación de las plantas por los productores y la evaluación de la estabilidad genética se plantea la siguiente propuesta metodológica para la propagación *in vitro* de la papaya cv. Maradol Roja (Figura 13).

Valoración económica

Fueron elaboradas las fichas de costo para la producción de un millar de plantas en frascos y en bolsas y la valoración del posible ahorro con la sustitución de la kinetina por el BB-6 o Pectimorf

para la producción de un millón de plantas, se observó que la variante que sustituye totalmente la kinetina por el BB-6 ($0.02 \mu\text{mol.L}^{-1}$), es la que mayor ahorro aporta al proceso con 65.2 CUC, seguida por la que sustituye la mitad de la kinetina por el BB-6 ($0.02 \mu\text{mol. L}^{-1}$) con 31.1 CUC y finalmente la sustitución total por el Pectimorf con 7.0 CUC.

CONCLUSIONES

1. Se estableció una metodología para la propagación *in vitro* por segmentos nodales de la papaya cv. Maradol Roja a partir de plantas de dos meses de edad, que abarcó desde el establecimiento *in vitro* hasta la aclimatización con un 80% de supervivencia.
2. El empleo de las sustancias bioactivas BB-6 ($0.02 \mu\text{mol.L}^{-1}$) o el Pectimorf ($0.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$), en las fases de establecimiento y multiplicación *in vitro* hasta el octavo subcultivo de la papaya cv. Maradol Roja, sustituye totalmente la kinetina como regulador del crecimiento.
3. Los descriptores morfológicos y el análisis multivariado en las variables evaluadas en los dos agroecosistemas estudiados, permitieron comprobar la alta similitud existente entre los individuos de plantas propagadas *in vitro* y los clones controles.
4. La similitud entre los patrones de las plantas donantes y las plantas obtenidas por cultivo *in vitro*, se demostró mediante el uso de AFLP con las combinaciones de cebadores empleadas.
5. Las plantas de papaya cv. Maradol Roja obtenidas por cultivo *in vitro* en condiciones de campo presentaron características agrobiológicas similares a las plantas control, con un incremento de los rendimientos de hasta 9.0 t.ha^{-1} por encima del obtenido por la vía tradicional.

RECOMENDACIONES

1. Emplear la metodología desarrollada para la obtención de posturas de papaya cv. Maradol Roja en las provincias necesitadas.
2. Utilizar el BB-6 ($0.02 \mu\text{mol.L}^{-1}$) o el Pectimorf ($0.4 \mu\text{mol.L}^{-1}$) como sustitutos de la kinetina en las fases de establecimiento y multiplicación hasta el octavo subcultivo, y continuar el estudio en otras fases de la micropropagación.
3. Aplicar el marcador genético AFLP en la papaya cv. Maradol Roja en estudios posteriores.
4. Realizar estudios similares en otras variedades de papaya de interés como la Maradol Amarilla.