

Nº 7

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**



**ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA OBTENCION IN VITRO
DE PLANTAS DE PAPAYA (CARICA PAPAYA L)
TIPO CERA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

CRISTINA ALMAZAN VILLALOBOS

MEXICO, D. F.

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

RESUMEN	i
I. INTRODUCCION	1
1. Antecedentes	1
2. Descripción botánica e im- portancia económica de la papaya.	2
3. Enfermedades virales.	5
4. Cultivo de Tejidos	11
II. MATERIALES Y METODOS	19
III. RESULTADOS.	25
IV. DISCUSION	40
V. CONCLUSIONES	47
VI. LITERATURA CITADA.	48

R E S U M E N

Como consecuencia del análisis bibliográfico efectuado sobre los aspectos biológicos, agronómicos y económicos concernientes a Carica papaya, tipo Cera; en el presente trabajo se analizó la problemática causada por enfermedades virales y la necesidad inmediata de desarrollar un programa de mejoramiento genético, motivo por el cual el objetivo planteado se relacionó directamente con la obtención in vitro de plantas de papaya.

Utilizando el cultivo de diferentes tejidos de plántulas de aproximadamente 20 días de edad se observó que los explantes de tallo, de hoja y de brotes apicales fueron susceptibles de generar tejido indiferenciado o callo en el medio nutricional de Murashige y Skoog, determinándose que las concentraciones que lo favorecieron fueron de 0.2 mg/l de ácido naftalén acético y de 0.02 mg/l ó 0.2 mg/l de benciladenina. La proliferación de las callosidades se mantuvo realizando trasplantes sucesivos cada 14 días a medio fresco.

La micropropagación de esta planta se obtuvo mediante el cultivo de los brotes apicales, que desarrollaron el meristemo apical y los laterales, transformándose cada uno de ellos en un brote independiente.

I. INTRODUCCION

1.- Antecedentes.

La papaya es una planta de origen tropical cultivada probablemente por las antiguas civilizaciones de México y de Panamá (Storey, 1976); desde entonces a la fecha, el cultivo se ha generalizado a casi todas las partes tropicales del mundo. Entre las causas que determinan su amplia distribución pueden considerarse algunas como son: facilidad de adaptabilidad del medio ecológico, rápida capacidad de reproducción, aprovechamiento del fruto y alto contenido de papaína, que es una enzima semejante a la pepsina por su acción proteolítica (CONAFRUT, 1973).

En México el cultivo de la papaya ocupa el quinto lugar en producción dentro de los frutales tropicales; sin embargo, de 1970 a 1978 su producción se ha mantenido sin un incremento considerable. Las causas que determinan este estado son diversas, encontrándose primero que no existe una variedad explotada comercialmente, sino que se trata de tipos con heterogeneidad genética; las labores de cultivo están poco desarrolladas, lo cual implica un manejo de las huertas fundamentalmente empírico e improvisado que ocasiona una gran dificultad en el control de plagas y enfermedades (León y Olivares, 1979); otra de las causas del abatimiento de la producción ha sido la presencia de enfermedades virales como son las causadas por el virus de la mancha anular (ringspot virus); el virus del mosaico y probablemente el "hunchy top" (cogollo arrepollado). Para nuestro país se considera a la citada en primer lugar como la principal enfermedad virosa (de Fischer y J. Calindo, 1977; 1978).

Siendo tales las condiciones de este cultivo se considera que la aplicación de los resultados obtenidos mediante el cultivo de tejidos, son de gran valor para su mejoramiento genético, pues através de ellos se tiene la posibilidad de lograr ciertas características agronómicas deseadas como son: precocidad, adaptabilidad a diferentes medios y resistencia a enfermedades (Favret, 1972).

Con base en estos aspectos, el objetivo del presente estudio es la obtención in vitro de plantas de papaya, particularmente las resistentes al virus de la mancha anular; teniendo como fase inicial la determinación de las potencialidades de dediferenciación de distintos tejidos; de las combinaciones adecuadas de reguladores del crecimiento para la inducción y proliferación de callo, así como el número de trasplantes necesarios para el mantenimiento de dicha proliferación.

2.- Descripción botánica e importancia económica de la papaya.

Carica papaya, L. pertenece a la familia Caricaceae del orden Parietales, la cual consta de 4 géneros y 31 especies: Carica (22 especies); Jarilla (1 especie); Jacaratia (6 especies); Cylicomorpha (2 especies) (Storey, 1976). Es una herbácea gigante parecida a las palmas, presenta tallo único grueso y carnoso de hasta 20 cm. de diámetro, sin ramas laterales pero con cicatrices foliares grandes y numerosas rematando en un denso grupo de hojas, las cuales son palmatilobuladas con peciolo largos. Las inflorescencias masculinas tienen pedúnculo largo, sus flores son blanco cremosas de forma más o menos tubular, corola pentalobulada y 10

estambres. Las inflorescencias femeninas tienen pedúnculo corto y flores sentadas o subsésiles, con 5 pétalos carnosos, ovario súpero y 5 estigmas sésiles. Las flores hermafroditas con ejes cortos son un tipo intermedio entre las masculinas y femeninas. El fruto es ovoide y varía de tamaño, la pulpa puede ser amarilla, anaranjada o rojiza; el interior es hueco donde se encuentran la masa placentaria y las semillas las cuales presentan sarcotesta mucilaginosa lisa y esclerotesta con numerosas protuberancias irregularmente dentadas (Badillo, 1971); teniendo además características que lo distinguen si proviene de una planta femenina, masculina ó hermafrodita (CONAFRUT, 1973).

La propagación de esta planta se hace por medio de semilla, transcurriendo un año o menos desde la siembra hasta la fructificación; la producción de fruto es continua durante todo el año, siendo escasa en los meses fríos y puede extenderse por varios años, comercialmente es recomendable la renovación de plantas a los tres años ya que después de este periodo la producción decae (Agete, 1931; Mandujano, 1980).

"Solamente en algunos estudios científicos ha sido utilizado el método de propagación asexual por medio de estacas y por injerto", .."el mayor peligro que ofrece esta práctica en las condiciones de las huertas de papaya de México es la transmisión de enfermedades vírosas por las herramientas de trabajo y por los árboles mismos"(Mandujano, 1980).

Dada la predominancia de la propagación sexual en este cultivo, existe diversidad genética entre los individuos y de aquí la imposibilidad de

tener una variedad que sea explotada comercialmente, lo que representa uno de los factores que se consideran dentro del estado de su producción que señalaremos más adelante.

Los principales usos que se le da a la papaya son: como fruta fresca, por la succulencia y sabor de ésta, además de que contiene minerales como hierro, calcio, fósforo y vitaminas A y C; en la extracción a partir del fruto de productos utilizados como materia prima para la industria de conservas alimenticias como compotas, mermeladas y confituras y en la fabricación de néctares (CONAFRUT, 1972).

Toda la planta tiene valor medicinal, en algunos países tropicales - utilizan el látex para el tratamiento de verrugas, vermes intestinales, úlceras, etc. "...el jugo de esta fruta tiene propiedades curativas para el estómago; las semillas se consideran como antihelmínticas y carminativas; las raíces de la planta dan un tónico para los nervios" (Ageto, 1931). Sin embargo muchas de éstas aplicaciones son de dudosos resultados.

El látex del fruto y de las partes verdes de la planta contiene tres enzimas proteolíticas: quimopapaina, lisozima y papaina (del Campo, 1980) de las cuales la última es la más importante por los diversos usos en la industria, como clarificador, aderezo, ablandador y en la medicina, en preparaciones para el estómago y estimulantes cardiacos (CONAFRUT, 1973).

A nivel mundial, el cultivo de la papaya tiene una amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales; en México se cultiva en

20 estados (CONAFRUT, 1973).

La superficie, producción y valor de la producción de 1970 a 1978 se aprecia en la Tabla 1; en la Fig. 1 se observan las fluctuaciones en cuanto a la producción, comparando ésta de 1970 a 1978 con 22 y 25 ton/ha respectivamente, podemos inferir que no hay un aumento considerable; - enumerar y analizar las causas de estas fluctuaciones es objeto de un estudio que no depende totalmente del presente trabajo, por los múltiples factores socioeconómicos que determinan la producción; sin embargo, hemos de señalar que las condiciones del cultivo en el país son malas fundamentalmente en cuatro aspectos: a) heterogeneidad genética, ya que por su propagación sexual se pierden características agronómicas de una generación a otra, b) ser un cultivo de temporal, c) labores de cultivo poco desarrolladas, lo que repercute en la incidencia de enfermedades - (León y Olivas, 1979) y d) enfermedades virales, en este aspecto se ha señalado la virosis que produce la mancha anular como uno de los factores que afectan la producción, no teniendo hasta la fecha un cultivar que sea tolerante ó resistente ni el método para combatir su vector, por lo que los productores se limitan a abandonar las huertas una vez que se han infectado ó en el mejor de los casos a quemar las plantas evitando así los focos de infección.

3.- Enfermedades virales.

Representan en el país uno de los más serios problemas; ya que hasta la fecha además de que no es posible controlar las huertas, una vez atacadas el daño es irreversible.

TABLA 1 : Superficie, producción y valor de la producción de Carica papaya.
 (Tomado del Centro de Estadística de la Dirección General de Economía Agrícola, S.A.G.- S.A.R.H.)

AÑO	SUPERFICIE COSECHADA (has)	PRODUCCION		VALOR DE LA PRODUCCION	
		ton/ha	total	pesos/ ton	total
1970	5,624	22.0	123 728	723.00	89 455.344.00
1971	6,074	23.8	144 561	600.00	86 736,720.00
1972	8,535	19.8	168 993	600.00	101 395,800.00
1973	9,222	20.0	184 440	656.00	120 992,640.00
1974	10,343	17.0	175 831	800.00	140 664,800.00
1975	10,695	23.0	256 680	1,007.00	258 474,760.00
1976	9,567	23.4	223 867	1,199.00	268 417,490.00
1977	10,898	25.0	272 450	1,522.00	414 668,900.00
1978	10,929	25.0	273 225	1,776.00	485 247,600.00

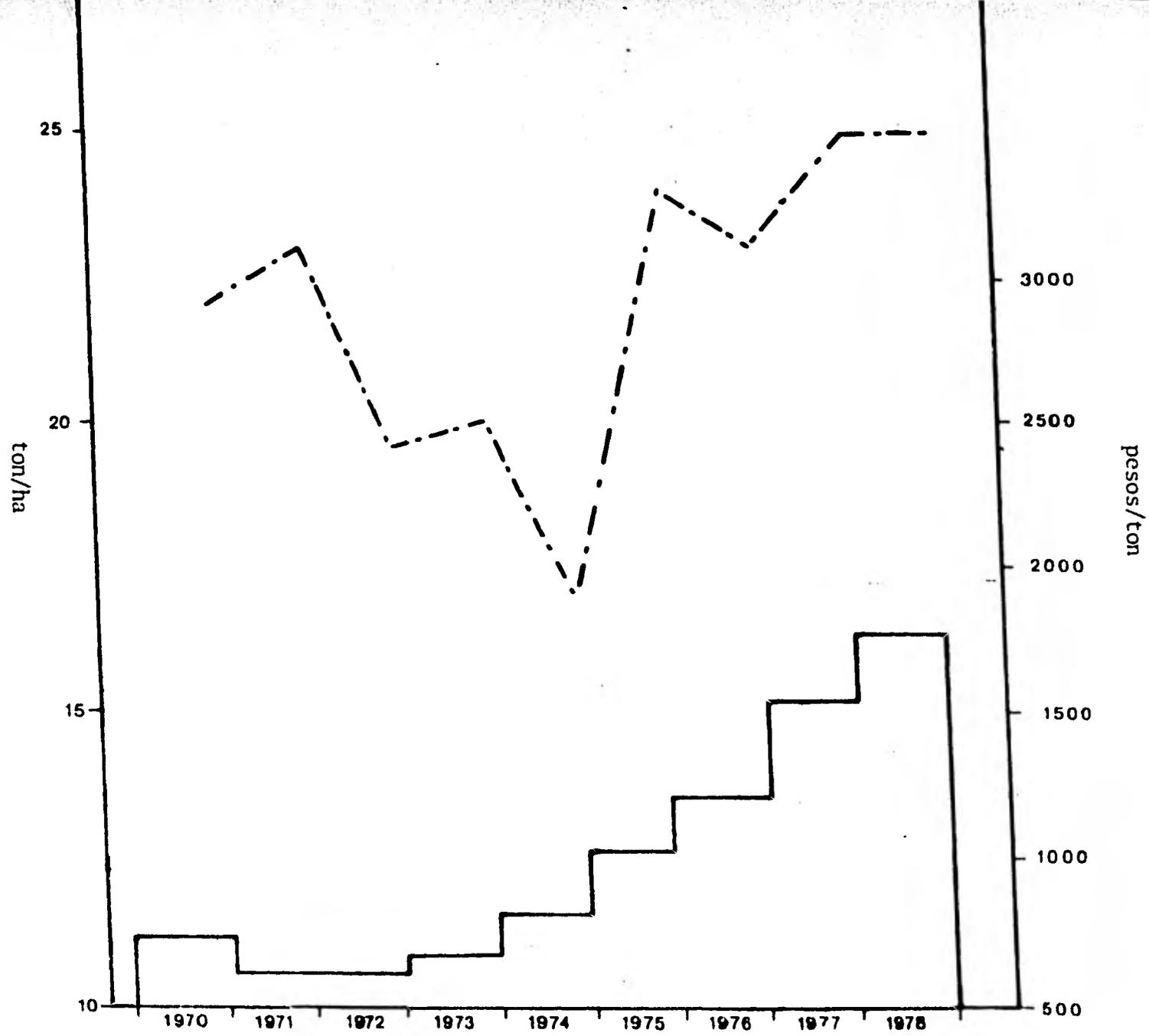


FIG. 1: Volúmen de producción, ton/ha (---) y valor de producción en pesos/ton (---) de Carica papaya .

Existen numerosos reportes concernientes a la identificación de los virus que atacan a la papaya : Jensen, (1949); Conover, (1962); de Bokx, (1965); Singh, (1969); Story y Halliwell, (1969); Cook y Zettler, (1970); Cook y Milbrath, (1971), entre otros.

"Bunchy top" o cogollo arrepollado: Bird y Adsuar, (1952) confirman la naturaleza viral de esta enfermedad y la transmisión por la chicharrita Empoasca papayae; las plantas infectadas quedan achaparradas con hojas cloróticas, peciolo cortos con manchas elongadas verde oscuro, en estados avanzados ocurre la defoliación excepto en el cogollo, la producción de látex decrece notablemente.

Virus del mosaico: fué descrito por Adsuar, (1946) quien reporta que es transmisible por inoculación mecánica, injerto y por el áfido Aphis spiraecola; las hojas de plantas dañadas presentan moteado amarillo o clorosis y en las hojas terminales arrugamiento; en ataques severos éstas quedan reducidas a estructuras filiformes. El tallo desarrolla manchas elongadas verde oscuro y el fruto presenta anillos café oscuro.

Virus de la mancha anular: Linder et al., (1945) descubrieron esta enfermedad; posteriormente Jensen, (1946;1947) confirma su naturaleza viral y el vector que la transmite: Myzus persicae; su sintomatología varía dependiendo si el ataque es o no severo y de la edad y estado fisiológico de la planta: las hojas presentan moteado verde amarillento, sin una deformación marcada aunque ésta puede ocurrir en los limbos; las manchas y anillos amarillos con centro verde son producidos en frutos de

plantas enfermas y manchas alargadas con apariencia acuosa en tallos y peciolo (Fig. 2). La sintomatología puede confundirse con la causada por el virus del mosaico.

de Bokx, (1965) aisló dos tipos de virus, encontrando diferencias en el rango de hospedantes y tamaño de las partículas virales (ver Tabla 2), las cuales son filiformes con dimensiones de 533 m μ para el denominado mosaico moderado y de 780 m μ para el virus de la deformación foliar y mancha anular conocido como "distortion ringspot virus". No hay evidencias claras que nos indique que éste y el virus de la mancha anular sean distintos, por lo que consideramos se trata del mismo virus.

Tabla 2: Hospedantes del virus del mosaico moderado (M.M.) y de la deformación foliar y mancha anular (D.R.V.) (De acuerdo a los resultados obtenidos por de Bokx, 1965).

PLANTA INDICADORA	M.M.	D.R.V.
<u>Cucurbita pepo</u> "Small sugar"		X
<u>C. pepo</u> var. <u>melopepo</u>		X
<u>Antirrhinum majus</u>	X	X
<u>Gomphrena globosa</u>	X	
<u>Cassia occidentalis</u>	X	

En la Tabla 2 se observan las diferencias en el rango de hospedantes entre ambos tipos virales. Se piensa; no obstante que el estudio del virus

debe encaminarse hacia su caracterización como tal y no a identificarlo con base en la sintomatología de plantas indicadoras, pues ésta varía dependiendo del estado fisiológico y edad de la planta.

En México, de Fischer y Galindo, (1977;1978) reportan que el virus de la mancha anular es el causante de la virosis que afecta las huertas y no el virus del mosaico, basándose en la sintomatología que presentan las plantas dañadas (Fig.2) la cual coincide con las descripciones hechas por Jensen, (1949) y en la caracterización de partículas virales filiformes y flexibles de aproximadamente 800 m μ , que a su vez es semejante a la reportada por de Bokx, (1965) para el virus de la deformación foliar y mancha anular.

Con respecto a la susceptibilidad de C. papaya a los dos tipos de virus se ha visto que no hay resistencia entre los individuos de diversos cultivares, pero C. cauliflora, C. stipulata, C. pubescens y Jacarta spinosa resultaron ser resistentes al virus de la mancha anular en las investigaciones realizadas por de Zerpa, (1967) y Cook y Zettler, (1970).

Dichas investigaciones han conducido a la búsqueda de resistencia al virus de la mancha anular a través de cruces interespecíficas (Jimenez y Horovitz, 1958; Horovitz y Jimenez, 1967; Mekako y Nakasone, 1975). En este aspecto no hay resultados satisfactorios; sin embargo indican ciertas potencialidades a explotar como aquellas que implican una selección genética en la cual pueda incorporarse al contingente genético de la especie

problema (C. papaya) áquel gene o genes involucrados en la resistencia de las plantas que la presenten, ya sea por obtención de híbridos ó por inducción de mutaciones con métodos físicos ó químicos.

En este último aspecto, la inducción de mutaciones también se logra por medio del uso del cultivo de tejidos ya que éste es útil por los aspectos nutricionales, fisiológicos y genéticos pues el callo mantenido por largo tiempo es inestable y sus células presentan alta probabilidad de mutaciones tanto estructurales como numéricas, por lo cual esta técnica se considera mutágena per se (Devreux, 1973).

4.- Cultivo de tejidos.

El desarrollo del cultivo de tejidos se inició en 1902 cuando G. Haberlandt postuló la capacidad de las células vegetales de crecer aisladas en un medio nutritivo, tal capacidad es ahora referida como la totipotencia de las células (Thomas y Davey, 1975).

Al haberse determinado que las plantas se nutren de sustancias inorgánicas por Sachs y Knop (1860-1861), el cultivo de tejidos tiene su primera fase en trabajos encaminados a la búsqueda de las combinaciones de minerales favorables para lograr el crecimiento ilimitado de las células vegetales in vitro (Street, 1977) el cual se obtiene al enriquecer los medios nutricionales con sustancias orgánicas como son las vitaminas del complejo B y el ácido indol acético (Thomas y Davey, 1975); con lo que en 1944, Skoog demuestra que las auxinas pueden estimular la forma-

2 A



2 B



FIG. 2: Plantas de papaya (Carica papaya) tipo Cera. (a) Planta sana; (b) Planta con síntomas de enfermedad virosa (virus de la mancha anular).

ción de raíces e inhibir la de brotes y que tal efecto puede ser superado parcialmente incrementando la concentración de sacarosa y fosfato inorgánico al medio (Thorpe, 1979); sus investigaciones realizadas en 1954 con callos de tabaco condujeron al descubrimiento de la 6-fufurilaminopurina, denominada kinetina por su capacidad para inducir división celular (Thomas y Davey, 1975).

En 1957 Skoog y Miller postularon con base en el uso de citocininas y auxinas en el cultivo de tejidos que el mecanismo regulador básico para entender la organogénesis es el balance entre estos reguladores. Ambos se requieren en la división y alargamiento de células de callo de tabaco, pero un nivel relativamente más alto de auxinas que de citocininas favorece la formación de raíces mientras que el caso inverso promueve la formación de brotes (Thorpe, 1979).

Estas investigaciones y otras posteriores ilustran la importancia del cultivo de tejidos para estudios no sólo de las condiciones adecuadas al crecimiento ilimitado de células vegetales a partir de tejidos diferenciados, proceso conocido como dediferenciación y que conduce a la formación de tejido indiferenciado o callo; sino también de los mecanismos involucrados en la diferenciación de órganos; además nuevas perspectivas han surgido en el aspecto genético con el cultivo de protoplastos y el cultivo de células haploides (Carmona, 1979).

Thomas y Davey, (1975) han sugerido que los protoplastos pueden utilizarse para hibridizar especies incompatibles, para introducir ácidos nucleicos extraños ó microorganismos benéficos a las células vegetales, así

como en manipulaciones genéticas en general.

Por otra parte, los métodos de cultivo de anteras y polen presentan varias características de interés agronómico, al obtener plantas haploides que a su vez permiten ciertas investigaciones en la derivación de líneas diploides homocigóticas, en los sistemas de selección celular y en los procedimientos de modificación genética entre otras (Sink y Padmanabhan, 1977; Picard, 1974; Carmona, 1979).

En resumen, el cultivo de tejidos es un sistema que permite la investigación de algunos de los procesos que ocurren en los vegetales como son la organogénesis, la embriogénesis y los procesos morfogénéticos; sus aplicaciones económicas están colocadas en cuatro categorías según Murashige, (1977):

- 1) propagación masiva (clonal),
- 2) obtención de plantas libres de patógenos,
- 3) genética y mejoramiento vegetal y
- 4) producción de fármacos y otras sustancias.

En todos estos casos se hace evidente la totipotencialidad de las células vegetales; es decir, la capacidad que tienen de dediferenciarse bajo ciertos estímulos químicos y físicos y de diferenciarse formando nuevos individuos con sólo cambiar favorablemente las condiciones iniciales de cultivo.

Los dos primeros métodos están basados en un sin número de investiga-

ciones que han demostrado y reafirmado su utilidad, lo que ha repercutido en el interés de horticultores para adoptarlos como métodos de propagación a gran escala. No hay que omitir que en el primer caso se generan plantas potencialmente idénticas al explante que les da origen y por ello se habla de propagación clonal, mediante la cual es posible mantener caracteres interesantes que pudieran perderse al propagar la planta sexualmente (micropropagación) y la probabilidad de establecer variedades en cultivos donde dicho establecimiento se ha dificultado por tratarse de plantas en las que la propagación vegetativa por métodos convencionales no es posible.

La regeneración de plantas libres de patógenos se ha llevado a cabo en plantas con parasitismo viral y en donde un sistema de resistencia ó tolerancia a virus no ha podido ser implantado (Carmona, 1979). En este caso las plantas se obtienen de meristemas apicales, que carecen de patógenos al no haber un sistema vascular que los trasloque a esta zona; estudios de este tipo se han realizado en fresa, crisantemo, dalia y clavel y en plantas leñosas como cítricos (Murashige, 1977).

En el aspecto genético y de mejoramiento vegetal, la importancia de la manipulación que se realiza al formar tejido indiferenciado o callo, es la obtención de células mutantes y por lo tanto distintas genéticamente del explante original (Sibi, 1972-citado por Carmona, (1979)-; Dutui, 1975); lo anterior hace del cultivo de tejidos un método más para inducir mutaciones. Las células del callo pueden ser disgregadas y crecer en un medio líquido para generar un cultivo en suspensión formado por células

aisladas o de pequeños grupos celulares que pueden crecer en un medio específico y los mutantes se registran imponiendo una presión selectiva (Carlson y Polacco, 1975; Green, 1977).

De otra manera, la variabilidad genética puede ser lograda en estas células por el uso de agentes mutágenos químicos ó físicos, con la ventaja que este método es semejante al usado en sistemas genéticos bacterianos al hacer posible el análisis de un gran número de células bajo condiciones controlables.

En la actualidad son numerosos los estudios en este campo; los métodos de cultivo in vitro tales como la obtención de callo, de protoplastos, de plantas haploides y el cultivo de células en suspensión ha puesto de manifiesto las ventajas con respecto a la selectividad de líneas mutantes resistentes (Carlson y Polacco, 1975; Murashige, 1977; Green, 1977; Carlson y Rice, 1977, Bourgin, 1978).

El estudio de las condiciones de obtención de ciertos tipos de mutantes se inició en 1967 con Lescure y en 1970 se tuvieron varias investigaciones dentro de las que destacan las hechas por Heimer y Filner quienes estudiando la regulación de la síntesis de la nitrato-reductasa en células de tabaco en suspensión, aislaron una cepa resistente a la treonina; Binding en el mismo año obtuvo callos de Petunia resistentes a la estreptomomicina (Bourgin, 1978); en 1970 Carlson determinó una técnica de aislamiento de mutantes auxotróficos a partir de esporas de Todea barbara y Osmunda cinnamomea y la utilización de dicha técnica a células haploides de

tabaco le permitió aislar dos cepas parcialmente auxotróficas para ciertas vitaminas (Carlson, 1970; 1977). Al mismo tiempo, Coleman regeneró a partir de callo de plantas de caña de azúcar susceptibles al virus del mosaico, plantas resistentes al mismo (Green, 1977) y Gengenbach y Green, (1975) reportaron la selección de callos de maíz de una línea resistente a la toxina de Helmithosporium maydis.

Estos estudios han permitido considerar al cultivo de tejidos como una herramienta para el fitomejoramiento. Green, (1977) considera que al utilizar tal técnica en aspectos genéticos se debe tomar en cuenta que la especie bajo investigación sea capaz de crecer y madurar en condiciones in vitro, que el carácter a modificar se exprese bajo el sistema elegido de tal manera que pueda llevarse a cabo la selección adecuada y que las células seleccionadas puedan regenerar plantas que expresen la mutación para que ésta sea transmitida a las subsecuentes generaciones.

Los pocos trabajos referentes a la obtención de plantas de C. papaya por cultivo de tejidos han tenido como objetivo propagar vegetativamente esta planta como alternativa al problema de segregación sexual y a la imposibilidad de implantar una técnica de propagación asexual por métodos convencionales. La utilización de citocultivos para el mejoramiento genético no ha sido reportado para esta planta.

de Brujine et al., (1974) regeneraron plántulas a partir de callo derivado de segmentos de peciolo de plantas de papaya de edad no especificada; Medhi y Hogan, (1976) obtuvieron plantas a partir de brotes apical

les y regiones nodales del Cultivar Solo No. 8; Yie y Liaw, (1977) en Taiwan trabajaron dos métodos de propagación clonal, induciendo la formación de callo y la diferenciación de meristemos apicales y laterales de brotes apicales de plántulas del Cultivar Solo No. 1. En la India, Arora y Singh, (1978a, b, c) reportaron la imposibilidad de proliferar in vitro tejido de plantas de papaya sexualmente diferenciadas debido a la exudación de látex, mientras que obtuvieron éxito al tratar con plántulas de 4 a 8 semanas de edad y estudiaron el efecto de las auxinas, citoquininas y ácido giberélico en el crecimiento de callosidades originadas de tallo.

Litz y Conover, (1978) en Florida , utilizando el brote apical de plantas maduras, lograron desarrollar plantas sin la inducción de callo, dejando establecido la relativa facilidad de este método de propagación, así como la ventaja de seleccionar individuos hembra tolerantes al virus de la mancha anular; para estos autores, los trabajos publicados hasta ese momento carecen de valor frutícola ya que el sexo y otros caracteres de la planta adulta son desconocidas en las plántulas; la probabilidad de poliploidía, aneuploidía ó aberraciones cromosómicas son grandes debido a la naturaleza heterogénea del callo de papaya y los explante de tejido ma duro raramente responden en el medio de cultivo, como aquéllos derivados de plántulas.

II. MATERIALES Y METODOS

1.- Material Biológico.

En la realización de este trabajo se utilizaron como material de explante, plántulas de Carica papaya tipo Cera de aproximadamente 20 días de edad obtenidas através de la germinación de semillas sembradas en recipientes con una mezcla de tierra de hoja, tierra negra y arena en partes iguales y manteniéndolas bajo condiciones de invernadero.

2.- Medio Nutricional.

El medio nutricional empleado fué el de Murashige y Skoog, (1962) - con 3% de sacarosa, 0.8% de agar, suplementado con diversas concentraciones de reguladores del crecimiento y pH ajustado a 5.8 ± 0.05 con NaOH 1N y HCL 1N. En frascos "gerber" se colocaron 15 ml. del medio nutricional sellándolos con papel aluminio y finalmente se esterilizaron durante 15 minutos en autoclave a 1 kg/cm^2 y $120 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.- Siembra del material en los medios de cultivo.

Las plántulas de papaya de aproximadamente 20 días de edad se usaron como material de explante ; antes de ser sembradas se desinfectaron de la siguiente manera: en material aséptico se remojaron sin raíces durante 5 minutos en alcohol etílico al 70%; posteriormente se lavaron agitando continuamente en cloro comercial (Cloralex) al 15% durante 20 minutos ; para remover el cloro se sumergieron en agua destilada estéril 3 veces. Una vez desinfectado el material se procedió a la siembra en una cámara de flujo laminar: sobre papel filtro estéril se disectaron las

plántulas (ver Fig.3), de tal manera que se obtuvieron segmentos de 0.5 cm. de tallo; las hojas cotiledonarias y asimilatrices fraccionadas a la mitad y los brotes apicales; estos explantes se colocaron en los frascos que contenían el medio de cultivo cuya composición varió en combinación de reguladores del crecimiento en cada fase de la investigación. Los frascos se sellaron herméticamente y se colocaron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo largo (16 hr. luz y 8 hr. oscuridad) con una intensidad luminosa de 2000 lux y temperatura de $26 \pm 5^{\circ}\text{C}$. El material se revisó periódicamente.

4.- Reguladores del Crecimiento.

4.1. Inducción de callo: La potencialidad de dediferenciación de los explantes de tallo, de hoja y de brote apical se probó empleando ácido naftalén acético (ANA) y benciladenina (BA) en las siguientes concentraciones:

MEDIO	ANA(mg/1)	BA(mg/1)
I ₀	-	-
I ₁	-	0.01
I ₂	-	0.1
I ₃	0.01	-
I ₄	0.01	0.01
I ₅	0.01	0.1
I ₆	0.1	-
I ₇	0.1	0.01
I ₈	0.1	0.1

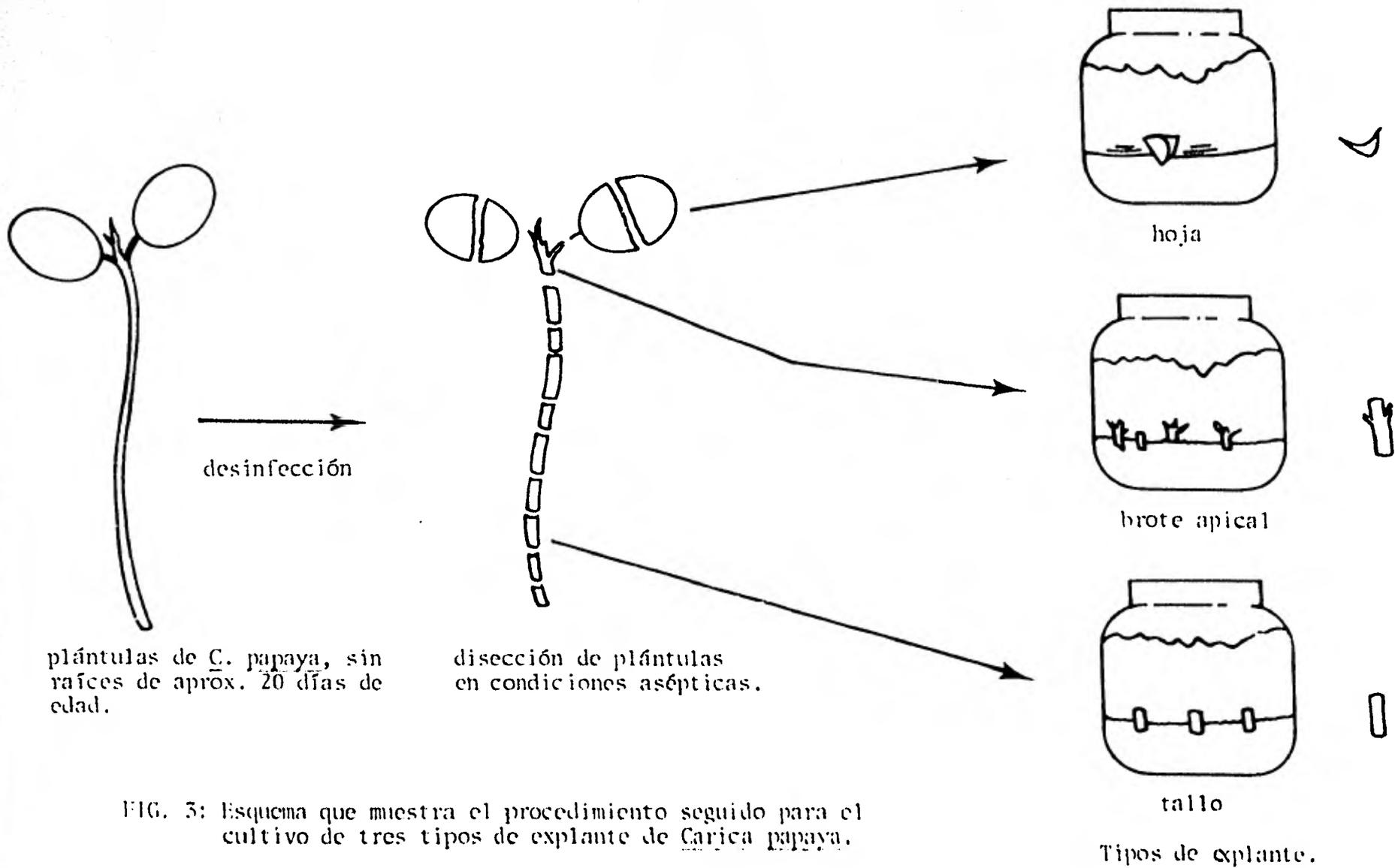


FIG. 3: Esquema que muestra el procedimiento seguido para el cultivo de tres tipos de explante de *Carica papaya*.

MEDIO	ANA(mg/l)	BA(mg/l)
M ₂	-	0.2
M ₅	0.02	0.2
M ₆	0.2	-
M ₇	0.2	0.02
M ₈	0.2	0.2

4.2. Proliferación de callo: El mantenimiento de la proliferación en las callosidades fué evaluada en 6 situaciones:

- 1.- Lote testigo, sin trasplante.
- 2.- Lote con 1 trasplante a los 14 días de originado el callo.
- 3.- Lote con trasplantes sucesivos cada 14 días al mismo medio de inducción de callo.
- 4.- Idem (3) al medio V₇
- 5.- Idem (3) al medio V₈
- 6.- Idem (3) al medio S₁

Los medios V₇ y V₈ coinciden con las concentraciones de ANA y BA que favorecieron la inducción y mayor crecimiento de las callosidades; el medio S₁ con aquellas que reportan Yie y Liaw (1977) para el crecimiento de callosidades de C papaya. Estos medios fueron suplementados con los compuestos orgánicos utilizados por los citados autores. Las concentraciones de reguladores del crecimiento fueron:

MEDIO	ANA(mg/1)	BA(mg/1)	Zeatina (mg/1)
V ₇	0.2	0.02	-
V ₈	0.2	0.2	-
S ₁	1.0	-	0.1

4.3. Diferenciación de brotes: Los brotes apicales cultivados en la fase de inducción de callo desarrollaron el meristemo apical y los laterales; para una mejor diferenciación de éstos se probó el ácido indol acético (AIA) y la zeatina (Z) como reguladores del crecimiento en las siguientes concentraciones.

MEDIO	AIA (mg/1)	Z(mg/1)
S ₂	0.1	2.0
S ₃	-	2.0

4.4. Enraizamiento de brotes: El medio nutricional de Murashige y Skoog (1962) fué suplementado con 4 mg/1 de ácido indol butírico y 0.3% de carbón activado.

5.- Evaluación de resultados.

Para la evaluación de inducción de callo se consideró el porcentaje de explantes de tallo, de hoja y de brotes apicales que lo desarrollan, con relación al total sembrado en cada uno de los diferentes medios, corroborando su significancia mediante la prueba de χ^2 .

La determinación de combinaciones adecuadas de reguladores para la

proliferación fué posible al considerar el diámetro en promedio alcanzado por las callosidades a los 20 días de cultivo; mientras que el número de trasplantes necesarios para mantener tal proliferación se evaluó con la observación de la degeneración de las callosidades en el tiempo, lo que indica indirectamente si éste continúa vivo o no, para lo cual se determinó la vida media (\bar{X}) y el coeficiente de velocidad de degeneración de dichas callosidades.(C.V.D.)

A los valores promedio del diámetro y de la vida media de las callosidades se les aplicó la prueba t ó "student" con el fin de verificar su significancia.

Los coeficientes de velocidad de callogénesis y de degeneración del callo se calcularon con la siguiente fórmula:

$$C.V. = \frac{A_1 + A_2 + \dots + A_n \times 100}{A_1 T_1 + A_2 T_2 + \dots + A_n T_n}$$

donde: A= número de explantes con callosidad en el tiempo 1,2, ..n. ó

Número de callosidades del tipo A, B ó C en el tiempo 1,2,..n.

T= tiempo i, 2, . .n.

III RESULTADOS

1.- Inducción de callo.

En la Tabla 3 se presentan los porcentajes de callogénesis en los explantes empleados. Para los medios $I_0 \dots I_8$ los resultados positivos se registraron a una concentración de 0.1 mg/l de ANA y cualesquiera de las concentraciones de BA: medios I_6 , I_7 e I_8 , sin haber diferencias significativas entre ellos ($50 < P > 25$) usando explantes de tallo y de brote apical; de éstos medios solo el I_8 fué útil para la inducción de callo a partir de segmentos de hoja.

Al aumentar la concentración de reguladores del crecimiento manteniendo la relación auxina-citocinina, medios $M_2 \dots M_8$ los porcentajes de callogénesis fueron más altos para los tres tipos de explante y difieren significativamente de los medios $I_0 \dots I_8$ ($P < 0.05$). En los medios M_7 y M_8 dichos explantes registraron los mejores porcentajes de callogénesis.

En la Fig. 4 se aprecian las callosidades originadas de los explantes de tallo, hoja y brote apical. En algunos casos aquéllos difieren principalmente en la pigmentación, encontrándose callosidades verde-pálido y blancas o albinas (Fig.5).

En la Tabla 4 se muestran los coeficientes de velocidad de callogénesis, indicándonos que la inducción de ésta varía de 4 a 10 días.

En los medios I_6 e I_7 se registró la formación de raíz en los tipos

TABLA 3 : Relación del porcentaje de callogénesis (++) en los explantes indicados y de los explantes sin respuesta (--) sembrados en diferentes combinaciones de ANA y BA

MEDIO	ANA (mg/l)	BA	EXPLANTES %					
			tallo		hoja		brote *	
			(++)	(--)	(++)	(--)	(++)	(--)
I ₀	-	-	-	100.0	-	100.0	-	100.0
I ₁	-	0.01	-	100.0	-	100.0	-	100.0
I ₂	-	0.1	6.0	94.0	-	100.0	-	100.0
I ₃	0.01	-	-	100.0	-	100.0	-	100.0
I ₄	0.01	0.01	-	100.0	-	100.0	-	100.0
I ₅	0.01	0.1	19.2	80.8	17.2	82.8	-	100.0
I ₆	0.1	-	37.0	63.0	-	100.0	35.7	64.3
I ₇	0.1	0.01	39.4	60.6	-	100.0	37.5	62.5
I ₈	0.1	0.1	48.2	51.8	21.4	78.6	70.0	30.0
M ₂	-	0.2	28.6	71.4	63.2	36.8	44.4	55.6
M ₅	0.02	0.2	10.0	90.0	87.0	13.0	40.0	60.0
M ₆	0.2	-	54.2	45.8	54.5	45.5	-	100.0
M ₇	0.2	0.02	70.5	29.5	69.4	30.6	62.5	37.5
M ₈	0.2	0.2	66.0	34.0	72.9	27.1	77.7	22.3

* desarrollo de callosidad en la base.



FIG. 4: Callosidades originadas a partir de los explantes de tallo (a);
hoja (b) y brotes apicales (c).

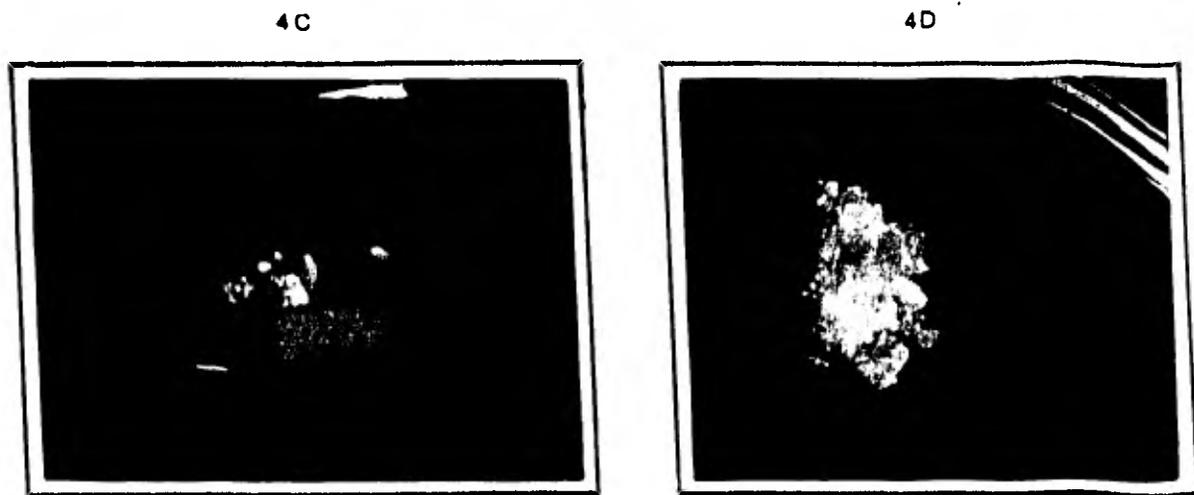


FIG. 5: Diferencias en pigmentación de las callosidades obtenidas:
(a) callosidad verde-pálido; (b) callosidad blanca o albina.

TABLA 4: Coeficientes de velocidad de callogenesis de distintos explantes sembrados en diferentes combinaciones de ANA Y BA.

MEDIO	E X P L A N T E S		
	tallo	hoja	brote
I ₂	5.29	-	-
I ₅	4.76	7.14	-
I ₆	5.41	-	4.76
I ₇	5.49	-	6.12
I ₈	7.85	7.14	7.14
M ₂	8.16	5.90	5.19
M ₅	7.14	6.42	7.14
M ₆	4.76	6.59	-
M ₇	6.55	6.73	6.49
M ₈	7.30	6.22	9.09

de explante usados (Fig. 6)

2.- Proliferación de callo

Una vez que se indujo la callogénesis, el crecimiento fué evaluado con el diámetro alcanzado por las callosidades a los 20 días de cultivo (Tabla 5).

Los explantes de tallo tuvieron una proliferación de 6.3 mm. en el medio M_7 que fué la mayor y difiere significativamente de la registrada en los otros medios empleados ($P < 0.1$). Para hoja, los medios que originaron mayor proliferación fueron el I_8 , M_5 , M_6 y M_7 los cuales no muestran diferencias significativas entre sí ($50 < P > 25$). En los medios M_5 , M_7 y M_8 la base de los brotes produjo callo de 8.0 mm. en promedio que en general, fué la mejor proliferación observada.

Durante su desarrollo las callosidades tendieron a degenerar cambiando su aspecto sucesivamente de frágil y verde-pálido, callosidad tipo A, a lechoso compacto, callosidad tipo B en donde puede permanecer indefinidamente ó necrosarse, callosidad tipo C (Fig. 7).

Con base en estas consideraciones es que se procedió a determinar el número de trasplantes necesarios y el medio adecuado para que las callosidades mantuvieran su aspecto verde-pálido o pudieran recuperar este aspecto.

En la Tabla 6 se encuentran tabulados la vida media (\bar{X}) de los tipos

6A



6B



6C

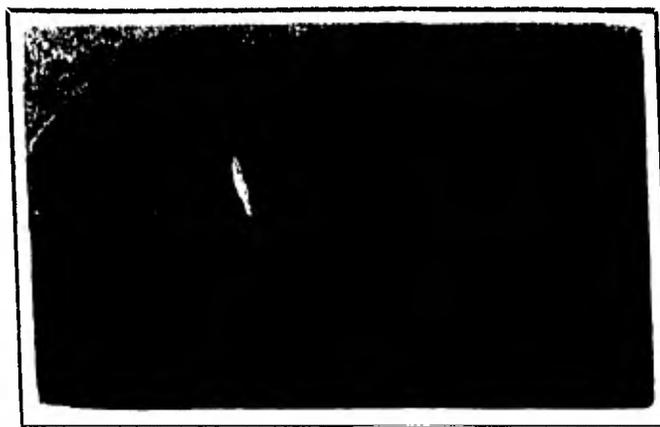


FIG. 6: Organogénesis de raíz en los explantes de tallo (a); hoja (b) y brote apical (c), inducida en los medios I_6 e I_7

TABLA 5: Relación de los valores promedio (D) en mm y desviación estándar (S) de las callosidades obtenidas a los 20 días de cultivo a partir de los explantes indicados en diferentes combinaciones de ANA y BA.

MEDIO	EXPLANTES					
	TALLOS		HOJAS		BROTOS	
	(D)	(S)	(D)	(S)	(D)	(S)
I ₂	2.5	1.5	-	-	-	-
I ₅	2.8	1.4	1.0	1.0	-	-
I ₆	2.2	2.6	-	-	4.0	1.0
I ₇	4.0	1.0	-	-	4.0	1.0
I ₈	4.3	1.1	3.1	1.5	4.0	1.0
M ₂	4.0	1.0	1.9	1.4	7.0	1.7
M ₅	4.0	1.0	3.1	1.3	8.0	1.0
M ₆	4.0	1.0	2.8	1.5	-	-
M ₇	6.3	3.9	2.6	1.5	8.0	1.0
M ₈	4.2	0.9	1.0	1.0	8.0	1.0

7



FIG. 7: Desarrollo y degeneración de las callosidades en el tiempo, de izquierda a derecha: callosidad verdepálido tipo A; callosidad lechosa compacta tipo B; callosidad que tiende a necrosarse , tipo B y callosidad necrosada

TABLA 6: Relación de la vida media (\bar{X}), desviación estándar (S) y los coeficientes de velocidad de degeneración de las callosidades tipo A, B y C en 6 situaciones diferentes

LOTE	C A L L O S I D A D E S								
	A			B			C		
	\bar{X}	S	C.V.D.	\bar{X}	S	C.V.D.	\bar{X}	S	C.V.D.
1.	6.5	3.1	15.3	23.8	14.5	4.2	28.0	15.4	3.6
2.	8.3	5.5	12.0	7.7	5.3	12.8	25.5	16.0	3.9
3.	15.5	10.2	6.4	26.7	15.3	3.7	27.9	15.5	3.5
4.	15.4	9.8	6.4	21.9	14.9	4.5	28.0	15.4	3.6
5.	16.0	10.2	6.2	18.0	11.6	5.5	28.0	15.4	3.6
6.	16.0	11.4	6.2	26.2	15.6	3.8	25.1	14.3	3.9
Promedio	12.9		8.7	20.7		5.7	27.0		3.6

de callosidades A, B y C y los coeficientes de velocidad de degeneración del tejido (C.V.D). Para las callosidades tipo A el valor de \bar{X} es menor en el lote testigo y difiere significativamente con respecto a los lotes 3, 4, 5 y 6 ($P < 0.01$), en éstos lotes el C.V.D. decrece, lo que indica que al realizar trasplantes cada 14 días ya sea al medio de inducción de callo ó a los medios V_7 , V_8 y S_1 la callosidad mantiene su aspecto verde-pálido 15.7 días en promedio, disminuyendo a la vez su velocidad de degeneración.

Los valores de \bar{X} indicados para las callosidades del tipo B muestran diferencias significativas entre sí ($P < 0.01$); los lotes 2, 4 y 5 presentaron una \bar{X} menor y un C.V.D. mayor con respecto al testigo, en el lote 2 esto se debió a la degeneración del tejido y por tanto a un mayor porcentaje de callos necrosados; por el contrario en los lotes 4 y 5 se mantuvo la proliferación de las callosidades, determinado por observación relativa de un aumento del diámetro. Los lotes 3 y 6 a su vez presentan una \bar{X} mayor y un C.V.D. menor mostrándonos que las callosidades permanecieron sin cambio de aspecto.

Este comportamiento fué similar para las callosidades del tipo C, en donde los lotes 1,3,4 y 5 no muestran diferencias significativas en los valores de \bar{X} ($50 > P > 25$) y a su vez son distintos de los lotes 2 y 6 ($p < 0.01$) considerando que en éstos hubo recuperación al aspecto de la callosidad del tipo B.

Las callosidades del tipo A son más inestables ya que permanecieron

12.9 días en promedio con su aspecto verde-pálido a diferencia de 20.7 y 27 días para los tipos B y C respectivamente con un C.V.D. mayor que éstos. Al no existir diferencias entre los lotes 3, 4, 5 y 6 en los que se realizaron trasplantes sucesivos cada 14 días se manifestó la importancia de dichos trasplantes más que el medio en el mantenimiento de las callosidades.

3.- Diferenciación de brotes.

Todos los medios empleados permitieron la sobrevivencia de los brotes apicales durante los primeros 15 días (Tabla 7); en un corto tiempo, sin embargo, tales brotes perdieron su pigmentación y se promovió la caída de hojas, lo que condujo a la muerte del tejido.

Sin embargo, en los medios S_2 y S_3 se produjo un mejor desarrollo y la proliferación de brotes múltiples, los que al ser separados pueden formar un nuevo individuo (Fig. 8 b, c y d).

En la Tabla 8 se presentan el número de brotes en promedio originados a partir de un brote apical (A) y los brotes originados al individualizar los brotes y colocarlos en medio fresco (B).

4.- Enraizamiento de brotes.

Se obtuvo 13.3% de brotes enraizados (Fig. 9) observándose que el 86.7% restante presentaron caracteres seniles que condujeron a la muerte.

TABLA 7: Porcentajes de Brotes (%) que desarrollan a los 15 días de cultivo: (1) meristemo Apical, (2) meristemo apical más meristemas laterales ó (3) sin desarrollo, sembrados en diferentes combinaciones de ANAy BA.

MEDIO	B R O T E S (%)		
	(1)	(2)	(3)
I ₀	33.3	-	66.7
I ₁	30.0	20.0	50.0
I ₂	100.0	-	-
I ₃	100.0	-	-
I ₄	100.0	-	-
I ₅	100.0	-	-
I ₆	14.3	85.7	-
I ₇	75.0	25.0	-
I ₈	60.0	40.0	-
M ₂	66.6	33.3	-
M ₅	80.0	20.0	-
M ₆	66.6	33.3	-
M ₇	37.5	62.5	-
M ₈	33.3	66.6	-

TABLA 8: Relación de brotes en promedio originados en los medios S_2 y S_3
 A. Brotes originados a partir de un brote apical (1a. siembra)
 B. Brotes originados de aquéllos que fueron obtenidos en A. que se separaron y se colocaron en medio fresco (resiembra)

MEDIO	AIA(mg/1)	Z (mg/1)	A.	B.
S_2	0.1	2.0	1.5	2.5
S_3	-	2.0	1.3	2.8

8A

8B



8C



FIG. 8: Brotes apicales que originan hojas laterales y brotes múltiples en los medios S_2 y S_3 (a, b, c).

9



FIG. 9: Brote con raíces, desarrolladas en el medio de Murashige y Skoog, suplementado con 4 mg/l de AIB y carbón activado.

IV DISCUSION

1.- Inducción de callo.

Para el establecimiento de tejido indiferenciado o callo suceden dos procesos: inducción y división los cuales se caracterizan por cambios metabólicos que conducen al desarrollo del mismo callo. Durante la inducción, las células se preparan para dividirse, la duración de esta fase varía con el estado fisiológico de las células en el explante original y las condiciones de cultivo empleadas (Aitchison et al., 1977).

Se ha dado importancia al tipo de explante usado, aunque teóricamente todas las células vegetales son capaces de retornar a un estado meristemático, las condiciones endógenas del cultivo son determinantes en el tipo de respuesta. Los factores a tomar en cuenta acerca de las características del explante incluyen: a) tipo de órgano donador, b) estado fisiológico y edad del órgano, c) estación en la que el explante se obtiene y d) tamaño del explante. Estos factores pueden ser controlados cuando se mantienen las plantas bajo condiciones de invernadero, habiéndose demostrado que cualesquier órgano como tallo, hoja, etc., puede ser usado en citocultivos (Thorpe, 1979).

Como se aprecia en la Tabla 3 bajo las condiciones químicas y físicas de cultivo utilizadas fué posible obtener callosidades de los tres tipos de explante usado, lo que confirma observaciones hechas por diversos investigadores en este sentido (Thorpe, 1979; Aitchison et al., 1977; Than Van y Trin, 1978) y concuerda con los resultados de González (1980) para C.

papaya quien con diferentes reguladores del crecimiento a los utilizados en este trabajo, obtiene callosidades de hoja, tallo y brote apical, a diferencia de lo reportado por Arora y Singh (1978 b) quienes no obtuvieron respuesta con segmentos de hoja.

En la obtención de porcentajes relativamente altos de callogénesis en los medios M_7 y M_8 para tallo, hoja y brote apical, fueron importantes las concentraciones de reguladores empleados. Sabemos que tanto las auxinas como las citocininas son necesarias para la formación de callo, aunque la aplicación separada de cada una de ellas permiten una respuesta, ésta se ve mejorada al aplicarlas juntas en determinadas concentraciones, este hecho se conoce como sinergismo. Estudios citológicos nos permitirían analizar acertadamente las respuestas obtenidas en los otros medios donde se logró callogénesis, pues nos indicarían si la respuesta se debió a un aumento en volumen originado por las auxinas ó en número celular favorecido por las citocininas.

Los coeficientes de velocidad de callogénesis (Tabla 4) tuvieron una amplitud de 4 a 10 días, que abarcan aquéllas reportadas para C. papaya por diversos autores: Litz y Conover (1978) 10 días; Arora y Singh (1978b) 3-4 días y Yie y Liaw (1977) 14 días. Este tiempo representa el periodo lag o de iniciación que es el tiempo mínimo que transcurre entre la aplicación del regulador y el efecto del mismo. En otras investigaciones se ha visto que en forma general este periodo es de 7 días (Aitchison et al., 1977; Thanh Van y Trin, 1978; Azaola, 1979).

La morfología y estructura de los callos varía aún tratándose de la misma especie (Thomas y Davey, 1975; Dutui, 1975) dependiendo de la composición del medio de cultivo, en especial de los niveles de reguladores del crecimiento y el estado fisiológico del explante, en este trabajo se obtuvieron diferencias en cuanto a la pigmentación : callosidades verde-pálido y blancas o albinas, lo que indica diferencias metabólicas en cuanto a síntesis de clorofila. Es posible que al hacer un análisis citogenético y/o de composición química existan divergencias citológicas a estos niveles.

La organogénesis de raíz obtenida en los medios I₆ e I₇ se debió a una relación a favor de las auxinas, que promueven la formación de raíces (Thomas y Davey, 1975; Yeoman y Street, 1977).

2.- Proliferación de callo.

La proliferación representa la segunda fase para el establecimiento del callo y se ha reportado que el cambio a medio fresco permite el crecimiento indefinido del tejido (Street, 1977; Thorpe, 1978; Skoog y Tsui, 1948; White, 1939; Blakely y Steward, 1961). Algunos autores como Thorpe, (1978) y (1979), Dutui (1975); Devreux (1973); Litz y Conover (1978) entre otros señalan las desventajas genéticas al mantener tal crecimiento; sin embargo, tales desventajas pueden ser útiles en aspectos agronómicos como la resistencia ó tolerancia a enfermedades.

Esta fase se caracteriza por un continuo crecimiento y división del tejido acompañado por un incremento en contenido de proteínas y ácidos -

nucléicos (Aitchison et al., 1977) , la cuantificación de éstas no fué posible llevarlas a cabo, por lo que la proliferación durante la primera fase se evaluó con valores relativos al diámetro alcanzado por el tejido a los 20 días de cultivo.

En los tres tipos de explante la proliferación se inicia en la parte seccionada, lo cual parece ser una forma mas o menos generalizada de inducir callo y se conoce como respuesta a la herida (Thomas y Davey, - 1975; Dutui, 1975; Thanh Van y Trin, 1978) que parece tener cierta importancia en la inducción pero no en el establecimiento del callo (Aitchison et al., 1977; Yeoman y Street, 1977) lo cual depende de los niveles exógenos y endógenos de reguladores del crecimiento en el cultivo.

La proliferación de callo en segmentos de tallo, aunque se inicia en las regiones seccionadas, prosigue una división hasta alcanzar cierto diámetro, lo mismo ocurre con los brotes en los que el callo se origina y continúa proliferando hacia la base.

Con relación al mantenimiento de las callosidades tipo A, B y C por medio de los trasplantes a medio fresco, debemos considerar dos aspectos fundamentales : la fisiología del tejido y la importancia del abastecimiento de nutrientes: de nuestra experiencia desprendemos que el tejido permanece vivo en el tipo de callosidad A durante 12.9 días en promedio, tanto por la apariencia mostrada como por la prolongación de su vida media en los lotes 3,4, 5 y 6 en comparación con el lote testigo; las otras callosidades pierden el potencial de división manteniendo su aspecto ó ne

crossándose.

Pensamos que posiblemente estas características son inherentes a la especie aunque para un análisis acertado conviene hacer otro tipo de investigaciones y de cualquier forma verificar las potencialidades de diferenciación de cada tipo de callosidad.

El abastecimiento de nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos requiere una atención especial. Murashige (1974) divide los constituyentes del medio en 1) sales inorgánicas, 2) sustancias orgánicas y 3) complejos naturales. Dentro del primer grupo se consideran los minerales, macro y micronutrientes; la fuente de carbono, los reguladores del crecimiento y las vitaminas en el grupo 2) y las sustancias como agua de coco y extracto de levadura en el último grupo. Se ha visto que de los macronutrientes el nitrógeno reducido es importante para el crecimiento de las células en cultivo, encontrándose que este nutriente se agota a los 14 días (indicado indirectamente al medir la actividad de la nitrato-reductasa) y que el abastecimiento de tal nutriente va acoplado a las concentraciones de sacarosa en el medio, la cual se agota a los 8 días de cultivo (Ojima y Ohira, 1978).

Si tomamos en cuenta lo anterior podremos explicar el hecho de que al renovar el medio cada 14 días se prolongó la vida media de las callosidades tipo A. El mantenimiento del aspecto verde-pálido está relacionado con la concentración de sacarosa y de auxina en el medio ya que según Edelman y Hanson (1971) el efecto de la sacarosa en la eficiencia

fotosintética consiste particularmente en la reducción del número de cloroplastos por célula, al inhibir el desarrollo lamelar y Pamplin y Chapman en 1975 (citado por Aitchison et al., 1977) proveen evidencias de que la sacarosa afecta la actividad de la 5-aminolevulinato sintetasa, importante en la síntesis de clorofila, por lo que algunos investigadores como Dutui (1975) recomiendan que se evite su uso; por otro lado, el desarrollo de los cloroplastos, dependiendo de la especie se ve afectado por las auxinas (Aitchison et al., 1977).

Estos dos factores deben ser considerados para el mantenimiento del tipo de callosidades verde-pálido, al igual que algunos factores físicos como la luz; de aquí que no se haya logrado un desarrollo más prolongado de este tipo de callosidades y los tipos B y C no recuperaran su aspecto original. Otros factores como los micronutrientes probablemente no influyen en el mantenimiento de las callosidades y los componentes orgánicos como las vitaminas, bajo las condiciones experimentales usadas, tampoco parecen ser determinantes en este sentido; no obstante, no se debe menospreciar su valor hasta no haber comprobado su importancia para las callosidades de C. papaya.

3.- Diferenciación de brotes.

El desarrollo de los meristemos apicales y laterales de los brotes se favoreció por la composición del medio en general y los niveles endógenos de reguladores, el desarrollo de los meristemos apicales ocurrió al remover las hojas, que representaban cierto grado de inhibición ó represión del desarrollo de tales meristemos.

El desarrollo de brotes múltiples ha sido reportado por Yie y Liaw (1977) y Litz y Conover (1978); los medios S_2 y S_3 coinciden con los utilizados por los primeros para la diferenciación de los brotes. Los resultados en este trabajo concuerdan con las apreciaciones de dichos autores y difieren con lo reportado por González (1980) ya que durante su investigación no logra el desarrollo de brotes múltiples; así pues la posibilidad de propagar vegetativamente esta especie se confirma con los resultados obtenidos en este trabajo.

5.- Enraizamiento de brotes.

Una relación auxina-citocinina a favor de la primera induce la formación de raíces (Thorphe, 1979; Thanh Van y Trin, 1978; Azaola, 1979; Yeoman y Street, 1977); para C. papaya Yie y Liaw (1977) y Litz y Conover, (1978) han reportado el enraizamiento de brotes derivados por cultivo de tejidos; el bajo porcentaje de enraizado y la respuesta de los brotes colocados para ello durante nuestra investigación, sugiere que la fisiología de éstos es importante, ya que de no haber alcanzado cierto grado de desarrollo, es posible que el incremento en la concentración de auxinas en el medio, actúe negativamente.

V CONCLUSIONES

1.- Los tres tipos de explante empleado, tallo, hoja y brotes apicales de plántulas de Carica papaya tipo Cera de aproximadamente 20 días de edad fueron susceptibles de experimentar dediferenciación bajo las condiciones de cultivo utilizadas.

2.- Las combinaciones de reguladores del crecimiento que favorecieron la inducción de callosidades fue de 0.2 mg/l de ANA y de 0.02 mg/l ó 0.2 mg/l de BA en los explantes usados, siendo la base de los brotes apicales las que desarrollaron mejor crecimiento (8.0 mm.).

3.- Para la proliferación de las callosidades se observó que es necesario el trasplante a medio fresco cada 14 días, no habiendo diferencias significativas si el trasplante se realiza al mismo medio de inducción de callo ó la los medios V₇, V₈ y S₁, recomendándose un estudio acerca del efecto de las concentraciones de sacarosa y de condiciones de luminosidad en el mantenimiento de la división en el tejido y en la diferenciación del mismo, con lo que se pueden iniciar los estudios de caracter genético que tendieran a la obtención de resistencia en esta especie al virus de la mancha anular.

4.- El desarrollo de brotes múltiples y la posibilidad de enraizar éstos, sugiere la utilización de citocultivos para la propagación vegetativa de esta especie, con la ventaja de poder seleccionar individuos con tolerancia y/o resistencia al virus de la mancha anular y diferenciadas sexualmente.

VI. LITERATURA CITADA

Adsuar, J., 1946. Studies on virus diseases of papaya (Carica papaya) in Puerto Rico. II Transmission of papaya mosaic by the green citrus aphid (Aphid spiraccola Patch). Univ. Pto. Rico Agric. Ext. Sta. Tech. Paper 2.

Agete y Piñeiro F. 1931 Fruta Bomba. Sria. Agric. Comb. y Trab. Circular 76, Santiago de las Vegas, Cuba, 26 p.

Aitchison, P.A., A.J. Macleod y M.M. Yeoman, 1977. Growth patterns in tissue (callus) cultures. En Plant Tissue & Cell Cultures. Blackwell Sc. Pub. 2a. Ed. 267-307.

Arora, I. K. y R. N. Singh, 1978 a. Growth hormones and in vitro callus formation of papaya. Scientia Horticulturae 8: 357-361

----- y -----, 1978 b. Callus initiation in the propagation of papaya Carica papaya L., in vitro. Jour. Hort. Sci. 53:151

----- y -----, 1978 c. In vitro plant regeneration of papaya. Current Science 47 (22): 867-868.

Azola, A, 1979. Papel de los reguladores del crecimiento vegetal en el cultivo de tejidos in vitro. Tesis Profesional, Q.F.B. Fac. Química, U.N.A.M. 140 p.

Badillo, M. V., 1971. Monografía de la familia Caricaceae. Univ. Central de Venezuela., Fac. Agron.

Bird, J, y J. Adsuar, 1952. On the viral nature of papaya bunchy top. Phytopathol. (1): 3

Blakely, L. M. y Steward F. C. 1961. Growth induction in cultures of Haplopappus graulis, I. The behaviour of cultured cells. Amer. Journ. Bot. 48: 351-358.

Bourgin, J. P., 1978. Isolement de mutants a partir de cellules vegetales au culture in vitro. Physiol. Veg. 16 (3):339-351

Carlson, P. S., 1971. Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of Nicotiana tabacum. Science 168: 487-489.

----- y T.B. Rice, 1977. Genetic engineering and crop improvement. HortScience 12 (2): 11-13

----- y J.C. Polacco, 1975. Plant cell cultures: Genetic aspects of crop improvement. Science 188: 622-625.

Carmona, A., 1979. Introducción al cultivo de tejidos.(op. inedit).

CONAFRUT, 1972. La papaya, aspectos de su cultivo y aprovechamiento. Serie de Divulgación. Folleto 5, SAG, México. 15 p.

-----, 1973. El papayo. Serie de Divulgación. Folleto 12, SAG, México. 31 p.

Conover, R. A., 1962. Virus diseases of the papaya in Florida. Phytopathology 52(1): 6

Cook, A.A. y G.M. Milbrath, 1971. Virus diseases of papaya on Oahu (Hawaii) and identification of additional diagnostic host plants. Plant Dis. Repr 55(9): 785-788

-----, y F.W. Zettler, 1970. Susceptibility of papaya viruses. Plant Dis. Repr. 54(10): 893-895.

de Bokx, J. A., 1965. Host and electron microscopy of two papaya viruses. Plant Dis. Repr. 49(9): 742-746

de Brujine, E., De Langhe y R. van Rijk, 1974, Actions of hormones and embryoid formation in callus cultures of Carica papaya. Int Symp Fytoform. Fytiat. 26: 637-645.

de Fischer, M. O. y J. Galindo, 1977. la virosis del papayo en México. Revista Panacea 5 (38): 6-7

----- y -----, 1978. A virus diseases of papaya (Carica papaya) in Mexico. Fitopatología 13(1):48

de Zerpa D. M., 1967 Inoculaciones sobre lechosa (Carica papaya L.) con virus de la "deformación foliar y mancha en anillo" (Distortion rings) en condiciones diversas. Agron. Trop. 17(4): 361-363

del Campo N., 1980. Estudio físico y químico de diez fenotipos criollos de Carica papaya L. de la región central del Estado de Veracruz. Tesis Profesional, Fac. de Ciencias Químicas, Univ. Veracruzana, 139 p.

Devreux, M. 1973. In vitro culture and mutation breeding. Em Induced Mutations an Plant Improvement. Int. Atom.ner. Agen Vienna: 41-51

Dutui, P. 1975. Variabilité cellulaire obtenue chez Vicia sativa var Septimane par culture des tissus in vitro. Tesis Doctoral. Amelioration des Plantes. Univ.Paris. Sud centre d' Orsay.

Edelman, J. y Hanson A.D., 1971 Sucrose suppression of chlorophyl syntesis in carrot callus cultures. Planta 98: 510- 156.

Favret, E. A., 1972. El mejoramiento de las plantas por inducción de mutaciones en Latinoamérica . En Induced Mutations and Plant Improvement. Int. Atom. Ener. Ag. Vienna: 49-59

Gengenbach, B. G. y C. E. Green, 1975. Selection of T-cytoplasm maize callus cultures resistant to Helmithosporium maydis; Race Phatotoxin Crop Science 15:645-649

Green, C. E., 1977. Prospects for crop improvement in the field of cell culture. HortScience 12(2): 7-10

González, A., 1980. Efecto morfogenético in vitro en Carica papaya L.
Tesis Profesional: Fitotecnia, Univ .Aut. Chapingo. 71 p.

Horovitz , S. y Jimenez H., 1967. Cruzamientos interespecificos e intergenéricos en Caricaceas y sus implicaciones fitotecnicas. Agron. Trop. 17: 323-343

Jensen, D.D., 1946. Virus diseases of plants and theirs insect vectors with special reference to Hawaii. Proc. Haw. Ent. Soc. 12: 535-610

-----, 1947. A new virus disease of papaya. Univ. Haw. Exp. Sta. Biennial Reprt, 1944-1946: 67

-----, 1949. Papaya virus diseases with special reference to papaya ringspot. Phytopathology 39: 191-211

Jiménez, H. y S. Horovitz, 1958. Cruzabilidad entre especies de Carica. Agron Trop. 7: 207-215

León R y E. Olivas, 1979. Relación entre virosis del papayo (Carica papaya) y aspectos climáticos en Veracruz. Bol Inf. CONAFRUT No. 8:10-12.

Linder, R.C., D.F. Jensen y W Ikeda., 1945. Ringspot : new papaya plunderer. Haw. Farm. & Home 8(10):10-14.

Litz R. E. y R. A. Conover, 1978. In vitro propagation of papaya. Hort-Science 13(3): 241-242.

Mandujano, R., 1980. Apuntes del cultivo de la papaya. Op. inedit.

Medhi A. y L. Hogan, 1976. Tissue culture of Carica papaya. HortScience 11: 311 (Abstr.).

Mekako, H. y H. Y. Nakasone, 1975. Interspecific hybridization among 6 Ca-rica species. Jour. Amer. Soc. Hort. Sci. 100(3): 237- 242

Murashige, T. y Skoog, F. 1962, A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

-----, 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166

-----, 1977. Current status of plant cell and organ cultures. Hort-Science 12(2): 127-130

Ojima K. y K. Ohira, 1978. Nutritional requeriments of callus and cell suspension cultures. En Frontiers of Plant Tissue Culture. Int. Assoc. Plant Tissue Culture, : 265-276.

Picard, E. , 1974. Mise au point de l'androgenese in vitro chez le blé tendre (Triticum aestivum L. EM . Theil) pour l'obtention de plantes haploi-

des. Tesis Doctoral. Amelioration des Plantes . Univ. Paris Sud Centre d'Orsay.

Singh, A.B., 1969. A new virus diseases of Carica papaya in India. Plant Dis. Repr. 53(4): 267-269.

Sink, K. C. y V. Padmanabhan, 1977. Anther and Pollen culture to produce haploids: progress and application for the plant breeder. HortScience 12(2): 19-24

Storey, W.B., 1976. Papaya. Carica papaya (Caricaceae). En Evolution of Crop Plants, Longman London, N.Y.: 20-24.

Story, G.E. y R.S. Haliwell, 1969. Identification of distortion ringspot virus disease of papaya in the Dominican Republic. Plant Dis. Repr. 53(9): 757-759

Street, H.E., 1977. Plant tissue and cell culture. 2a. Ed. Blackwell Scient. Pub. England 614 p.

Skoog, F. y Tsui C., 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. Amer. Jour. Bot. 35: 782-787

Thanh Van y H. Trin. 1978. Morphogenesis in thin cell layers : concept, methodology and results. En Frontiers of Plant Tissue Culture, Int.

Assoc. Plant Tissue Culture: 37-48.

Thomas, E. y M.R. Davey, 1975. From single cells to plants. Wykeham Pu. Ltd. London & Winchester. 111 p.

Thorpe, T.A., 1978. Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro. En Frontiers of Plant Tissue Culture. Int. Assoc. Plant Tissue Culture: 49-59.

-----, 1979. Organogenesis in vitro: structural physiological and biochemical aspects. (op. inedit).

White, P. R. , 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. Amer. Journ. Bot. 26:59-64

Yeoman, M.M. y H.E. Street, 1977. General cytology of cultured cells. En Plant Tissue and Cell Culture. Bo. Monog. Vol II: 31-61'

Yie, S.T. y S. I. Liaw. 1977. Plant regeneration from shot tips and callus of papaya. In vitro. 13(9): 564-568