

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN
Y ALIMENTOS

TESIS PROFESIONAL

EFECTO DE LA LUZ ROJA EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE PAPAYA MARADOL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN ALIMENTOS

PRESENTA
SERGIO DE JESÚS HERNÁNDEZ CABRERA

DIRECTOR DE TESIS
DR. GILBER VELA GUTIÉRREZ

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS.

MARZO 2022





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
DIRECCION DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACION ESCOLAR



Autorización de Impresión

Lugar y Fecha: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 16 de agosto de 2022

C. Sergio de Jesús Hernández Cabrera

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Alimentos

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Efecto de la luz roja en la embriogénesis somática de papaya maradol

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores

Mtra. Isabel vega Rosario

Mtra. Susana Guadalupe Zea Caloca

Dr. Gilber Vela Gutiérrez

Firmas



(Handwritten signatures in blue ink)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la vida tener la dicha y satisfacción de poder concluir esta etapa en mi vida.

Agradezco a Dios la sapiencia y la responsabilidad que me brinda para poder llegar a este paso en mi vida, por ser el guía de mis pasos y encontrar los mejores momentos para que todo suceda.

Mi mayor agradecimiento y mi respeto para Beatriz Victoria Cabrera García y José Manuel Hernández Cordero (mis padres) por ser un ejemplo de perseverancia y superación para mí y por enseñarme que jamás debo rendirme, gracias por ser mis guías en esta vida, gracias por la educación que me brindaron y sobre todo gracias por brindarme siempre su apoyo, Mamá gracias ser el timón de mi vida, por seguir apoyándome en todos mis proyectos y por el infinito amor que día a día me regalas, Papá gracias por haber sido el ancla en mi vida, gracias por dejarme el corazón lleno de amor y gracias por seguir cuidando de mi desde el cielo. Los amo y espero que ambos se sientan orgullosos de lo que su hijo va logrando en su vida, este proyecto que hoy concluyo es gracias a ustedes y es la más bonita herencia que me pudieron regalar.

A Alejandra Guadalupe Hernández Cabrera (hermana) gracias por estar siempre a mi lado, por ser esa guía extra que la vida me dio y poder encontrar en ti el amor más bonito, gracias por tu apoyo siempre y por ser una guía materna que siempre ha cuidado de mí, a mi cuñado Erick Ruiz Méndez gracias por tu apoyo y cariño, y por que sin duda te has convertido en pieza fundamental de mi vida y a quien admiro con el corazón.

A mi familia Navarro Álvarez le doy mi más sincero agradecimiento por ser parte importante en mi vida y por apoyarme en cada momento de ella, gracias por su amor, comprensión y cariño y por ser parte de mi motivación para superarme todos los días.

A mis abuelitas Luisa y Consuelo por creer siempre en mí, gracias por ser el ejemplo más bonito en mi vida de fortaleza y valentía, gracias por su amor desmedido, las admiro y respeto con mucho amor.

Y finalmente dedico este proyecto a quienes ahora son mi mayor motivación y quienes me inspiran ser mejor cada día, Isaack, Mauro, Bastian y Natalia mis sobrinos.

RECONOCIMIENTOS

Mi mayor reconocimiento a mi director de tesis Dr. Gilber Vela Gutiérrez, por todos los conocimientos compartidos, por ser un gran guía durante la elaboración de este proyecto, por ser una inspiración en el área de la investigación en mi vida, por su entrega y dedicación a la investigación y sobretodo darle mi más sincero agradecimiento por permitirme el uso de su laboratorio para realizar la presente investigación, por las enseñanzas que en mi ha dejado, por su paciencia y por jamás dejarme solo en el laboratorio, gracias por ser un investigador entregado y dejar en sus alumnos grandes aprendizajes y el amor a la investigación, gracias por la confianza que usted deposito en mí para llevar a cabo este proyecto.

Agradezco a la Mtra. Susana Guadalupe Zea Caloca por su apoyo durante mi formación profesional, por los consejos brindados y por la enseñanzas que en mi dejo durante esta etapa de mi vida, gracias por su apoyo y asesoría brindada durante la realización de la presente investigación y gracias por ser un ejemplo de superación profesional para sus alumnos.

Agradezco a la Mtra. Isabel Vega Rosario su tiempo, dedicación y apoyo en el proceso de asesorías y entrega de la presente investigación.

A la Mtra. Emperatriz Domínguez Espinosa le doy gracias por brindarme su apoyo durante toda la carrera, gracias por sus consejos, lecciones y enseñanzas que en mi dejo y que podre aplicar en mi vida profesional, gracias por ser un ejemplo de liderazgo que me inspira a superarme todos los días, la recuerdo con mucho cariño y afecto, mi admiración y respeto para usted y gracias por ser un gran ejemplo en mi vida.

A todos mis maestros y asesores que formaron parte de mi vida profesional les doy las gracias y mi reconocimiento, por su dedicación y entusiasmo a formar profesionales de calidad, su entrega y dedicación nos inspirar a ser mejores día con día, gracias por ser la fuente de inspiración y superación para muchos de nosotros, mi reconocimiento para cada uno de ustedes que han logrado tener un crecimiento profesional y así poder hacer crecer y mejorar nuestra licenciatura.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
OBJETIVOS	5
GENERAL	5
ESPECÍFICOS.....	5
MARCO TEÓRICO	6
PAPAYA	6
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	6
ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	7
ORIGEN DE LA PAPAYA MARADOL.....	8
PAPAYA MARADOL.....	8
DESCRIPCIÓN BOTANICA.....	9
FLOR	11
SEMILLA	13
CARACTERÍSTICAS EXTERNAS DE LA SEMILLA	13
Forma y tamaño:	13
Hilo y micrópilo:	14
Funículo:.....	14
Rafe:.....	15
Cubierta seminal:	15
CARACTERÍSTICAS INTERNAS DE LA SEMILLA.....	16
Cubierta seminal:	16
Endospermo:	16
Embrión:	16
Cotiledones:	17
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LA PAPAYA	18
EXIGENCIAS ECOLÓGICAS	18
PROPAGACIÓN DE LA PAPAYA.....	19
Propagación por semilla.....	19

Propagación asexual o esquejes.....	19
Propagación de tejidos.....	20
POST COSECHA DE LA PAPAYA.....	20
PRODUCCIÓN MUNDIAL.....	20
PRODUCCIÓN NACIONAL.....	22
PRODUCCIÓN ESTATAL.....	23
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	23
FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO DE TEJIDOS.....	24
El inoculo o explante.....	24
Factores físicos.....	25
Factores químicos.....	26
EMBRIÓN SOMÁTICO.....	26
CALLO EMBRIOGÉNICO.....	27
CULTIVO <i>IN VITRO</i>	27
Tipos de crecimiento <i>in vitro</i>	28
Crecimiento organizado.....	28
Crecimiento desorganizado.....	28
MEDIO DE CULTIVO.....	28
Sales minerales.....	29
Compuestos orgánicos.....	29
Preparaciones naturales complejas.....	30
Materiales inertes.....	30
AGAR.....	31
MEDIO MURASHIGE AND SKOOG (MS).....	31
SACAROSA.....	31
VITAMINAS.....	32
GLUTAMINA.....	34
2,4 – ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO.....	34
EFFECTO DE LA LUZ EN LAS PLANTAS.....	35
ASEPSIA.....	35
DESINFECCIÓN.....	36

METODOLOGÍA.....	37
TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO.....	37
VARIABLES	38
MUESTRA.....	38
DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.....	38
PRIMERA ETAPA: EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	38
SEGUNDA ETAPA: GENERACIÓN DE PLÁNTULAS	40
ANÁLISIS DE DATOS.....	41
RESULTADOS.....	42
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS DOCUMENTALES	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Arbol de papaya maradol (Carica papaya).....	10
FIGURA 2. Tipos de flores: femenina, masculina y hermafroditas (penttandria, carpeloide y trompetilla o esteril).	12
FIGURA 3. A. Semilla madura de papaya, B. Hilo (HI) de la semilla, C. Micrópilo (mi) de la semilla. Hernández C. Sergio. 2016.....	14
FIGURA 4. a) Semillas inmaduras adheridas al funículo (fu) en la cavidad del fruto; b) semilla madura con el funículo (fu) adherido.	14
FIGURA 5. a) Semilla de papaya con la sarcotesta adherida (nótese el brillo en la superficie); b) mesotesta de la semilla de papaya; c) Rafe (r).....	15
FIGURA 6. Estructura interna de la semilla de C. papaya. a) a, embrión; b, endospermo; c, endotesta; d, mesotesta; e, tegmen; f, rafe; b) a, mesotesta; b, endotesta; c, tegmen; d, endospermo; e, calaza; f, cotiledón; g, radícula. Hernández C. Sergio. 2016	16
FIGURA 7. Embrión de la semilla de papaya: r, radícula; co, cotiledón.....	17
FIGURA 8. Producción mundial de papaya.....	22
FIGURA 9. Producción nacional de papaya durante el periodo de 1997 a 2008.....	23
FIGURA 10. Diagrama de flujo correspondiente a la etapa 1.....	39
FIGURA 11. Diagrama de flujo correspondiente a la etapa 2.....	41
FIGURA 12. A. Embrión recién obtenido de semilla de frutos inmaduros de papaya Maradol. B. embriones sometidos a tratamiento de oscuridad. C. embriones sometidos a 1 hora de luz roja en sus diferentes porcentajes de sacarosa.....	42
FIGURA 13. Embriones en fase globular, de corazón y torpedos de papaya Maradol.....	43
Figura 14. Efecto en la fuente e intensidad luminosa y tiempo de cultivo para aparición de embriones somáticos.....	44
Figura 15. Formación de embriones somáticos de papaya maradol en los tratamientos de luminosidad.....	45

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación taxonómica del fruto de papaya maradol.....	7
TABLA 2. Composición química de la papaya maradol.....	18
TABLA 3. Vitaminas liposolubles	33
TABLA 4. Vitaminas hidrosolubles	33
TABLA 5. Diseño experimental.....	37
TABLA 6. Variables independientes y dependientes	38

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
μmol	micromoles
2,4-D	2,4- ácido diclorofenoxiacético
Cm	centímetros
CONAFRUT	Comisión Nacional de Fruticultura
g	gramos
Gln	glutamina
Hrs	horas
Kg	kilogramos
L	litros
Memb	medio de cultivo embriogénico
Mg	miligramos
Mm	milímetros
MS	Murashige and skoog
m.s.n.m	metros sobre el nivel del mar
nm	nanómetro
TMAC	Tasa Media Anual de Crecimiento
Ton	toneladas
U	unidades
UDP-Glucosa	Uridina difosfato glucosa
HR	Humedad Relativa

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento y la propagación convencional ha contribuido significativamente por varias décadas en el mejoramiento genético de plantas, sin embargo, actualmente uno de los principales retos que tienen, es la necesidad de incrementar la productividad por un lado y por otro el disminuir los costos de producción, por lo tanto en este sentido el uso de herramientas biotecnológicas es una alternativa viable para resolver estos retos (Mondal, et al, 2004).

En el proceso de modificar la composición genética de las plantas a través del uso de la biotecnología, el cultivo de tejidos tiene un importante papel, porque actúa como un intermediario entre los avances hechos por la biología molecular en el aislamiento y modificación de genes y la regeneración de plantas transformadas para ser evaluadas por los genetistas y Fito mejoradores (Manzanilla, 2004).

Dentro de las técnicas de cultivo de tejidos la embriogénesis somática representa un método eficiente para la regeneración de plantas y se le ha preferido entre otros métodos, para ser usada en el mejoramiento genético de frutales, debido principalmente a la dificultad que existe para regenerar tejidos por otras vías, como la organogénesis, por el alto contenido de componentes fenólicos en los explantes (Litz, y otros, 1991). La embriogénesis somática se define como el proceso por el cual células somáticas desarrollan los estados de embriogenia y dan como resultado plantas completas sin fusión de gametos (Merkle, 1990).

El desarrollar un protocolo eficiente de regeneración de cultivo de tejidos de la papaya maradol (*Carica papaya L.*) vía embriogénesis somática bajo tratamientos de efecto de luz roja, abre la posibilidad para obtener de manera más pronta la generación de embriones somáticos y reducir el tiempo para la generación de plántulas de papaya maradol (*Carica papaya L.*) *in vitro*.

Como objetivo general de la investigación se plantea evaluar el efecto de la luz roja en el proceso de embriogénesis somática para la regeneración de plantas de papaya Maradol. Derivado de este se tienen tres objetivos específicos que son: generar una línea embriogénica eficiente para la producción *in vitro* de plántulas de papaya Maradol a partir de embriones provenientes de frutos inmaduros, evaluar el efecto de la luz roja sobre la velocidad de la embriogénesis somática y evaluar el efecto de la luz blanca (fotoperiodo de 16 horas) sobre la regeneración de plantas de papaya Maradol.

La metodología a realizarse en la presente investigación consiste en someter a los embriones somáticos en tres variantes de investigación: Tiempos de exposición a la luz, concentración de 2,4-D (2,4-ácido dicloro fenoxiacético) mg/l y % de sacarosa en el medio Memb, para poder acelerar el proceso de producción de embriones cigóticos aptos para la obtención de plántulas de papaya maradol.

El proyecto de investigación pretende acelerar el tiempo de producción de embriones somáticos con la ayuda a la exposición de luz roja, para poder obtener de manera más rápida plántulas del fruto de papaya maradol.

JUSTIFICACIÓN

Carica papaya L. es uno de los miembros de la familia Caricácea con solo cuatro especies nativas originarias de América del Sur. Se cultiva en las regiones tropical y subtropical en varios países de América y África (Reyes, 1983). La propagación de la papaya es por semillas, lo que trae como consecuencia considerable variabilidad en poblaciones comerciales (Drew y Manshardt, 1997). Además, el cultivo es afectado por varias enfermedades, la más importante de ellas es la causada por el Virus de la Mancha Anular de la Papaya (PRSV). La biotecnología en este cultivo puede ser una herramienta útil para acelerar los programas convencionales de propagación masiva de plantas y mejoramiento genético.

La embriogénesis somática representa una alternativa para la regeneración de plantas, sobre la cual influyen diversos factores durante el cultivo *in vitro*. Entre estos, las condiciones de iluminación durante la formación de embriones somáticos son determinante.

El crecimiento y desarrollo vegetal son actividades dependientes de la luz, esta relación se conoce como fotomorfogénesis la cual esta medida por fotoreactores (fitocromo y citocromo) que pueden o no interactuar y producir cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos (Spalding y Folta, 2005), gracias a la información que adquieren de la calidad, cantidad, dirección y foto periodicidad de la luz que controla su crecimiento y diferenciación (Bergareche y Moysset, 1993). Es así que la luz es el elemento ambiental más importante para el desarrollo de las plantas, y provee energía suficiente para realizar la fotosíntesis. Cabe mencionar que los fotoreceptores son moléculas proteicas con capacidad de absorber la luz gracias a que poseen uno o más cromóforos. Por ejemplo los fitocromos son fotoreceptores de luz roja (600 a 700 nm) y luz roja lejana (700 a 800 nm).

Por ello, en esta investigación se planteó someter embriones cigotos a tratamientos con luz roja para acelerar el proceso de producción de embriones somáticos para la obtención de plántulas de papaya maradol (*Carica Papaya* L.) con mayor rapidez.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México ocupa el tercer lugar mundial en la producción de papaya, después de Brasil y Nigeria, en el 2011 la producción de papaya en México fue 634, 368,99 ton. Los principales estados productores de México son Chiapas, Veracruz y Oaxaca. El cultivo de embriones ha ayudado al mejoramiento genético de especies arbóreas por que acorta el periodo siembra-floración, así mismo, ha sido efectivo para acortar el ciclo de mejoramiento de *Iris spp.* Por qué acorta el periodo de latencia de las semillas que oscila entre unos pocos meses y varios años; esta latencia se debe algunos inhibidores del crecimiento del embrión presentes en el endospermo y en la cubierta de la semilla, por medio del cultivo de embriones, es posible acortar la latencia y producir plántulas para el transporte a las 2 o 3 semanas (Vela, y otros, 2014).

Con la presente investigación se pretende identificar qué tratamiento (porcentaje de sacarosa, concentración de 2,4D (2,4-ácido diclorofenoxiacético) y tiempo de exposición a la luz roja) es el más viable para acelerar la producción de embriones somáticos idóneos para obtener plántulas de papaya maradol.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto de la luz roja en el proceso de embriogénesis somática para la regeneración de plantas de papaya Maradol.

ESPECÍFICOS

- Generar una línea embriogénica eficiente para la producción *in vitro* de plántulas de papaya Maradol a partir de embriones provenientes de frutos inmaduros.
- Evaluar el efecto de la luz roja sobre la velocidad de la embriogénesis somática.
- Evaluar el efecto de la luz blanca (fotoperiodo de 16 horas) sobre la regeneración de plantas de papaya Maradol.

MARCO TEÓRICO

PAPAYA

Familia: Caricácea

Género: *Carica*

Especie: Papaya

Nombre científico: *Carica Papaya L.*

Nombres comunes: papaya, lechosa, mamona, chamburro, melón zapote, fruta bomba (Fonnagre, y otros, 2007).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La *Carica papaya L.* pertenece a la familia caricácea, es una cotiledónea, polígama (en la misma planta puede tener flores masculinas, femeninas o hermafroditas), especie diploide con un pequeño genoma de 372 Mbp/1C y nueve pares de cromosomas. El nombre del género *Carica* se deriva del nombre Latín de una especie de higuera que sus frutos y hojas se asemejan a *Carica papaya*: el epíteto específico de papaya probablemente proviene del nombre común de la fruta (OGTR, 2008).

La familia Caricácea solamente incluye cuatro géneros, tres de los cuales son de América tropical (*Carica*, *Jacaratia* y *Jarilla*) y uno de África ecuatorial (*Cylicomorpha*). El género *Carica* agrupa unas 21 especies de plantas, dentro de las cuales *Carica papaya* es la más importante por su utilización en la alimentación humana, la clasificación taxonómica se detalla en la tabla 1 (Alfonso, 2010).

TABLA 1. Clasificación taxonómica del fruto de papaya maradol.

REINO	VEGETAL
Tronco	Cormophyta
División	Antophyta
Subdivisión	Angiosperma
Clase	Dicotiledónea
Subclase	Chrisopetala
Segundo grado evolutivo	Dialipetada
Orden	Parietales
Familia	Caricácea
Genero	Carica
Especie	Papaya

Fuente: Alfonso, 2010.

ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Se cree que la papaya es nativa del sur de México y de algunos países vecinos de América central. Se cultiva en Florida, Hawái, Este de África, Sudáfrica, Sri-Lanka, India, Islas Canarias, Malasia y Australia. Está presente en países tropicales y subtropicales. La papaya fue descrita por primera vez en 1526, por el cronista español Gonzalo Fernández de Oviedo, quien manifiesta haberlas encontrado en las costas de Panamá y Colombia. La fruta se propago rápidamente a la mayoría de los trópicos, probablemente debido a la abundancia y a la alta viabilidad de las semillas. El cultivo se adapta muy bien a las áreas tropicales con suelos fértiles y lluvias abundantes. Datos del historiador, indican que la propagación de la papaya se inició aproximadamente en el año 1500, cuando los conquistadores españoles llevaron las semillas a Panamá y República Dominicana. Durante el siguiente siglo, los navegantes españoles y portugueses llevaron las semillas a Filipinas, Malasia e India. Para el año de 1600, ya había producción de fruta en las regiones cálidas del sur y centro de América, sur de México, las Antillas, Bahamas y Bermudas. En ese mismo siglo, las semillas de papaya fueron transportadas de la India a Nápoles, en Italia. El cultivo llegó a Hawái entre 1800 y

1820. En 1900, las semillas de papaya fueron llevadas a la Florida, probablemente de plantaciones provenientes de las Bahamas. Las primeras semillas de la variedad Maradol se introdujeron a México en 1978, a través de CONAFRUT, en Xalapa, Veracruz (De la Cruz y otros, 2003)

En la actualidad es ampliamente cultivada en diferentes regiones extra americanas como Hawái, Australia y Sudáfrica. La papaya crece bien en alturas comprendidas entre los 0 y 1.000 m.s.n.m con temperaturas entre 22 y 32 °C (Bernal, y otros, 2001).

Originaria de Centroamérica; otros autores afirman que es originaria de los trópicos de Suramérica (Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela). Se cultiva en todos los países tropicales por su fruto comestible (Bernal, y otros, 2001).

ORIGEN DE LA PAPAYA MARADOL

El fitomejorador cubano Adolfo Rodríguez Rivera fue el creador de esta variedad, misma que se desarrolló en un periodo de alrededor de diez años.

El trabajo se inició con la línea “Corralillo” desarrollada por Rodríguez Rivera de 1938 a 1949. En el año de 1949, introdujo otra línea procedente del oriente de Cuba, lo que dio como resultado un fruto con excelente olor y sabor. A partir de ese momento se desarrollaron una gran cantidad de cruzamientos entre ambas líneas con el propósito de fijar las principales características de ambas: un mesocarpio de gran espesor, el sabor y olor.

En 1956, se logró mediante autopolinización la completa realización de esta variedad, logrando además una reducción del tamaño del fruto, alto rendimiento y una vida de anaquel mayor al resto de las variedades. El nombre de la variedad: “Maradol” proviene del nombre de su creador “Adolfo” y su esposa “María” (Rodríguez Nodals y Rodríguez Manzano, 2000).

PAPAYA MARADOL

Es un cultivar ginodioico (población compuesta por plantas hermafroditas y femeninas), de origen cubano, introducido a México en 1977 por CONAFRUT. La fruta es alargada, cilíndrica, de gran tamaño, el tamaño del fruto varía de 10 a 15 cm o más de largo, y de 7 a 15 cm o más de diámetro y pueden llegar a pesar entre 1 y 3 kg. La piel de la fruta es lisa y delgada, de color verde y no se torna

amarilla conforme va madurando. La pulpa es de color roja o amarilla, y su sabor es dulce aunque no es tan intenso como las variedades Hawaianas. Resultan muy sensibles a enfermedades post-cosecha como la antracnosis (Barreiro, 1999).

La papaya pertenece a la Familia Caricácea, que agrupa cuatro géneros, de los cuales el más importante es *Carica* y las especies son diversas, sobresaliendo en nuestro país *Carica papaya* L. Botánicamente, el fruto de la papaya es una baya, con semillas comestibles hasta 500 que contiene una especia de sabor parecido a la pimienta (Barreiro, 1999).

La papaya es un fruto climatérico. El climaterio es un estado de auto estimulación en el que se produce un cambio de crecimiento a envejecimiento de los frutos, observándose un incremento repentino en la actividad respiratoria, así como cambios bioquímicos iniciados por la producción autocatalítica de etileno (Barreiro, 1999).

Durante la maduración la pulpa de papaya sufre un cambio de color de verde a naranja. Este proceso es debido a la pérdida de clorofilas y a la síntesis de carotenoides. Estos cambios de pigmentación se producen al sufrir los cloroplastos cambios estructurales originándose los cromoplastos (Lobo, 1995).

A lo largo del período de maduración, los carotenoides del cloroplasto (α y β -carotenos, luteína, violaxantina y neoxantina) disminuyen y aumentan los carotenoides del cromoplasto (criptoxantina, anteraxantina y zeaxantina), al tiempo que se produce una carotenogénesis, siendo los productos mayoritarios en la fruta madura el α y β caroteno (Lobo, 1995).

Existe muy poca información sobre la relación entre el cambio de color de la pulpa y el patrón de carotenoides en distintos estados de maduración (Lobo, 1995).

DESCRIPCIÓN BOTANICA

La papaya es una planta herbácea tipo arbustiva que en su madurez alcanza alturas de hasta de 10 metros, de tallo sencillo que a veces se ramifica y con tronco hueco y madera esponjosa. Todas las partes de la planta exudan un látex lechoso si se hieren, este líquido contiene una enzima llamada papaína, que es capaz de digerir las proteínas. (Baraona y Sancho, 1991).

La papaya es una planta herbácea de crecimiento relativamente rápido y de vida corta. Tiene un tallo erecto con una coloración que va desde el verde claro, en la proximidad del ápice al verde grisáceo en el resto de su longitud. Las hojas son palmatilobuladas y se presentan dispuestas en espiral a lo largo del tallo. En la zona terminal se presenta las hojas tiernas y en la parte inferior hojas viejas y secas que se caen a medida que la planta crece. El sistema radicular es pivotante con una raíz principal bastante desarrollada, mientras que las raíces secundarias son flexibles. El fruto es una baya cuya forma va a depender del tipo de flor que lo origina. Normalmente, los frutos femeninos son más redondeados, mientras que los hermafroditas suelen tener una forma más piriforme o cilíndrica, (Agrolanzarote, 2012).



FIGURA 1. Árbol de papaya Maradol (*Carica papaya* L.)

FLOR

Dentro de la especie *Carica papaya*, se reconocen 6 tipos de flores:

1. Flor típica femenina. La flor correspondiente es grande y de forma cónica cuando aún está cerrada. Al abrir sus pétalos lo hacen hasta la base de la flor. El fruto producido por estas flores es esférico y grande.
 2. Flor hermafrodita pentándria. Es muy parecida a la anterior, pero la diferencia está en cuando abre tiene 5 estambres cortos. El ovario tiene también 5 surcos profundos longitudinales que permanecen hasta la madurez.
 3. Flor hermafrodita intermediaria. Tiene una organización indefinida, los pétalos pueden fusionarse hasta 2 tercios, de su longitud o estar libres hasta la base. El número de estambres varía entre 2 y 10, los carpelos de igual forma varían entre 5 y 10. Dicha flor da origen a frutos deformes los cuales reciben el nombre de carpelódicos o “cara de gato”, estos no tienen un valor comercial.
- Estas flores se presentan cuando las temperaturas se ponen frescas, teniendo como nivel 24.5 °C en el días y 15.25 °C en la noche.
4. Flor hermafrodita elongata. Los pétalos se unen entre una cuarta y 3 cuartas partes de su longitud. Presenta 10 estambres, 5 largos y 5 cortos. El ovario es alargado y cuando tiene de 5 a más carpelos la forma de la fruta varía desde largo cilíndrica a piriforme. Este tipo de flor es la más buscada comercialmente.
 5. Flor hermafrodita trompetilla o estéril. Lo que ocurre con esta flor es que no desarrolla un ovario, aunque es muy parecida a la elongata, pero revisándola bien se nota la diferencia. Se presenta cuando hay altas temperaturas, un estrés hídrico y/o deficiencias nutrimentales. Es muy importante retirarla ya que al dejarla cuajar, esa zona se queda sin frutos.
 6. Flor masculina. Las flores de este tipo tienen el tubo de la corola largo y delgado, presentan 10 estambres. Estas vienen en racimos.

Con respecto a la floración, la variedad maradol es un cultivo ginodioico, ya que solo se encuentra conformado por plantas hermafroditas y femeninas.

Hay ocasiones en las cuales las flores hermafroditas, como antes se mencionó, que no pueden desarrollar completamente o no desarrollan el ovario. Varias son las razones por las cuales no son efectivas estas flores, como por ejemplo un estrés hídrico causado por la falta de agua, una fertilización poco adecuada, principalmente en nitrógeno, aunque también se da por la presencia de malezas ya que compiten con la planta por los nutrientes disponibles.

Dentro de la variedad maradol su población es perteneciente al 66% de plantas hermafroditas y en un 34 % a planas femeninas (Baraona y Sancho, 1991).



FIGURA 2. Tipos de flores: femenina, masculina y hermafroditas (pentandria, carpeloide y trompetilla o estéril).

SEMILLA

Está formada por un embrión pequeño, aplanado lateralmente y rodeado por el endospermo, así como de una cubierta formada por una endotesta dura y muricada y de una sarcotesta traslúcida que contiene un fluido delgado mucilaginoso. Cada fruto puede producir de 300 a 800 semillas, las cuales tiene un sabor picante y una cantidad considerable de grasa amarilla (Alfonso, 2010).

La semilla es el producto del óvulo fertilizado, que en las angiospermas se forma dentro del ovario, y es el resultado de la reproducción sexual. La forma de las semillas está determinada por el tipo de óvulo del que se han originado y su posición dentro del fruto. El tamaño está determinado por la posición que guardan las semillas dentro del fruto y por la cantidad de nutrimentos que reciban durante su ontogenia. El hilo es una cicatriz que queda en la semilla cuando ésta se desprende del funículo. El micrópilo es una perforación a manera de canal que comunica a la semilla con el exterior y es el lugar por donde penetra el tubo polínico hacia el saco embrionario. El rafe es la costura longitudinal de la semilla formada en la parte en que el funículo se unía al rudimento seminal. El funículo es el filamento que une el rudimento seminal con la placenta, formado principalmente por tejido vascular y que sirve de puente para el paso de agua y nutrientes de la planta madre a la semilla durante su desarrollo (Gil y Miranda, 2005).

CARACTERÍSTICAS EXTERNAS DE LA SEMILLA

Forma y tamaño: La semilla de papaya es de forma ovoide y de color marrón oscuro en la madurez. Su tamaño fluctúa entre 4 y 6 mm (figura 3A), lo que concuerda con lo encontrado por Moreno (1980). Por estas características, Eames (1961) la consideró como una semilla de tamaño pequeño, propio de las especies primitivas (Nimbro , 1988).

Hilo y micrópilo: En la semilla de papaya, el hilo es bastante conspicuo, de forma redondeada y color amarillo claro (figura 3B). El micrópilo se encuentra muy próximo al hilo, porque procede de óvulos anátropos (figura 3C) (Gil y Miranda, 2005).

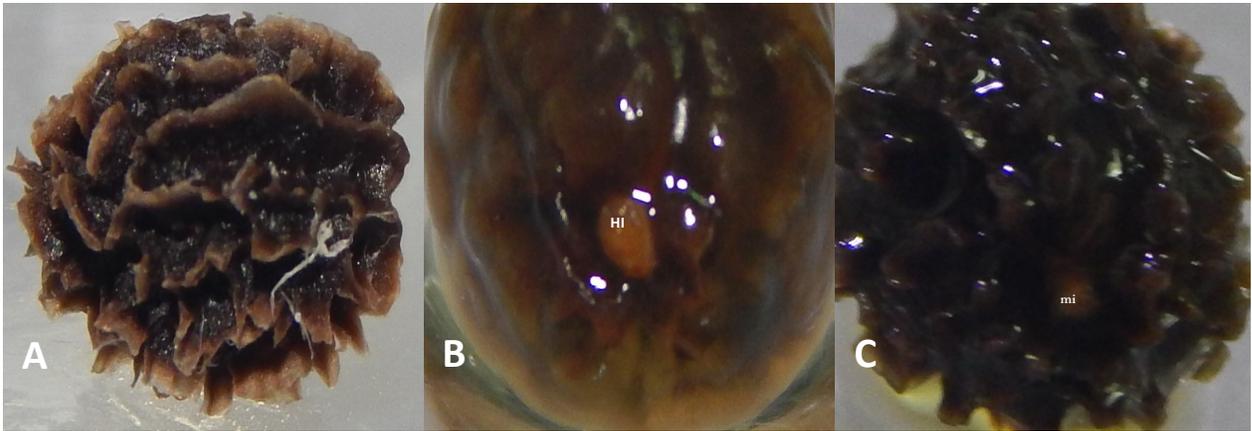


FIGURA 3. A. Semilla madura de papaya, B. Hilo (HI) de la semilla, C. Micrópilo (mi) de la semilla. Hernández C. Sergio. 2016

Funículo: Las semillas de papaya se encuentran unidas al funículo en posición parietal. Este es evidente, prominente y grueso, con una longitud entre 0.5 y 1.0 cm. El color varía desde blanquecino, en semillas inmaduras (figura 4a), hasta amarillo, en las semillas maduras (figura 4b).

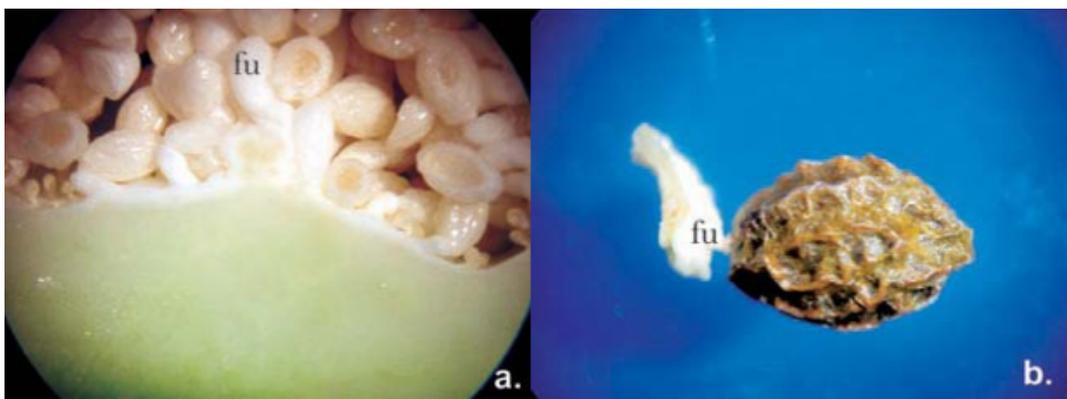


FIGURA 4. a) Semillas inmaduras adheridas al funículo (fu) en la cavidad del fruto; b) semilla madura con el funículo (fu) adherido.

Rafe: Gracias a que la semilla de papaya procede de óvulos anátropos, es posible apreciar esta región fácilmente, presente como una cicatriz (figura 5c).

Cubierta seminal: La semilla de papaya proviene de un rudimento con dos tegumentos que al desarrollarse conforman la cubierta seminal. Los tejidos derivados del tegumento externo originan la exotesta, la mesotesta y la endotesta, mientras que los derivados del tegumento interno forman el tegmen. La exotesta es de consistencia carnosa, jugosa, de color anaranjado y se le conoce como sarcotesta (figura 5a). La mesotesta es oscura, rugosa y dura (figura 5b) (Gil y Miranda, 2005)

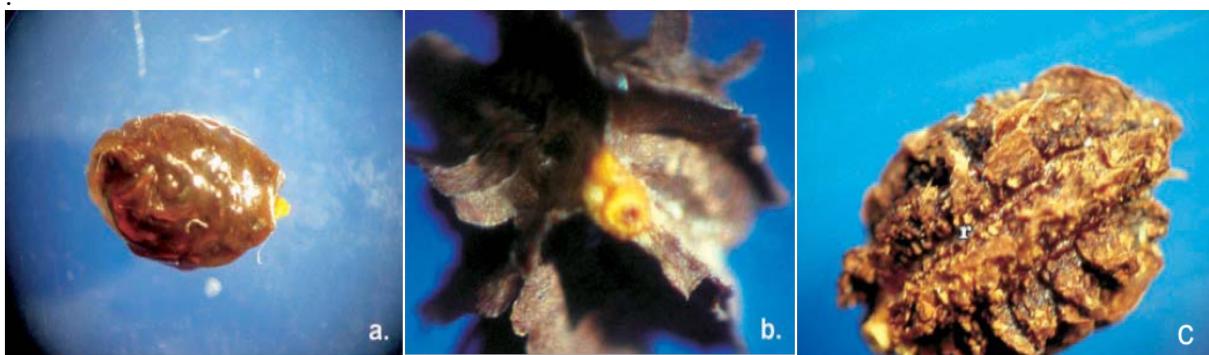


FIGURA 5. a) Semilla de papaya con la sarcotesta adherida (nótese el brillo en la superficie); b) mesotesta de la semilla de papaya; c) Rafe (r)

CARACTERÍSTICAS INTERNAS DE LA SEMILLA

Al realizarle un corte transversal (a) y transmediano (b) a la semilla de papaya, se aprecian a simple vista, entre otras, tres estructuras: la cubierta seminal, el endospermo y el embrión (Gil y Miranda, 2005).

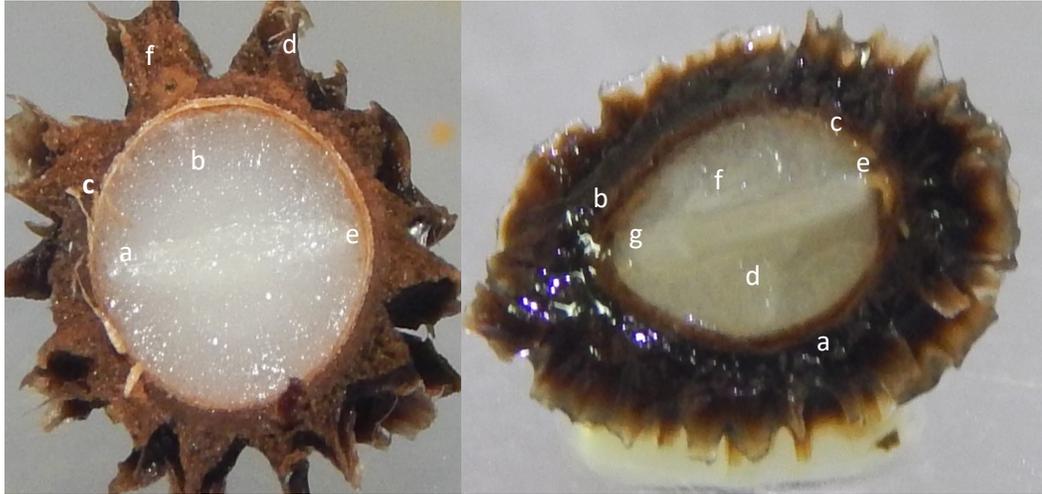


FIGURA 6. 6a) Estructura interna de la semilla de *C. papaya*. a) a, embrión; b, endospermo; c, endotesta; d, mesotesta; e, tegmen; f, rafe; 6b) a, mesotesta; b, endotesta; c, tegmen; d, endospermo; e, calaza; f, cotiledón; g, radícula. Hernández C. Sergio. 2016

Cubierta seminal: La semilla de papaya observada es bitegumentada, debido a que el primordio seminal posee dos tegumentos: los tejidos derivados del tegumento externo constituyen la testa y los derivados del tegumento interno conforman el tegmen, lo que concuerda con lo descrito por Corner (1976).

Endospermo: Al analizar los cortes, se concluyó que el tipo de endospermo es entero porque su superficie es lisa, suave y de consistencia carnosa. De acuerdo a su posición, está clasificado como externo, ya que rodea por completo al embrión. Esta descripción está acorde con la de Niembro (1988).

Embrión: De acuerdo con lo observado, y tomando como base la clasificación hecha por Martín (1946) y la descripción de Niembro (1988), se dedujo que el embrión de papaya presenta división axial, porque se ubica en el eje central de la semilla, y subdivisión folial, porque muestra cotiledones

expandidos. La forma del embrión es espatulada, ya que los cotiledones son rectos y la radícula no se encuentra cubierta por ellos, como se observa en la figura 6 (Gil y Miranda, 2005).

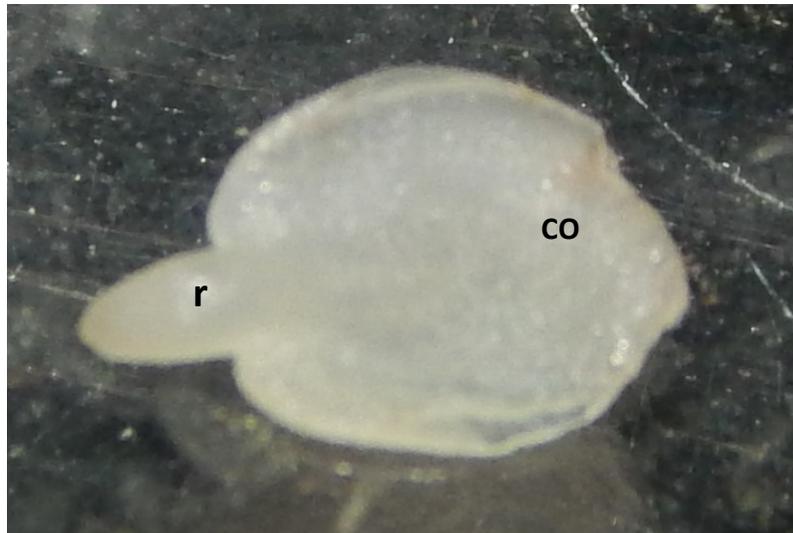


FIGURA 7. Embrión de la semilla de papaya: r, radícula; co, cotiledón.

Cotiledones: Al apreciar los cotiledones de la semilla de papaya, se concluyó que son planos y delgados. En cuanto a la forma, son ovados y de igual tamaño, uno con respecto al otro. El margen de los cotiledones es entero, con ápice redondeado. La base es atenuada porque el ángulo que forma la punta de la radícula con el margen de los cotiledones es menor de 45° (figura 7).

Según la vernación o postura que presentan los cotiledones dentro de la semilla, son rectos porque presentan una postura paralela al eje del embrión (Gil y Miranda, 2005).

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LA PAPAYA

TABLA 2. Composición química de la papaya maradol

Agua	88.80%
CHOS	8%
Proteínas	0.61%
Grasas	0.14%

La papaya contiene 88.8 % de agua, 8% de hidratos de carbono, 0.61% de proteínas, 0.14% de grasas. La mayor parte de sus hidratos de carbono está formado por los azúcares: sacarosa, glucosa y fructosa. El contenido vitamínico de la papaya: 100 g de pulpa aporta el 103% de las necesidades diarias de Vitamina C, y el 18% de la Vitamina A (para un adulto). Las Vitaminas del grupo B están presentes en pequeñas cantidades, excepto los folatos de los que contiene 38 μ /100g. En cuanto a minerales es rica en potasio (257 mg/100g), y contiene cantidades apreciables de calcio, magnesio, fosforo y hierro. La pectina (fibra vegetal de tipo soluble) está presente en la porción de 1.8% (Roger, 1995).

EXIGENCIAS ECOLÓGICAS

Las condiciones idóneas para la papaya son climas cálidos y húmedos, se adapta al clima mediterráneo siempre y cuando no haya riesgos de helada. Durante el verano su crecimiento es muy rápido de modo que si se cultiva en invernaderos de plástico y la temperatura sube demasiado, existe el riesgo de quemaduras. Por lo tanto es en la estación cálida cuando tiene mayores necesidades de agua y nutrientes. Durante la estación fría el crecimiento se enlentece de tal modo que hay que evitar el exceso de agua que podría dañar sus raíces. Una gran ventaja de este cultivo es que no es muy exigente en lo relativo a la calidad del agua. El gran tamaño de sus hojas la hace muy sensible al viento por lo que es preferible cultivar bajo protección. Es una planta de preferencia de suelos profundos, fértiles y con buen drenaje (FAO, 2002).

PROPAGACIÓN DE LA PAPAYA

La papaya se puede propagar de varias formas según su importancia genética.

- Por semilla
- Esquejes
- Cultivos de tejido. (Magfor, 2004)

Propagación por semilla

La forma más eficiente de propagación, es el uso de semillas genéticas para siembras comerciales. En el caso de la variedad, criolla, una planta hermafrodita deseable puede producir un promedio de 21 frutas grandes a medianas y cada fruta, 250 semillas viables con el poder germinativo necesario. En las variedades Hawaianas, una sola fruta hembra puede producir hasta 200 semillas. Las variedades e híbridos que son producidos bajo certificación, se desarrollan en invernaderos especiales, libres completamente de agentes exteriores que generan contaminación genética o microbiológica, como virus, bacterias, hongos, fitoplasmas u otros. (Magfor, 2004)

Se ha comprobado que el virus de la mancha anular del papayo, no se transmite por semilla. (Magfor, 2004)

Propagación asexual o esquejes

La papaya también se propaga por esquejes, estacas, injertos y raíces cortadas. Para realizarlo se escogen ramas laterales vigorosas, se eliminan todas las hojas, dejando intacto el primordio foliar, se le aplica fungicidas específicos con soluciones hormonales y después de 3 a 4 días, se separan cuidadosamente, cortando de la base del árbol, parte leñosa ya lignificada, se aplica un enraizador comercial a base de ácido indol butírico y luego se siembra en una bandeja de arena aplicando riegos constantes para evitar la muerte incipiente de raíces (Magfor, 2004)

A partir de esa observación, los esquejes están listos para ser llevados a bolsas o indirectamente a campo. La desventaja de este método es que puede transmitirse el virus de la mancha anular.

Propagación de tejidos

Con los métodos de cultivo de tejidos y propagación in vitro se puede mantener la variedad dioica sin perder su identidad por polinización natural. Para este método se usan yemas laterales y se estimulan por corte del punto apical de crecimiento o por aplicaciones de citoquininas directamente a las yemas laterales. Luego se colocan los brotes y se siembran los meristemas aislados en el laboratorio. Un problema serio es la contaminación bacteriana (Magfor, 2004).

POST COSECHA DE LA PAPAYA

La fruta es sensible a las quemaduras de sol, al maltrato de corte, el transporte y debe ser separado de la planta con sumo cuidado, utilizando guantes de plástico o engomados y cortándola con una torsión ligera o utilizando un cuchillo corto, dejándole 0.05 cm de pedúnculo. La cosecha deberá realizarse de acuerdo a los siguientes índices de madurez:

- I. verde: fruta fisiológicamente madura, totalmente verde pero bien desarrollada.
- II. verde madura: cambio de color con una o dos rayas amarillas sensiblemente perceptible, con el 10-15 % color amarillo de la superficie de la cascara rodeada de un verde claro.
- III. $\frac{1}{4}$ de madura: Fruta con el 25 % de la superficie de la cascara amarilla rodeada de superficie clara.
- IV. $\frac{1}{2}$ madura: 75 % de la superficie de la cascara amarilla.
- V. Madura: 76-100 % de la superficie de la cascara amarilla únicamente el cuello verde del área contraída hacia arriba (Magfor, 2004).

PRODUCCIÓN MUNDIAL

El cultivo de la papaya se ha extendido a todos los trópicos del mundo, en regiones con una altura entre 0 y 400 metros, prosperando a temperaturas que oscilan entre 20 y 28 °C, por debajo de este rango el proceso de maduración de la fruta se torna más lento. Resultando un producto de mala calidad, y se ve afectada la polinización. Además, es necesario mantener un nivel constante y bien distribuido de la humedad, de entre 150 y 200 mm de agua por mes, en especial en los meses de temporada seca. En cuanto los vientos es bastante tolerante, gracias a la estructura de su tallo y de los

pedúnculos, pero se requiere instalar cortinas rompevientos en aquellas zonas donde lleguen a superar los 80 km/hora.

Tomando en cuenta tanto las características como las necesidades ambientales de la papaya, y con base en las estadísticas de producción de la FAO para el año 2007, fácilmente se puede visualizar que las principales zonas de cultivo se encuentran en los continentes de América, Asia y África (fig. 8) Existe también una pequeña producción en Ocenia, equivalente a 14 mil 757 toneladas anuales, en su mayoría provenientes de las islas de Fiji y Samoa, la cual representa el 0.2% del volumen mundial.

En el caso de África, el mayor productor del continente es Nigeria, con una participación del 10.61% del volumen mundial equivalente a 765 mil toneladas anuales de papaya fresca; seguido por Etiopia con el 3.61% del volumen mundial, equivalente a 260 mil toneladas anuales de papaya fresca y la República Democrática del Congo con el 3.05% del volumen mundial, equivalente a 219 mil 840 toneladas anuales de papaya fresca.

En el caso de Asia encontramos que hay un mayor número de países con participación en la producción de papaya fresca. Por un lado, India produjo 700 mil toneladas, equivalente al 9.71% del volumen mundial, en tanto Indonesia produjo 621 mil 524 toneladas de papaya fresca, equivalentes al 8.62% del volumen mundial. En conjunto, el resto de las naciones asiáticas produjo alrededor de 644 mil toneladas, equivalentes al 8.94% del volumen mundial.

América juega un papel central en la producción de papaya fresca. No solo se encuentran aquí los mayores productores a nivel mundial, si no que la distancia entre las zonas de cultivo y el principal país importador se toma un factor importante, dado que la papaya es una fruta sumamente delicada.

En el 2007, a nivel mundial. La producción de papaya fresca fue de 7 millones 207 mil 534 toneladas. Como principal productor encabezó la lista Brasil, representando el 25% de total, seguido de México con el 13%, Nigeria, India e Indonesia ocuparon las siguientes posiciones, y existen otros países productores como Etiopia, Congo, Perú, Venezuela, China, Cuba, Tailandia y Colombia que en conjunto aportan anualmente entre 100 mil y 230 mil toneladas (FAO, y otros, 2009).

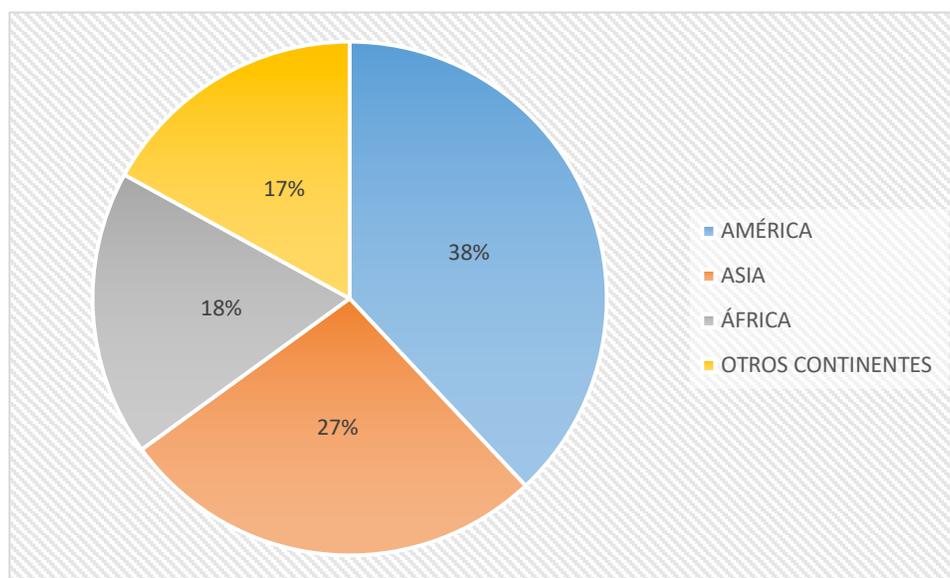


FIGURA 8. Producción mundial de papaya

PRODUCCIÓN NACIONAL

En el 2007 México ocupó el segundo lugar a nivel mundial en la producción de papaya fresca. Se produjeron en nuestro país alrededor de 919 mil toneladas, lo que representa aproximadamente el 13% del volumen mundial y un aumento del 88% con respecto a los niveles que se tenían en 1994. Sin embargo para el 2008 esta cifra mostro u retroceso del 29% al pasar de 652 mil 934 toneladas. Durante el 2008 México produjo 652,933.62 toneladas de papaya fresca (*Carica papaya L.*) manteniéndose como primer exportador y segundo productor a nivel mundial. En México existen cinco regiones representativas para la producción de papaya fresca. Durante el periodo de 1997 a 2008 la región Sur Sureste se ubicó en primer lugar con un promedio de 577 mil toneladas, que representa el 79.16% del volumen nacional con una Tasa Media Anual de Crecimiento (TMAC) al 2007 de 5.4%. Le sigue la región Centro Occidente, con un promedio de 129 mil toneladas, lo que representa el 17.75% del volumen y una TMAC al 2007 de 1.24%. En tercer lugar se encuentra la región Noroeste, que ha promediado 14 mil toneladas, lo cual representa el 1.84% del volumen nacional y que ha experimentado TMAC al 2007 del -3.08%. En cuarto lugar se ubica la región Centro, con un promedio de 6 mil toneladas, el 0.81% nacional, y na TMAC al 2007 del -0.32%. Finalmente, la región Norte ha presentado la mayor TMAC, con un 19.96%, sin embargo su

producción es de 3 mil toneladas en promedio, representando el 0.44% del país (fig.9) (FAO, y otros, 2009).

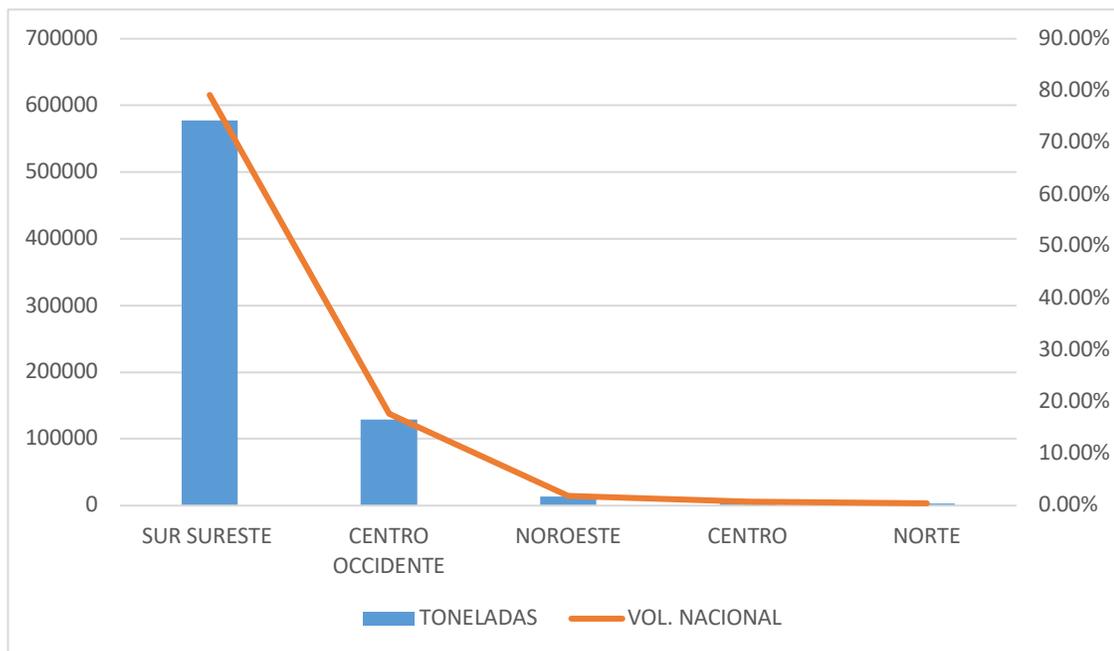


FIGURA 9. Producción nacional de papaya durante el periodo de 1997 a 2008.

PRODUCCIÓN ESTATAL

El estado de Chiapas es donde se obtiene el mayor rendimiento de papaya fresca, con aproximadamente 69.92 toneladas por hectárea en promedio durante el periodo de 1997 a 2008. Este valor se encuentra en los rangos promedio de esta fruta, que oscilan entre 60 y 80 toneladas anuales por hectárea, aunque están muy por debajo de los obtenidos en las principales zonas productoras del mundo. Durante el 2008, la tendencia de Chiapas como estado con el mejor rendimiento se mantuvo, alcanzando 79.9 toneladas por hectárea (SIAP, 2014).

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis se refiere a la formación de un embrión somático a partir de células somáticas que no son el producto de la fusión de gametos. Esta terminología fue utilizada por Tokin en 1963 para describir la formación de un individuo a partir de una o varias células somáticas. Sin embargo este fenómeno no debe confundirse con la organogénesis (Abdelnour y otros, 1994).

La embriogénesis somática o asexual *in vitro* es el proceso mediante el cual las células somáticas haploides o diploides se desarrollan en embriones pasando a través de diferentes estados morfológicos característicos de la embriogénesis cigótica, pero sin la fusión de gametos. Un embrión somático se caracteriza por presentar una estructura bipolar, la cual desarrolla precoz y simultáneamente un meristemo de tallo y un meristemo de raíz (Margara, 1987).

Si bien es cierto, el potencial embriogénico de las especies está regulado genéticamente; la expresión de la competencia embriogénica de células somáticas podría tener influencia fisiológica y de otros factores del desarrollo *in vitro*. El hecho de que células somáticas aisladas puedan desarrollarse en embriones, demuestra que el programa de desarrollo de la embriogénesis somática está contenido y está controlado por la célula misma. Sin embargo la naturaleza exacta del mecanismo disparador de la embriogénesis, sea este físico, bioquímico o genético, es hasta ahora desconocido (Gray, 2000).

La embriogénesis somática es mejor conocida para células de cultivo de tejidos que producen embriones somáticos, mediante una secuencia de desarrollo que va a través de estados bien definidos; los cuales son notablemente similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica, excepto que los embriones somáticos carecen del estado de dormancia (Dodeman, y otros, 1997). En monocotiledóneas el patrón de desarrollo de los embriones tanto cigóticos como somáticos comprende los estados de globular, escutelar y el estado de coleoptilo (Gray, 2000).

La importancia de la embriogénesis somática radica en que permite la posibilidad de la multiplicación de genotipos a gran escala. Facilita el cultivo en medios líquidos y favorece la automatización del sistema de cultivo. Además es una técnica de regeneración celular, la cual, puede ser utilizada como base para el mejoramiento genético no convencional. Permite la conservación a largo plazo (crioconservación) de líneas celulares de interés genético y comercial, facilitando el intercambio internacional de germoplasma *in vitro* (Aguilar, y otros, 2008).

FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO DE TEJIDOS

El inóculo o explante

Es el órgano, tejido o fragmento de tejido, células, etc. Excisado del material parental para iniciar el cultivo *in vitro*. La elección del explante adecuado constituye el primer paso para el establecimiento

de los cultivos, este variara de acuerdo al objetivo perseguido. En general factores como el genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico son importantes de considerar (Abdelnour, y otros, 1994).

Factores fisicos

pH, intercambios gaseosos, humedad, luz y temperatura

- pH: El grado de acidez o alcalinidad (pH) del medio de cultivo es importante y específico para cada tipo de plantas, al igual que ocurre en el suelo, por lo que se hace necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio. Sin embargo, el pH adecuado estará en un rango de 4.5 a 7 para las plantas.
- Intercambio gaseoso: Los gases más corrientes son O₂ (oxígeno), CO₂ (dióxido de carbono) y C₂H₄ (etileno).
- La humedad: En condiciones in vitro la humedad dentro de los recipientes es casi 100 %. Por eso la planta in vitro en general no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica tales como cera, estomas, cutícula, etc.
- La luz: En condiciones in vitro clásicas, la intensidad y calidad de la luz es muy bajo (10 W/m² en comparación de condiciones naturales donde la luz puede representar hasta 900 W/m²). La calidad de la luz también es muy baja y se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para tener diferentes longitudes de onda. El espectro útil para los vegetales es de 400 a 700 nanómetros. Dos fenómenos importantes dependientes de la luz son: fotosíntesis y fotomorfogenesis.

Fotosíntesis: Es el proceso por medio del cual las plantas en presencia de luz, agua y en los cloroplastos incorporan el dióxido de carbono para formar los compuestos orgánicos que le permitirán crecer y reproducirse.



Fotomorfogenesis: La luz es un factor importante en la morfogenesis. La morfogenesis funciona con la presencia de pigmentos susceptibles a radiación azul y roja. Las funciones más conocidas son las del pigmento susceptible al rojo: fitocromo (rojo 660 nm y rojo lejano 730 nm); expansión foliar, elongación de entrenudos, diferenciación de estomas, síntesis de clorofila, etc. (Abdelnour, y otros, 1994).

Factores químicos

El medio de cultivo: Consiste de una mezcla de determinadas sustancias sobre o dentro del cual crecen los explantes (inóculos). Para su uso, el medio de cultivo se esteriliza ya sea en autoclave o por filtración a través de filtros de papel miliporoso (Abdelnour, y otros, 1994).

EMBRIÓN SOMÁTICO

Estructura organizada de forma similar a la de un embrión. Aunque morfológicamente es similar a la de un embrión cigoto, se genera a partir de células vegetales somáticas. Bajo condiciones *in vitro*, los embriones somáticos experimentan procesos de desarrollo similares a los embriones de origen cigótico. Cada embrión somático es potencialmente capaz de desarrollarse en una plántula normal (Jaúregui, y otros, 2006).

Las características más distintivas de un embrión somático es que constituye un nuevo individuo con estructura bipolar, capaz de originar una planta completa. Los embriones obtenidos por esta vía presenta una morfología y desarrollo similares a los embriones cigóticos obtenidos por la fecundación, pero contrariamente a estos, tienen la particularidad de presentar una estructura genética idéntica a la planta de origen (Macías, 2007).

Morfológicamente un embrión somático es muy similar a un cigótico, sobre todo en su desarrollo evolutivo desde pro embrión, fase globular, corazón, torpedo y fase cotiledonar o embrión maduro, esto para el caso de las especies dicotiledóneas, pero, difiere en que el embrión cigótico al llegar a la fase cotiledonar tiene un periodo de transición que conlleva una expansión celular, acumulación de reserva, tolerancia a la desecación en una fase de maduración, luego una fase de desecación y dormancia con control hormonal. Reducción metabólica, acumulación de reservas, desarrollo y preparación para germinación (Aguilar, 2002).

CALLO EMBRIOGÉNICO

Corresponde a un conjunto de células procedentes de la desorganización de un tejido o de una suspensión de células. El callo tiene la peculiaridad de presentar células no diferenciadas para su última función pero que conservan el poder de dividirse (célula meristemática o embriogénica) (Abdelnour, y otros, 1994).

CULTIVO *IN VITRO*

El concepto de cultivo de tejidos o propagación *in vitro* (del latín en vidrio) abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células y órganos. Se le llama *in vitro* debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente. Esta técnica consiste en cultivar un inóculo con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas. Esta capacidad de regenerar no solamente tejidos y órganos, sino también una planta entera es única en plantas, no puede encontrarse un fenómeno similar en animales superiores. Podemos definir el cultivo de tejidos como un conjunto de técnicas con las cuales podemos ejercer un control relativo sobre los procesos morfogenéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio (Berthdul y Berrios, 1987)

Al igual que en otros métodos de multiplicación vegetativa o asexual, los individuos descendientes de una planta madre propagada *in vitro* son clones, es decir, son copias genéticamente idénticas a la planta madre. En plantas propagadas por semilla (propagación sexual), la descendencia no es clónica ya que cada semilla tiene su propia base genética que resulta de la mezcla de ambos progenitores, por lo tanto, cada individuo es único (Berthdul y Berrios, 1987)

El proceso de la técnica de cultivo *in vitro* ha permitido enormes progresos en el conocimiento de los factores que intervienen en el desarrollo de una planta: crecimiento, desarrollo y floración. De este modo la técnica de cultivo *in vitro* no solamente es una herramienta para la investigación en biología y fisiología vegetal, sino también, un medio de multiplicación y propagación de plantas al servicio de los programas de producción vegetal ya sea de plantas anuales o perennes. (Berthdul y Berrios, 1987)

El cultivo de tejidos puede utilizarse para diversos propósitos como son: la micropropagación, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, el mejoramiento genético y la conservación de germoplasma (Abdelnour, y otros, 1994).

Tipos de crecimiento *in vitro*

Crecimiento organizado

Se refiere al tipo de cultivo que se inicia con una parte organizada de la planta (ápices, hojas, semillas, brotes, etc.) y esa parte u órgano sigue creciendo *in vitro* manteniendo sus características estructurales. Se aplica también cuando se desarrolla una estructura a partir de un tejido desorganizado (organogénesis) (Abdelnour, y otros, 1994).

Crecimiento desorganizado

Este tipo de crecimiento se caracteriza porque a partir de fragmentos de tejidos u órganos se produce un tejido sin estructura específica que contiene un número limitado de algunos tipos de células especializadas encontradas en una planta intacta. Un tejido desorganizado (callo) puede crecer con subcultivos y puede ser mantenido en medio sólido o líquido durante varios meses o años. Puede ser usado para iniciar suspensión de células y protoplastos (Abdelnour, y otros, 1994).

MEDIO DE CULTIVO

Los medios de cultivos son combinaciones de sustancias químicas que los investigadores han descrito después de numerosos experimentos y que permite que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro*.

Los ingredientes de un medio de cultivo vegetal pueden clasificarse en: 1) sales inorgánicas (minerales), 2) compuestos orgánicos, 3) preparaciones naturales complejas y 4) materiales inertes (Abdelnour, y otros, 1994).

Sales minerales

Los esfuerzos realizados para optimizar las necesidades de las plantas específicas, han dado como resultado numerosas fórmulas de mezclas de sales. Sin embargo, los elementos mayores esenciales que todas las plantas requieren y que están presentes en los fertilizantes comunes, también forman parte de los medios de cultivo: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Azufre (S), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Hierro (F).

Además de los elementos menores, que también son esenciales pero que se requiere en cantidades extremadamente pequeños: Boro (B), Molibdeno (Mo), Manganeso (Mn), Cobalto (Co), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Cloro (Cl) e Iodo (I).

Una de las mezclas de sales más usadas es la descrita por Murashige and Skoog. Esta es conocida como fórmula MS (Abdelnour, y otros, 1994).

Compuestos orgánicos

En esta categoría se encuentran sustancias como carbohidratos, hormonas o reguladores de crecimiento, vitaminas y algunos otros compuestos que se han descrito como beneficiosos para cultivo de tejidos: aminoácidos, amidas, purinas y pirimidinas y ácidos orgánicos.

- Los carbohidratos: Son sustancias orgánicas como los azúcares que proveen tres de los elementos esenciales: Hidrogeno (H), Carbono (C) y Oxigeno (O).

Los azúcares son producto de la fotosíntesis, proceso por medio del cual la planta convierte el dióxido de carbono y agua en carbohidratos con ayuda de la clorofila y la luz. Sin embargo, las plantas que crecen *in vitro*, debido a la baja intensidad lumínica, no pueden fabricar todo el azúcar que requieren, por lo que adicionan altas concentraciones de sacarosa al medio de cultivo.

- Hormonas: Las sustancias hormonales críticas en el cultivo de tejidos son las auxinas y las citoquininas. Estas intervienen en la elongación y división celular, formación de brotes y raíces y en la germinación de la semilla.

Entre las axinas más utilizadas en el medio de tejidos se encuentra: ácido indolacético (A.I.A.), ácido naftalenacético (ANA), 2,4-D, Picloram. Entre las citoquinina se encuentra: benzilaminopurina (BA), la kinetina y zeatina.

Las giberelinas y el ácido absicico son también utilizados en algunos casos.

- Vitaminas: La Vitamina que se ha demostrado consistentemente como importante en el cultivo de tejidos es la tiamina. Sin embargo, otras han sido utilizadas con frecuencia por estimular procesos específicos: biotina, ácido nicotínico, piridoxina, pantolenato, riboflavina.
- Aminoácidos: Entre los aminoácidos y amidas que se han mostrado más frecuentemente como beneficiosos esta L-arginina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutámico y L.tirosina.

Otros compuestos orgánicos comúnmente empleados en el cultivo de tejidos son el inositol, adenina, sulfato de adenina, el ácido cítrico y el ascórbico (para evitar la oxidación de los tejidos) (Abdelnour, y otros, 1994).

Preparaciones naturales complejas

Una gran variedad de sustancias de composición indefinida han sido utilizadas para enriquecer el medio de cultivo. Entre ellas se menciona: extracto de malta, agua de coco, extracto de levadura, pulpa de banano, caseína hidrolizada y jugo de naranja y tomate (Abdelnour, y otros, 1994).

Materiales inertes

- Geles húmedos que actúan como agentes de soporte: agar, gelrite, fitogel
- Carbón activado que en bajas concentraciones contrarresta efectos negativos que producen algunas sustancias liberadas al medio por el cultivo (fenoles). (Abdelnour, y otros, 1994)

AGAR

El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 grados. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él (Gamazo, y otros, 2005).

MEDIO MURASHIGE AND SKOOG (MS)

Medio MS es el medio de cultivo de tejidos más utilizado, de los cuales se han desarrollado muchas variaciones. El medio se originó a partir de medio de White y desarrollado originalmente para el cultivo de callos de *Nicotiana tabacum*. En comparación con medio White, se incrementa la concentración de todos los ingredientes. Un aumento de nitrógeno 50 a 60 mM estimuló el crecimiento de células de *Nicotiana* significativamente, sin embargo, a una concentración superior de 80 mM fue claramente desventajoso para las células. El aumento de todos los demás elementos, especialmente de los macro-Elementos, también estimuló el crecimiento de los callos. Debido a la alta concentración de minerales, medio MS es un medio muy rico en solución salina y puede ser demasiado salado para ciertas especies de plantas. Para evitar este problema, MS se utiliza a menudo con los microelementos en plena concentración, pero con los macroelementos, respectivamente, la mitad o las tres cuartas partes de la concentración como se ha descrito originalmente por los autores. A veces, las vitaminas originales MS se sustituyen por las vitaminas de Linsmaier y Gamborg medio B5 con respecto a la mayor concentración de tiamina en relación con el requisito de esta vitamina por las plantas (Duchefa Biochemie, 2016).

SACAROSA

La sacarosa es el alimento edulcorante más consumido. Se fabrican alrededor de 100 millones de toneladas/año que se extraen principalmente de la caña de azúcar y de la remolacha azucarera (Primo, 1995).

Es un disacárido que se forma por la unión de la glucosa 1-fosfato que se transforma en el azúcar – nucleótido UDP-glucosa, que se combina con la fructosa 6-fosfato formando sacarosa fosfato. Que es el intermediario precursor de la Sacarosa. La Sacarosa es la forma principal de transporte de azúcares en las células vegetales, como lo es la glucosa en las células animales; al igual que la glucosa

que es transportada en la sangre de los animales, la Sacarosa es exportada desde las hojas a través de los haces vasculares, proporcionando los carbohidratos requeridos por el resto de la planta (Barioglio, 2006).

Obtención

Los trozos de remolacha se lixivian con agua en contracorriente y la disolución de azúcar se trata con agua de cal, para separar los ácidos vegetales (oxálico, tartárico y otros hidroxiacidos), así como los albuminoides. El exceso de cal, que se encuentra disuelto como sacarato cálcico, se separa como carbonato cálcico por inducción de dióxido de carbono (saturación).

Después de prensar el precipitado, el jarabe diluido se transforma en vacío en un jarabe denso y el azúcar bruto que cristaliza se separa por centrifugación. El residuo gris del jarabe, las “melazas, se utiliza como alimento para el ganado o se somete a la fermentación alcohólica. El azúcar cristalino, todavía de tipo siruposo, se puede refinar mediante recristalización, filtración sobre carbón activado y evaporación a vacío (Hans, y otros, 1987).

A partir de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) se obtiene prensando el jarabe, que se neutraliza con hidróxido de calcio y se evapora en vacío hasta que cristaliza.

Propiedades

La Sacarosa forma prismas monocíclicos, que se disuelven fácilmente en agua y difícilmente en etanol de alto porcentaje. Los ácidos minerales diluidos hidrolizan a la Sacarosa, originando una molécula de D.glucopiranososa y otra de D-fructopiranososa (Hans, y otros, 1987).

VITAMINAS

Las vitaminas son un grupo de sustancias orgánicas de variada estructura, sin valor energético propio, necesarias en pequeñas cantidades que el organismo humano es incapaz de sintetizar. Cuando lo hace es en cantidades insuficientes, por lo que su aporte exógeno resulta esencial.

Su aporte basta con que sea mínimo, pero su ausencia determinara el fracaso en los procesos básicos y fundamentales del metabolismo celular.

Actualmente se consideran trece familias de sustancias con naturaleza vitamínica. Se dividen, clásicamente, en dos grupos en función de su solubilidad en solventes orgánicos o en agua como podemos observar en la tabla 2 y 3.

Constituyen un grupo de moléculas de estructura química muy heterogénea, con variado peso molecular que oscila desde los 122 para la niacina hasta los 1355 para la cianocobalamina.

Algunos presentan estructuras muy parecidas a otros compuestos orgánicos, tales como la vitamina C con los azúcares, la vitamina D con las hormonas esteroideas, y la vitamina B₁₂ con las porfirinas (Entrala, 1998).

TABLA 3. Vitaminas liposolubles

Vitamina A	Retinol. B-caroteno
Vitamina E	Tocoferol
Vitamina K	Filoquinona (K ₁), menaquinona (K ₂)
Vitamina D	Colecalciferol (D ₃), ergocalciferol (D ₂)

Fuente: Entrala, (1998).

TABLA 4. Vitaminas hidrosolubles

Vitamina B ₁	Tiamina
Vitamina B ₂	Riboflavina
Vitamina PP	Ac. Nicotínico
Vitamina B ₅	Ac. Pantotenico
Vitamina B ₆	Piridoxina
Vitamina B ₈	Biotina
Vitamina B ₉	Ac. Fólico
Vitamina B ₁₂	Cianocobalanina
Vitamina C	Ac. Ascórbico

Fuente: Entrala, (1998).

GLUTAMINA

La glutamina (Gln) es un aminoácido polar sin carga. Al igual que el resto de los aminoácidos, está formado por un grupo carboxilo, un grupo amino libre, un átomo de hidrogeno y una cadena lateral. En la cadena lateral se encuentra un grupo amino, por lo que la glutamina posee dos átomos de nitrógeno en total. Debido a la estructura química de la glutamina, este aminoácido posee características únicas y diferentes del resto de los aminoácidos (Canul y Coop, 2009).

2,4 – ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO

Al ácido 2,4-diclorofenoxiacético, conocido por su nombre común como 2,4-D se le clasifica dentro del grupo de los herbicidas fenoxi o fenoxiacéticos o clorofenólicos.

Por su modo de acción, al 2,4-D se le incluye dentro de los “herbicidas hormonales” pues actúa de modo parecido a la hormona natural auxina, o ácido indol-3-acético (AIA). Las plantas de manera natural producen hormonas -que son sustancias químicas que actúan de manera precisa y en cantidades muy pequeñas- y su concentración es regulada por la propia planta; en el caso de la auxina es una hormona que regula el sano crecimiento y desarrollo vegetal, pero en su forma sintética y a una concentración mucho mayor provoca la muerte de la planta ya que no encuentra un mecanismo de control interno (Bejarano, 2007).

El 2,4-D es un herbicida sistémico debido a que se absorbe por las hojas o la raíz y se transporta por la savia a todo el cuerpo alcanzando los tejidos internos y partes no rociadas. Se acumula en las regiones de crecimiento e induce malformaciones que matan a la planta. Es considerado uno de los primeros herbicidas “selectivos” pues mata más a las plantas de hoja ancha y causa poco daño a los de hoja angosta; se ha usado para controlar malezas de hoja ancha, anuales y perennes, en su post-emergencia, en cultivos de cereales, caña de azúcar, pastizales, áreas industriales y en céspedes, jardines domésticos y campos de golf. El 2,4-D también se vende mezclado con fertilizante para el cuidado de jardines domésticos (Bejarano, 2007).

El 2,4-D se produce de diversas formas, incluyendo su forma como ácido, pero al ser ésta muy volátil y corrosiva los productos comerciales se formulan como sales aminas o ésteres del ácido, existiendo ésteres de baja y alta volatilidad. Las sales aminas se formulan comúnmente como soluciones acuosas, mientras que los ésteres menos solubles en agua se aplican como emulsiones. Su

toxicidad aguda varía según estas formas.⁷ Además de su forma como ácido hay ocho sales y ésteres del 2,4-D registrados en Estados Unidos, con más de 660 productos comerciales agrícolas y domésticos que lo contienen como ingrediente activo o mezclado junto con otros ingredientes activos. Hay que considerar además que en las formulaciones comerciales del 2,4-D se encuentran otros ingredientes mal llamados “inertes” que no son desglosados en la etiqueta, ni incluidos en las pruebas requeridas para su registro pero que son también tóxicos (Bejarano, 2007).

EFEECTO DE LA LUZ EN LAS PLANTAS

La luz también es responsable de muchos movimientos o tropismos. Como regla general el tallo se dirige hacia la fuente de luz, la raíz lo hace alejándose de la fuente de luz, y la hoja adopta una posición en la que su parte ancha queda perpendicular a los rayos solares. Cualquier movimiento como respuesta a un estímulo luminoso se conoce como fototropismo. Otro concepto importante es el de fotoperiodismo (conjunto de fenómenos determinados por la duración del período de luz). Desde hace tiempo se conoce que la iniciación de la floración en muchas plantas depende de la longitud del día. Las plantas que requieren un período de luz largo para iniciar la floración superior a 14 horas se denominan de día largo (trigo, avena, etc.), y las que precisan de 8 a 10 horas para florecer se llaman de día corto (maíz, sorgo, etc.). Hay plantas que difieren en su respuesta a la longitud del día después de iniciada la floración, así la fresa es de día corto para la iniciación de la floración pero de día largo para la formación de los frutos (existen grandes diferencias intervarietales dentro de una especie). Las plantas tienen unas necesidades de iluminación según su naturaleza y estado de desarrollo. Cuando la luz no es suficiente para un desarrollo normal las plantas tienden al ahilamiento (tallos se hacen altos y delgados) y presentar clorosis y malformación de hojas. En el caso de cultivos de raíces y tubérculos tiende a producir una disminución del rendimiento y de la calidad; también influye en una disminución del aroma y dulzura de los frutos (Vicente, 2002).

ASEPSIA

Se habla de asepsia para referirse a un conjunto de técnicas que garantizan la ausencia de gérmenes o microorganismos infecciosos, tanto en superficies como en profundidad, de los materiales expuestos o de los seres vivos.

Utiliza agentes físicos como medio para conseguir matar y eliminar los microorganismos. El calor seco y húmedo es el más utilizado (Silva, y otros, 2006).

La Real Academia de la lengua Española lo define como un estado libre de infección, conjunto de procedimientos científicos encaminados a impedir el acceso de gérmenes infecciosos al organismo, que se aplican prácticamente con motivo de intervención quirúrgica, esterilizando del material, bata, guantes, etc., del personal sanitario (Arias, y otros, 2001).

DESINFECCIÓN

Proceso capaz de eliminar prácticamente todos los microorganismos patógenos conocidos, pero no todas las formas de vida bacterianas (endosporas), sobre objetos inanimados.

1. Desinfección de bajo nivel: empleo de un procedimiento químico con el que se pretende destruir la mayor parte de las formas vegetativas bacterianas, algún virus y hongos, pero no el *Mycobacterium tuberculosis*, ni las esporas bacterianas.
2. Desinfección de nivel intermedio: empleo de un procedimiento químico con el que se consigue inactivar todas las formas bacterianas vegetativas, el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, así como la mayoría de los virus y hongos, pero que no asegura necesariamente la destrucción de esporas bacterianas.
3. Desinfección de alto nivel: empleo de un procedimiento químico con el que se consigue la reducción o destrucción de todos los microorganismos vegetativos, microbacterias, virus pequeños o no lipídicos, virus lipídicos o de mediano tamaño, esporas micóticas y algunas (aunque no todas) esporas bacterianas hasta un nivel apropiado como para permitir un uso seguro del material en un paciente.

La desinfección de alto nivel se puede llevar a cabo por dos métodos: desinfección manual por inmersión y mediante la utilización de máquinas automáticas desinfectadoras (es el método considerado "gold estándar" aunque no siempre resulte eficiente (Llano, y otros, 2011)

METODOLOGÍA

TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO

La presente investigación es de tipo experimental de laboratorio y de análisis cuantitativo. Es experimental porque se manipularán algunas variables: dosis de luz roja durante la incubación, % de sacarosa y mg/l de 2,4 D (2,4-ácido diclorofenoxiacético) en el medio de cultivo; y de análisis cuantitativo porque se medirá el efecto de la luz roja sobre el proceso de embriogénesis somática de papaya Maradol (*Carica papaya* L).

El diseño experimental que se abordará en la presente investigación, se describe en la tabla 4.

TABLA 5. Diseño experimental

Tratamientos	Variables		
	Sacarosa (%)	2,4 D (mg/l)	Tiempo de exposición a la luz rojas (h)*
T1	3	1	0
		2	1
		3	2
T2	6	1	0
		2	1
		3	2
T3	9	1	0
		2	1
		3	2

*El resto de las horas los embriones se incubaran en oscuridad total.

Se abordará un diseño factorial con tres niveles o variables (tri-variado), el primero corresponde a 3 concentraciones diferentes de sacarosa (3, 6 y 9 %), el segundo nivel corresponde a tres concentraciones diferentes de 2,4 D (2,4-ácido diclorofenoxiacético) (1, 2 y 3 mg/l) y el tercer nivel corresponde a tres tiempos de exposición a la luz roja (0, 1, 2); es decir, 3x3x3, correspondiente a 27 tratamientos, considerando que se desarrollarán por duplicado, se tendrán en total 54 experimentos, a los que se les medirá diferentes variables de respuesta:

- Cantidad de embriones producidos a determinado tiempo (1, 2 y 3 meses).
- Periodo de generación de embriones somáticos.
- Calidad de los embriones producidos (color, apariencia, tamaño y tipo).

VARIABLES

En la tabla 5, se presentan las variables independientes y dependientes de la presente investigación.

TABLA 6. Variables independientes y dependientes

VARIABLES INDEPENDIENTES	VARIABLES DEPENDIENTES
% Sacarosa	Cantidad de embriones producidos en determinado tiempo (1, 2 y 3 meses)
Tiempo (h) de exposición a luz roja	Tiempo de aparición de los primeros embriones somáticos
Concentración 2,4 D mg/l (2,4-ácido diclorofenoxiacético),	Calidad de los embriones producidos

MUESTRA

Semillas de papaya maradol (*Carica papaya* L.) extraídas de un fruto inmaduro proveniente del municipio de Tuxtla Gutiérrez.

DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se desarrollará en dos etapas, las que se describen en seguida.

1. Embriogénesis somática
2. Generación de plántulas

PRIMERA ETAPA: EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

1. Se utilizó un fruto de papaya Maradol inmaduro, obtenido de los alrededores de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Se lavó con suficiente agua y jabón, posteriormente se desinfectó utilizando cloro comercial (Cloralex®) al 6%.
2. En condiciones de esterilidad se extrajeron las semillas del fruto y se colocaron en el interior de cajas petri, se sellaron y se almacenaron en refrigeración (4°C).

3. Previo a la obtención del embrión cigoto, las semillas se desinfectaron con etanol al 96% durante 5 minutos, se realizaron varios lavados (agua desionizada estéril), posteriormente, se colocaron en una solución de cloro comercial al 20% y tween 20 (tres gotas), durante 20 minutos.
4. Los embriones cigotos se extrajeron de manera aséptica, utilizando un microscopio estereoscópico (VELAB, SERIE: S MODELO: VE-S4, México) en una campana de flujo laminar provista de luz blanca y ultravioleta (NOVATECH, CFLH-90, México).
5. Cada uno de los embriones extraídos se colocaron en placas que contenían medio para inducción de callos embriogénicos (MEmb) (Murashige and Skoog (MS) con vitaminas al 100% de su fuerza, suplementado con 0.4 g/l de glutamina, mg/l (de acuerdo al diseño experimental) de 2,4 D (2,4-ácido diclorofenoxiacético), Sacarosa (de acuerdo al diseño experimental), 8 g/l de agar y pH 5.8).
6. A cada una de las cajas se les colocó en promedio siete embriones cigóticos, y se almacenaron en condiciones de oscuridad, proveyéndoles luz roja (de acuerdo a lo establecido en el diseño experimental).

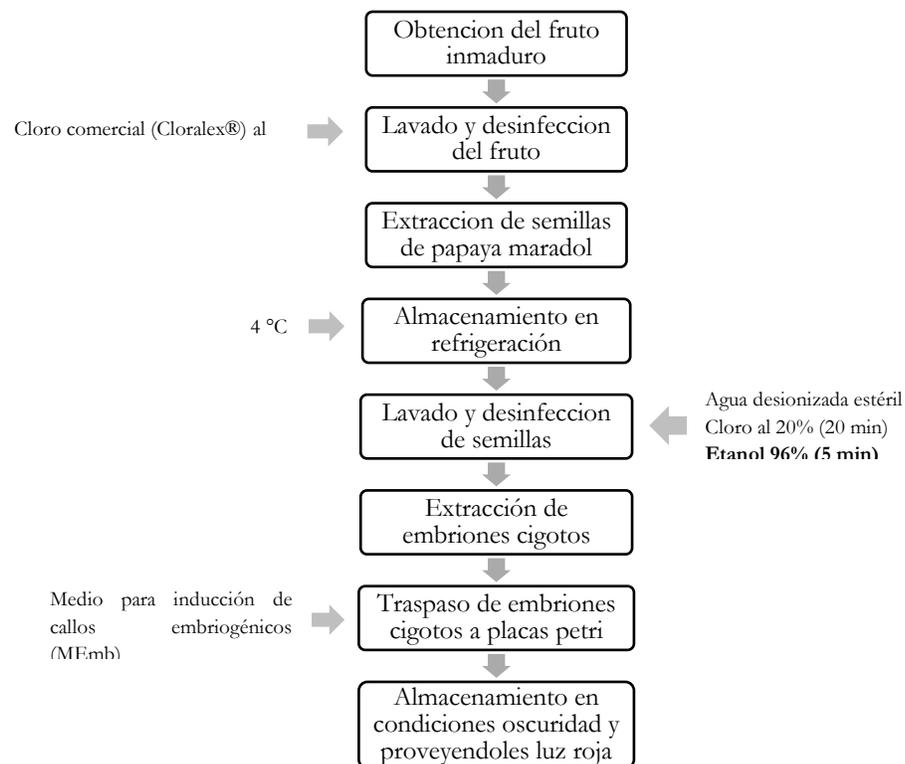


FIGURA 10. Diagrama de flujo correspondiente a la etapa 1

SEGUNDA ETAPA: GENERACIÓN DE PLÁNTULAS

1. Los embriones obtenidos a través de embriogénesis somática se subcultivarán cada mes (utilizando MEmb) para producir suficiente cantidad de embriones, de esa manera seleccionar los de mejor calidad en estadio de torpedo para su elongamiento.
2. Estos embriones en estadio de torpedo se colocarán en placas petri con medio de cultivo G (Murashige and Skoog (MS) al 100% de su fuerza, suplementado con 1 mg/l de BAP, 0.5 mg/l cinetina, sacarosa al 3% (30 g/l), gelrite 3 g/l y pH 5.8). Las placas se incubarán a una temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa (HR) de $80\pm 5\%$, y con un fotoperiodo de 16 h (16 h luz blanca y 8 h oscuridad). Estas condiciones se logran a través de una cámara bioclimática (Prendo, CB-14, México), provista de un sensor de temperatura y HR, además de un temporizador para el control del fotoperiodo. La cámara se encuentra provista de un sistema de lámparas que irradian luz blanca fría con una luminosidad de 6000K/h, esto permitirá elongar los embriones para producir pequeñas plántulas.
3. Para obtener plantas se realizaron subcultivos cada mes, considerando las condiciones de cultivo y ambientales descritas anteriormente, una vez que las plantas alcancen una longitud de 1 cm aproximadamente, se transferirán a pequeños frascos de cultivo (tipo magenta®) utilizando medio G4 (Murashige and Skoog (MS) al 100% de su fuerza, suplementado con 1 mg/l de BAP, 0.5 mg/l cinetina, sacarosa al 3% (30 g/l), PEG al 4% (40 g/l), 10 mg/l de ABA, gelrite 3 g/l y pH 5.8) y las mismas condiciones de incubación.
4. Cuando las plantas hayan alcanzado una altura aproximada de 3.0 cm, se estará en condiciones de generar un protocolo para el enraizamiento, aclimatación y su crecimiento en condiciones de invernadero o a campo abierto (Protocolo no considerado en la presente investigación).

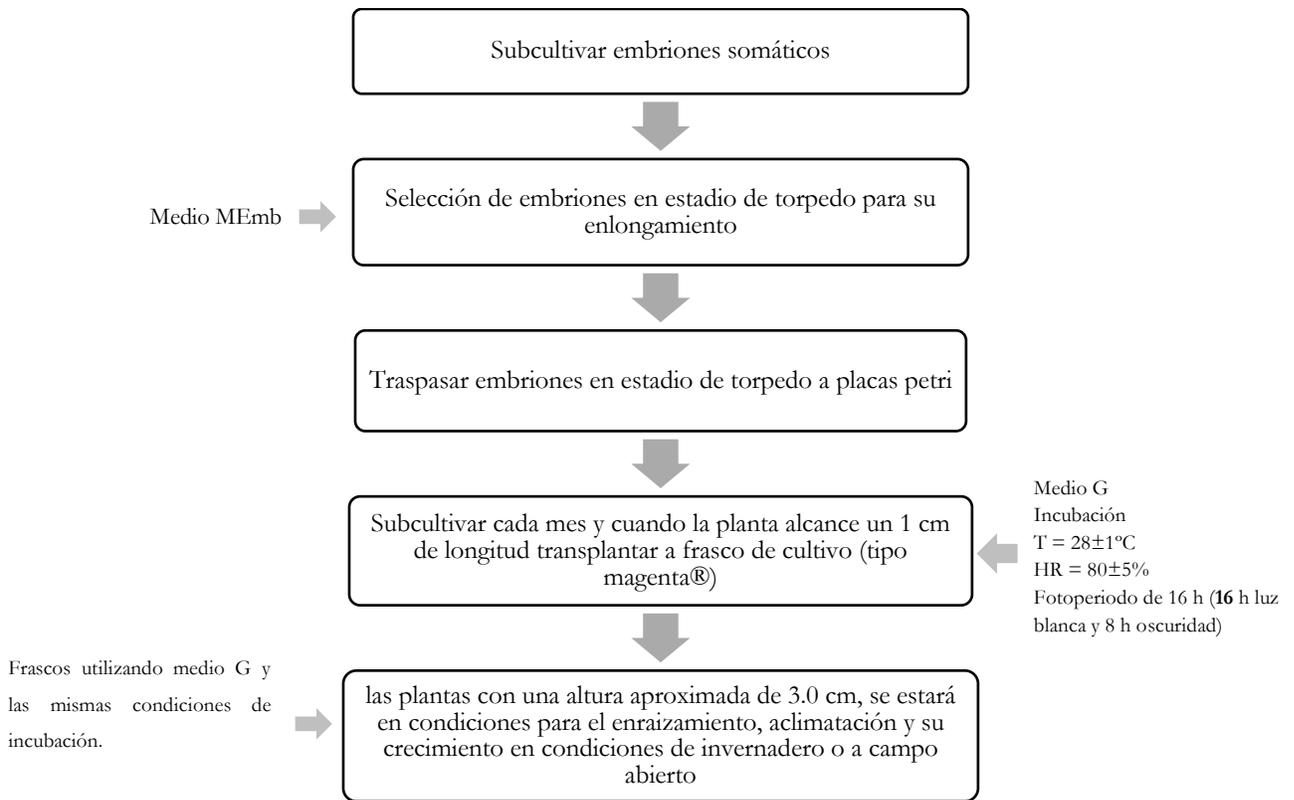


FIGURA 11. Diagrama de flujo correspondiente a la etapa 2

ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos se presentarán mediante estadística descriptiva; de acuerdo al diseño experimental planteado (bi-variado), se evaluará el efecto de las dos variables (Sacarosa, concentración de 2,4 D y luz roja) a través de Análisis de Varianza de dos vías (Two-way ANOVA) ($p < 0.05$), utilizando el software estadístico Minitab® Express versión 17.0 para Macintosh.

RESULTADOS

Obtención de embriones cigóticos

Los embriones cigóticos fueron obtenidos de semillas de un fruto de papaya maradol inmaduro, donde se le dieron los tratamientos indicados en la metodología para obtener embriones cigóticos estériles aptos para ser cultivados, fueron seleccionados los embriones cigóticos que cumplieran con la estructura de la semilla definida, es decir sin fracturas en la sarcotesta y sin existencia de ella.

Obtención de embriones somáticos

Los embriones se obtuvieron después de un sub-cultivo en periodo de un mes y medio, en medio Memb (Sales de MS suplementado con 10 mg/l de 2,4-D) cada medio con el porcentaje de sacarosa anteriormente definido así como los mg/l de 2,4-D (2,4, ácido diclofenoxicético) y el tiempo a exposición a luz roja de los embriones provenientes de semillas de frutos inmaduros de papaya Maradol (figura 8). El callo embriogénico se forma a partir de los meristemos apicales y radiculares del embrión. Los callos embriogénicos se observaron de color amarillo, de consistencia frágil y exudan un líquido claro y denso.

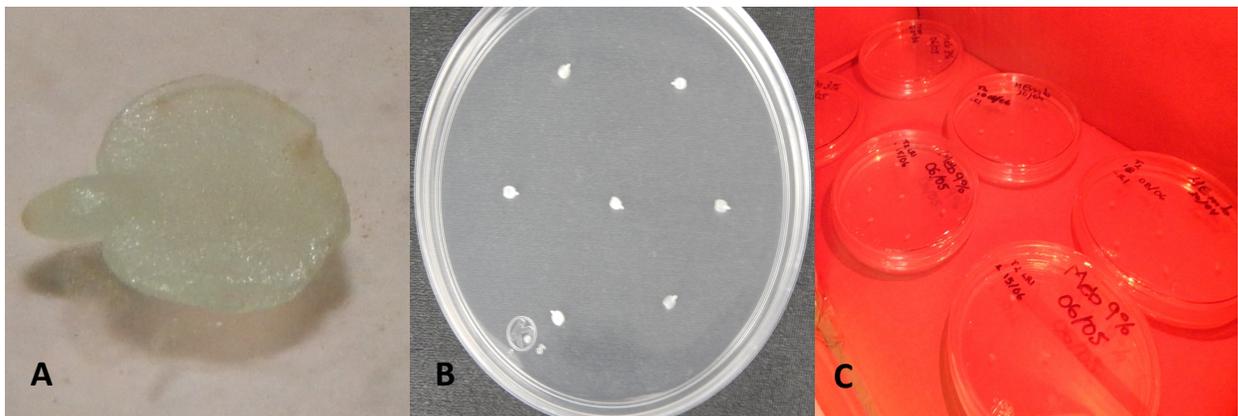


FIGURA 12. A. Embrión recién obtenido de semilla de frutos inmaduros de papaya Maradol. B. embriones sometidos a tratamiento de oscuridad. C. embriones sometidos a 1 hora de luz roja en sus diferentes porcentajes de sacarosa.

Para producir suficiente cantidad de callos embriogénicos se realizaron 2 sub – cultivos en medio Memb (Sales con MS con vitaminas y suplementado con 1 mg/L de 2,4-D) (Figura 9). La cantidad de callo embriogénico se incrementa en el explante conforme es transferido a medios frescos en presencia de la auxina (2,4-D), de esta forma se induce a sucesivas fases embriogénicas (embriogénesis secundaria). Los mejores resultados obtenidos en la formación de callos embriogénicos y somáticos se alcanzaron utilizando los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los embriones. La fase globular y de corazón son las más apropiadas para transformación de embriones mediante el método de biobalística. Se ha demostrado que el 2,4-D estimula la síntesis de otras auxinas, como el ácido indol acético (AIA), en células de zanahoria.



FIGURA 13. Embriones en fase globular, de corazón y torpedos de papaya Maradol.

De acuerdo a los tres porcentajes diferentes a los que se sometieron los embriones la producción de embriones fue más pronta en los medios que contenían 9% de sacarosa, seguidos de los que estaban en 3% de sacarosa y por último en los medios de 6%, esta reacción se debe a que al contener estos porcentajes de sacarosa los embriones entran en estrés

Condiciones de iluminación.

Se determinó que las condiciones de iluminación evaluadas influyeron en la formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos provenientes de un fruto inmaduro de papaya maradol.

Se observó que el número de embriones cigóticos que dieron origen a embriones somáticos tuvo un incremento exponencial con respecto al tiempo de cultivo, con la mayor respuesta embriogénica en alta intensidad luminosa independientemente de la fuente de luz empleada. De esta forma, del total de embriones cigóticos establecidos en condiciones de oscuridad tenían formación de embriones somáticos de los 17 a los 22 días de cultivo, de los embriones expuestos a una hora de luz roja presentaron la formación de embriones somáticos de los 16 a los 21 días de cultivo y finalmente los embriones que estuvieron en exposición a la luz roja en un fotoperiodo de 2 horas tuvieron la presencia de embriones somáticos de los 15 a los 18 días de cultivo, estas variables en días de aparición también van dependientes de las demás variables como el % de sacarosa y los mg/l de 2,4-D en el medio de cultivo, como se observa en la figura 10, en esta figura fueron tomados los valores con mayor relevancia en los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los embriones somáticos.

Sin embargo, tomando como valor de referencia el total de embriones somáticos obtenidos a los 15 días en promedio de cultivo en cada intensidad luminosa, se puede determinar la frecuencia de aparición de los embriones somáticos.

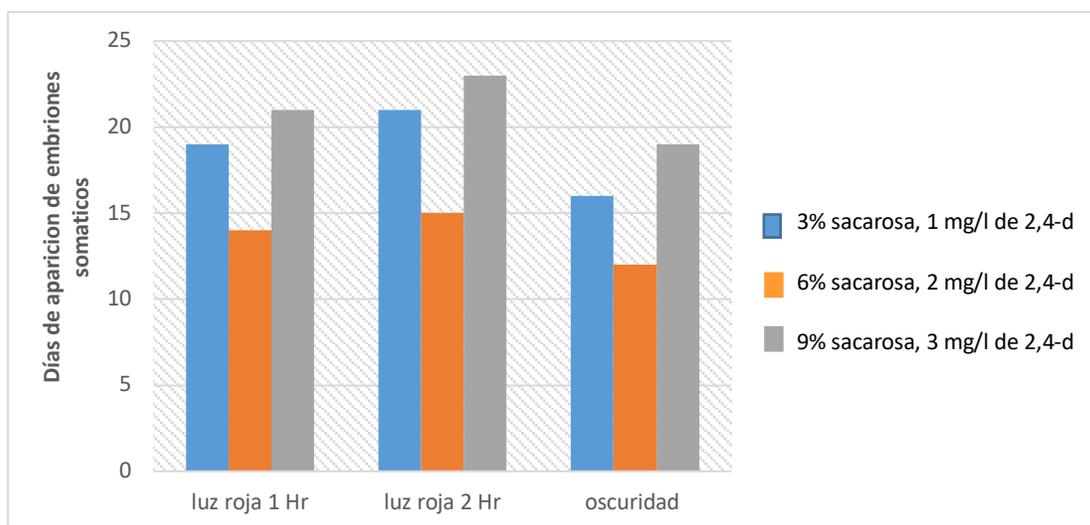


Figura 14. Efecto en la fuente e intensidad luminosa y tiempo de cultivo para aparición de embriones somáticos.

Esto demuestra que se obtuvo la aparición de embriones somáticos en promedio de los 15 días hasta los 22 días de acuerdo a cada experimento con las variables marcadas, donde se observa que se obtuvo la aparición de embriones de manera más rápida en el medio de cultivo con embriones cigóticos con las variables de 2 Hrs de exposición a la luz roja con 6% de sacarosa y 2 mg/l de 2,4-D. Por el contrario, en condiciones de exposición a la luz podemos observar que en los tres tipos de experimentos la más efectiva es donde se sometieron los embriones cigóticos a un periodo de exposición a la luz roja, con variables de 6% de sacarosa y 2 mg/l de 2,4-D.

Morfología de los embriones somáticos.

Al analizar la morfología de los embriones somáticos después de 22 días de cultivo, se encontró predominio de embriones somáticos en etapa globular y consistencia compacta (Figura 11a). Sin embargo, una semana después estos tenían un desarrollo asincrónico con diferentes tamaños y grados de desarrollo, siendo visible las etapas globular, corazón y torpedo, típicas de esta ruta morfológica y similares a la del embrión cigótico (Figura 11b).

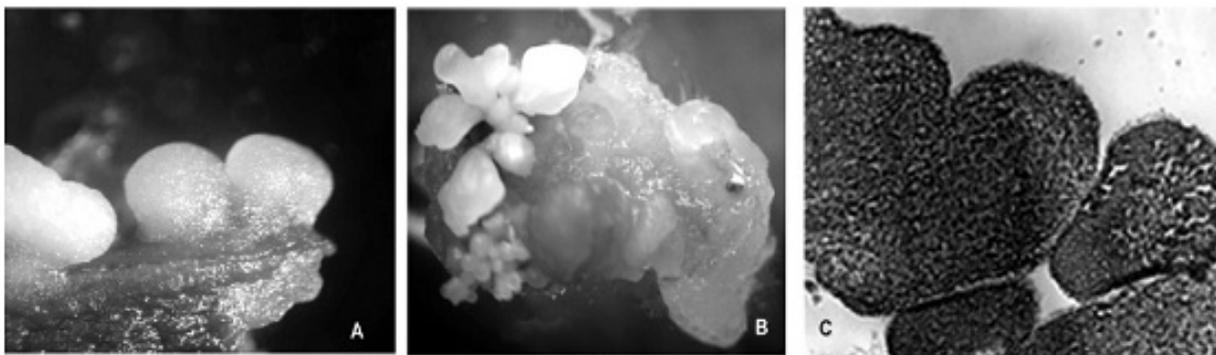


Figura 15. Formación de embriones somáticos de papaya maradol en los tratamientos de luminosidad

En la porción apical de los embriones somáticos en etapa globular, fue visible una invaginación, indicio del comienzo de su transición a la etapa de corazón. Los cortes histológicos corroboraron la presencia de embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo (Figura 11c).

Esta continua multiplicación de los embriones somáticos de papaya maradol, permitió un incremento en el número de embriones somáticos al finalizar la fase de multiplicación con respecto al número de embriones somáticos inicialmente establecidos en cada una de las fuentes de luz. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la tasa de multiplicación de los embriones somáticos en los diferentes tratamientos de luz a los que fueron sometidos.

Estos resultados indican que con alta intensidad luminosa es posible incrementar la formación de embriones somáticos, sin encontrar diferencias significativas entre los 21 y 28 días de cultivo

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Obtención de embriones

Los embriones globulares se obtuvieron después de dos sub-cultivos en periodos de un mes, Cai y otros, (1999) publicaron resultados concordantes al haber inducido la formación de embriones globulares, de corazón y torpedos después de cuatro a cinco semanas de cultivar embriones cigóticos en medio de inducción.

Efecto de auxina 2,4-D

La inducción de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos se ha reportado en varios cultivares de papaya (“Co7”, “Solo”, “Maradol” y “Maradol Rojo” y otros cultivares hawaianos) (Fitch y Manshardt, 1990). Sin embargo en este trabajo, los embriones cigóticos de papaya maradol, fueron sometidos a tratamientos en el medio de cultivo de dosis de 2,4-D y dosis de iluminación con luz roja. Al respecto Anandan y otros. (2012) observaron que los embriones cigóticos extraídos de semillas maduras y negras (140 a 150 días después de la antesis).

A las ocho semanas de cultivo, los explantes de papaya maradol cultivados en un gradiente de 2,4-D presentaron un comportamiento similar al que observaron Anandan y otros (2012). Estos autores obtuvieron los mayores porcentajes de formación de callo al utilizar concentraciones entre los 2 y 6 mg/l de 2,4-D, observando un pico de respuesta de 87% de formación de callo con la primera concentración, siendo el 75% de estos embriogénicos. Además, los mismos autores observaron que al utilizar concentraciones mayores a 3 mg/l disminuyó significativamente la formación de callo, lo cual indica un efecto inhibitorio del proceso de inducción de callo por parte del regulador de crecimiento a partir de cierto umbral (Anandan y otros, 2012). Por lo anterior los porcentajes de formación de callo en los explantes de papaya maradol cultivados bajo concentraciones de 2,4-D en niveles de 1 a 3 mg/l, indicando un grado favorable de susceptibilidad de este genotipo en las concentraciones de este mismo regulador del crecimiento.

Luego de 15 días de cultivo, 65% de los explantes de papaya maradol cultivados en una concentración de 2 mg/l de 2,4-D formaron callo, porcentaje que fue significativamente distinto del observado con las otras concentraciones del regulador. Además, el porcentaje de formación de callo embriogénico y el número de embriones somáticos obtenidos tuvo igual una variación significativa en base a los demás tratamientos. Fitch y Manshardt (1990) observaron un comportamiento similar en la variedad de papaya “Kapoho” al cultivar embriones cigóticos desnudos (cosechados 104 días

después de la floración), ya que dichos explantes presentaron un porcentaje de formación de callo similar, sin importar la concentración de 2,4-D utilizada.

Efecto de la luz roja

El empleo de alta intensidad luminosa en diferentes tratamientos de dosis de exposición, favoreció la formación de embriones somáticos de papaya maradol, quizás debido a que al tejido llegó una mayor cantidad de irradiación luminosa, la influencia de la luz en la formación de embriones somáticos, ha demostrado que favorece y acelera la formación de los mismos en tiempos más cortos de cultivo.

Estas variaciones en la capacidad embriogénica de los embriones cigóticos en las diferentes fuentes de luz evaluadas, pudieron estar influenciadas por el espectro de luz que llegó al tejido de los embriones somáticos. Es conocido que en cámaras de crecimiento con luz artificial el espectro luminoso es continuo. Sin embargo, bajo condiciones de luz solar los tejidos están expuestos a las diferencias espectrales que varían en dependencia de las condiciones climáticas, duración del período luminoso y el ambiente de cultivo *in vitro* (Hogewoning y otros, 2010).

A su vez, la variación observada en este trabajo en cuanto al número de embriones cigóticos con embriones somáticos, refleja que durante los primeros 15 días de cultivo ocurre una intensa actividad mitótica en los embriones cigóticos, dando origen a las estructuras embriogénicas principalmente en presencia de alta intensidad luminosa.

La literatura científica refiere que las lámparas fluorescentes usadas en el cultivo *in vitro* aportan luz roja y luz azul, lo que unido a la intensidad luminosa activa los fotoreceptores del tejido e inducen dicho proceso morfogénico. El color rojo del espectro luminoso inducen la formación de embriones somáticos, y el color azul los inhibe aunque favorece su desarrollo (Hoshino y Cuello, 2006).

Los resultados alcanzados en este trabajo difieren con los referidos por Bonacin y otros (2000) y Mauro y otros (2001), quienes no encontraron diferencias en la respuesta embriogénica en cinco genotipos hawaianos cultivados en rangos de intensidad luminosa entre 8-12 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y 27-33 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, aludido a las bajas intensidades luminosas evaluadas. Mientras que Jin y otros (2004), al evaluar intensidades de iluminación de 10, 20 y 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtuvieron la mejor respuesta de formación de embriones somáticos en embriones cigóticos expuestos a 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sin diferencias entre 20 y 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante el desarrollo embrionario.

De igual manera, indican una relación directa entre el número de estructuras embriogénicas obtenidas en las fases de formación y multiplicación de embriones somático, y difiere de los resultados obtenidos por Bailey y otros (1993) y Simmonds y Donaldson (2000), quienes observaron que cultivares con alta capacidad de formación de embriones somáticos desarrollaron un bajo potencial de proliferación.

Una de las causas que pudieron haber influido en los resultados alcanzados en este trabajo es el espectro de luz. Al respecto, Hogewoning y otros (2010) plantearon que en cámaras de crecimiento con luz artificial esta es continua, mientras que en condiciones de luz solar, los tejidos son expuestos a las diferencias espectrales que varían en dependencia de las condiciones de tiempo, duración del día y el ambiente de cultivo. En este sentido, Franklin y Whitlam (2007) describen que en días nublados el espectro de luz solar contiene más azul y menos rojo lejano entre 700-750 nm que en días normales, y una baja proporción del rojo a rojo lejano.

Algunos trabajos refieren que la luz influye en la inducción y morfología de embriones somáticos diferenciados. Una posible explicación de la diferenciación de los embriones somáticos, es la correlación entre la proporción de luz del rojo lejano y el rojo absorbido en los fitocromos, lo cual puede producir efectos inhibitorios en dependencia de la cantidad de fitocromos activados (Torné y otros, 2001).

Por su parte, D'Onofrio y otros (1998), informaron sobre los efectos de la luz en la diferenciación de embriones somáticos en *Sidonia* sp. Al correlacionar la proporción de embriones somáticos diferenciados con el fotoequilibrio, encontraron un incremento exponencial desde 0%-30% de embriones somáticos diferenciados al incrementar el fotoequilibrio de cero a uno, lo que sugiere una actividad de los fitocromos para inducir la embriogénesis somática.

Se ha encontrado que el espectro de la luz roja y alta intensidad luminosa favorece la formación de embriones somáticos en células embriogénicas de Zanahoria (*Daucus carota*). Por otro lado, una duración del fotoperíodo de 16 horas luz, incrementa el número y tamaño de los embriones somáticos en la especie Miraguano (*Araujia sericifera*); mientras que en Agave azul (*Agave tequilana*), 16 horas luz durante la fase de formación de embriones somáticos, estimula la sensibilidad de los callos embriogénicos (Torné y otros, 2001; Rodríguez-Sahagún y otros, 2011). Algunos trabajos refieren que la luz influye en la inducción y morfología de embriones somáticos, pero poco es conocido acerca del efecto de la calidad y cantidad de luz sobre parámetros fisiológicos y bioquímicos del explante, los cuales varían entre especie y genotipo. Se plantea que el 2,4-D y la luz, son capaces de inducir una explosión oxidativa en el tejido para producir especies de oxígeno

reactivo. Estos cambios en el ambiente celular del cultivo *in vitro*, inducido por factores de estrés del medio de cultivo o el ambiente físico, son responsables de la reprogramación de la expresión génica. En este contexto, se promueve la diferenciación celular e induce la formación de embriones somáticos (Zavattieri y otros, 2010).

Sustancias celulares como el peróxido de hidrógeno y óxido nítrico, inducen la expresión del gen oxidasa alternativo (del inglés, *alternative oxidase*: AOX) y la embriogénesis somática. Este gen reduce la producción de especies de oxígeno reactivo en la mitocondria de las células vegetales. Así, puede ser considerada una correlación entre la expresión de dicho gen, las respuestas de estrés y reprogramación celular vía embriogénica (Arnholdt-Schmitt y otros, 2006).

Esto concuerda con Widholm y otros (2010), quienes plantearon que si la concentración de 2,4-D disminuye por debajo del umbral requerido para formar embriones somáticos, estos continúan su desarrollo utilizando los nutrientes del medio de cultivo. Además, el 2,4-D una vez absorbido por el tejido vegetal, puede ser degradado o conjugado con otras auxinas pues está expuesto a factores físicos y sujeto a la conversión enzimática (Machakova y otros, 2008).

CONCLUSIONES

El procedimiento utilizado (técnicas y medios de cultivo) permitió obtener embriones somáticos idóneos para la obtención de plántulas de papaya Maradol mediante un sistema de embriogénesis somática eficiente y con bajos niveles de contaminación.

Los resultados obtenidos en este trabajo, permitieron demostrar el efecto del tipo e intensidad de luz en la formación y multiplicación de embriones somáticos de papaya maradol.

REFERENCIAS DOCUMENTALES

- ABDELNOUR, Esquivel Ana y Vicent, Escalant Jean. 1994. *Conceptos Basicos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. s.l. : CIRAD, 1994.
- AGUILAR , M. 2002. *Curso cultivo de tejidos vegetales para la conservación y el mejoramiento genetico*. Ecuador : s.n., 2002. AGUILAR , V María Elena , Ortiz , V Juan Luis y Sandoval , F Jorge Arturo. 2008. *Embriogénesis somática en plátanos y bananos: perspectivas y limitaciones*. Costa Rica : CATIE, 2008. 978-9977-57-460-8 ALFONSO, García Mario. 2010. *Guia Técnica del Cultivo de la Papaya*. El Salvador : CENTA, 2010. págs. 8-9.
- Agrolanzarote. (Enero de 2012). *Fichas técnicas de cultivos de Lanzarote*. . Obtenido de <http://www.agrolanzarote.com>
- ARIAS, Jaime, y otros. 2001. *Generalidades médico-quirúrgicas*. España : TEBAR, 2001. pág. 277. 84-95447-11-8.
- BARAONA, Cockrel Marcia y SANCHO, Barrentes Ellen. 1991. *Fruticultura especial: piña y papaya*. EUNED. 1991.
- BARREIRO, Perera Mario. 1999. *Claridades agropecuarias*. 198-93, México : ASERCA, 1999, págs. 3-4.
- BARIOGLIO, F. Carlos. 2006. *Diccionario de las ciencias agropecuarias*. Primera. Argentina : ENCUESTRO Grupo Editor, 2006. pág. 379. 987-23022-4-3.
- BEJARANO, Gonzáles Fernando. 2007. *2,4-d, Razones para su prohibición mundial*. México : RAPAM, 2007, Vol. I.
- BERNAL, José y Cruz , T. Acela. 2001. *Papaya. Frutales de Clima Cálido*. Colombia : Corpoica, 2001.
- BERTHDUL, Marc y Berrios , Alberto. 1987. *Tecnología del cultivo de tejidos de café (coffea arabica)*. Panama : IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura), 1987, Vol. 1.
- CARVAJAL, Ramón. 2006. *Papaya. Lo que México aportó al mundo*. México : Lectorum, 2006. págs. 96-97.
- CANUL, Medina Gustavo y Coop, Gamas Ofelia . 2009. *Glutamina en nutrición clínica*. 4, México : MEDIGRAPHIC, 2009, Revista de endocrinología y nutrición , Vol. 17, pág. 161.

- DE la Cruz, j., Vela, G. Gilber, y Garcia, H. S. 2003. Pawpaw: Post-harvest Operation. Mejia, D. AGSI/FAO. Italy.
- DODEMAN, V L, Ducreux, G y Kreis, M. 1997. *Zygotic embryogenesis versus sometic embryogenes* . Canada : INFOMUSA, 1997.
- DUCHEFA Biochemie. 2016. Duchefa biochemie. *murashige & skoog medium*. [En línea] 2016. [Citado el: 29 de Mayo de 2016.] <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0221>.
- ENTRALA, Bueno A. 1998. *Vitaminas: aspectos practicos en medicina*. México : DIAZ DE SANTOS, 1998. págs. 3,4. 84-7978-214-5.
- Estudio de OPORTUNIDADES DE MERCADO E INTELIGENCIA COMERCIAL INTERNACIONAL de la PAPAYA MÉXICANA e identificación de NECESIDADES DE INFRAESTRUCTURA LOGÍSTICA*. PAPAYA, COMITES ESTATALES DEL SISTEMA PRODUCTO. México : s.n., pág. 11.
- FAO. 2002. *El cultivo protegido en clima mediterráneo. Papaya*. Roma : s.n., 2002. pág. 285.
- FAO y SAGARPA. 2009. Estudio de oportunidades de mercado e inteligencia comercial internacional de la papaya . [En línea] 2009. [Citado el: 30 de Mayo de 2016.] http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/documents/estudios_promercado/papaya2009.pdf.
- FONNAGRE, Ramiro y Jiménez , Silvia Luz. 2007. *Papaya. Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia*. Colombia : Editorial Universidad de Antioquia, 2007. pág. 201.
- GAMAZO, Carlos, López , Goñi Ignacio y Díaz, Ramón . 2005. *Manual practico de microbiologia*. Tercera. España : MASSON, 2005. 84-458-1519-9.
- GIL, Ivonne Arlette y Miranda , Diego. 2005. *Morfología de la flor y de la semilla de papaya (Carica papaya L.)*. 2, Colombia : s.n., 2005, Vol. 23, págs. 217-221.
- GRAY, D. 2000. *Nonzygotic embryogenesis*. Florida : Plant Tissue Culture , 2000.
- HANS, Beyer y Wolfgang, Walter . 1987. *Manual de química orgánica*. 19. España : EDITOIAL REVERTÉ, 1987. pág. 478. 84-291-7066-9.

- JAÚREGUI, Rincón Juan y Cháves , Vela Norma Angélica. 2006. *Golsario de botecnologia*. 1. Aguascalientes : UAA (Univercidad Autonoma de Aguascalientes), 2006. 970-728-049-2.
- LITZ, R. E. y Jaiswal, V. S. 1991. *Micropagation of tropical and subtropical fruits*. s.l. : DORDRECHT, 1991. pág. 247.
- LLANO, Membiela Belém, y otros. 2011. *Guia tecnica: Limpieza, desinfección, esterilización*. España : GRAFICAS CANO, 2011. pág. 9.
- LOBO, Rodrigo María Gloria . 1995. *Caracterización bioquimica de frutos de papaya Carica papaya, cv. Sunrise), hembra y hermafrodita, en realcion con su aptitud al procesado por congelación*. Madrid : UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, 1995. págs. 17-19.
- MACÍAS, Moreira María José. 2007. *Evaluación de fuentes dosis de carbohidratos y condiciones ambientales sobre la reactividad embriogénica de genotipos seleccionados de cacao Nacional* . Ecuador : UTM (Universidad Tecnica de Manabi), 2007.
- MAGFOR, Jica. 2004. *Papaya. Frutas*. Nicaragua : s.n., 2004. págs. 81-82.
- MANZANILLA, Ramírez Miguel Angel . 2004. *Inducción de embriogénesis somática demtejido nuclear de tres variedades de mango (Mnagifera indica L.)*. Colima : UDC, 2004. pág. 8.
- MARGARA, J. 1987. *Mutiplicación vegetativa y cultivo in vitro. los meristemos y la organogénesis* . Madrid : MUNDI-PRENSA, 1987.
- MERKLE, S. A. 1990. *Maturatio of yello poplar somatyc embryos* . New York : Plenum Press, 1990.
- MONDAL, T. K., y otros. 2004. *Recent advances of tea (Camellia sinensis) biotechnology*.3, 2004, Vol. 76, págs. 195-205.
- NIMBRO, A. 1988. *Semillas de árboles y arbustos: ontogenia y estructura*. México : LIMUSA, 1988.
- OFFICE of the Gene Technology Regulador (OGTR). 2008. *The Biology of Carica papaya L. (papaya, papaw, paw pan)*. Australian Government. 55 pp.
- PRIMO, Yúfera Eduardo. 1995. *Química orgánica básica y aplicada de la molécula a la industria*. España : REVERTÉ, 1995. pág. 895. Vol. II. 978-84-291-7954-5.
- ROGER, Jorge. 1995. *Propiedades de la papaya. Alimentos que curan*. s.l. : SAFELIZ, 1995. pág. 75.

SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [En línea] 2014. [Citado el: 30 de Mayo de 2016.] <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por.cultivo/>.

SILVA, García Luis, y otros. 2006. *Limpieza del instrumental e higiene del medio Hospitalario*. España : MAD, 2006. pág. 33. 978-84-665-5757-3.

VAZQUEZ, García Enrique, y otros. 2010. *Producción y manejo postcosecha de papaya maradol en la planicie Huasteca*. Tamaulipas : SAGARPA, 2010. 978-607-425-464-8.

VELA, Gutiérrez Gilber , y otros. 2014. *Porpagación y enraizamiento in vitro de papaya maradol a partir de embriones cigotos*. 2, México : s.n., 2014, Vol. 67, pág. 891.

VICENTE, Lazo José. 2002. *Efectos de la radiación sobre las plantas* . México : s.n., 2002

