



FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTANDARIZACION DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACION
DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN
TEMPORAL DE VASOS GEMELOS (BIT)

AUTORA

RUTH ELENA GOMEZ CARRERA

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE
PAPAYA (*Carica papaya L.*) EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL DE
VASOS GEMELOS (BIT)

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Tutor científico

MS. José Alcides Flores Cedeño

Profesor guía

M.Sc. Fernando Xavier Rivas Romero

Autora

Ruth Elena Gómez Carrera

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo, **ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE PAPAYA (*Carica papaya L.*) EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL DE VASOS GEMELOS (BIT)**, a través de reuniones periódicas con la estudiante **RUTH ELENA GÓMEZ CARRERA**, en el semestre **2018-1**, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Fernando Xavier Rivas Romero

Master Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

CC: 171809270-7

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, **ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE PAPAYA (*Carica papaya L.*) EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL DE VASOS GEMELOS (BIT)**, de **RUTH ELENA GÓMEZ CARRERA**, en el semestre **2018-1**, dando el cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María Isabel Ballesteros

Doctora en Biología con mención en Genética

CC: 1757168610

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente a la estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

José Alcides Flores Cedeño
Magister en Biotecnología Agrícola
CC:0913748323

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro (amos) que este trabajo es original, de mi (nuestra) autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Ruth Elena Gómez Carrera

CC: 1721113833

AGRADECIMIENTOS

Dra. Daynet Sosa, Directora del CIBE. Al MS. José Flores y su equipo de trabajo, Ing. José García, Joffre Mendoza y Fernando Piña, por su apoyo y enseñanzas durante este proceso.

M.Sc. Fernando Rivas y a la PhD. María Isabel Ballesteros por las correcciones pertinentes en el trabajo escrito.

DEDICATORIA

A mi familia y amigos, por su amor incondicional, por ser mí fuerza para culminar esta etapa de mi vida.

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, quienes facilitaron el desarrollo de la tesis.

RESUMEN

La producción de papaya se ve afectada debido a la variabilidad sexual en la semilla. Los métodos de propagación convencional implican el mantenimiento de grandes plantaciones de terreno para abastecer la demanda del consumidor. Una alternativa es la micropropagación en el biorreactor de inmersión temporal de vasos gemelos (BIT). La finalidad del presente trabajo es el establecimiento de una metodología de desinfección para la introducción de yemas axilares y la evaluación del tiempo de inmersión y la densidad del inóculo en el BIT para obtener una mayor tasa de multiplicación. La desinfección del material vegetal se realizó con etanol al 70% por 1 minuto, hipoclorito de sodio al 2% por 5, 6 y 8 min, y lavados con agua destilada estéril. Para la introducción se utilizó el medio Murashige & Skoog con 1 mg.L^{-1} de ácido giberélico y 2 mg.L^{-1} de kinetina; de la misma manera para la multiplicación suplementado con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de benzil adenina, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido indolacético y $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido giberélico; durante 21 días se evaluó la tasa de multiplicación, número de hojas, altura y diámetro del tallo. Se trasladó el material vegetal al BIT para evaluar el tiempo de inmersión (1 y 2 min) y densidad del inóculo (4 y 8) en 200 ml de medio líquido de multiplicación, con una frecuencia de inmersión de 6 h, fotoperíodo de 12 h de iluminación por día y 28°C . En la desinfección con hipoclorito de sodio al 2% por 6 y 8 min se logró el 100% de supervivencia sin oxidación. En la etapa de introducción se obtuvo el 96,4% de supervivencia; de igual manera en la etapa de multiplicación en medio semi-sólido (83,33%), con un número de hojas 1.88 ± 0.02 , altura $1.12 \pm 0.04 \text{ cm}$, diámetro de $0.43 \pm 0.01 \text{ cm}$ y una tasa de multiplicación de 1.20 ± 0.02 . En el BIT, en un tiempo de 2 min de inmersión cada 6 h con una densidad de inóculo de 8, se obtuvo un número de hojas 6.03 ± 0.04 , altura $1.65 \pm 0.10 \text{ cm}$, diámetro 0.73 ± 0.02 y una tasa de multiplicación de 5.05 ± 0.06 . Este trabajo además de generar un aporte académico, podría contribuir al fortalecimiento del sector productivo, ofreciéndoles plántulas con el sexo conveniente (hermafrodita), con alta calidad genética y fitosanitaria.

ABSTRACT

Papaya production is affected due to sexual variability in the seed. The methods of conventional propagation involve the maintenance of large land plantations to supply the consumer's demand. An alternative is the micropropagation in the bioreactor of temporary immersion of twin vessels (BIT). The purpose of this work is the establishment of a disinfection methodology for the introduction of axillary buds and the evaluation of immersion time and inoculum density in the BIT to obtain a higher multiplication rate. Disinfection of the plant material was carried out with 70% ethanol for 1 minute, 2% sodium hypochlorite for 5, 6 and 8 min, and washed with sterile distilled water. For the introduction, Murashige & Skoog medium was used with 1 mg.L⁻¹ of gibberellic acid and 2 mg.L⁻¹ of kinetin; in the same way for multiplication supplemented with 0.5 mg.L⁻¹ of benzyl adenine, 0.5 mg.L⁻¹ of indoleacetic acid and 0.3 mg.L⁻¹ of gibberellic acid; for 21 days the multiplication rate, number of leaves, height and diameter of the stem was evaluated. The plant material was transferred to the BIT to evaluate the immersion time (1 and 2 min) and density of the inoculum (4 and 8) in 200 ml of liquid multiplication medium, with an immersion frequency of 6 h, photoperiod of 12 h of lighting per day and 28°C. In the disinfection with 2% sodium hypochlorite for 6 and 8 min, 100% survival without oxidation was achieved. In the introduction stage, 96.4% survival was obtained; similarly in the stage of multiplication in semi-solid medium (83.33%), with a number of leaves 1.88 ± 0.02 , height 1.12 ± 0.04 cm, diameter of 0.43 ± 0.01 cm and a multiplication rate of 1.20 ± 0.02 . In the BIT, in a time of 2 min of immersion every 6 h with an inoculum density of 8, a number of leaves was obtained 6.03 ± 0.04 , height 1.65 ± 0.10 cm, diameter 0.73 ± 0.02 and a multiplication rate of 5.05 ± 0.06 . This work in addition to generating an academic contribution, could contribute to the strengthening of the productive sector, offering them seedlings with the suitable sex (hermaphrodite), with high genetic and phytosanitary quality.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema	3
1.3. Justificación.....	4
1.4. Objetivos	5
1.4.1. Objetivo General.....	5
1.4.2. Objetivos Específicos	5
2. Capítulo II. Marco Teórico	5
2.1. Descripción botánica	5
2.2. Origen y distribución	16
2.3. Taxonomía	17
2.4. Importancia comercial.....	17
2.5. Métodos de propagación	20
2.5.1. Micropropagación tradicional.....	22
2.5.2. Biorreactores de Inmersión Temporal.....	25
3. Capítulo III. Diseño del Plan Experimental	38
3.1. Tratamientos.....	38
3.2. Unidad experimental.....	39
3.3. Diagrama de flujo del proceso	40
4. Capítulo IV. Materiales y Métodos	40

4.1.	Población y Muestra	40
4.2.	Materiales y Métodos para la obtención de datos	40
4.2.1.	Material vegetal	41
4.2.2.	Desinfección e Introducción del Material Vegetal	42
4.2.3.	Micropropagación Tradicional vs BIT	44
4.3.	Análisis estadístico	46
5.	Capítulo V. Resultados y Discusión	46
5.1.	Desinfección del material vegetal	46
5.2.	Introducción del material vegetal	49
5.3.	Micropropagación Tradicional.....	50
5.4.	Micropropagación en BIT	53
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
6.1.	Conclusiones	62
6.2.	Recomendaciones	62
	REFERENCIAS.....	64
	ANEXOS	75

1. Capítulo I. Introducción

1.1. Antecedentes

La papaya (*Carica papaya L*) conocida como lechosa es una fruta dulce que se cultiva en zonas cálidas. Posee nutrientes como la vitamina A, C, B1, B2 y B3; y minerales como Na, Ca, K, P y Fe. Su origen exacto se desconoce, pero varios autores han reportado que sus cultivos se encuentran desde el sur de México, América Central y hasta el sur de Brasil. La papaya es una planta arborescente que pertenece a la familia Caricaceae, la misma que está formada por cinco géneros, siendo el mayor de estos *Carica* con 21 (Cruz & Portal, 2010). Gracias a su alto valor nutritivo tiene una gran aceptación, no solamente en el Ecuador sino en el resto del mundo (Alonso, Ramos, & Torne, 2006).

La producción de este cultivo es el resultado del esfuerzo de los agricultores por incrementar el área de cultivo. A nivel mundial los principales países que lideran la cadena de exportación son México (33,67%), Brasil (18,20%), Estados Unidos (8,96%) y otros como Guatemala, Países Bajos y Malasia (FAOSTAT, 2012). El mercado de consumidores de esta fruta crece de manera constante especialmente en países Europeos y Canadá, así como en Estados Unidos donde el cultivo de papaya variedad “Maradol” representa el 75% de consumo de esta fruta (Ferraguetti, 2003).

En el Ecuador la producción de esta fruta cada día cobra importancia económica. Debido a sus características organolépticas, la papaya ecuatoriana se ha abierto al mercado de exportación desde el año 2002, específicamente la variedad “hawaiana” (Macías, 2010). La producción de papaya se centra actualmente en las provincias de Santo Domingo, Santa Elena y Los Ríos. En estos sectores, se produce durante todo el año; las variedades que se cultivan son Maradol, Tainung y Hawaiana. Un estimado de 400 hectáreas son destinadas para su producción,

las mismas que aumentan por la demanda de los consumidores (ProEcuador, 2015)

La manera típica de propagación de esta fruta ha sido la reproducción sexual o por semilla, donde se seleccionan plantas femeninas o hermafroditas para la obtención de esta fruta. Sin embargo, el 25% de estas plantas pierde su hermafroditismo afectando a la producción del cultivo (Talavera, Espadas, Fuentes, & Santamaría, 2009). Otra forma de producción es la propagación vegetativa por medio de injertos o estacas, donde se cortan y se seleccionan ramas laterales (60-90 cm), manteniendo intacto el primordio foliar (Linneo, 1753). Adicionalmente se aplican fungicidas para evitar el crecimiento de hongos; se añaden soluciones que regulan el crecimiento vegetativo, y finalmente se siembran bajo condiciones controladas de luminosidad y humedad (Fec, 2002).

Aunque son los métodos más comunes de propagación no proporcionan beneficios a corto plazo, pues su crecimiento es lento, se degeneran en el tiempo y no mantienen las características favorables para su comercialización (Guzmán, 1998). Las nuevas tecnologías han permitido obtener plántulas con características favorables para su exportación y consumo, utilizando herramientas biotecnológicas como la multiplicación *in vitro*, bajo condiciones controladas de laboratorio (Aular & Casares, 2011). Se han realizado estudios de clonación de plantas a partir de yemas apicales o axilares, con la finalidad de producir plantas con características deseables y libres de patógenos (Mora, 1998). Un estudio reportó que las plantas obtenidas de la micropropagación tradicional conservan su hermafroditismo (100%), obteniendo frutos ideales para su comercialización (Talavera, Espadas, Fuentes, & Santamaría, 2009)

La propagación *in vitro* posee varias vías de regeneración de plantas, ya sea por brotes adventicios preexistentes, yemas de *novo* y embriogénesis somática (Roca,

Arias, & Chávez, 1991). Esta metodología biotecnológica es ampliamente utilizada para el mejoramiento de cultivos, obteniendo una descendencia uniforme en el tiempo a partir de la selección de un genotipo. Todos estos logros son posibles gracias al aprovechamiento de las propiedades de las células, como la totipotencia (Levitus, Echenique, Rubinsteins, Hopp, & Mroginski, 2010).

1.2. Planteamiento del problema

La producción de papaya se ve afectada por varios factores, entre los cuales el principal de es su sexualidad, pues *Carica papaya L.* presenta tres tipos de variantes sexuales: macho, hembra y hermafrodita. De estos tipos, solo la última tiene un alto valor a nivel comercial porque sus frutos apiñados alcanza un tamaño aproximadamente 50 cm de largo conteniendo hasta 400 semillas en su cavidad (Aspeitia, Torres, Mendoza, & Reyes, 2014). El tipo de sexualidad de la papaya no puede ser determinado sino hasta la etapa de floración; y además, esta variabilidad sexual se debe las condiciones ambientales, ecológicas, entre otras variables (Linneo, 1753).

Una de las técnicas biotecnológicas más usadas es la micropropagación *in vitro*, la misma que utiliza un área de trabajo amplia para el crecimiento de las plantas cultivadas bajo condiciones de laboratorio. Además, es necesario el mantenimiento periódico del material vegetal, para lo cual se requiere un equipo de técnicos que realizan esta actividad (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2002). De manera general, en esta multiplicación se utilizan medios semisólidos lo cual dificulta la difusión de nutrientes desde el medio de cultivo hacia el explante vegetal (Capote, et al., 2009). La manipulación del material representa el 60% de los costos de producción debido a la mano de obra (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2002).

Algunas plantas que se obtienen de manera tradicional han sido reportadas como pérdidas durante la etapa de aclimatación. Esto se debe a que el intercambio de gases en el ambiente artificial al cual está sometido el material vegetal no es el adecuado para la supervivencia durante esta etapa (Capote, et al., 2009).

1.3. Justificación

La producción de *Carica papaya L.* variedad Maradol en el Ecuador ocupa grandes extensiones de terreno y la inversión es alta. Por tal razón la micropropagación de explantes vegetales en un sistema de inmersión temporal de vasos gemelos (BIT), puede ser una alternativa para obtener plantas de alta calidad, contribuyendo a la sustentabilidad y al incremento de su producción.

El sistema de inmersión temporal es una alternativa de la micropropagación tradicional, para obtener plantas con buenas características. Los investigadores han creado variantes de estos sistemas que emplean dos frascos gemelos que difieren del conocido sistema RITA. Esta alternativa rentable permite la disminución de los costos de producción y mano de obra, gracias a la semi-automatización de este proceso. Además, el material vegetal toma fácilmente los nutrientes presentes en un medio líquido, a diferencia de los medios semisólidos. Las condiciones de operación pueden ser controladas, garantizando un intercambio de gases adecuado entre el material vegetal y su ambiente. Por otro lado, se puede renovar fácilmente el medio de cultivo reduciendo el tiempo de transferencia de los explantes (Brasali, et al., 2012).

Esta alternativa de micropropagación ha sido empleada para obtener plantas de interés comercial, tales como uva, banano, piña, cítricos, entre otros. Los estudios reportan altas tasas de multiplicación en medios líquidos, generando plantas con características favorables para el mercado. Utilizando el BIT para la multiplicación

y germinación de embriones somáticos de papaya se obtuvieron altos coeficientes de multiplicación y porcentaje de germinación (Berthouly & Etienne, 2005)

Finalmente, el sistema de inmersión temporal de vasos gemelos (BIT), es una alternativa rentable para la micropropagación de plantas de interés comercial, como es la papaya ecuatoriana. Se utilizarán metodologías adecuadas para la desinfección, introducción y multiplicación; evaluando dos factores que determinan la eficiencia de esta técnica biotecnológica como son el tiempo de inmersión y el número de explantes vegetales.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Estandarizar una metodología para la micropropagación *in vitro* de papaya utilizando un Sistema de Inmersión Temporal de Vasos Gemelos (BIT).

1.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar una metodología de desinfección para la introducción *in vitro* de yemas axilares de *Carica papaya* variedad Maradol.
- Evaluar los parámetros como el tiempo de inmersión y el número de explantes del cultivar utilizados en BIT para obtener mayor tasa de multiplicación *in vitro*.

2. Capítulo II. Marco Teórico

2.1. Descripción botánica

Carica papaya L. es una planta dicotiledónea, arborescente, inerme, laticífera y erguida, de crecimiento rápido y de vida corta (Posada, 2005). El tiempo de duración en campo es entre 7 y 15 años; desde el punto de vista comercial son máximo 3 años, esto debido a que se dificulta la etapa de recolección del fruto, su producción disminuye y se hace poco rentable el mantenimiento del cultivo (Lobo, 1995).

Alcanza una altura que va desde 2 hasta 10 m, con un diámetro de 6 a 30 m. Esta planta herbácea posee una copa abierta y redonda, con hojas grandes y pecíolo de 0.7 a 1 m, con una lámina palmeada formada de 7 a 9 lóbulos, que a su vez se compone de pequeños lóbulos gruesos y carnosos. El tronco es cilíndrico, erguido y hueco, con excepción en los nudos. Su crecimiento es modopódico en la etapa joven y cuando madura se ramifica. La corteza de esta planta arborescente es lisa de color verde grisáceo, con manchas oscuras y látex lechoso (Fonnegra & Jiménez, 2007), esta descripción botánica se puede observar en la Figura 1.



Figura 1. Árbol de papaya.

Tomado de (Koehler, 1897).

La planta de papaya tiene flores actinomorfas, pentámeras y gamopétalas. Son de 3 tipos: hembras, machos y/o hermafroditas. Posee un cáliz tubular de color verde (8-10 mm) y una corona (10 a 20 mm de largo) de color amarilla pálida. Las flores femeninas son superiores en tamaño a las masculinas (2 pulgadas de largo); pueden encontrarse solitarias o en grupos de 5 a 6. Tienen un cáliz corto, con 3 a 5 sépalos; sus pétalos son de color blanco o amarillo pálido sin estambres. El pistilo está formado por 1 ovario liso en forma de elipse, el cual facilita la polinización. Además, está constituido por 5 carpelos unidos y por un estigma

grande y recortado (Font, 1965). En la Figura 2 se puede observar la estructura de la flor femenina y sus partes internas.

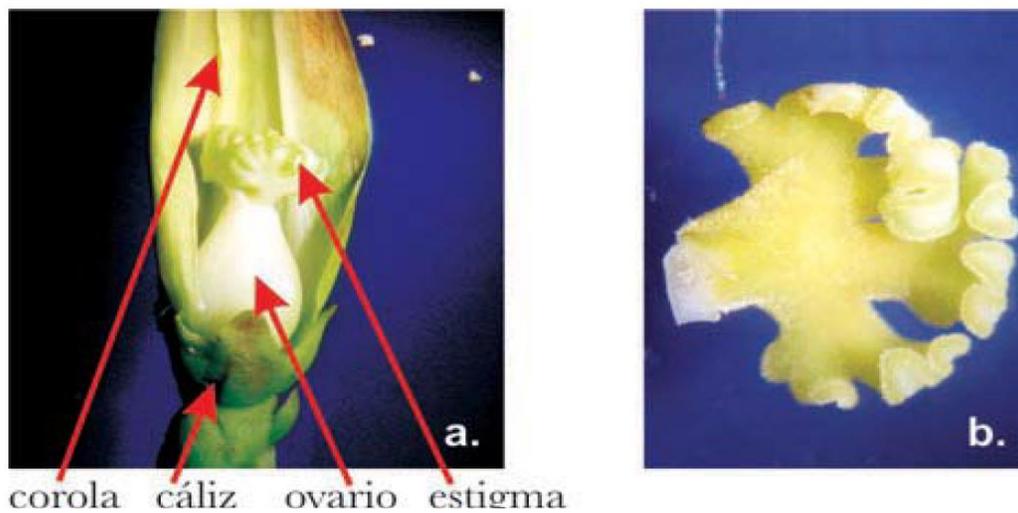


Figura 2. Estructura de la flor femenina.

Tomado de (Gil & Miranda, 2005).

- a) Partes de la flor femenina: corola, cáliz, ovario y estigma
- b) Estigma de *Carica papaya* L.

Las flores masculinas de color amarillo pálido, tienen una corola tubular y estrecha, con 10 estambres. Miden entre 1 a 11 pulgadas de largo y se encuentran en forma de racimos (15 a 20 flores). En la Figura 3a se observa su estructura delgada y larga, con un pistilo rudimentario y 5 pétalos. Además, al realizar un corte transversal se puede observar al gineceo, al haz vascular dorsal, 5 carpelos, y una amplia cavidad central que contiene las semillas (figura 3b) (Gil & Miranda, 2005).

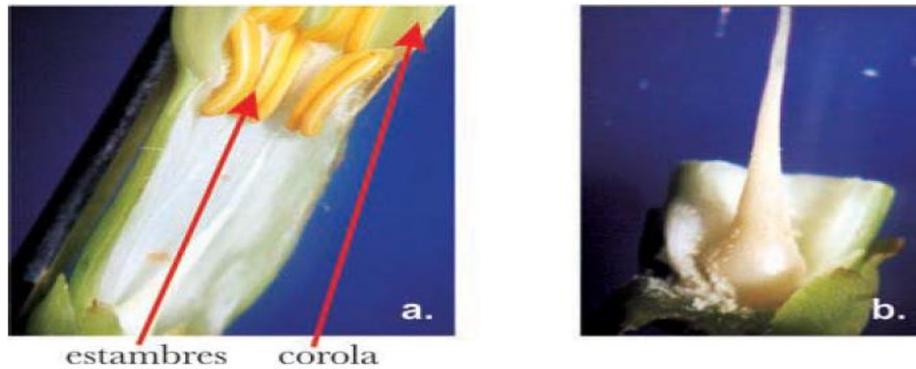


Figura 3. Estructura de la flor masculina.

Tomado de (Gil & Miranda, 2005).

a) Flor estaminada: estambres y corola

b) Pistilo rudimentario.

En la Figura 4a se puede observar la estructura del gineceo, como el haz vascular y la cavidad central. De la misma manera se puede observar estas estructuras junto con el carpelo al realizar un corte transversal (Figura 4b).

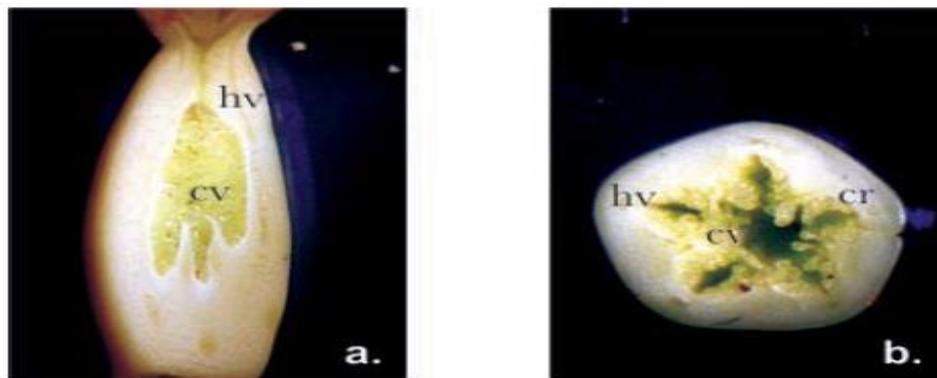


Figura 4. Estructura del gineceo.

Tomado de (Gil & Miranda, 2005).

a) Corte longitudinal: haz vascular (hv) y carpelo (cr).

b) Corte transversal. haz vascular (hv), carpelo (cr) y cavidad central (cv).

Las flores hermafroditas tienen 10 estambres ubicados al final de la corola. Los 5 primeros estambres son opuestos a los pétalos y los otros salen desde su borde. En la Figura 5 se observa a detalle la morfología de la flor hermafrodita con sus distintas partes (Gil & Miranda, 2005).

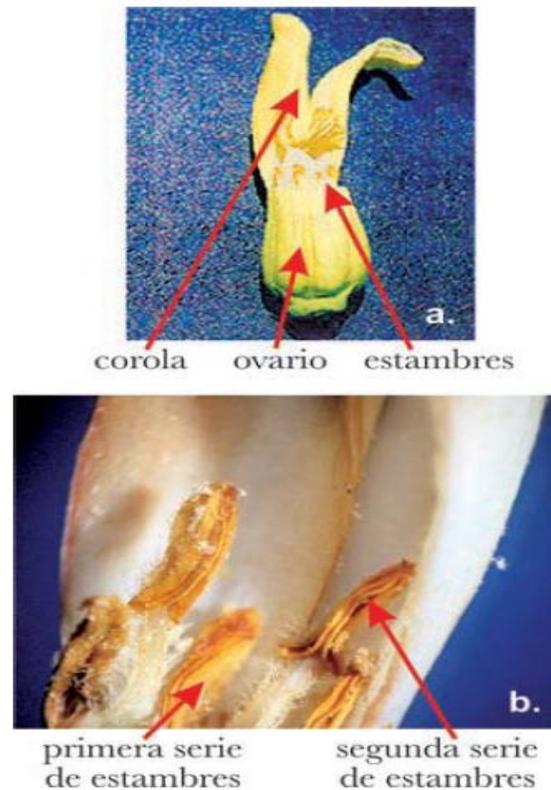


Figura 5. Estructura de la flor hermafrodita

Tomado de (Gil & Miranda, 2005).

- a) Partes de la flor hermafrodita: corola, ovario y estambres.
- b) Detalle de la disposición de los estambres.

Las flores hermafroditas de la planta de papaya pueden ser de 3 tipos: “pentandrias”, “elongatas” o “irregulares”. Las primeras son parecidas a las flores femeninas, la única diferencia se puede observar al separar los pétalos, en donde se aprecian 5 estambres fértiles, 5 lóbulos en el ovario correspondientes a los 5

pistilos; y sus frutos son lobulados y redondos. El segundo tipo de flor se asemeja a las masculinas, ya que son alargadas, cilíndricas, gamopétalas, con 10 estambres fértiles y un ovario alargado en forma de cilindro; sus frutos de igual manera son alargados. Por último, las flores irregulares tienen un aspecto intermedio a las dos antes mencionadas. No están bien definidas y sus frutos varían en tamaño y forma (Lobo, 1995).

El fruto de la planta de papaya se encuentra alrededor del tronco, en forma de bayas elipsoidales o esféricas. Este fruto toma un color anaranjado cuando alcanza la madurez; su pulpa es blanda con un líquido lechoso (Linneo, 1753). En la Figura 6 se puede observar las variedades cultivadas en el Ecuador: “Hawaiana”, “Tainung” y “Maradol”.

La primera variedad se introdujo en el año 1985, proveniente desde Brasil. Tiene forma de pera con un peso entre 400 y 800 gramos; su sabor es más dulce que los otros tipos de fruta. En el cavidad central se encuentran las semillas de color negro de aproximadamente 5 mm de largo, cubiertas de una capa gelatinosa. La variedad “Tainung” tiene una pulpa de color rojo con fuerte aroma. Cuando madura el fruto toma un color amarillo en un 40% de la superficie. Su peso promedio es de 1.1 kilos con una textura suave. Su floración toma 6 meses y su cosecha 5 meses más. La variedad nacional conocida como “Maradol”, tiene una forma de pera, pero su estructura es alargada y su peso es superior a las otras dos variedades (1.5 y 2 kilos); su desarrollo óptimo se da en climas cálidos, especialmente en regiones que se encuentran a menos de 800 m de altura sobre el nivel del mar. De igual manera, toma 6 meses para la floración y 5 meses más para la cosecha (ProEcuador, 2015).



Figura 6. Papayas cultivadas en Ecuador.

Tomado de (ProEcuador, 2015).

- a) Hawaiana
- b) Maradol
- c) Tainung

Los frutos que provienen de flores hermafroditas tipo “elongata”, presenta mejores características a nivel comercial, como forma alargada y un buen tamaño (Manzaneque, Cuevas, & Hueso, 2008).

En la cavidad de la fruta se puede encontrar aproximadamente 200 a 400 semillas, cubiertas de una capa mucilaginosa (sarcotesta). La semilla es el producto de la fertilización del óvulo (reproducción sexual). Tienen una forma ovalada y de color café oscuro en la madurez. Su tamaño varía entre 4 y 6 mm de largo y 3 a 4.5 cm de ancho. Las semillas se dividen en tres partes: cubierta llamada testa, un endospermo y embrión. La testa tiene como función proteger la semilla de posibles daños físicos y de factores bióticos externos. Por otro lado, el endospermo se origina a partir de la fusión entre 2 o más núcleos polares provenientes del saco embrionario. Finalmente, el embrión presenta una división axial y una subdivisión

folial. Los cotiledones son rectos y la radícula no se encuentra cubierta por los mismos, tal como se observa en las Figura 7 y 8 (Becerra & Chaparro, 1999).

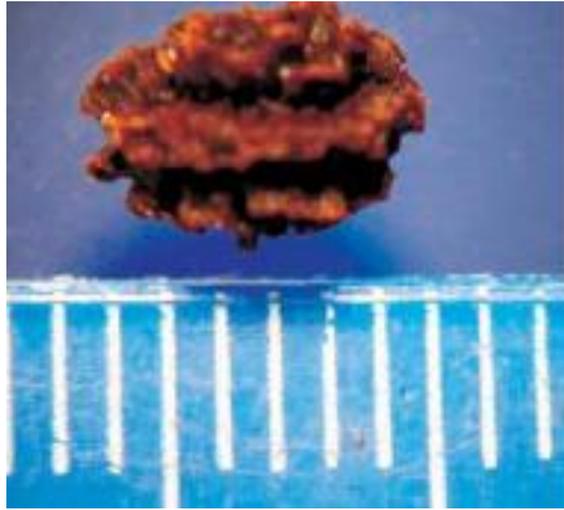


Figura 7. Semilla madura.

Tomado de (Gil & Miranda, 2005).



Figura 8. Embrión de papaya: r) radícula; co) cotiledón.

Tomado de (Gil & Miranda, 2005).

La planta de papaya tiene un sistema radicular que se extiende de forma radial; su raíz pivotante alcanza un metro o más de profundidad (Figura 9). La mayor cantidad de raíces se encuentran a los 10 cm del suelo y se extienden hasta 1.80 m (Jiménez, 2002).



Figura 9. Raíces de la papaya.

Tomado de (Sanmamed, 2016).

El número de cromosomas de la papaya es $2n=18$. Su sexualidad se determina en la etapa de floración, es decir, 3 a 4 meses después de la siembra. Presenta una variante sexual, ya sea macho, hembra o hermafrodita. Los factores genéticos y las condiciones ecológicas, determinan el tipo de sexo en la papaya. A efectos prácticos es necesario conocer que existen distintos cruces posibles que determinan la sexualidad de esta planta. En la Tabla 1 se muestra lo descrito por (Lobo, 1995).

Tabla 1.

Cruces genéticos que determinan la sexualidad en la papaya

Tipo de cruces		Sexo obtenido		
Donante de polen	Receptor de polen	Macho (M)	Hembra (H)	Hermafrodita (Hr)
Hr	H	-	50%	50%
M	Hr	25%	25%	25%
Hr	-	-	33%	66%

Tomado de (Lobo, 1995).

La semilla que proviene de plantas hermafroditas producen descendientes con una relación 2:1 entre Hr y H (66.6% Hr contra 33.3% H); mientras que las semillas de genotipos femeninos tienen una relación 1:1. Sin embargo, las masculina (M) también intervienen en la polinización y pueden aparecer individuos con ese tipo de sexo. Por tal razón, es aconsejable sembrar 2 a 3 plantas en cada hoyo para poder asegurar que al menos una planta sea hermafrodita (Macías, 2010).

A pesar de que el sexo este determinando por factores genéticos, las condiciones ambientales pueden producir variaciones a nivel de expresión génica. La temperatura es un factor clave en la etapa de floración; si esta se encuentra por debajo de los 20°C, el sexo de las flores cambia. Esto provoca que las flores hermafroditas transformen los estambres en carpelos; generando una producción de frutos deformes que no pueden comercializarse. Además de la temperatura, el riego y la fertilización juegan un rol importante para el desarrollo floral. Puede presentarse el fenómeno de esterilidad femenina en la planta disminuyendo la producción en campo. La falta de nitrógeno puede incrementar este problema en el desarrollo del ovario (flor “vana”). La nutrición de la planta debe ser la adecuada

para mantener la formación de los frutos, evitando la deformación conocida como “cara de gato” o “cartera”. Esto se presenta cuando la formación de los ovarios de flores hermafroditas no es la correcta, ha este fenómeno se lo conoce como carpelodia (Lobo, 1995).

2.2. Origen y distribución

Carica papaya L. tiene su origen en América Central. Su descripción más antigua, en 1535, señala que es propia Panamá (Muñoz, 1983). En 1959, Van Leare mencionó que su origen es el sur de México; sin embargo, en 1983, Litz señaló que *Carica* se localiza desde el norte hasta el sur de América.

En la actualidad, sus cultivos se distribuyen en todas las zonas tropicales del continente americano, desde México hasta Brasil; y su producción ha sido ampliada a otros continentes como África y Asia (Linneo, 1753).

En Ecuador, el cultivo de papaya es de tradición para los pequeños agricultores, su producción se centran en las provincias de Los Ríos, Santo Domingo y Santa Elena (ProEcuador, 2015). La producción de esta fruta tropical tuvo su inicio en los 70's, y 2000. Según datos reportados por el INEC (2002), se encontraban 1608ha en monocultivos cuya producción alcanzaba 12179 t.

El cultivo de papaya se distribuye en zonas con climas tropicales y subtropicales, donde la precipitación media es de 1.500 mm anuales y su temperatura varía entre 20 a 25 °C. La planta se desarrolla en hábitats cuyos suelos sean fértiles, blandos, profundos y permeables, con un pH de 5.5 a 7 (Linneo, 1753). En nuestro país se cultivan tres tipos de papaya, tales como, Hawaiana, Tainung y Maradol; la última

de estas variedades se produce en Santa Elena para su exportación al mercado estadounidense, en 22 hectáreas de terreno (Verni, 2014).

2.3. Taxonomía

La papaya es una fruta tropical que pertenece a la familia *Caricaceae*, la misma que está conformada por cinco géneros, tales como *Carica*, *Jarilla*, *Jacaratia*, *Vasconcellea* y *Cylicomorfa*. Desde el punto de vista económico, *Carica papaya L.* es la más importante de las 21 especies. Su género está conformado por plantas dioicas, monoicas y hermafroditas (Posada, 2005). A continuación, se detalla en la Tabla 2 la clasificación taxonómica de la papaya.

Tabla 2.

Clasificación taxonómica de la papaya

División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliosida</i>
Subclase	<i>Dilleniidae</i>
Orden	<i>Violales</i>
Familia	<i>Caricaceae</i>
Género	<i>Carica</i>
Especie	<i>Carica papaya L.</i>

Tomado de (Posada, 2005).

2.4. Importancia comercial

La producción del cultivo de papaya en el Ecuador se da durante todo el año, siendo el clima cálido el más idóneo para la cosecha de frutas con buenas características, tales como, tamaño, color y sabor. Los principales destinos de la

papaya ecuatoriana han sido países como Francia, Países Bajos, Canadá, Estados Unidos, entre otros (ProEcuador, 2015).

Se estima que la producción de esta fruta ocupa 400 hectáreas de terreno con una tendencia a aumentar. El objetivo de los exportadores del país, es colocar en el mercado estadounidense 100 toneladas de esta fruta. Según el sector papayero, cada hectárea de terreno destinado para el cultivo puede albergar 2000 planta, sin embargo su producción se da pasado los 8 meses. La asociación CORPAPAYA (2015) indica, que en el período 2010 al 2014, la producción de papayas frescas alcanzó una tasa de crecimiento promedio anual (TCPA) de 6.18%. La exportación de esta fruta desde el año 2009 ha tenido un crecimiento de 2.99%, mientras que el nivel de toneladas ha decrecido en 3.91% debido a cierto factores que han afectado su producción (ProEcuador, 2015).

El mayor socio comercial del Ecuador en este rubro es Reino Unido (50% de participación), seguido de Países Bajos (17.23% de participación), Bélgica (15.45% de participación) y Alemania (14.61% de participación), tal como se muestra en la Figura 10.

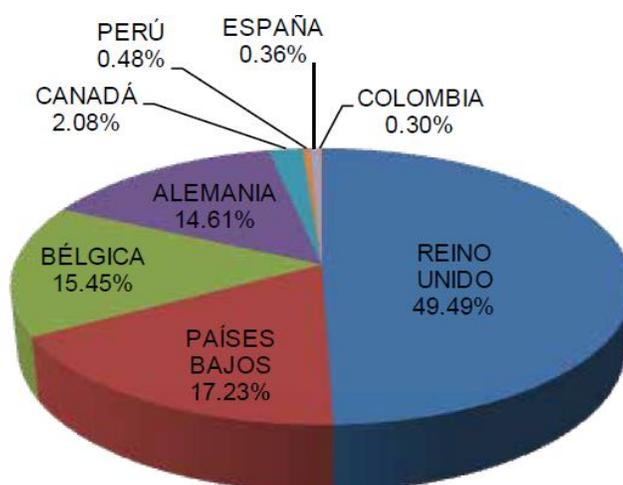


Figura 10. Destinos de las exportaciones de la papaya ecuatoriana.

Tomado de (ProEcuador, 2015).

Estados Unidos y México desde el año 2014, lideran la exportación de papaya, seguido de Alemania, Canadá y Países Bajos. Por otro lado, las exportaciones en el mundo alcanzaron USD 259 millones en el mismo año. México ha tenido una participación del 33.67% de las exportaciones mundiales, llegando a comercializar 131.191 toneladas de la fruta, con un valor de USD 87 millones (ProEcuador, 2015).

A partir del año 2015, el Ecuador logró su exportación hacia los Estados Unidos, mediante un plan estratégico entre los Ministerios de Agricultura de ambos países, con la finalidad de realizar chequeos en los cultivos y evitar la presencia de patógenos utilizando plantas hidrotémicas (ProEcuador, 2015).

Actualmente, la variedad “Hawaiana” es de preferencia por los consumidores; sin embargo, la variedad “Maradol” está cultivándose en San Elena con la finalidad de llegar al mercado estadounidense (Figura 11).



Figura 11. Cultivo de Papaya variedad Maradol localizada en la hacienda AnaCardo, Santa Elena.

Tomada de (Verni, 2014).

2.5. Métodos de propagación

La producción vegetal comprende 2 etapas; la primera consta de la selección de órganos especializados, sea semilla, estacas u otro; en la segunda fase se propaga de manera individual, ya sea por la vía vegetativa, a partir de la selección de clones, o por semillas para las variedades seleccionadas por autofecundación (Agricultura, 1989).

La reproducción sexual por semillas es la forma más fácil y económica, a pesar de los problemas que presenta el cultivo. Se realiza la siembra directa de las semillas en el área de cultivo y pasada las 3 semanas germinan. Es importante eliminar la capa que las recubre (mucílago) para facilitar este proceso. El porcentaje de germinación varía entre 50 a 60% en plantas silvestres que han pasado por un tratamiento previo, y para las plantas cultivadas aumentan a un 80% (Linneo, 1753).

La reproducción asexual o vegetativa se realiza a partir de tubérculos, rizomas, retoños, entre otros órganos vegetales; particularmente de estacas y acodos, o por injertos. La multiplicación vegetativa por estacas consiste en la reproducción de la planta idéntica a la progenitora a partir de un fragmento de ésta. Existen 6 tipos de estacas: raíces, hojas, tallos, sencillas, axilares y cruz, en la Figura 12 se observan los 3 tipos de estacas antes mencionadas (Agricultura, 1989).



Figura 12. Tipos de estacas: sencilla, axila y cruz.

Tomado de (Agricultura, 1989).

Los esquejes en el cultivo de papaya se realizan cortando la cabeza del papayo (3 o 4 años de cultivo) para obligarlo a ramificarse. Cuando alcanzan un tamaño entre 25 y 30 cm, se cortan y se sumergen en agua caliente para evitar la pérdida de savia. Posteriormente se siembran en macetas y se colocan en invernaderos para controlar los factores como humedad y temperatura (Lobo, 1995). Este método de multiplicación resulta costoso porque requiere de espacio en el invernadero para mantener las condiciones adecuadas para su crecimiento y necesita largos períodos para responder a la demanda del consumidor (Agricultura, 1989).

Otra técnica que se utiliza es la multiplicación por acodos. Se realiza de tres maneras: 1) acostando y enterrando la planta que tiene ramas largas y flexibles; 2) aporcando plantas que poseen ramas rígidas y cortas; 3). Con ayuda de un plástico se realiza una fijación aérea de las ramas largas y rígidas (Agricultura, 1989). A pesar de posibilitar plantaciones homogéneas, se presenta el riesgo de transmisión de enfermedades causadas por virus y problemas de compatibilidad y duración del injerto (Agricultura, 1989).

2.5.1. Micropropagación tradicional

En cultivo de tejidos vegetales se ha desarrollado metodologías que permiten obtener individuos con características deseables en poco tiempo. Las vías de regeneración son: organogénesis y embriogénesis somática (Posada, 2005). Los estudios en los cultivos han permitido desarrollar nuevas técnicas de multiplicación *in vitro*; así como también, la conservación de germoplasma, rescate de embriones, saneamiento vegetal, transformación genética, entre otras (Stiles, Lemme, Sodur, Morshidi, & Manshard, 1993).

Existen 5 fases de multiplicación *in vitro*: fase 0 y I: Preparación y establecimiento; fase II: Multiplicación; fase III: elongación; fase IV: enraizamiento; y fase V: aclimatación (Posada, 2005).

La fase de preparación y establecimiento es una de las más críticas de la micropropagación de papaya. En esta planta se presentan problemas en la fase de establecimiento, cuando se emplean yemas axilares, apicales o meristemas que provienen de campo, debido al contacto con microorganismos que se encuentran en el ambiente (Brar & Khush, 1994). Los protocolos de micropropagación no han sido perfeccionados; sin embargo, todos los estudios de propagación *in vitro* emplean yemas axilares provenientes del papayo para su introducción en medios de cultivo. En el establecimiento *in vitro* del cultivo de papaya se presentan varias dificultades, tales como, la obtención de brotes axilares de tamaño similar, contaminación del material vegetal por factores ambientales, bajo coeficiente de multiplicación, entre otros (Arrieta, 1996).

Se ha logrado la micropropagación de un híbrido de papaya IBP 42-99, empleando hojas de plantas de 11 meses de edad. Se aplicaron dos fitohormonas en las hojas, 6-BAP y GA₃, en concentraciones de 500 mg.L⁻¹ y 1000 mg.L⁻¹

respectivamente. Su función principal es estimular el crecimiento vegetal y el desarrollo de yemas. Posteriormente, se aplicó un protocolo de desinfección utilizando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (0.5 – 3%), alcohol al 70% y lavados sucesivos con agua estéril. Adicionalmente se puede añadir antibióticos como gentamicina, estreptomycin, cefatoxima, entre otros inhibidores de crecimiento de patógenos (Arrieta, 1996).

Una vez terminada la desinfección del material vegetal, se procede a la siembra en frascos de vidrio de 250 ml que contienen un medio de cultivo compuesto por sales MS (Murashige & Skoog, 1962) . Este protocolo debe ser establecido para alcanzar altos porcentajes de supervivencia del material vegetal en esta fase inicial (Rajeevan & Pandey, 1986).

La fase de multiplicación se caracteriza por la utilización de varios reguladores de crecimiento, tales como, la kinetina, isopenteniladenina y 6-BAP (Islam, Rahman, Hossain, & Joarder, 1993). Sin embargo, el regulador más efectivo ha sido el 6-BAP en conjunto con el ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones entre 0.5 – 0.1 mg.L⁻¹. Con esta combinación se han logrado coeficientes de multiplicación entre 7.5 – 9.87 (Gallardo, Posada, Kosky, Reyes, & Herrera, 2002).

En los frascos que contienen el material vegetal, se ha observado que el etileno tiene una correlación con la proliferación de brotes de papaya. Se aplicaron inhibidores de la biosíntesis del etileno, cuyo efecto persiste en las yemas de papaya en comparación con otros tratamientos que utilizan ácido 1-aminociclopropano-1-carboxil (ACC) (Lai & Yeh, 2000).

La multiplicación se realiza en medio MS suplementado con reguladores de crecimiento, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y

luminosidad. Comúnmente, los frascos se colocan en un área amplia bajo esos parámetros por un tiempo de 15 días. Los autores reportan la presencia de bacterias endógenas en papaya. Para reducir la contaminación microbiana se puede emplear medios de cultivo sin azúcar, con un tratamiento previo de carbenicilina (500 mL.L^{-1}) y cefotaxina (200 mL.L^{-1}) (Fitch, et al., 2005).

Durante la fase de elongación se transfiere el material vegetal nuevamente a un medio de multiplicación cada 21 días. Posteriormente se colocan en un nuevo medio de cultivo suplementado de ácido giberélico (AG_3) en concentraciones de $1\text{-}5 \text{ mg.L}^{-1}$ por 15 días. Los explantes de papaya han alcanzado alturas entre los 3 y 3.8 cm, con un 92% de brotes elongados (Banergee, 2002).

La fase de enraizamiento de papaya se la puede realizar en laboratorio o en invernaderos. De manera *in vitro*, los brotes deben alcanzar una altura de 3 cm, con 3 a 4 hojas, los mismos que se sembrarán en un medio que contiene el 50% de las sales MS, suplementado con ácido indol butírico (AIB) en concentraciones de $3\text{-}5 \text{ mg.L}^{-1}$. Es aconsejable que el medio permanezca en el área de desarrollo por 20 días, para finalmente transferir el material vegetal a un medio MS sin reguladores. Por otro lado, se puede enraizar *ex vitro* utilizando soluciones de ácido indol-acético (AIA) y AIB en concentraciones de 10 mg.L^{-1} y 8 mg.L^{-1} respectivamente. El material vegetal debe ser lavado con abundante agua y sumergido 24 horas en dichas soluciones (Posada, 2005).

Finalmente, la aclimatación es la última etapa del protocolo de micropropagación de plantas, y que además sigue siendo una de las más críticas. Durante los 15 días de aclimatación se debe controlar la humedad relativa (95-100%) para alcanzar un porcentaje de supervivencia del 65% en los 7 primeros días. Es importante que la planta desarrolle un buen sistema radicular, debido a que los nutrientes son absorbidos desde el suelo hacia la planta. En papaya es crucial

mantener una alta humedad relativa para lograr un alto porcentaje de adaptación de la planta en cámaras húmedas (Posada, 2005).

Los autores recomiendan cubrir al material vegetal con frascos de vidrio durante 4 semanas, con esto garantizan que el agua solo humedezca el sustrato. Este mecanismo hizo posible aumentar la aclimatación de papaya hasta un 71%, alcanzando una altura de 10-15 cm, con 7-12 hojas y 6-10 cm de raíz (Gallardo, Posada, Kosky, Reyes, & Herrera, 2002).

2.5.2. Biorreactores de Inmersión Temporal

La papaya se propaga por métodos tradicionales; sin embargo, se presentan problemas de latencia, los cuales llegan a afectar a la germinación y a su conservación. Se producen plantas heterogéneas con características poco favorables (Posada, 2005). Los protocolos de micropropagación de cultivos hermafroditas podrían reducir el número de plantas (6000 a 2000 plantas) que se requiere para la siembra en un área de terreno. Como resultado se generan plantas uniformes que conservan su hermafroditismo, a diferencia de la reproducción sexual. Para estas frutas de interés comercial es necesario mejorar estos protocolos de multiplicación *in vitro* para su escalado (Talavera, Espadas, Fuentes, & Santamaría, 2009).

El desarrollo tecnológico ha permitido cumplir los objetivos de comercializar cultivos de interés, mediante el uso de Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT). Esta alternativa de micropropagación permite optimizar la multiplicación de plantas élites, debido a la reducción de costos de operación mediante la utilización de medios de cultivos líquidos (Colmenares & Giménez, 2000). Además el proceso es semi-automatizado y de fácil manipulación, por lo que se reduce la mano de obra; y a su vez disminuye el tiempo de establecimiento del material vegetal, aumenta la tasa de multiplicación gracias al contacto intermitente con el medio de cultivo y a la aireación forzada, obteniendo así plantas de mayor vigor, en comparación con la

multiplicación convencional (Berthouly & Etienne, 2005). El comportamiento de las plantas mejora en la etapa de aclimatación, garantizando un alto porcentaje de supervivencia en comparación con la multiplicación tradicional (Niemenak, Saare-Surminski, Rohsius, Omokolo, & Lieberei, 2008).

Sin embargo presenta algunas desventajas, como la hiperhibrididad, variación en el tamaño, contaminación, entre otros. El mayor problema se presenta en especies recalcitrantes como mortiño, cacao, palma y algunos árboles. La eficiencia de los protocolos de micropropagación en sistemas de inmersión temporal se ha ido perfeccionando en comparación con la multiplicación tradicional, debido a las pérdidas en la etapa de aclimatación (Escalona, 2005).

Se los llama biorreactores de inmersión temporal (BIT) ya que en estos sistemas ocurren una serie de procesos biológicos mediante el empleo de sistemas automatizados o semi-automatizados (Doran, 2013). Uno de los primeros usos fue la multiplicación *in vitro* de begonias en biorreactores *airlift*, con lo que se logró reducir el 60% en los costos, comparando con la micropropagación tradicional (Jiménez, 1995). Desde entonces se han utilizado para la micropropagación masiva de plantas de interés, a partir de yemas axilares, apicales, microtubérculos y embriones somáticos. Han sido empleados para obtener, lirios, frutillas, papas, stevia, uva, *Amelanchier x grandifolia*, banano, plátano, frutos cítricos, piña, entre otros (Colmenares & Giménez, 2000).

En papaya se han descrito algunas experiencias previas utilizando el Biorreactor de Inmersión Temporal de Vasos Gemelos (BIT), y se obtuvieron altas tasas de multiplicación en comparación con la micropropagación convencional (Escalona, 2005). Han sido empleados en la multiplicación de embriones somáticos de papaya cv "Maradol Roja", con una frecuencia de 3 veces al día por 1 minuto. Los resultados indican que el coeficiente de multiplicación fue de 4, en un medio de

cultivo líquido suplementado con 2.4-D (1mgL^{-1}) Los investigadores mencionan que el uso de BIT es más eficiente que la micropropagación tradicional, ya que permite mayores rendimientos del cultivo en corto tiempo (Posada, 2005).

En la Tabla 3 se muestran las ventajas del uso de sistemas de inmersión temporal en la micropropagación de *Spathiphyllum* frente a la multiplicación tradicional en medio semi-sólido.

Tabla 3.

Comparación entre la multiplicación tradicional frente a la micropropagación en BIT de Spathiphyllum.

	Detalle	Biorreactor	Cultivo en Agar
<i>Material</i>	Volumen del recipiente	20 L	500 mL
	Volumen del medio L/recipiente	16.6 L (liquid)	100 mL (agar)
	Número de recipientes	6	1000
	Número de inóculo utilizado para el sub cultivo	96 tubos de ensayo	150 tubos de ensayo
	Período del cultivo	90 días	60 días
	Espacio del cultivo	0.5 m^3	36 m^3
	Cantidad de lámparas fluorescentes (40W)	6	30
<i>Mano de obra</i>	Tiempo de operación	200 min	2500 min
	*Preparación de medio (100 L)	60 min	450 min
	Autoclavado	10 min	140 min
	Inoculación	45 min	1250 min

	Transferencia al cuarto de cultivo	10 min	60 min
	Eliminación de cultivos	45 min	300 min
	Lavado de recipientes	30 min	300 min
<i>Transplante</i>		1800 min	1800 min

Tomado de (Gupta & Ibaraki, 2008).

Nota: *Volumen de medio de cultivo de 100 L en cultivo de biorreactores y cultivo en agar.

De acuerdo a la operatividad del sistema se han clasificado en 4 grupos: máquinas de inclinación, inmersión completa y renovación del medio de cultivo, inmersión parcial y mecanismo de renovación del medio de cultivo, y la inmersión completa del material vegetal y transferencia del medio sin renovación de nutrientes. Todos estos sistemas difieren en su diseño, instalación, tamaño, tipo de soportes, control computarizado o un timer, uso de bombas de aire o bombas peristálticas (Berthouly & Etienne, 2005).

En 1952, Steward y colaboradores, aplicaron por primera vez esta técnica de micropropagación en medios de cultivo líquidos utilizando dos tubos, uno con medio líquido y el otro contenía el tejido vegetal en una fase gaseosa y viceversa. Los “aparatos de Steward” fueron empleados hasta el año 1985, hasta que Tisserat y Vercook emplearon el sistema automatizado aplicando el “cambio de flujo”, con lo cual entro en debate acerca del tiempo de inmersión del cultivo (Escalona, 2005). En 1993 se introdujo el sistema RITA (Recipient for Automated Temporary Immersion System) desarrollado por Alvard y colaboradores. En el año de 1995, se definió un nuevo concepto usando medios de cultivo líquidos, lo que generó interés en el mundo. De esta manera se realizó pruebas en este sistema variando recipientes, equipos, tiempos y frecuencias de inmersión, entre otras variables que determinan la eficiencia de este sistema (Maldonado, Rodríguez, Gómez, & Cárdenas, 2003).

El CIRAD (La Reseche Agronomique Pour Le Développement) crea este SIT que permite la semi-automatización del proceso de multiplicación de plantas en laboratorio (Berthouly & Etienne, 2005). En la Figura 13 se muestra el funcionamiento básico del sistema RITA, el mismo que consiste en un recipiente de 1L de capacidad que está dividido por un compartimiento superior y uno inferior. El superior con base perforada sirve de soporte (membrana, espuma de poliuretano, tamices o mallas metálicas) para el material vegetal. La parte inferior sirve de reservorio para el medio de cultivo líquido. En el centro de este sistema se encuentra un tubo, por el cual se inyecta aire estéril a través de un compresor, el mismo que se encuentra conectado por mangueras que permiten el desplazamiento del medio de cultivo líquido hacia los explantes en un tiempo y frecuencia determinado (Berthouly & Etienne, 2005).

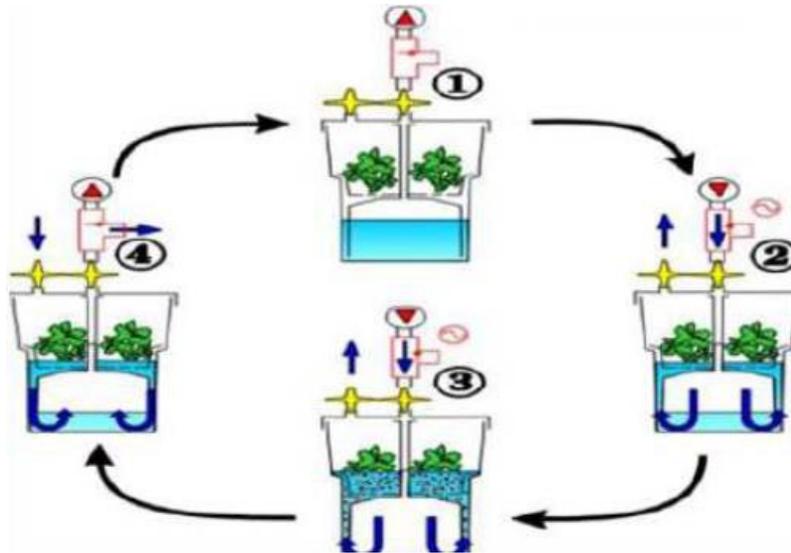


Figura 13. Recipient for Automated Temporary Inmersion System (RITA).

Tomado de (Alvard, 1993).

Pese a las ventajas que ofrece el RITA, resulta costoso para los países en vías de desarrollo por la patente del equipo. Debido a la alta inversión comenzaron a

desarrollar otras tecnologías que permitan la multiplicación de plantas *in vitro*. Es así que en 1999, se construyó la primera Biofábrica para la producción de 60 millones de plantas (Pérez, Orellana, Suárez, & Valdés, 1998).

En 1997, investigadores cubanos diseñaron una variación de este sistema, el mismo que emplea el uso de dos frascos idénticos en capacidad y tamaño, a diferencia del sistema RITA. Gracias a este avance se logró establecer metodologías de micropropagación de plantas con mayores tasas de multiplicación, enraizamiento y aclimatación. Los autores indican que gracias al intercambio de gases en la atmósfera de los frascos, estas plantas llegan a sobrevivir en campo y tienen un mayor crecimiento y desarrollo (Jiménez, 1995). El BIT está formado de dos recipientes de vidrio con capacidad de 1 L. Cada envase tiene orificios de 5 mm en cual se introduce tubos o mangueras del mismo diámetro. La primera manguera se introduce hasta el fondo del recipiente y por encima de la tapa (8 cm); la segunda manguera conecta ambos recipientes (Maldonado, Rodríguez, Gómez, & Cárdenas, 2003).

El mecanismo de operación de los sistemas de inmersión temporal no varía, ya que se basa en el principio de Pascal, el mismo que consiste en la introducción de aire a través de un compresor que pasa por las mangueras o tubos que se encuentran conectados a los recipientes. El aire introducido pasa por filtros bacteriológicos (0.45 μm) hasta llegar al frasco de reservorio del medio de cultivo, gracias a la presión positiva que se genera en el interior del envase, y este fuerza para subir por la segunda manguera hasta llegar al recipiente que contiene los explantes vegetales. Todo este proceso se da por un tiempo determinado y una vez finalizado, se invierte el proceso hasta un nuevo ciclo de inmersión (Maldonado, Rodríguez, Gómez, & Cárdenas, 2003) Este proceso es controlado por tiempo (timers) o tableros de control lógicos programables (PLC), los mismos que fueron diseñados para controlar el tiempo y la frecuencia de inmersión. Uno

está programado para abrir la válvula solenoide que permite el ingreso de aire al envase de reservorio, y el otro controlador la cierra después del tiempo de inmersión. En la Figura 14 se muestra el proceso de operación del BIT.

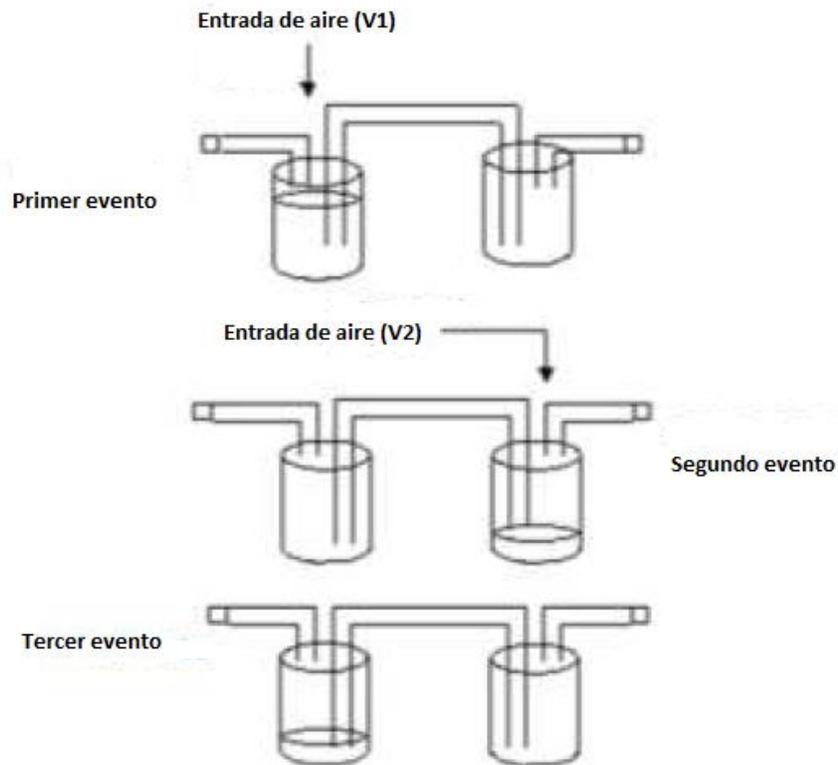


Figura 14. Operación del Biorreactor de Inmersión Temporal de Vasos Gemelos.

Tomado de (Maldonado, 2003).

Las condiciones de operación de la multiplicación *in vitro* de plantas de interés deben estar establecidas para que el cultivo tenga un buen desarrollo. Los factores dependen de la especie y del explante, entre los cuales podemos encontrar: intensidad de luz, temperatura, humedad relativa y fotoperíodo (Chagas & Soares, 2003).

La humedad relativa (HR) es un factor que influye en el desarrollo del cultivo *in vitro*. En los frascos de vidrio la HR es alta, mientras que en el área de desarrollo se encuentra entre 60-70%. Es importante mantener este factor ya que si disminuye (50%) puede perder agua el explante, a su vez se concentran los componentes del medio como las sales, y puede generar toxicidad. Si la HR supera el valor promedio puede generar una contaminación en los recipientes (Pierik, 1990).

Otro factor importante es la temperatura, ya que influye en el metabolismo de la planta (Palomares, Vidales-Fernández, Guillén, & Salgado, 2003). Las especies vegetales presentan una temperatura óptima de crecimiento, que varía de acuerdo al genotipo, explante y edad. Los estudios reportan un rango de temperatura entre 20 a 28°C (Pierik, 1990).

El fotoperíodo y la intensidad de luz también juegan un rol importante en el crecimiento de las especies vegetales. Ambas influyen en las características morfológicas de los explantes (Palomares, Vidales-Fernández, Guillén, & Salgado, 2003). La intensidad de luz o irradiación debe ser entre 8 a 15 Wm² (Pierik, 1990). La necesidad de luz de una planta *in vitro* es menor, en comparación con aquellas que se encuentran en campo. Esto se debe a que el medio de cultivo en el cual crece la planta contiene sacarosa que ayuda al metabolismo de las plantas autótrofas (Escalona, 2005). Con respecto a la calidad de luz, los pigmentos fotosintéticos de las plantas se encargan de absorber la energía de las radiaciones para llevar a cabo las reacciones químicas. El fotoperíodo hace referencia a los ciclos de luz y oscuridad, se emplean entre 14 a 16 horas de luz; excepto en casos donde el cultivo necesita oscuridad (Pierik, 1990).

Existen parámetros cinéticos que influyen directamente en el crecimiento de las plantas en estos biorreactores, entre estos se encuentra la aireación que si no es

controlado puede generar estrés celular por efecto cizalla. El flujo de aire depende de la forma, tipo, diseño y construcción del Biorreactor (Gupta & Ibaraki, 2008). El ingreso de aire activa el ciclo de inmersión que mantiene en contacto a los explantes con el medio de cultivo. Gracias a la inyección de aire existe un intercambio gaseoso en el envase entre el dióxido de carbono con el oxígeno. La presión del flujo de aire debe ser establecida en los ensayos experimentales, ya que se relaciona con el mezclado de medio y disminución del efecto cizalla (Preil & Beck, 1991).

Las plantas requieren de oxígeno para su desarrollo y crecimiento. En la micropropagación tradicional se utilizan tapones que permiten el oxígeno del aire ingrese a los frascos para estimular el crecimiento de los explantes. La eficiencia de la aireación en estos sistemas viene dada por el coeficiente de transferencia de oxígeno k_La . Este depende de la tasa de aireación y del tamaño de las burbujas que se generan en los biorreactores (Gupta & Ibaraki, 2008). El tamaño de las burbujas depende del tipo y del tamaño de los poros por el cual atraviesa el aire al sistema, normalmente tienen un diámetro entre 0.5 a 1 mm para valores de k_La altos. De manera general los valores de k_La superiores a 10 h^{-1} son suficientes para el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, en el cultivo de tabaco, la biomasa se volvió constante cuando el valor de k_La fue 10 h^{-1} (Kato, Hikosaka, & Hirose, 2002).

Entre los factores que afectan esta constante podemos encontrar: mezcla, coeficiente de difusión, viscosidad, tensión superficial, velocidad del flujo de aire, tamaño de la burbuja y tipo de biorreactor (Fonseca, Mavituna, & Brodelius, 1998). Con el objetivo de aumentar la eficiencia de aireación se utiliza difusores porosos para conseguir valores altos de k_La y disminuir el efecto cizalla (Payne, Shuler, & Brodelius, 1987).

Dentro de los biorreactores se forman tres fases, líquida, gaseosa e intrafase (Figura 15). Se representan con la siguiente ecuación matemática (Ecuación 1):

$$OTR = KLa (DO^* - DO)$$

(Ecuación 1)

Donde OTR es la tasa de transferencia de oxígeno, k_{La} es el coeficiente de transferencia de oxígeno, DO^* es la concentración de oxígeno disuelto en el medio a temperatura de 25°C para sistemas acuosos (258 μM o 8.24 ppm) y DO es la concentración de oxígeno disuelto. Esta ecuación resulta muy práctica para caracterizar a la transferencia de oxígeno en BIT (Gupta & Ibaraki, 2008).

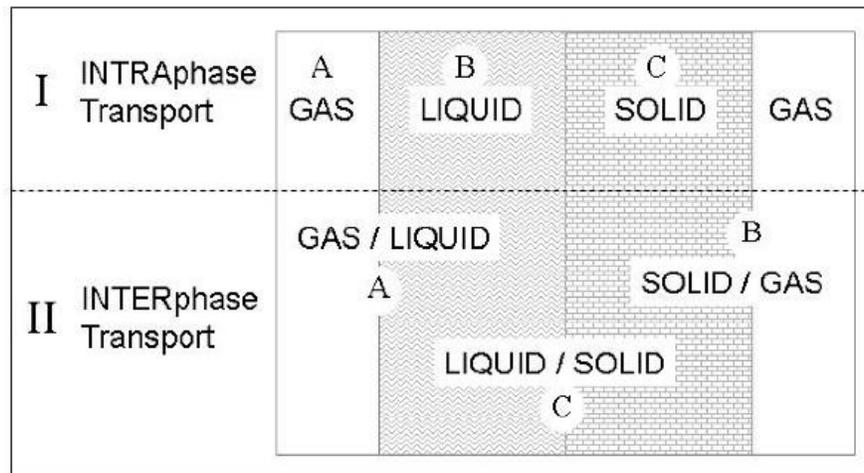


Figura 15. Representación esquemática del fenómeno de transporte considerando la transferencia de oxígeno en un sistema trifásico.

Tomado de (Gupta & Ibaraki, 2008).

El transporte intrafase es crítico, pues casi todo el oxígeno que entra al BIT, se queda en la fase gaseosa sin ser transportado al tejido vegetal. En la fase gaseosa el gas tiende a dispersarse como burbujas de manera rápida gracias a la difusión. Para que exista una mezcla adecuada, las burbujas deben fusionarse y separarse a medida que circulan por el frasco. La eficiencia de la transferencia de

oxígeno es tan baja que la dispersión y la mezcla no suele ser muy importante, ya que no hay un cambio en la composición de esta fase a medida que opera el Biorreactor. Incluso si las velocidades de flujo de gas son bajas, la composición del gas que sale es casi la misma que entra. A diferencia de los reactores microbiano, que operan a 0.1-1 VVM (volúmenes de gas por volumen de líquido por minuto), los biorreactores de cultivo de tejidos pueden operar con flujos de menor magnitud, sin tener cambios en la composición del gas (fase uniforme) (Gupta & Ibaraki, 2008).

En la fase líquida, la mezcla depende del diseño y operación del Biorreactor. Los mecanismos de transporte de oxígeno, como la mezcla y circulación son importantes a lo largo del proceso. La circulación hace referencia a qué tan rápido el fluido va desde un lugar a otro en el Biorreactor. La mezcla es una medida de la rapidez de ese fluido que se dispersa en el sistema. En estos sistemas BIT, es necesario que la mezcla sea correcta para poder dispersar el líquido con el gas; y se la circulación es necesaria para mover el líquido a zonas donde el transporte entre gas-oxígeno no se efectivo (Gupta & Ibaraki, 2008).

En la siguiente ecuación se describe la solubilidad del oxígeno en estado de equilibrio, representada por la ley de Henry:

$$C_L = \frac{y_{O_2} p}{H}$$

(Ecuación 2)

A medida que el medio de cultivo se mezcla, la transferencia de oxígeno aumenta debido al incremento en la presión hidrostática (P). Las estrategias para mejorar el transporte de oxígeno en estos sistemas es aumentar la fracción molar del oxígeno (y_{O_2}) añadiendo oxígeno de la fase gaseosa. Al aumentar la temperatura

en el sistema (H), la solubilidad del oxígeno disminuye (C_L). Los cultivos vegetales normalmente se encuentran a 20-25 °C y se han conseguido altas tasas de crecimiento en medios líquidos. La difusión de oxígeno (DO) a 25°C en este sistema es de $2.26 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Gupta & Ibaraki, 2008).

El transporte de oxígeno en la fase sólida (tejido) es crítico porque el oxígeno debe ingresar al interior del explante vegetal para mantener la respiración celular. La velocidad del transporte de oxígeno en el tejido vegetal debe ser capaz de llegar a los tejidos externos e internos de la planta (Gupta & Ibaraki, 2008). Este flujo de oxígeno está descrito por la ley de Fick:

$$\frac{\partial C_{O_2}}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x}(N_{O_2}) - r_{O_2}$$

(Ecuación 3)

Donde la relación entre el consumo de oxígeno (∂C_{O_2}) en el tiempo (∂t) es igual a la diferencia entre el consumo de oxígeno ($\frac{\partial}{\partial x}(N_{O_2})$) y demanda biológica de oxígeno o BOD (r_{O_2}). Existen varias ecuaciones que representan el flujo de oxígeno en tejidos cultivados en placa, cilindros o esferas. Se asume que la cinética es de orden cero (BOD es constante) porque las células vegetales utilizan cualquier oxígeno que se encuentre en el ambiente, antes de recurrir a una respiración anaeróbica. De igual manera, se asume que la difusión de oxígeno en este sistema es equivalente al agua porque organismos tienden a transportar el oxígeno que se encuentra en la fase acuosa hacia los tejidos, de tal manera, que la difusión de oxígeno neta es igual a la tasa de transferencia de oxígeno del sistema (Gupta & Ibaraki, 2008).

Además de la aireación, la agitación puede presentar problemas en el cultivo de tejidos vegetales. La entrada de aire al sistema genera turbulencia o agitación del

medio de cultivo, esto se debe a la formación de agregados que afectan a la agitación en el sistema y a la difusión de oxígeno. Es importante que el tiempo y frecuencia de inmersión sean bien establecidos durante la experimentación, ya que puede generar ruptura en el tejido. Para reducir este posible efecto es necesario controlar la composición del medio de cultivo, pH, presión del flujo de aire y manipulación del explante (Pérez, Orellana, Suárez, & Valdés, 1998).

El volumen y renovación del medio de cultivo también deben ser optimizados para garantizar un desarrollo adecuado de la planta. Son importantes porque en varios estudios se mencionan que la evaluación de la composición del medio genera mayores tasas de multiplicación. Por ejemplo, en caña se ha observado que al aumentar 10 veces el volumen se puede incrementar el coeficiente de multiplicación a 8.3 en un período de 30 días. Además, la renovación del medio de cultivo debe realizarse cada cierto tiempo para evitar que los tejidos se fenolicen y el desarrollo de la planta no sea completo (Berthouly & Etienne, 2005).

La acumulación de biomasa en BIT es notoria en varios estudios porque hay un aumento en la tasa de multiplicación. Sin embargo, la cantidad de biomasa en exceso puede disminuir la eficiencia de este sistema ya que el desarrollo y crecimiento de la plantas es excesivo. Por tal razón, los investigadores han recomendado el uso de retardantes de crecimiento para disminuir el crecimiento y estimular la generación de nuevos brotes. Entre los más utilizados podemos encontrar: paclobutrazol, ancymidol, entre otros (Berthouly & Etienne, 2005). Pueden generar efectos en el metabolismo de isoprenoides pero su uso en plantas como la uva, sábila, crisantemo, caña de azúcar es ventajoso porque generan resistencia a la desecación (Escalona, 2005).

3. Capítulo III. Diseño del Plan Experimental

En la etapa de desinfección de yemas axilares de papaya se establecieron tres tratamientos donde se evaluó el tiempo de inmersión (5, 6 y 8 minutos) en hipoclorito de sodio al 2%. Se realizaron dos ensayos en los que cada tratamiento constaba de 10 repeticiones. En la micropropagación utilizando BIT se evaluó el tiempo de inmersión (1 y 2 minutos) y la densidad del inóculo (4 y 8 explantes). Se realizaron dos ensayos y cada tratamiento se realizó por triplicado.

3.1. Tratamientos

Los tratamientos para la desinfección de yemas axilares de papaya se muestran en la Tabla 4. Se realizaron 10 repeticiones de cada tratamiento en cada uno de los ensayos realizados.

Tabla 4.

Tratamientos de desinfección de yemas axilares de Papaya variedad "Maradol"

Tratamiento	Concentración de Hipoclorito de Sodio (% v/v)	Tiempo de Inmersión (minutos)
T0	-	-
T1	2	5
T2	2	6
T3	2	8

Nota: Tratamiento control T0 consta de lavados con agua destilada estéril

Por otro parte, en la Tabla 5 se muestran los tratamientos de la etapa de multiplicación de yemas axilares en BIT. Cada tratamiento se realizó por triplicado en cada ensayo.

Tabla 5.

Tratamientos de micropropagación de yemas axilares de papaya en el BIT

Tratamiento	Tiempo de Inmersión	Densidad del inóculo (No. Explantes por BIT)
TA	-	4
TB	-	8
T1	1 min. 6 h ⁻¹	4
T2	1 min. 6 h ⁻¹	8
T3	2 min. 6 h ⁻¹	4
T4	2 min. 6 h ⁻¹	8

Nota: Tratamientos control TA y TB con 4 y 8 explantes respectivamente, cultivados en medio MS semi-sólido.

3.2. Unidad experimental

En la fase de desinfección de yemas axilares se consideró como unidad experimental a un frasco de vidrio que contiene el medio de cultivo MS semi-sólido y el material vegetal. De la misma manera, en la etapa de micropropagación en BIT se consideró como unidad experimental al recipiente que contiene los explantes vegetales y el envase de reservorio de medio de cultivo.

3.3. Diagrama de flujo del proceso

En la Figura 16 se muestra el diagrama de flujo del proceso de experimentación de la presente investigación.

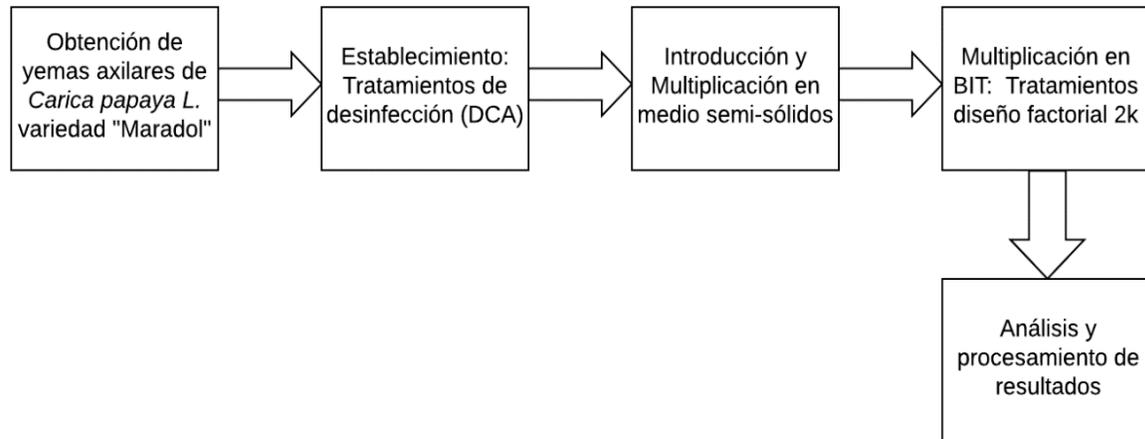


Figura 16. Diagrama de flujo de la multiplicación *in vitro* de yemas axilares de *Carica papaya L.* variedad "Maradol".

4. Capítulo IV. Materiales y Métodos

4.1. Población y Muestra

La población es *Carica papaya* variedad "Maradol" y la muestra son yemas axilares de papaya que se encuentra en el invernadero del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL).

4.2. Materiales y Métodos para la obtención de datos

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL), a cargo de MSc. José Flores y su equipo de trabajo Ing. José García, Técnicos Sr. Fernando Piña y

Sr. Joffre Mendoza. El laboratorio se encuentra ubicado en la ciudad de Guayaquil-Ecuador, edificio PROTAL, Campus Gustavo Galindo en el Km 30.5 vía Perimetral.

4.2.1. Material vegetal

Abdelnour & Escalant (1994) mencionan que el tamaño óptimo de los explantes vegetales es de 2 cm, esto se debe a que conforme aumenta el tamaño del material vegetal (superficie de contacto), aumenta el porcentaje de contaminación por hongos o bacterias. Además, es importante introducir explantes jóvenes ya que a mayor edad tienden a acumular contaminantes del ambiente, por lo tanto esta etapa de desinfección se dificulta. Por esta razón se utilizaron yemas axilares de un tamaño aproximadamente 2 cm que no presentaban daños, provenientes de plantas de 4 meses de edad (Figura 17).

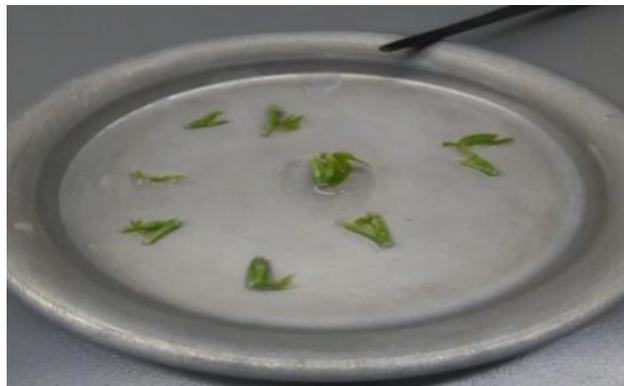


Figura 17. Yemas axilares de Papaya variedad "Maradol"

Se utilizó la cabina de flujo laminar horizontal para realizar el proceso de desinfección, introducción y multiplicación *in vitro* de yemas axilares de papaya. Para la limpieza y esterilización de la cabina de flujo se preparó una solución de permanganato de potasio (KMnO_4) y formol, dicha reacción exotérmica genera gases, que son los que desinfectan por completo la cabina de flujo. Además, de

este proceso semanal, se limpia con alcohol 70% antes y después de ingresar a la cabina de flujo horizontal (Figura 18).



Figura 18. Cabina de flujo horizontal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CIBE.

4.2.2. Desinfección e Introducción del Material Vegetal

Las yemas axilares de papaya fueron trasladadas al laboratorio para realizar el proceso de desinfección. Se colocaron en una solución de etanol al 70% por un minuto, posteriormente se evaluó el tiempo de inmersión del material vegetal (5,6 y 8 minutos) en hipoclorito de sodio 2%, y finalmente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril (Tabla 4). El material vegetal fue sembrado en el medio Murashige & Skoog modificado (MS) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (Korneva, Flores, Santos, & Mendoza, 2013), bajo las siguientes condiciones: temperatura de 25°C, humedad relativa del 66%, con fotoperiodo de 12 horas. Por 21 días se evaluó el porcentaje de contaminación y oxidación de las yemas axilares de papaya.

Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron soluciones stock, las mismas que se detallan en la Tabla 6. Se añadieron 25 mL de A, 1 mL de B, 10 mL de C, 2.9 mL de D y 1 mL de E a un matraz de 1 L. Posteriormente, se agregaron componentes como mioinositol (100 mg.L^{-1}), ácido ascórbico (40 mg.L^{-1}), agua de coco (50 mL.L^{-1}) y sacarosa (30 g.L^{-1}); se ajustó a un pH 5.9 y se añadió el agente gelificante (2.5 g.L^{-1}). Se dispuso 20 ml de medio en frascos de vidrio estériles, los mismos que fueron esterilizados en una autoclave por 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión.

Tabla 6.

Formulación del medio de cultivo Murashige & Skoog modificado (MS)

Soluciones madre	Compuesto químico	Concentración
A	NH_4NO_3	66 g.L^{-1}
	KNO_3	76 g.L^{-1}
	MgSO_4	14.8 g.L^{-1}
	KH_2PO_4	6.8 g.L^{-1}
B	H_3BO_3	6.2 g.L^{-1}
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9 g.L^{-1}
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.5 g.L^{-1}
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 g.L^{-1}
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25 g.L^{-1}
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025 g.L^{-1}
C	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.74 g.L^{-1}
	EDTA	2.78 g.L^{-1}
D	CaCl_2	150 g.L^{-1}
E	KI	830 mg.L^{-1}
Mioinositol	Compuesto orgánico	100 mg.L^{-1}
Ácido ascórbico	Ácido orgánico	40 mg.L^{-1}

Agua de coco	Minerales y vitaminas	50 mL.L ⁻¹
Sacarosa	Azúcar	30 g.L ⁻¹
<i>Phytigel</i>	Gelificante	2,5 g.L ⁻¹

El material vegetal sano proveniente de la fase I, se sembró en el medio de cultivo MS (Tabla 6) suplementado con 1.0 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) y 2.0 mg.L⁻¹ de kinetina (Mousumi, Sukumar, & Barid, 1994). Transcurridos 21 días se evaluó el porcentaje de oxidación de las yemas axilares de papaya. En la Figura 19 se puede observar el proceso de introducción de yemas axilares dentro de la cámara de flujo.



Figura 19. Introducción de yemas axilares en medio semi-sólido

4.2.3. Micropropagación Tradicional vs BIT

Para la multiplicación *in vitro* tradicional de yemas axilares de papaya, se utilizó el medio MS semi-sólido suplementado 0.5 mg.L⁻¹ de benzil adenina (BAP), 0.5 mg.L⁻¹ de ácido indolacético (AIA) y 0.3 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) (Solis, Olivera, & La Rosa, 2011). El material vegetal sano proveniente de la fase II, fue

incubado por 21 días a las mismas condiciones para evaluar la tasa de multiplicación, número de hojas, altura y diámetro del tallo.

En la Figura 20 se puede observar el biorreactor de inmersión temporal de vasos gemelos (BIT), el mismo que consta de dos frascos, en uno de ellos se colocaron las yemas axilares de papaya provenientes de la fase III y en el otro frasco el medio de cultivo líquido MS suplementado con reguladores de crecimiento: 0.5 mg.L^{-1} de benzil adenina (BAP), 0.5 mg.L^{-1} de ácido indolacético (AIA) y 0.3 mg.L^{-1} de ácido giberélico (GA_3) (Solis, Olivera, & La Rosa, 2011). La tabla 5 indica los tratamientos que se realizaron en esta etapa de multiplicación *in vitro* de explantes de *Carica papaya* variedad Maradol. El material vegetal fue incubado en el área de desarrollo a una temperatura de 25°C , humedad relativa del 66%, con fotoperiodo de 12 horas de iluminación por día, frecuencia de inmersión de 6 horas y 200 ml de medio de cultivo. Se evaluó por 21 días la tasa de multiplicación, número de hojas, altura y diámetro del tallo.



Figura 20. Biorreactor de Inmersión Temporal de Vasos Gemelos (BIT)

4.3. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico INFOSTAT, para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos establecidos. Se realizó un ANOVA, prueba de contraste de medias de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

Las hipótesis de este proyecto de investigación son:

- Hipótesis nula (H_0): no existen diferencias significativas entre los tratamientos cuando el valor de p es superior a 0.05.
- Hipótesis alternativa (H_1): si existen diferencias significativas entre los tratamientos cuando el valor de p es menor a 0.05.

5. Capítulo V. Resultados y Discusión

5.1. Desinfección del material vegetal

El origen de la contaminación microbiana puede presentarse por microorganismos endógenos, microorganismos superficiales o por la manipulación del material vegetal en el área de trabajo (Hernandez & Gonzalez, 2010). Por lo tanto, es importante establecer un protocolo de desinfección adecuado para evitar pérdidas del material vegetal por contaminación. Los resultados en este trabajo muestran que el T0 (lavados con agua estéril) tuvo un alto porcentaje de contaminación por hongos (91.25%) (Anexo 2), sin oxidación del material vegetal. En el tratamiento T1 (2% NaClO por 5 minutos) se evidenció contaminación por hongos (22.5%); por el contrario, en los tratamientos 2 y 3 (2% NaClO por 6 y 8 minutos) no se observó contaminación en el material vegetal, como se muestra en la Figura 21. El análisis estadístico de los resultados indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos, por lo tanto se acepta la H_1 ($p < 0.05$) y se rechaza la H_0 .

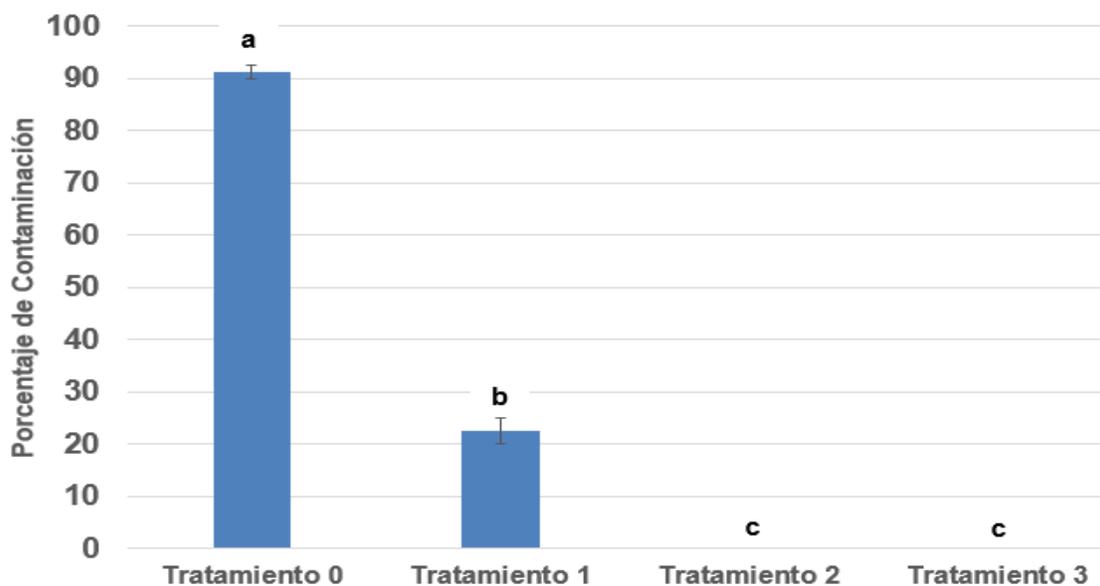


Figura 21. Evaluación de la contaminación de yemas axilares de papaya variedad “Maradol” a los 21 días de siembra. Test de Tukey con α 0.05: medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

En la Figura 22 se puede observar que los tratamientos con un tiempo de inmersión de 6 y 8 minutos, fueron eficientes para la desinfección de yemas axilares de papaya.

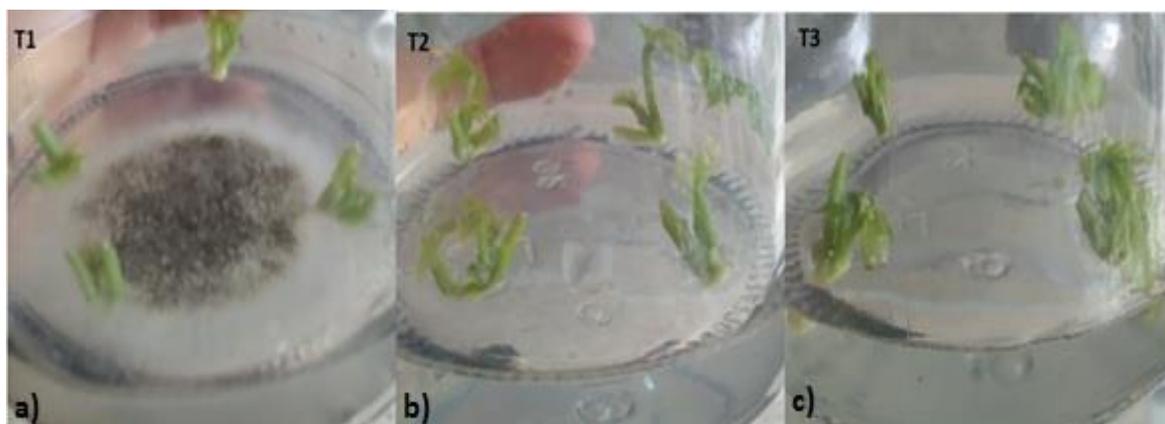


Figura 22. Tiempo de inmersión de yemas axilares en hipoclorito de sodio al 2%.

- a) T1 muestra sumergida por 5 minutos
- b) T2 muestra sumergida por 6 minutos
- c) T3 muestra sumergida por 8 minutos.

En este trabajo, los resultados indican que en la desinfección de yemas axilares de papaya con etanol al 70% por 1 minuto, hipoclorito de sodio al 2% por 6 y 8 minutos y tres lavados con agua destilada estéril, se obtuvo el 100% de supervivencia del material vegetal sin oxidación del mismo. Esto se debe a que las sustancias desinfectantes actúan de forma letal frente a los microorganismos (Perez, 1993). Los alcoholes como el etanol, presentan una actividad antimicrobiana en concentraciones óptimas (60-90%), generando desnaturalización de enzimas esenciales para el microorganismo (Avanza, Sádaba, Mediavilla, & Flórez, 2003). El hipoclorito de sodio es un agente de amplio espectro cuyo mecanismo de acción es la inhibición enzimática por la oxidación de los grupos S-H, provocando cambios en la permeabilidad de la membrana causando lisis celular. Se ha visto que en bacterias Gram positivas y Gram negativas (no esporuladoras) tiene la capacidad de penetrar la pared celular, siendo más efectiva que otros compuestos como el amonio cuaternario (Aldana & Sarassa, 1999) (Anexo 3).

Los resultados obtenidos se asemejan con otras investigaciones, donde utilizan agentes desinfectantes como el etanol al 70% por 1 minuto, hipoclorito de sodio al 10% por 20 minutos, seguido de lavados con agua destilada estéril. Este protocolo fue eficiente para la desinfección de yemas axilares de *Carica papaya L.* variedad "Rainbow" (Capla & Cheah, 2016). En este trabajo resultó eficiente la desinfección del material vegetal con una concentración menor de hipoclorito de sodio por menos tiempo (2% NaClO por 6 y 8 minutos).

Es importante conocer que la concentración de estas sustancias químicas pueden aumentar la tasa de mortalidad en esta etapa inicial, esto lo afirma Maassen & Olsen (2007), donde indican que altas concentraciones de hipoclorito de sodio (>50%) por tiempos prolongados (>10 minutos) puede generar necrosis el tejido vegetal debido a su efecto fitotóxico, causando estrés oxidativo en el explante por

la presencia de radicales libres, los mismos que alteran los mecanismos antioxidantes y destruyen biomoléculas esenciales para la supervivencia de la planta (Azofeifa, 2009). En este trabajo no se evidenció oxidación del material vegetal (Figura 23) debido a que las concentraciones de NaClO y el tiempo de inmersión fueron los adecuados para la desinfección de yemas axilares de papaya.



Figura 23. Yemas axilares de papaya variedad “Maradol” sin oxidación

Los tratamientos 2 y 3 fueron eficientes para la desinfección del material vegetal; sin embargo considero que el tratamiento 2 (hipoclorito de sodio al 2% por 6 minutos) es el adecuado porque se reduce el uso de este agente desinfectante, al igual que el tiempo de inmersión.

5.2. Introducción del material vegetal

Los resultados a los 21 días de evaluación de la oxidación del material vegetal en la etapa de introducción en el medio MS modificado, muestran que las yemas axilares no presentaron oxidación. Se obtuvo un alto porcentaje de supervivencia (96.4%), por lo tanto se considera superada esta etapa. En la Figura 24 se muestran yemas axilares de la fase de introducción.



Figura 24. Yemas axilares de *Carica papaya* L. de la etapa de introducción en medio de cultivo MS suplementado con 1.0 mg.L^{-1} de ácido giberélico (GA_3) y 2.0 mg.L^{-1} de kinetina.

El medio de cultivo utilizado en la introducción *in vitro* fue eficiente para el crecimiento de las yemas axilares de papaya, gracias a los macronutrientes, micronutrientes y vitaminas que componen el medio MS. Este protocolo de introducción fue efectivo para aumentar el crecimiento celular y la proliferación de brotes gracias a la acción de los reguladores de crecimiento como el ácido giberélico y la kinetina en concentraciones de 1.0 mg.L^{-1} y 2.0 mg.L^{-1} respectivamente. Varios autores mencionan que la interacción de estas fitohormonas en concentraciones adecuadas favorece el crecimiento celular, aumentando así el coeficiente de multiplicación del material vegetal en el medio semi-sólido (Mousumi, Sukumar, & Barid, 1994).

5.3. Micropropagación Tradicional

En la micropropagación tradicional se evaluó el número de hojas, altura, diámetro del tallo y tasa de multiplicación. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7.

Multiplicación in vitro de yemas axilares en medio semi-sólido

Número de hojas	1.88 ± 0.02
Altura (cm)	1.12 ± 0.04
Diámetro del tallo (cm)	0.43 ± 0.01
Tasa de multiplicación	1.20 ± 0.02

En la Figura 25 se pueden observar las yemas axilares de papaya obtenidas de la multiplicación *in vitro*. La media de los resultados obtenidos indica que el material vegetal alcanza una altura de 1.12 ± 0.04 , con un diámetro de 0.43 ± 0.01 , con un número de hojas de 1.88 ± 0.02 y una tasa de multiplicación de 1.20 ± 0.02 . Además, no se observó oxidación y se obtuvo un alto porcentaje de supervivencia (83.33%).



Figura 25. Yemas axilares de *Carica papaya L.* de la etapa de multiplicación en medio de cultivo MS suplementado 0.5 mg.L^{-1} de benzil adenina (BAP), 0.5 mg.L^{-1} de ácido indolacético (AIA) y 0.3 mg.L^{-1} de ácido giberélico (GA_3).

El medio de cultivo utilizado en la fase de la micropropagación en medio semi-sólido fue eficiente para obtener una mayor proliferación de brotes. Los reguladores de crecimiento, como el ácido indolacético, benzil adenina y el ácido

giberélico en concentraciones de 0.5 mg.L^{-1} , 0.5 mg.L^{-1} y 0.3 mg.L^{-1} respectivamente; entran en contacto con el material vegetal y envían su información para que las células vegetales empiecen a diferenciarse. Cuando reciben estas señales se desencadena una serie de procesos metabólicos y osmóticos (Vidal, 2008). La combinación de estas fitohormonas fue el adecuado para promover el crecimiento y desarrollo óptimo en el proceso de multiplicación. No se observó la presencia de callos en las yemas de papaya, esto se debe a que el balance entre las auxinas y citoquininas fue el adecuado para evitar la formación de células indiferenciadas (Aspeitia, Torres, Mendoza, & Reyes, 2014). La adición de giberelinas en el medio de cultivo produce un crecimiento normal del material vegetal, es decir permiten la elongación del tallo y el apareamiento de nuevos brotes, en combinación con los reguladores de crecimiento utilizados en esta fase (Singh, Jermakow, & Swain, 2002). Al igual que al adicionar citoquininas como benzil adenina, se rompe la dominancia apical y promueve el crecimiento de nuevos brotes porque interviene en la fase G_2 y M del ciclo celular en asociación con auxinas (Kurina, 2009). (Pierik, 1990).

La tasa de multiplicación de yemas axilares de papaya fue baja en comparación con otros estudios. En el trabajo de Rohman (2007) se obtuvo una alta tasa de multiplicación (2.5) al combinar BAP, GA_3 , AIA y adenina. En este trabajo, el coeficiente de multiplicación fue menor (1.2), esto podría deberse a que la relación entre la concentración de las fitohormonas y la velocidad de crecimiento no fue el adecuado para obtener mayor proliferación de brotes. Por lo tanto, se podría evaluar la concentración de fitohormonas responsables de la proliferación celular para incrementar la multiplicación *in vitro* de yemas axilares de papaya variedad "Maradol" en medio semi-sólido.

5.4. Micropropagación en BIT

El material vegetal sano fue trasladado al BIT, durante 21 días se evaluó la tasa de multiplicación, el número de hojas, el diámetro del tallo y la altura. En la Figura 26 se puede observar el BIT utilizado para la micropropagación de yemas axilares de papaya variedad “Maradol”.

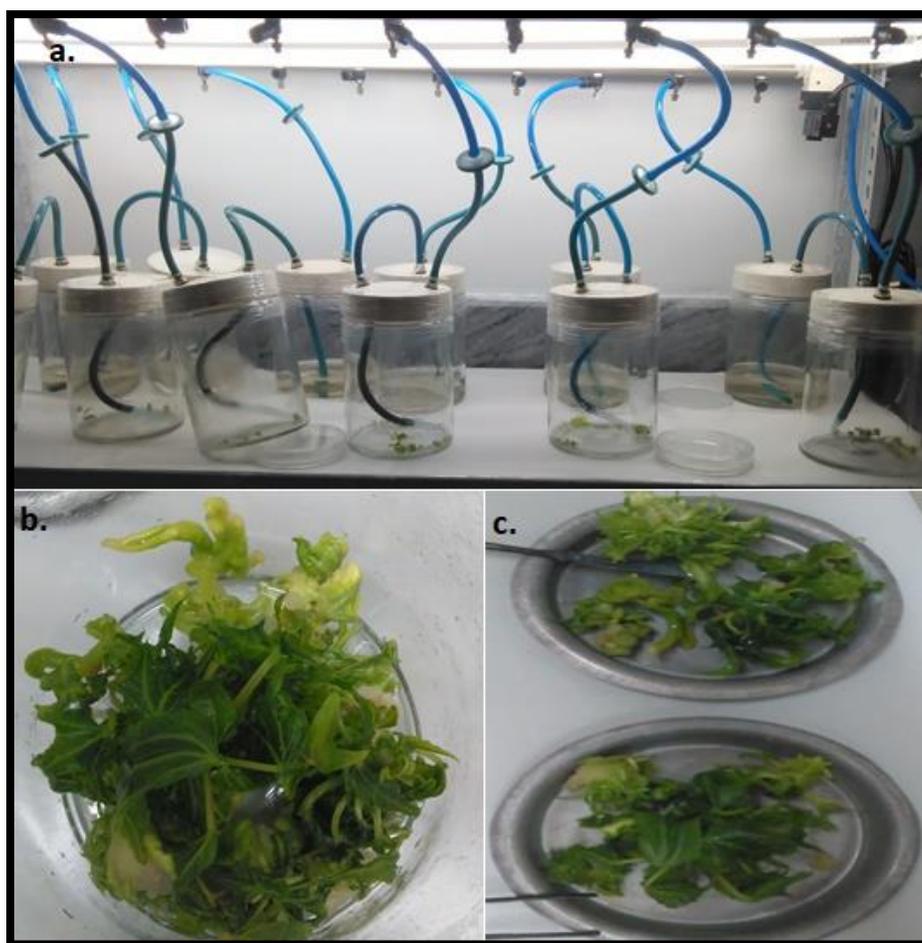


Figura 26. Multiplicación de yemas axilares de papaya en medio líquido

a) Biorreactor de inmersión temporal

b) Plántulas de papaya obtenidas del BIT

c) Clasificación de plántulas de papaya

El análisis estadístico de los resultados indica que siguen una distribución normal; por lo tanto se realizó un análisis de varianza y la prueba de contraste de medias Tukey con un nivel de significancia de 0.05. En la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos de las variables de estudio. Con respecto a la tasa de multiplicación, el tratamiento 4 (tiempo de inmersión 2 minutos, frecuencia: 6 horas, densidad del inóculo: 8 explantes por unidad de BIT) presentó una mayor proliferación de brotes axilares (5.04 ± 0.06), puesto que existen diferencias significativas en cuanto a los tratamientos T1 (1.77 ± 0.02), T2 (2.52 ± 0.38) y T3 (3.48 ± 0.02). Por lo tanto se acepta la H1 ($p < 0.05$) y se rechaza la Ho. El análisis estadístico de los resultados con respecto al número de hojas indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el T4 (tiempo de inmersión 2 minutos, frecuencia: 6 horas, densidad del inóculo: 8 explantes por unidad de BIT), el mejor tratamiento con una media de 6.03 ± 0.04 . Por lo tanto se rechaza la Ho y se acepta la H1 ($p < 0.05$). De la misma manera se analizaron los resultados de la variable altura, el análisis estadístico indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos. Los mejores tratamientos resultaron ser el 4 (tiempo de inmersión 2 minutos, frecuencia: 6 horas, densidad del inóculo: 8 explantes por unidad de BIT) y el 3 (tiempo de inmersión 2 minutos, frecuencia: 6 horas, densidad del inóculo: 4 explantes por unidad de BIT) con una media de $1,65 \pm 0.10$ y $1,71 \pm 0.002$ respectivamente. Se acepta la H1 ($p < 0.05$) y se rechaza la Ho. Finalmente, el análisis estadístico de los resultados para el diámetro del tallo de las plántulas de papaya indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento 4 (tiempo de inmersión 2 minutos, frecuencia: 6 horas, densidad del inóculo: 8 explantes por unidad de BIT) resultó ser el mejor con una media de 0.73 ± 0.02 . Por lo tanto se acepta la H1 ($p < 0.05$) y se rechaza la Ho.

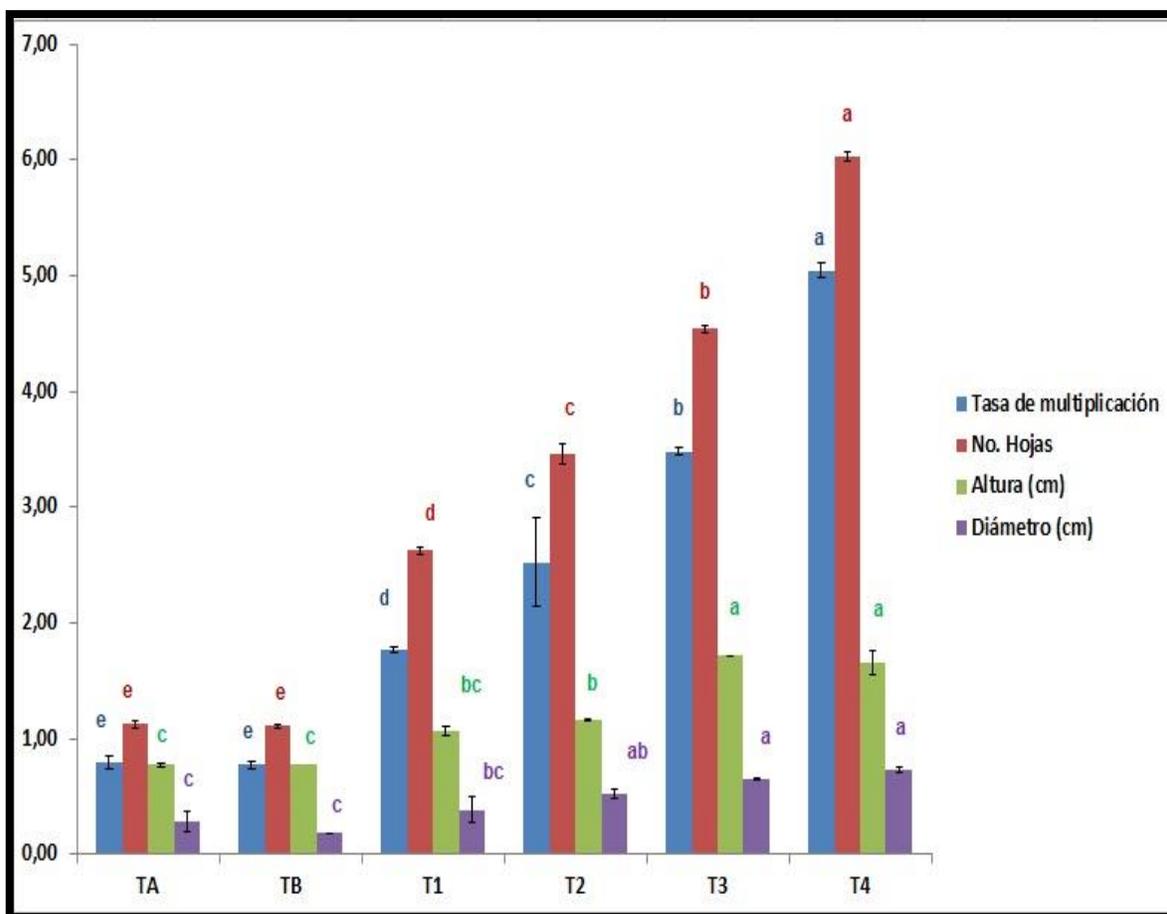


Figura 27. Evaluación de las variables dependientes (tasa de multiplicación, número de hojas, altura y diámetro del tallo) frente a los tratamientos establecidos en el diseño factorial 2^2 . Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

La micropropagación de yemas axilares de papaya variedad “Maradol” en BIT, demostró ser una herramienta eficiente para aumentar la tasa de multiplicación, número de hojas, altura y diámetro del tallo. En la Figura 28 se muestran las plántulas obtenidas de los tratamientos T1-T4 de la multiplicación en BIT; en la Tabla 8 se muestran los resultados de la fase III y IV.

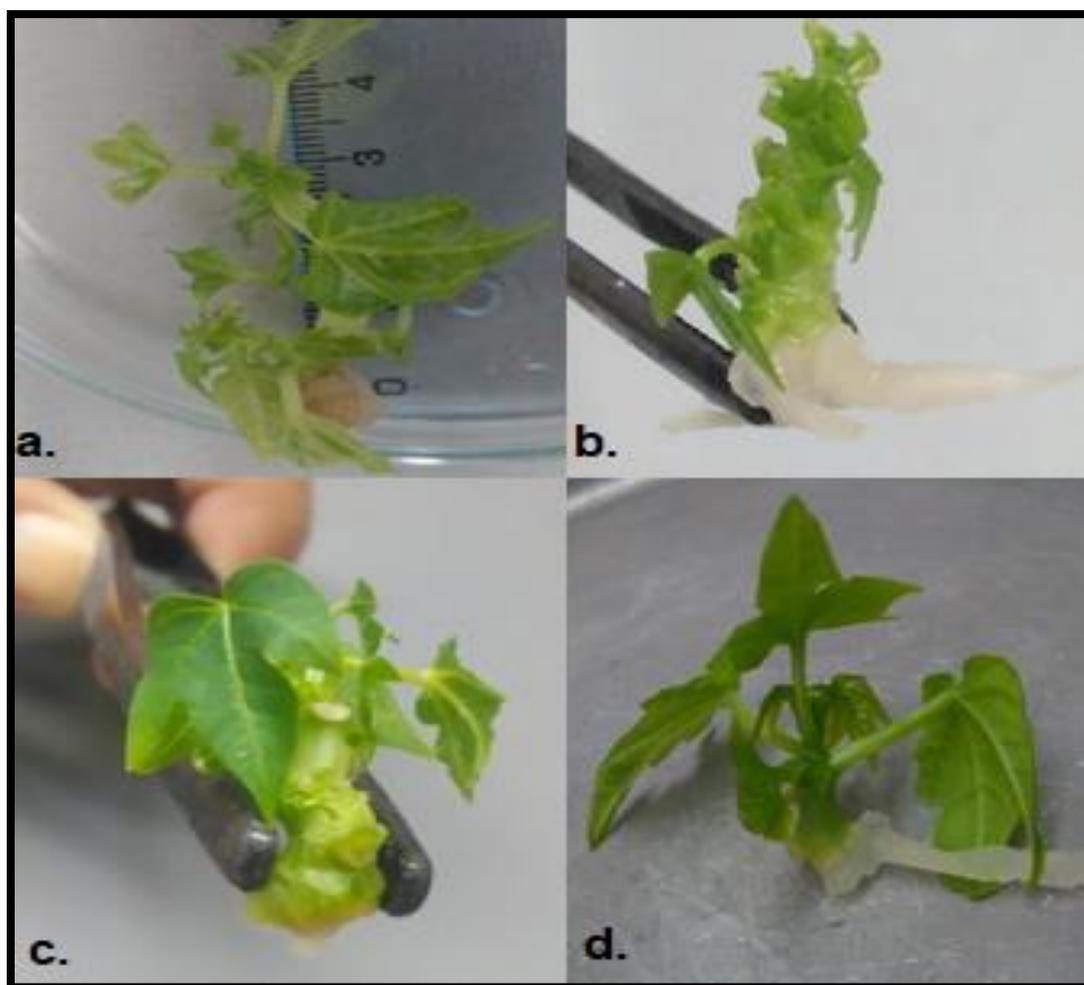


Figura 28. Micropropagación de yemas axilares de Carica papaya L. variedad “Maradol” en el Biorreactor de Inmersión Temporal de Vasos Gemelos (BIT)

a) Mejor tratamiento T4 con un tiempo de inmersión 2 minutos, frecuencia: 6 horas, densidad del inóculo: 8 explantes por unidad de BIT

b) T3 con un tiempo de inmersión 2 minutos, frecuencia: 6 horas, densidad del inóculo: 4 explantes por unidad de BIT

c) T2 con un tiempo de inmersión 1 minutos, frecuencia: 6 horas, densidad del inóculo: 8 explantes por unidad de BIT

d) T1 con un tiempo de inmersión 1 minutos, frecuencia: 6 horas, densidad del inóculo: 4 explantes por unidad de BIT.

Tabla 8.

Micropropagación de yemas axilares de Carica papaya L. variedad "Maradol"

Variables Dependientes	Micropropagación convencional *	BIT (T4) **
T. Multiplicación (No. Brotes por yema)	1.20 ± 0.02	5.05 ± 0.06
No. Hojas	1.88 ± 0.02	6.03 ± 0.04
Altura (cm)	1.12 ± 0.04	1.65 ± 0.10
Diámetro (cm)	0.43 ± 0.01	0.73 ± 0.02

Nota: ** Mejor tratamiento de multiplicación de yemas axilares. Edad del material vegetal *63 días y **84 días.

La micropropagación en BIT resultó ser una alternativa para la micropropagación de yemas axilares de papaya, esto se refleja en los resultados obtenidos con respecto a las variables dependientes: tasa de multiplicación, número de hojas, altura y diámetro del tallo. Esta alternativa de multiplicación ha permitido reducir los costos de operación mediante el uso de un medio de cultivo líquido (MS suplementado con 0.5 mg.L⁻¹ de benzil adenina, 0.5 mg.L⁻¹ de ácido indolacético y 0.3 mg.L⁻¹ de ácido giberélico). Además, el proceso es semi-automatizado y fácil manipulación, reduciendo la mano de obra, aumentando la tasa de multiplicación para finalmente obtener plantas con mejor vigor en comparación con aquellas provenientes de la micropropagación tradicional (Berthouly & Etienne, 2005).

En este estudio, los resultados no difieren del estudio realizado por García y colaboradores (2015), donde la tasa de multiplicación promedio de brotes axilares de papaya en el sistema RITA fue de 5.7 para las tres líneas de inmersión: 1, 2 y 5 minutos cada 4 horas. En el trabajo de Damiano y colaboradores (2003), obtuvieron una tasa de multiplicación muy alta (24 ±3.32) en el sistema BIT, con

un tiempo de inmersión de 60 minutos al día, en el medio de cultivo líquido MS suplementado con 0.15 mg. L^{-1} de BAP y 0.015 mg. L^{-1} de AIB. Sin embargo, los brotes presentaban menor tamaño y se dificultaba el pase a la fase enraizamiento. En este trabajo los brotes alcanzaron un tamaño similar ($<2 \text{ cm}$) a la multiplicación en el sistema RITA, esto se debe al rol que cumplen las fitohormonas en el explante vegetal. Por otra parte, la tasa de multiplicación (5.05) fue similar a la obtenida en la multiplicación de café (Berthouly & Etienne, 2005) y en banano (Alvard & Teosson, 1993), con un tiempo de inmersión de 20 minutos cada 2 horas. Por el contrario, Colmenares & Giménez (2003) obtuvieron tasas mucho más altas en banano cv. Williams (8.4) y plátano Hartón (11.2), en tiempos de inmersión de 20 minutos cada 4 horas. Esto indica que tiempos prolongados, frecuencias superiores a las 4 horas y mayor densidad de inóculo se podría obtener mayor proliferación de brotes (T4: tiempo de inmersión 2 minutos; frecuencia de inmersión 6 horas; densidad del inóculo 8 explantes por unidad de BIT). Escalona (2005) menciona que la frecuencia de inmersión no es un parámetro que incide de forma directa en la obtención de plántulas; por el contrario, el tiempo de inmersión incide directamente en la proliferación de brotes, siendo una inmersión de 2 minutos determinante para obtener una tasa de multiplicación de 5.05; es decir, a mayor número de explante por unidad de BIT, mayor es la tasa de multiplicación, esto se comprueba con los resultados obtenidos en este estudio, donde el tratamiento 4 alcanzó una mayor proliferación de brotes, con una densidad de inóculo de 8 explantes por unidad de BIT.

Estos resultados se pueden comparar con investigaciones realizadas con begonias, linium, orquídeas, banano, café y plátano, en donde las frecuencias de inmersión son prolongadas con tiempos de inmersión cortos, resultando un mayor número de brotes y por ende mayor coeficiente de multiplicación (Berthouly & Etienne, 2005).

Los brotes obtenidos de esta multiplicación fueron más alargados que los tratamientos control (TA: 0.29; TB: 0.19), cuyo aspecto fue en forma de macollo, sin formación de callo; esto se asemeja con los resultados de García y colaboradores (2015). Esta proliferación se logró al adicionar fitohormonas al medio de cultivo líquido, que generan una ruptura de la dominancia apical, estimulando la proliferación de brotes (García, et al., 2015). Por otro lado, al adicionar giberelinas aumenta la elongación celular; y las auxinas inducen la formación de raíces (Escalona, 2005). Por esta razón, los brotes multiplicados en el sistema BIT alcanzaron una mayor altura y algunos llegaron a formar raíces (Anexo 4). En este estudio, la tasa de multiplicación en BIT fue mayor, más del doble, en comparación con la micropropagación tradicional (1.20). En este último caso, los brotes axilares fueron pequeños (1.12 ± 0.04) y sin apareamiento de raíces en el medio de multiplicación semi-sólido. La longitud de las especies vegetales en campo va desde los 5 cm hasta los 30 cm; por lo cual, estas plántulas de papaya *in vitro* deben alcanzar un tamaño similar para lograr una mejor adaptación en campo (Martínez & Galotti, 2001). La autora indica que a mayor concentración de citoquininas en sinergia con brasinólidos, se puede obtener una mayor proliferación de brotes (Roca & Mroginski, 1991).

Por otro lado, el número y tamaño de hojas también ejercen su efecto en la proliferación de brotes. Escalona (2005) menciona que el crecimiento acelerado de las hojas puede generar una disminución en el coeficiente de multiplicación, ya que genera una gran acumulación de biomasa con un crecimiento excesivo del follaje, esto se ha observado en piña, banano, ñame y gladiolo. Para contrarrestar este efecto, se puede utilizar retardantes de crecimiento como el paclobutrazol (PBZ), cuya función es inhibir el crecimiento de los nudos y por ende la producción de nuevos brotes. En este trabajo no se evidenció su efecto en la tasa de multiplicación, al contrario, aumenta progresivamente, siendo innecesario el uso de PBZ en el cultivo de papaya.

Además, no se encontraron problemas con hiperhibrididad o vitrificación del material vegetal, debido al estricto control en el tiempo y frecuencia de inmersión. Los autores recomiendan el uso de soportes físicos, como la celulosa o esponjas para sostener el explante en el medio de cultivo (Berthouly & Etienne, 2005). De igual manera, Damiano (2003), Posada (2003) y García (2015), no encontraron problemas de vitrificación o hiperhibrididad del material vegetal.

Finalmente, la micropropagación de yemas axilares de papaya en BIT se considera una alternativa eficiente para aumentar la tasa de multiplicación en papaya; tras evaluar dos de los parámetros que determinan la eficiencia de operación se puede confirmar su aplicación a nivel comercial. Además, al emplear el medio de cultivo líquido permite que el explante vegetal tome fácilmente los nutrientes cuando está en contacto intermitente en un tiempo y frecuencia establecida. Este contacto reduce la toxicidad evitando pérdidas del material vegetal, a diferencia de la multiplicación tradicional donde se presenta mayormente este efecto (Korneva, Flores, Santos, & Mendoza, 2013).

El tiempo de multiplicación en las etapas iniciales (desinfección, introducción, multiplicación en medio semi-sólido) tomó aproximadamente 5 meses y para los tratamientos en BIT se invirtieron 3 meses de investigación. Además, el costo del agente gelificante fue excluido, ya que el medio de cultivo que se utilizó es líquido. También mencionan que el 70% del costo total representa el agar o el agente gelificante que se utiliza en la multiplicación tradicional (Pucchoa, Purseramen, & Rujbally, 1999). De igual manera, al utilizar el sistema de inmersión temporal de vasos gemelos se invirtió aproximadamente \$70, a diferencia del sistema RITA cuyo valor supera los \$4000. Además, el costo aproximado de una planta *in vitro* en medio semi-sólido es 0.10 centavos, mientras que al utilizar la multiplicación en BIT se reduce a 0.01 centavos. La inversión inicial del BIT es alta debido a los insumos y equipos empleados, sin embargo el costo-beneficio de este sistema

permite recuperar el capital invertido en poco tiempo. Según Doran (1998), los biorreactores bajo condiciones adecuadas permiten el escalado del proceso, su funcionamiento correcto depende la aireación, del tamaño de las burbujas, del volumen y de la acumulación de biomasa. Estos parámetros influyen directamente en el crecimiento de la planta. Estos factores deben controlarse para evitar efectos cizalla en el explante vegetal y aumentar la eficiencia de operación de este sistema, estimulando la proliferación de brotes (Gupta & Ibaraki, 2008). Dichos factores en BIT son difíciles de obtener en la práctica, debido a que el tiempo de la mezcla del material vegetal en el medio de cultivo líquido, y el consumo están relacionados íntimamente (Doran, 2013). Sin embargo, no existe alguna fórmula que permita establecer que estos parámetros en escala piloto puedan controlarse en escala comercial, ya que conforme aumenta el volumen de capacidad, aumentan los parámetros y se dificulta su control. Los autores sugieren incrementar la potencia del compresor de aire para aumentar la presión en este sistema, y que a su vez el flujo de aire que ingresa sea mayor, por ende puede aumentar la proliferación de los brotes (Doran, 2013).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

Tiempos de inmersión prolongados (6 y 8 minutos) en hipoclorito de sodio al 2% resultó ser la mejor alternativa para la desinfección del material vegetal, obteniendo el 100% de supervivencia, sin oxidación del explante.

La multiplicación de yemas axilares en el Biorreactor de Inmersión Temporal de Vasos Gemelos es una alternativa para la micropropagación de papaya, al utilizar el medio MS líquido suplementado con 0.5 mg.L^{-1} de benzil adenina (BAP), 0.5 mg.L^{-1} de ácido indolacético (AIA) y 0.3 mg.L^{-1} de ácido giberélico (GA_3).

A mayor tiempo de inmersión del material vegetal en medio líquido se obtiene una mayor tasa de multiplicación (5.05 ± 0.06). El tiempo de inmersión (2 minutos) y la densidad del inóculo (8 explantes por unidad de BIT) son dos parámetros que determinan la eficiencia de este sistema.

6.2. Recomendaciones

Se recomienda evaluar otros parámetros que determinan la eficiencia de multiplicación de yemas axilares en BIT, tales como, frecuencia de inmersión, volumen de medio de cultivo, capacidad del recipiente, subcultivos, empleo de retardantes del crecimiento, tipo y manejo de explantes vegetales.

Se recomienda estudiar los parámetros fisiológicos para aumentar la tasa de supervivencia en campo, estos parámetros pueden ser, la concentración de

clorofila, densidad estomática, metabolismo del carbono, actividad fotosintética, asimilación de nutrientes, actividad enzimática.

REFERENCIAS

- Agricultura, I. (1989). Compendio de Agronomía Tropical. San José: El Ministerio..
- Albarracín, C. (2012). Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación in vitro de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales. (Tesis inédita de Ingeniería). Quito: Escuela Politécnica del Ejército.
- Aldana, L., & Sarassa, S. (1999). Efecto de desinfectantes y antimicrobianos naturales frente a cepas de *Listeria monocytogenes*. Bogotá: Universidad Javeriana.
- Alonso, E., Ramos, R., & Torne, Q. (2006). Caracterización y evaluación de los recursos genéticos de papaya (*Carica papaya* Linn). Recuperado el 02 de julio de 2017 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11679/38377>
- Alvard, D., & Teosson, C. (1993). *Comparison of methods of liquid medium for banana micropropagation*. Recuperado el 05 de julio de 2017 de http://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=520309
- Arrieta, G. (1996). Embriogénesis somática in vitro a partir de láminas foliares de papaya (*Carica papaya* L.) provenientes de la multiplicación clonal con yemas axilares de plántulas adultas y de plántulas germinadas in vitro. (Tesis de Maestría). Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Aspeitia, V., Torres, M., Mendoza, D., & Reyes, H. (2014). Evaluación de marcadores genéticos para discriminación entre hembras y hermafroditas de papaya (*Carica papaya* L.) variedad "Maradol" . Recuperado el 02 de agosto de 2017 de

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802014000300003

- Aular, J., & Casares, M. (2011). Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela. Recuperado el 12 de julio de 2017 de <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v33nspe1/a22v33nspe1.pdf>
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. Recuperado el 15 de julio de 2017 de http://www.mag.go.cr/rev_mesov20n01_153.pdf
- Baca, A. (2002). Optimización de la micropropagación in vitro de Carica papaya L. (Tesis inédita de Ingeniería). Lima: Universidad Nacional Agraria .
- Banergee, J. (2002). *Tissue culture and transformation studies in indian cultivars of papaya (Carica papaya L.)*. Recuperado el 16 de julio de 2017 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/368/html>
- Becerra, N., & Chaparro, M. (1999). Morfología y anatomía vegetal. Recuperado el 17 de agosto de 2017 de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/20124/21206
- Berthouly, M., & Etienne, H. (2005). *Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. Liquid Culture for in vitro*. Recuperado el 19 de julio de 2017 de http://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=533338
- Brar, D., & Khush, G. (1994). *Cell and Tissue culture for plant improvement. Mechanisms of plant growth and improved productivity*. New York: Basra.
- Brasali, M., Medero, V., Otero, E., Torres, M., López, J., Cabera, M., Beovidez, Y. (2012). Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la multiplicación in vitro del cultivar de plátano vianda "INIVITPV06-

30" (Musa AAB). Recuperado el 12 de agosto de 2017 de <http://132.248.9.34/hevila/Biotecnologiavegetal/2012/vol12/no1/6.pdf>

Capla, A., & Cheah, K. (2016). *Micropropagation of Hermaphrodite Carica papaya L. Rainbow Seedlings via Axillary Bud Pathway*. Recuperado el 12 de julio de 2017 de <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/BIO-12.pdf>

Capote, I., Escalona, M., Daquinta, M., Pina, D., González, J., & Aragón, C. (2009). Efecto del análogo de Brasinoesteroide (MH5) en la aclimatización de los brotes de Vriesea propagados en Sistema de Inmersión Temporal. Recuperado el 23 de agosto de 2017 de http://uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_articulo_5_200921.pdf

Chagas, J., & Soares, M. (2003). *Nocoes de Cultivo de Tecidos Vegetais*. Recuperado el 26 de octubre de 2017 de <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/18311/1/DOC157.pdf>

Clouse, S., & Sasse, L. (1998). *Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development*. *Plant Physiol*, 49, 427-451. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.427

Colmenares, M., & Giménez, C. (2000). Nuevas estrategias para la inducción de brotes en Musáceas. Venezuela: Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Zulia. Recuperado el 23 de agosto de 2017 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362008000300005

Cruz, M., & Portal, O. (2010). Estrategias para la obtención de plantas transgénicas de papaya con resistencia al virus de la mancha anular de la papaya (PRSV). *Biotecnología Vegetal*, 10(4), 195-207. Recuperado el 12 de octubre de 2017 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/287/817>

- Doran, P. (2013). *Bioprocess Engineering Principles*. San Diego: Academic Press.
- Escalona, M. (2005). *Scaling-up plant production by temporary immersion and quality of regenerants*. Cuba: Centro de Bioplantitas de la Universidad de Ciego de Ávila. Recuperado el 12 de septiembre de 2017 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522016000300008
- FAOSTAT. (2012). *Crop Production*. Recuperado el 27 de Mayo de 2017, de <http://www.faostat.fao.org/site/535/default.aspx#ancor>.
- Fec. (2002). *Manual Técnico de Buenas Prácticas Agrícolas en Papaya*. Recuperado el 25 de Junio de 2017, de http://www.fec-chiapas.com.mx/sistema/biblioteca_digital/886buenaspracticaspapaya.pdf
- Ferraguetti, G. (2003). *Caliman01-O primeiro híbrido de mamão Formosa Brasil: qualidade do mamão para mercado interno*. *Incaper*, 211-218.doi: 10.1590/0100-2945-069/14.
- Fitch, M., Leong, T., Akashi, L., Yeh, A., White, S., De la Cruz, A., Moore, P. (2005). *Growth and yield of clonally propagated and seeding-derived papayas. i. growth. li. Yield*. Recuperado el 24 de julio de 2017 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/50718>
- Fonnegra, R., & Jiménez, S. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Recuperado el 13 de agosto de 2017 de <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/revistaudea/article/view/1722/5547>
- Fonseca, M., Mavituna, F., & Brodelius, P. (1998). *Engineering aspects of plant cell culture*. Recuperado 15 de octubre de 2017 de <http://www.springer.com/us/book/9783540938828>
- Font, P. (1965). Diccionario de botánica. Barcelona: Labor S.A. Recuperado el 16 de octubre del 2017 de

<http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/prodanimal/informacion/biblio.pdf>

- Gallardo, J., Posada, L., Kosky, R., Reyes, M., & Herrera, L. (2002). Micropropagación del híbrido Cubano de Papaya IBP 42-99. Recuperado 18 de octubre de 2017 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/447>
- García, A., Sandrea, Y., González, O., Díaz, A., Albarran, J., Schmidt, A., Marín, C. (2015). *Micropropagation of papaya plants in temporary immersion recipients from axillary shoots*. Recuperado el 18 de agosto de 2017 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/50718/51946>
- Gil, A., & Miranda, D. (2005). Morfología de la flor y de la semilla de papaya (*Carica papaya* L.) variedad Maradol e híbrido Tainung-1 . Recuperado el 29 de julio de 2017 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/viewFile/19944/21087>
- Gupta, D., & Ibaraki, Y. (2008). *Plant Tissue Culture Engineering*. Recuperado el 02 de julio de 2017 de <http://www.springer.com/gp/book/9781402035944>
- Guzmán, G. (1998). Guía para el Cultivo de Papaya. Recuperado el 23 de Mayo de 2017, de http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec_papaya.pdf.
- Hernandez, Y., & Gonzalez, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. Recuperado el 04 de julio de 2017 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015

- Ikeda, A., Ueguchi, Y., Sonoda, H., Kitane, M., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Yamaguchi, J. (2001). *Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the Sl.R1 gene, an ortholog of the height regulating gene*. Recuperado el 17 de julio de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11340177>
- Islam, R., Rahman, S., Hossain, M., & Joarder, O. (1993). *In vitro clonal propagation of papaya (Carica papaya L.)*. Recuperado el 03 de julio de 2017 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/447>
- Jiménez. (1995). *Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems*. Recuperado el 05 de julio de 2017 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/437>
- Jiménez, J. (2002). Manual práctico para el cultivo de papaya hawainana. Recuperado el 18 de julio de 2017 de <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/90022688.pdf>.
- Kato, M., Hikosaka, K., & Hirose, T. (2002). *Leaf discs floated on water are different from intact leaves in photosynthesis and photoinhibition*. *Photosynth*, 72, 65-70. doi: 10.1023/A:1016097312036
- Korneva, S., Flores, J., Santos, E. P., & Mendoza, J. (2013). *Plant regeneration of plantain "Barraganete" from somatic embryos using a temporary immersion system*. Recuperado el 19 de julio de 2017 de <http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v30n4/bta03413.pdf>
- Kurina, M. (2009). *Reguladores de crecimiento y cultivo vegetal*. San Luis: Universidad Nacional de San Luis. Recuperado el 25 de octubre de 2017 de <http://agropecuarios.net/reguladores-del-crecimiento.html>
- Lai, C., & Yeh, S. (2000). *Enhancement of papaya axillary shoot proliferation in vitro by controlling the available ethylene*. *Botanical Bulletin of Academia* Recuperado el 27 de octubre de 2017 de <https://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2000/3/bot13-05.pdf>

- Levitus, G., Echenique, V., Rubinsteins, C., Hopp, E., & Mroginski, R. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Recuperado el 24 de Junio de 2017, de http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf
- Linneo, C. (1753). *Species Plantarum 2*. Recuperado el 06 de Octubre de 2017, de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/23-caric1m.pdf.
- Lobo, M. (1995). Caracterización bioquímica de frutos de papaya (Carica papaya, cv Sunrise), Hembra y Hermafrodita, en relación con su aptitud al procesado por congelación. (Tesis inédita doctoral). Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Macías, A. (2010). Competitividad de México en el mercado de frutas y hortalizas de Estados Unidos de América. Recuperado el 12 de noviembre de 2017 de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1316-03542010000200003&script=sci_abstract
- Maldonado, E., Rodríguez, L., Gómez, O., & Cárdenas, M. (2003). Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal. *Centro Agrícola*, 30, 69-72. doi: 10.28940/terra.v35i3.193
- Manzaneque, R., Cuevas, J., & Hueso, J. (2008). *Formas florales de la papaya cultivada en invernaderos de Almería*. Recuperado el 12 de noviembre de 2017 de <http://www.fundacioncajamar.es/pdf/bd/comun/transferecia/01b-formas-florares-de-la-papaya-1404812880.pdf>.
- Martínez, S., & Galotti, L. (2001). Las especies de *Eryngium* Sect Foetida en la Argentina. Recuperado el 18 de octubre de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/242628249_Las_especies_de_Eryngium_Section_Foetida_Apiaceae_de_Argentina

- Mora, E. (1998). Variedades de papaya: Estación Experimental Fabio Baudrit Costa Rica. Costa Rica: Universidad de Costa Rica. Recuperado el 16 de octubre de 2017 de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212010000100019&script=sci_arttext&lng=pt
- Mousumi, M., Sukumar, G., & Barid, M. (1994). *Callus culture and plantlet production in Carica papaya (Var. Honey Dew)*. Recuperado el 16 de octubre de 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007%2F00234144>
- Mroginski, L., Sansberro, P., & Flaschland, E. (2002). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Recuperado el 15 de octubre de 2017 de http://www.argenbio.org/adf/uploads/Libro_INTA_II/Parte_I.pdf
- Muñoz, S. (1983). Programa de mejoramiento genético de la fruta bomba Carica papaya L. Recuperado el 19 de octubre de 2017 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/447/html>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco cultures*. Recuperado el 21 de noviembre de 2017 de http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Skoog1962.pdf
- Niemenak, N., Saare-Surminski, K., Rohsius, C., Omokolo, D., & Lieberei, R. (2008). *Regeneration of somatic embryos in Theobroma cacao L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues*. *Plant Cell Report*, 27, 667-676. doi: 10.1007/s00299-007-0497-2
- Orellana, P. (1998). Propagación y mejor genética de plantas por Biotecnología. Villa Clara: J.N. Recuperado el 15 de noviembre de 2017 de <https://lib.ugent.be/en/catalog/rug01:001638941>

- Palomares, M., Vidales-Fernández, I., Guillén, H., & Salgado, R. (2003). *Influencia de espacios de crecimiento, temperaturas e intensidades de luz en la conservación in vitro de germoplasma de aguacate*. Michoacán: Universidad de Michoacana de San Nicolás. Recuperado el 23 de octubre de 2017 de http://www.avocadosource.com/WAC7/Section_14/VidalesFernandezI2011b.pdf
- Payne, G., Shuler, M., & Brodelius, P. (1987). *Large scale plant cell culture*. Munich: Lydersen. doi: 10.1016/0141-0229(91)90104-I
- Perez, J. (1993). Empleo del hipoclorito de sodio NaOCl en sustitución del flameo en el cultivo in vitro. Villa Clara-Cuba: Universidad Central Marta Abreu. Recuperado el 27 de julio de 2017 de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2011100106>
- Pérez, J., Orellana, P., Suárez, M., & Valdés, C. (1998). Propagación masiva en Biofábricas. Villa Clara: Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Recuperado el 12 de octubre de 2017 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/rt/printerFriendly/198/html>
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. España: Mundi-Prensa. doi: 10.4067/S0717-920020080001000007.
- Posada, L. (2005). Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la papaya. *Biotecnología Vegetal*, 5(2), 67-69. Recuperado el 17 de julio de 2017 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/447>
- Preil, W., & Beck, A. (1991). *Somatic embryogenesis in bioreactor culture*. *Act. Hort*, 289, 179-192. Recuperado el 26 de agosto de 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1006455716864>
- ProEcuador. (2015). *Análisis Sectorial de Papaya*: Instituto de Promoción de Exportación e Inversiones. Recuperado el 17 de Octubre de 2017, de

http://www.proecuador.gob.ec/wpcontent/uploads/2015/07/PROEC_AS2015_PAPAYA1.pdf

- Pucchoa, D., Purseramen, P., & Rujbally, B. (1999). *Effects of medium support and gelling agent in the tissue of tobacco*. Mauritius: University of Mauritius.
- Rajeevan, S., & Pandey, R. (1986). *Lateral bud culture of papaya (Carica papaya L.) for clonal propagation*. Recuperado el 26 de agosto de 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00180803>
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Cali: L.A.
- Salehi, H. (1997). *A simple procedure for disinfection of "Baby Masquerade" minature rose explants*. Iran Islamic Republic: Departamento de Agricultura. Recuperado el 18 de agosto de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/283300527_In_Vitro_Culture_of_the_Rosa_Species
- Singh, D., Jermakow, A., & Swain, S. (2002). *Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in Arabidopsos*. Recuperado 18 de octubre de 2017 de <http://www.plantcell.org/content/14/12/3133>
- Solis, R., Olivera, J., & La Rosa, R. (2011). *In vitro propagation of Carica papaya var. PTM-331 from apical meristem*. Recuperado el 27 de octubre de 2017 de <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/v18n3/pdf/a12v18n3.pdf>
- Stiles, J., Lemme, S., Sodur, M., Morshidi, M., & Manshard, R. (1993). *Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars*. Recuperado el 17 de octubre de 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00225007>
- Talavera, C., Espadas, F., Fuentes, G., & Santamaría, J. (2009). *Acclimatization, rooting and field establishment of micropropagated papaya plants*. *Proc*

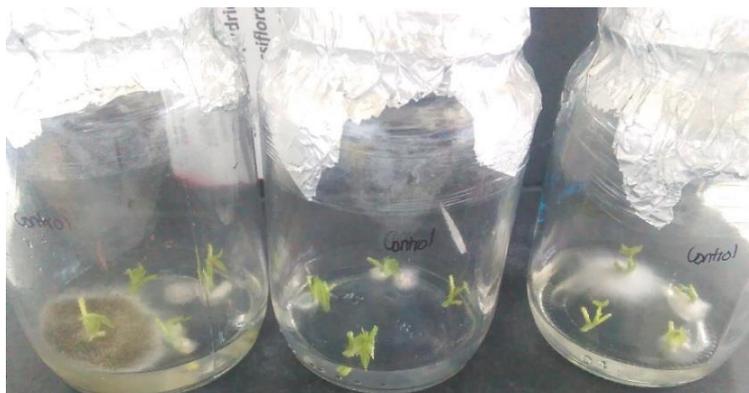
IIIrdIS on Acclim and Establ of Micropropagated Plants, 87-95. Recuperado el 15 de agosto de 2017 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/viewFile/50718/51196>.

- Verni, F. (2014). En Santa Elena ya crece la papaya qye se irá a EE.UU. *El Universo*. Recuperado el 17 de noviembre de 2017 de <http://www.eluniverso.com/noticias/2014/02/08/nota/2150886/santa-elena-ya-crece-papaya-que-se-ira-eeuu>.
- Vidal, G. (2008). Desafíos ambientales en nuestros tiempos. *Avances y perspectivas*, 20, 5-6. Recupeado el 18 de octubre de 2017 de https://www.researchgate.net/profile/Marcus_Sobarzo/publication/40883146_Conceptos_basicos_sobre_medio_ambiente_y_desarrollo_sustentable/links/09e4150acd907248c7000000/Conceptos-basicos-sobre-medio-ambiente-y-desarrollo-sustentable.pdf.

ANEXOS



Anexo 1. *Carica papaya* L. ubicada en el campus del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL).



Anexo 2. Tratamiento control (T0) de la etapa de desinfección de yemas axilares de papaya

Objetivo	Desinfectante
Pared celular	Formaldehído, hipoclorito y mercuriales
Membrana citoplasmática, acción sobre el potencial de la membrana	Anilidas y hexaclorofeno
Enzimas de membrana, acción sobre la cadena de transporte de electrones	Hexaclorofeno
Acción sobre el ATP	Clorhexidina y óxido de etileno
Acción sobre enzimas con grupos -SH	Óxido de etileno, glutaraldehído, peróxido de hidrógeno, hipoclorito, yodo y mercuriales.
Acción sobre la permeabilidad general de la membrana	Alcoholes, clorhexidina y compuestos de amonio cuaternario
Ribosomas	Peróxido de hidrógeno y mercuriales
Ácidos nucleicos Hipocloritos	Hipocloritos
Grupos tiol	óxido de etileno, glutaraldehído, peróxido de hidrógeno, hipoclorito, mercuriales
Grupos amino	Óxido de etileno, glutaraldehído e hipoclorito
Oxidación general	Óxido de etileno, glutaraldehído e hipoclorito

Anexo 3. Mecanismo de acción de las sustancias desinfectantes contra células microbianas. Tomado de Alba & Araujo 2008.



Anexo 4. Plántulas de papaya obtenidas de la multiplicación en el sistema BIT con formación de raíz.

