

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
PROGRAMA EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD
SUBPROGRAMA EDC-BIOLOGIA

**INFORME FINAL INTEGRADO
LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES
DE ANACAFE
JULIO 2006-JULIO 2007**

EVELYN XIOMARA AGVIK ESPAÑA
PROF SUPERVISOR: LIC. BILLY ALQUIJAY
SUPERVISOR UNIDAD DE PRACTICA: LICDA. ANA SILVIA MARTÍNEZ

VoBo ASESOR INSTITUCIONAL

AGRADECIMIENTO A Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de ANACAFE por haber permitido la realización de la práctica de EDC (Experiencia Docente con la Comunidad) y la investigación “**Inducción a enraizamiento *in vitro* de plántulas de papaya *Carica papaya* var. Hawaiana Aloha Pride**” en sus instalaciones.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. RESUMEN DE ACTIVIDADES	4
3. ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA PRÁCTICA DE EDC	
3.1 SERVICIO	
3.1.1 Actividad No. 1 Preparación de Soluciones madres y de medios de cultivo.....	5
3.1.2 Actividad No. 2 Introducción de materiales vegetales nuevos	6
3.1.3 Actividad No. 3 Transferencia de material vegetal en propagación y en desarrollo....	6
3.1.4 Actividad No. 4 Evaluación de materiales vegetales y Control de contaminación.....	7
3.1.5 Actividad No. 5 Congreso mesoamericano para la biología y conservación.,.....	7
3.2. DOCENCIA	
3.2.1 Actividad No. 1 Elaboración de trifold informativo	7
3.2.2 Actividad No. 2 Pláticas informativas a estudiantes	7
3.2.3 Actividad No. 3 Congreso mesoamericano para la biología y conservación.....	7
3.3 ACTIVIDADES NO PLANIFICADAS	
3.3.1 SERVICIO	
3.3.1.1 Actividad No. 1 Jornada Científica	8
3.3.1.2 Actividad No. 2 V Congreso del Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala	8
3.3.2 DOCENCIA	
3.3.2.1 Actividad No. 1 Convergencia 2006	8
3.3.2.2 Actividad No. 2 Conferencia de Paleocología. Impartida por Carlos E. Avendaño	8
3.3.2.3 Actividad No. 3 Conferencia: Guatemala: A center for Salamander Biodiversity. Impartida por el Dr. David B. Wake de la Universidad de Berkely, California.	9
3.3.2.4 Actividad No. 4 Pláticas formativas	9
3.3.2.5 Actividad No. 5 Jornada Científica	9
3.3.2.6 Actividad No. 6 V Congreso del Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala	9
3.3.2.7 Actividad No. 7 Taller ANACAFE	9
3.3.2.8 Actividad No. 8 Festival Mundial de Aves	9
3.4 INVESTIGACION	
3.4.1 Actividad No. 1 Elaboración de medio de cultivo de los diferentes tratamientos.....	10
3.4.2 Actividad No. 2 Siembras de los diferentes tratamientos	10
3.4.3 Actividad No. 3 Evaluación de contaminación	10
3.4.4 Actividad No. 4 Observación y medición de resultados.....	10
3.4.5 Actividad No. 5 Transferencia a bandejas	10

4. RESUMEN DE INVESTIGACIÓN	11
5. ANEXOS	12

1. INTRODUCCIÓN

El programa contribuye a la formación profesional del estudiante de la carrera de Biología, instruyendo al estudiante sobre las Ciencias Biológicas a través de las actividades de docencia, servicio e investigación.

El Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad (EDC) tiene como finalidad la divulgación y aplicación de los conocimientos que posee el estudiante de Biología, permitiendo al mismo tiempo adquirir experiencia en el área de la Biología.

En las prácticas de EDC, se llevan a cabo tres actividades importantes: servicio, docencia e investigación. Cada actividad está designada con una cantidad de horas específica. Se presenta un listado detallado de las actividades que se realizaron durante la práctica, el objetivo que tenía realizarla, como se llevó a cabo y los resultados que se obtuvieron de las mismas.

2. RESUMEN DE ACTIVIDADES

Programa Universitario	Fecha Propuesta	Horas EDC Asignadas	Horas EDC Acumuladas	% de Horas EDC de Avance/Acumuladas
a. Servicio	Julio 2006 – Diciembre 2006	275 + 60 (herbario)	275+ 60 (herbario)	100% + 100% (herbario)
b. Docencia	Julio 2006 – Diciembre 2006	155	145	93.55%
c. Investigación	Julio 2006 – Julio 2007	350	50	100%

Actividad	Programa	Fecha de la Actividad	Horas EDC Ejecutadas
Preparación de Soluciones madres y de medios de cultivo	S	Julio-diciembre	14
Introducción de materiales vegetales nuevos	S	Julio-agosto	12
Transferencia de material vegetal en propagación y en desarrollo	S	Julio-diciembre	167
Evaluación de materiales vegetales y Control de contaminación	S	Julio-diciembre	15
Congreso mesoamericano para la biología y conservación	S	29 octubre-2 noviembre	25
Elaboración de trifoliar informativo	D	20 agosto- 10 septiembre	25
Pláticas informativas a estudiantes	D	13 septiembre	15
Congreso mesoamericano para la biología y conservación	D	29 octubre-2 noviembre	25

Pláticas Formativas	D	Julio	10
Converciencia	D	26 julio	8
Conferencia sobre "Paleoecología"	D	Agosto	2
Conferencia Salamandras	D	Agosto	2
Jornada Científica	S/D	18 – 19 septiembre	18/8
V Congreso del Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala	S/D	26, 27 y 28 septiembre	24/12
Taller ANACAFE	D	13 de septiembre	2
Taller Congreso MSBC	D	Octubre	5
Festival Mundial de Aves	D	20 al 22 de octubre	31
Elaboración de protocolo	I	Septiembre 2006	35
Elaboración de medio de cultivo de los diferentes tratamientos	I	Enero 2007	35
Siembras de los diferentes tratamientos	I	Enero -Febrero 2007	40
Evaluación de contaminación (reposición de frascos contaminados)	I	Enero -Febrero 2007	20
Observación y medición de resultados	I	Enero 2007- Marzo 2007	100
Transferencia a bandejas			25
Discusión de resultados	I	Abril-Mayo2007	16
Conclusiones	I	Mayo 2007-	16
Recomendaciones	I	Mayo 2007	16
Elaboración del Informe Final	I	Mayo-Junio 2007	30

3. ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA PRÁCTICA DE EDC

3.1 SERVICIO: Laboratorio de Cultivo de Tejidos de ANACAFE

3.1.1 Actividad No. 1 Preparación de Soluciones madres y de medios de cultivo

OBJETIVO: Hacer un medio de cultivo específico para el material vegetal que se desea propagar.

PROCEDIMIENTO: Se preparan soluciones de 2 litros (a excepción de ciertos casos). En un balón aforado se colocan la sacarosa, macro y microelementos, vitaminas y reguladores de crecimiento según el medio a preparar, se afora con agua destilada. Se introduce un magneto para que se disuelva y se mezcle. Se lleva a pH óptimo de 5.6 y se agrega phytagel; luego se calienta en horno de microondas por 30 minutos en punto de ebullición para disolver el gelificante. La solución caliente se vierte con una pipeta en los frascos para cultivo y se tapan. Las bandejas con los frascos se llevan a la autoclave por 20 minutos para esterilizar a 250° F y 15 lb/in³.

RESULTADOS: Preparación de medios de cultivo esterilizados para la micropropagación o desarrollo de los materiales vegetales.

LIMITACIONES: Ninguna

3.1.2 Actividad No. 2 **Introducción de materiales vegetales nuevos**

OBJETIVO: Desinfectar e introducir materiales vegetales nuevos para su micropropagación y desarrollo *in vitro*.

PROCEDIMIENTO: I. Semillas de orquídea (*Cattleya aurantiaca*). 1. Desinfección: Se prepara una solución de hipoclorito de sodio al 20% con unas gotitas de Tween para que se rompa la tensión superficial. Se lleva a la campana. Se agita y se deja reposar durante 20 minutos, se forman dos fases al precipitar las semillas que tienen embrión (al trabajar con una especie con poca semilla o rara se utilizan todas las semillas, con y sin embrión para aprovechar al máximo el material). Se filtra utilizando un embudo y erlenmeyer. Se hacen tres lavados con agua destilada estéril cada 2 minutos. Se hace la segunda desinfección por 10 minutos con el hipoclorito al 20%, se repiten los lavados con agua destilada estéril.

2. Siembra: Se trabaja en la cámara de flujo laminar y los instrumentos y cristalería previamente esterilizados. Con pinzas se toman las semillas y se colocan en el medio, se agrega unas gotas de agua destilada y estéril para que haya una mejor dispersión de las semillas. Se sellan los frascos.

RESULTADOS: 0% de contaminación, germinación. El procedimiento de desinfección fue efectivo.

LIMITACIONES: El tiempo de germinación de las orquídeas es prolongado.

II. Ornamental *Leucanthemum sp*: 1. Preparación y desinfección: Las plantas se sacaron de las macetas, se limpió la tierra, se les cortó raíces y hojas y se lavaron con agua de chorro y jabón desinfectante. Los trozos de plantas se desinfectaron en una solución de benlate 3% por 30 minutos, luego en alcohol 70% por 5 minutos, luego en hipoclorito de sodio al 25% por 45 minutos, se llevaron a la cámara, se hicieron 3 lavados con agua destilada estéril durante 1 minuto cada una, se hizo otra desinfección con hipoclorito de sodio al 25% por 15 minutos, se hicieron 3 lavados con agua destilada estéril durante 1 minuto cada una.

2. Siembra: Se tomó cada trozo de planta y se puso a secar en papel toalla estéril, se colocó sobre el plato con papel esterilizados, se hicieron cortes a cada lado, de hojas y base hasta lograr un trozo de aproximadamente 2 mm de cada lado. Algunos trozos se cortaron por la mitad para exponer el meristemo y otros se dejaron enteros. Se colocaron en los frascos y se llevaron al cuarto de crecimiento.

RESULTADOS: Se contaminó el 99% de los frascos, el único meristemo que no se contaminó continúa en cultivo.

LIMITACIONES: El procedimiento para la desinfección se estaba ensayando, el cual se puede modificar para obtener menos contaminación. Además las plantas fueron sometidas a un tratamiento previo por lo que estaban debilitadas.

3.1.3 Actividad No. 3 **Transferencia de material vegetal en propagación y en desarrollo**

OBJETIVO: Proporcionar a la planta mayor espacio y nutrición para su desarrollo individual.

PROCEDIMIENTO: Se esterilizan los instrumentos que se utilizan y se limpia la cámara. Todo el procedimiento se realiza con pinzas y bisturí o tijera. Se coloca el material vegetal sobre un plato con papel esterilizado. Se separan cada una de las plantas haciendo cortes, se escogen las mejores plantas. Se colocan tres o cuatro en cada frasco nuevo. Se etiqueta el frasco, colocando el medio utilizado, la fecha de siembra, tipo de explante y la persona que lo realizó. Se llevan a cuartos de crecimiento con temperatura y fotoperíodo específicos para cada cultivo.

RESULTADOS: Propagación y desarrollo de las plántulas en mayor espacio y nutrición adecuada.

LIMITACIONES: Ninguna

3.1.4 Actividad No. 4 **Evaluación de materiales vegetales y Control de contaminación**

OBJETIVO: Verificar el buen desarrollo del material vegetal, y descartar los frascos contaminados y determinar las causas de la contaminación.

PROCEDIMIENTO: Se hacen revisiones periódicas del material vegetal que están en incubación en los cuartos de crecimiento en diferentes etapas de desarrollo

RESULTADOS: Obtención de lotes de los materiales vegetales en propagación o desarrollo, libres de contaminantes.

LIMITACIONES: Ninguna

Otras Actividades:

3.1.5 Actividad No. 5 **Congreso mesoamericano para la biología y conservación**

OBJETIVO: Colaborar en la organización y desarrollo de los distintos talleres y conferencias impartidos por profesionales.

PROCEDIMIENTO: Colaboración y asistencia en las diferentes áreas de organización.

RESULTADOS: La actividad se realizó en forma ordenada y se lograron los objetivos del mismo.

LIMITACIONES: falla de equipo, falta de material en ocasiones.

3.2. DOCENCIA

3.2.1 Actividad No. 1 **Elaboración de trifoliar informativo**

OBJETIVO: Dar a conocer las técnicas de propagación *in vitro* y el propósito de las mismas.

PROCEDIMIENTO: Se hicieron revisiones bibliográficas para obtener información completa acerca del tema. Se elaboró el trifoliar con los temas de mayor importancia.

Entregar los trifoliales a estudiantes y profesionales de la Escuela de Biología.

RESULTADOS: Elaboración y entrega de trifoliales a estudiantes.

LIMITACIONES: Ninguna.

3.2.2 Actividad No. 2 **Pláticas informativas a estudiantes**

OBJETIVO: Practicar como educador, enriquecer los conocimientos de los estudiantes de la carrera de Biología acerca de las técnicas de propagación *in vitro* de materiales vegetales.

PROCEDIMIENTO: Se preparó material audiovisual para apoyo en la realización de las conferencias. Se realizó una conferencia a los estudiantes del curso de Botánica III.

RESULTADOS: Se realizó la conferencia el 13 de septiembre del 2006.

LIMITACIONES: Ninguna

3.2.3 Actividad No. 3 **Congreso mesoamericano para la biología y conservación**

OBJETIVO: Conocer la realidad del papel de las ciencias biológicas en mesoamérica a través de los distintos talleres y conferencias, las cuales darán a conocer los diferentes trabajos e investigaciones realizados.

PROCEDIMIENTO: Asistencia a talleres y conferencias de dicho congreso que tendrá lugar en La Antigua Guatemala, teniendo una duración de 6 días.

RESULTADOS: Obtener valiosa información acerca de investigaciones que se realizan en otros países y en el nuestro. Conocer nuevas técnicas que se pueden emplear en investigaciones.

LIMITACIONES: Ninguna

3.3 ACTIVIDADES NO PLANIFICADAS

3.3.1 SERVICIO

3.3.1.1 Actividad No. 1 Jornada Científica

PROCEDIMIENTO: Participación en la realización de la actividad como edecán, colaborando en inscripción y entrega de material a los participantes y ayuda en los salones de conferencias.

RESULTADOS: Inscripción y entrega de material a los participantes de la actividad.

LIMITACIONES: Hubo más participantes de los esperados y por lo tanto hizo falta material.

3.3.1.2 Actividad No. 2 V Congreso del Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala

PROCEDIMIENTO: Colaboración en la organización de la actividad, instalación de computadoras y cañoneras para los conferencistas y encargada de un salón de conferencias durante los 4 días.

RESULTADOS: La actividad se realizó con el mayor orden y no hubo ningún problema.

LIMITACIONES: Ninguna

3.3.2 DOCENCIA

3.3.2.1 Actividad No. 1 Convergencia 2006

OBJETIVO: Dar a conocer el trabajo que realizan investigadores guatemaltecos en el extranjero. Interesar y estimular a jóvenes estudiantes de secundaria y universidad, en el trabajo de investigación y en la ciencia en general.

PROCEDIMIENTO: Las conferencias del día 26 de julio (a las que asistí), tuvieron lugar en el Salón Multimedia del edificio de Farmacia. Dio inicio a las 10:00 am con el tema “Filosofía de la ciencia”, impartido por el Dr. Jesús García; la segunda conferencia fue impartida por el Dr. Sergio Torres: “Educación superior en ciencias biológicas” y “Bioseguridad de agentes microbianos para el control biológico de plagas”, dado por la Dra. Conchita Toriello. La segunda y tercera conferencia en jornada vespertina, finalizando la actividad a las 18:00 horas.

RESULTADOS: Conocer los trabajos e investigaciones que han realizado profesionales guatemaltecos en el extranjero e obtener información sobre los temas citados.

LIMITACIONES: Ninguna

3.3.2.2 Actividad No. 2 Conferencia de Paleoecología. Impartida por Carlos E. Avendaño

OBJETIVO: Obtener información para un mejor conocimiento del tema.

Realizada en el mes de agosto de 2006.

RESULTADOS: Aprender acerca de la importancia de la paleoecología, sobre la importancia de la restauración para recuperación de ecosistemas; además sobre Palinología para reconstrucción de paisajes pasados y las fases que lleva este proceso.

LIMITACIONES: Ninguna

3.3.2.3 Actividad No. 3 **Conferencia: Guatemala: A center for Salamander Biodiversity.** Impartida por el Dr. David B. Wake de la Universidad de Berkely, California. OBJETIVO: Conocer el trabajo de investigación realizado en Guatemala acerca de la Biodiversidad de las salamandras. Realizada en el mes de agosto de 2006.

RESULTADOS: Conocer sobre las investigaciones que se realizan en nuestro país por investigadores extranjeros.

LIMITACIONES: Ninguna

3.3.2.4 Actividad No. 4 **Pláticas formativas**

PROCEDIMIENTO: Se llevaron a cabo pláticas sobre temas como autoestima, trabajo en grupo, etiqueta, etc. Las cuales fueron impartidas en el salón Multimedia del edificio de Farmacia, donde participamos las personas que apoyarán como edecanes en la Jornada Científica. Estas pláticas se realizaron en la semana del 10 de julio al 14 de julio del 2006.

RESULTADOS: Convivencia con los demás participantes y conocimiento de temas de importancia para desarrollo personal y colaboración en el congreso.

LIMITACIONES: Ninguna

3.3.2.5 Actividad No. 5 **Jornada Científica**

PROCEDIMIENTO: Asistencia a varias conferencias como “Helechos Arborescentes”, “Pez Blanco y Calidad Fisicoquímica del Agua”, “Biocombustibles”, etc. Al igual que el segundo día a las conferencias de murciélagos, hongos, etc. Esta actividad fue realizada los días 18 y 19 de septiembre de 2006.

RESULTADOS: Conocer sobre las investigaciones que se realizan en nuestra facultad.

LIMITACIONES: Ninguna

3.3.2.6 Actividad No. 6 **V Congreso del Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala**

PROCEDIMIENTO: Se realizaron conferencias sobre temas ambientales como “Indicadores Biológicos para la Determinación de la Calidad Ambiental”, “Manejo de Vida Silvestre”, “Pesquerías” y “Manejo Forestal”, las cuales fueron impartidas en el Hotel Tikal Futura los días 26, 27 y 28 de septiembre del 2006.

RESULTADOS: Conocer sobre las investigaciones realizan profesionales que han sido egresados de nuestra facultad.

LIMITACIONES: Ninguna

3.3.2.7 Actividad No. 7 **Taller ANACAFE**

PROCEDIMIENTO: En un salón del edificio de ANACAFE, se llevó a cabo una capacitación para el personal de la institución sobre la Responsabilidad Social Empresarial, el 13 de septiembre.

RESULTADOS: Se participò en un grupo de discusión y se presentó el tema asignado. Se aprendió acerca de la responsabilidad que las empresas deben tener cons sus empleados y con la sociedad.

LIMITACIONES: Ninguna

3.3.2.8 Actividad No. 8 **Festival Mundial de Aves**

OBJETIVO: Conocer a través de salidas de campo las diferentes especies de aves que se pueden encontrar en una región.

PROCEDIMIENTO: la actividad se realizó del 20 al 22 de octubre en Tecpán, Chimaltenango. En donde se llevaron a cabo salidas de campo a diferentes horas para obtener la mayor cantidad de información sobre las especies de aves que habitan en la región.

RESULTADOS: Aprender a reconocer algunas especies de aves y algunos cantos. También aprender a usar las guías para identificación de aves.

LIMITACIONES: Estuvo un poco nublado por las tardes.

3.4 INVESTIGACIÓN: Enraizamiento *in vitro* de plántulas de papaya *Carica papaya* var. *Hawaiiana Aloha Pride*.

3.4.1 Elaboración de medio de cultivo de los diferentes tratamientos

OBJETIVO: Preparación de Medio de cultivo Murashige & Skoog (MS), para desarrollo de las plántulas de papaya, adicionado con las diferentes concentraciones de AIB (1.25, 2.5, 5 y 10 μ M) del ensayo.

PROCEDIMIENTO: Se preparó medio MS (Murashige & Skoog) agregando cada una de las diferentes concentraciones de ácido indolbutírico a utilizar.

RESULTADOS: Preparación de medios de cultivo esterilizados para la inducción de enraizamiento de las plántulas de papaya.

3.4.2 Siembras de los diferentes tratamientos

OBJETIVO: Sembrar las plántulas en los diferentes tratamientos para evaluar la respuesta a la hormona de enraizamiento.

PROCEDIMIENTO: Los viales se colocaron en cuartos de crecimiento con temperatura media de 28°C y diferentes tiempos de incubación en oscuridad (0.5, 1 y 2 semanas) según los tratamientos para la inducción de raíz.

RESULTADOS: Se sembró un total de ciento veinte plántulas de papaya.

3.4.3 Evaluación de contaminación (reposición de frascos contaminados)

OBJETIVO: Verificar el buen desarrollo del material vegetal, y descartar los frascos contaminados.

PROCEDIMIENTO: Se hacen revisiones periódicas del material vegetal que están en incubación en los cuartos de crecimiento.

RESULTADOS: Obtención de lotes de los materiales vegetales libres de contaminantes.

3.4.4 Observación y medición de resultados

OBJETIVO: Evaluar la respuesta de la hormona para enraizamiento en plántulas de papaya.

PROCEDIMIENTO: Se sacaron las plántulas de los frascos y a las que presentaron raíz se les tomó medidas de número de raíces y longitud.

RESULTADOS: Se obtuvo aproximadamente un 5% de plántulas que presentaron raíz. Entre estas algunas deformes.

3.4.5 Transferencia a bandejas

OBJETIVO: Aclimatar las plántulas para el desarrollo de raíz.

PROCEDIMIENTO: Las plántulas se colocaron en bandejas que contenían una mezcla de suelo estéril y peatmoss en las mismas proporciones, luego se colocaron en el invernadero para la aclimatación.

RESULTADOS: Aproximadamente el 50% de las plántulas no sobrevivieron en la aclimatación. Algunas plántulas presentaron raíz (4).

4. RESUMEN DE INVESTIGACION

En este experimento se utilizaron plántulas de *Carica jpapaya* var. Hawaiiana Aloha Pride, obtenidas indistintamente de brotes axilares y apicales in vitro a través de organogénesis indirecta. Se utilizaron plántulas de un tamaño aproximado de 2.5 cm de altura con dos o tres hojas, que fueron cultivadas en medio Murashige & Skoog (MS) conteniendo diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB) bajo condiciones de oscuridad de 0.5 a 2 semanas, para evaluar el efecto de la auxina y diferentes tiempos de incubación en la inducción de raíz. Todas las plántulas fueron transferidas a medio libre de hormona por tres semanas, antes de ser transferidas a suelo estéril con peatmoss. El mejor resultado de porcentaje de enraizamiento (5.8%) fue sumamente bajo, obtenido con la concentración más alta de AIB (10 μ M) y el menor tiempo de incubación (0.5 semanas). En los demás no se obtuvieron resultados significativos.

Se concluyó que los tratamientos utilizados no fueron efectivos para los brotes utilizados en este experimento. Se recomienda utilizar plantas provenientes de brotes apicales y cambiar a medio de enraizamiento inmediatamente después de la multiplicación para que no sean afectadas por intoxicación con BAP. Finalmente, se recomienda evaluar de nuevo el tratamiento de enraizamiento in vitro.

5. ANEXOS

FOTOGRAFIAS



Foto 1. Plántula de papaya del tratamiento T1S4 que presenta raíces deformes al ser transferida a aclimatación.



Foto 2. Plántula de papaya del tratamiento T3S3 que presenta raíces bien formadas en medio libre de hormona.



Foto 3. Plántula de papaya del tratamiento T3S3 que presenta raíces bien formadas antes de ser transferida a aclimatación.



Foto 4. Plántula de papaya del tratamiento T1S3 que presenta raíces deformes antes de ser transferida a aclimatación.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
PROGRAMA EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD
SUBPROGRAMA EDC-BIOLOGIA

INFORME FINAL

**“Inducción a enraizamiento *in vitro* de plántulas de papaya *Carica papaya* var.
Hawaiana Aloha Pride”**

EVELYN XIOMARA AGVIK ESPAÑA
PROF SUPERVIROR: LIC. BILLY ALQUIJAY
SUPERVISOR UNIDAD DE PRACTICA: LICDA. ANA SILVIA MARTÍNEZ

VoBo ASESOR INSTITUCIONAL

ÍNDICE

1. Resumen	2
2. Introducción	3
3. Referente Teórico.....	4
3.1 El cultivo de papaya en Guatemala	4
3.2 Cultivo de Tejidos Vegetales	4
3.3 Micropropagación.....	5
3.4 Enraizamiento	5
3.5 Hormonas y Reguladores de Crecimiento	6
3.6 Auxinas	6
3.7 Efecto de las auxinas sobre las raíces y formación de raíces.....	7
4. Planteamiento del Problema.....	8
5. Justificación	9
6. Objetivos	10
7. Hipótesis	11
8. Materiales y Métodos	12
8.1 Universo de Trabajo	12
8.1.1 Investigadoras	12
8.1.2 Lugar de Trabajo	12
8.1.3 Material Vegetal	12
8.2 Procedimientos	12
8.2.1 Medios de Cultivo	12
8.2.2 Preparación de Medios de Cultivo modificados	12
8.2.3 Condiciones de Cultivo	12
8.2.4 Monitoreo del Experimento	12
8.2.5 Diseño de la Investigación	12
8.2.5.1 Población y Muestra	12
8.2.5.2 Tratamientos y Diseño del Experimento	12
8.2.5.3 Variables	13
8.2.5.4 Análisis de Resultados	13
8.2.6 Unidad Experimental	13
9. Resultados	14
10. Discusión de Resultados	20
11. Conclusiones	21
12. Recomendaciones	22
13. Referencias Bibliográficas	23
14. Anexos	25

INDUCCIÓN A ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE PLÁNTULAS DE PAPAYA *Carica Papaya* VAR. HAWAIANA ALOHA PRIDE

Evelyn X. Agvik España. eveagvik@yahoo.com
Analab. ANACAFE. Asesor: Ana Silvia Martínez

1. RESUMEN

En este experimento, realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de ANACAFE, se utilizaron plántulas de papaya *Carica papaya* var. Hawaiana Aloha Pride, obtenidas indistintamente de brotes axilares y apicales *in vitro* a través de organogénesis indirecta. Se utilizaron plántulas de un tamaño aproximado de 2.5 cm de altura con dos o tres hojas, que fueron cultivadas en medio Murashige & Skoog (MS) conteniendo diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB) bajo condiciones de oscuridad de 0.5 a 2 semanas, para evaluar el efecto de la auxina y diferentes tiempos de incubación en la inducción de raíz. Todas las plántulas fueron transferidas a medio libre de hormona por tres semanas, antes de ser transferidas a suelo estéril con peatmoss. El mejor resultado de porcentaje de enraizamiento (5.8%) fue sumamente bajo, obtenido con la concentración más alta de AIB (10 μ M) y el menor tiempo de incubación (0.5 semanas). En los demás no se obtuvieron resultados significativos.

Se concluyó que los tratamientos utilizados no fueron efectivos para los brotes utilizados en este experimento. Se recomienda utilizar plantas provenientes de brotes apicales y cambiar a medio de enraizamiento inmediatamente después de la multiplicación para que no sean afectadas por intoxicación con BAP. Finalmente, se recomienda evaluar de nuevo el tratamiento de enraizamiento *in vitro*.

2. INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es una de las más importantes cosechas de frutos tropicales con versátiles usos médicos e industriales. Ha sido propagada usualmente por semillas obteniendo una amplia variabilidad de características morfológicas y frutos de calidad. Para usos comerciales, los métodos de propagación sexual y vegetativa no son convenientes porque son más laboriosos y costosos, por lo tanto han sido desarrolladas alternativas para su micropropagación (Magdalita, 2003).

El cultivo de tejidos se fundamenta principalmente en la totipotencialidad celular. La micropropagación es la multiplicación masiva *in vitro*. En esta técnica se cultiva asépticamente una fracción de tejido u órgano (explante), el cual en estado de crecimiento se multiplica con la formación de callo o sin ella (Roca, 1991). En el caso de su aplicación en la regeneración de plántulas de papaya ha sido lograda por organogénesis indirecta y embriogénesis somática indirecta.

En investigaciones realizadas para la inducción de raíces de brotes de papaya *in vitro*, han sido utilizadas las auxinas AIB (ácido indolbutírico) y ANA, se ha demostrado que en términos de porcentaje y número de raíces el AIB ha sido superior a las demás auxinas (Drew 1992).

Debido a la alta utilidad y eficientes resultados que se han obtenido en investigaciones anteriores donde se utiliza AIB para enraizamiento de plántulas de papaya, el objetivo principal de este estudio, realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de ANACAFE, fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de este regulador bajo distintos tiempos de incubación en oscuridad para la inducción de raíz en plántulas de papaya. Los resultados que se obtuvieron en este ensayo son de gran importancia para aplicarlos en el estudio principal de AGROCYT-ANACAFE para obtener plantas enraizadas de papaya y posteriormente inocularlas con micorrizas.

3. REFERENTE TEÓRICO

3.1 El Cultivo de Papaya en Guatemala

La papaya (*Carica papaya*) es originaria de zonas tropicales de México y Centro América. Su alto valor nutritivo y propiedades medicinales son algunas de las características que han contribuido a incrementar su cultivo (OIRSA, 2002). A pesar de las ventajas que presenta el cultivo de papaya, en varios países no se ha logrado alcanzar el máximo potencial del cultivo. Debido a la alta incidencia de plagas y enfermedades, desconocimiento de prácticas adecuadas del cultivo, entre otras causas las plagas y enfermedades constituyen en el cultivo de papaya, uno de los principales temas a considerar si se desean obtener altas producciones. Las plagas que más pueden perjudicar al fruto son los nemátodos, la araña roja, la mosca de la fruta del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*) y la mosca *Toxotrypana curvicauda* (PROEXANT, 2006). El cultivo de papaya presenta además de los problemas de plagas y enfermedades, problemas de virosis como el virus de mosaico y Virus de la Mancha anular de papaya (VMAP) que limita las producciones en el campo. (Semillas del Caribe, 2006). La papaya es susceptible al virus del anillo de la papaya (PRV) (Roca, 1991).

En la Universidad del Valle de Guatemala (UVG), han aplicado las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* y de transformación genética para el mejoramiento de cultivares de papaya, con el objeto de desarrollar plantas que sean resistentes a virus y así obtener una variedad que se pueda comercializar (comunicación personal con Espinoza, M. 2006, UVG).

3.2 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales se define como el aislamiento y crecimiento de tejidos en un medio sintético y aséptico, bajo condiciones controladas. Consiste en preservar y lograr la proliferación de diversas porciones de la planta, en un medio nutritivo complementado con vitaminas, reguladores de crecimiento y fuentes de carbono. Algunas de las investigaciones efectuadas desde los inicios de cultivo de tejidos son los primeros cultivos exitosos de órganos y el descubrimiento de la importancia de las vitaminas y de las auxinas para el crecimiento de raíces; los reportes sobre crecimiento indefinido de callos en medios artificiales; los trabajos de organogénesis de Skoog; la descripción del fenómeno de embriogénesis en cultivos de zanahoria; la obtención de los primeros protoplastos; el cultivo de anteras para regenerar plantas haploides a partir de granos de polen y otros (Hernández, 1991).

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son los estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines; bioconversión y producción de compuestos útiles; obtención de plantas libres de patógenos; propagación de plantas; y conservación e intercambio de germoplasma (Hartmann, 1992).

El cultivo de tejidos tiene un enorme potencial para el mejoramiento de cosechas, por la facilidad relativa con que se pueden seleccionar características deseables. El establecimiento de los cultivos de tejidos dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee (Hernández, 1991).

Tipos de inóculo empleados:

1. Cultivo de células y tejidos: se establecen a partir de masas aisladas de células con una misma función.
2. Cultivo de órganos: los tallos, raíces y hojas segmentados y desinfectados se transfieren a medios en donde originarán conglomerados celulares indiferenciados (callos), embriones o embrioides somáticos (embriogénesis) o nuevos tallos, hojas y raíces (organogénesis).
3. Cultivo de embriones: los embriones se separan del tejido de protección circundante, y se les coloca en medios nutritivos adecuados para inducir su desarrollo (Hernández, 1991).

3.3 Micropropagación.

Es una multiplicación masiva *in vitro* en donde se obtiene una descendencia uniforme en condiciones de asepsia. En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas, ornamentales y más recientemente, en especies leñosas. En algunas especies, esta metodología ha demostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación.

Fases de la micropropagación según Roca, 1991:

- Establecimiento del cultivo aséptico
- Crecimiento y multiplicación del inóculo
- Enraizamiento de brotes y aclimatación

3.4 Enraizamiento

La inducción de raíces, así como también de tallos o embrioides empieza con la desdiferenciación de grupos de células de parénquima para producir centros de actividad meristemática (Hartmann, 1992). Según Torpe (1983), el proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. El medio de MS (Murashige y Skoog, 1962), por ejemplo, diluido al 50% ha dado resultados positivos en diferentes especies. Así mismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Roca, 1991).

Si el sistema radical es diferenciado *in vitro*, las plantas no se pueden trasplantar directamente a las condiciones de invernadero sin una paulatina adaptación a las condiciones del suelo. A este periodo de adaptación se le ha denominado período de endurecimiento. Durante esta fase de endurecimiento, las plantas se riegan preferentemente con medio de cultivo diluido al 50% y posteriormente se sustituye esta fórmula de riego por soluciones nutritivas menos complejas (Roca, 1991).

Se conoce un gran número de especies en las cuales se puede fomentar la proliferación aleatoria de callos en los explantes, mediante la adición de una o varias citocininas y auxinas al medio básico. En consecuencia, se puede inducir la formación de brotes y raíces ajustando la relación auxinas/citocininas exógenas (Roca, 1991).

3.5 Hormonas y reguladores de crecimiento en los cultivos *in vitro*

Las hormonas vegetales son compuestos orgánicos sintetizados en una parte de la planta y translocado a otra parte donde, en concentraciones muy bajas, produce una respuesta fisiológica. Ciertos compuestos sintetizados únicamente en laboratorio también pueden causar ciertas respuestas fisiológicas, estos se consideran reguladores de crecimiento porque no son sintetizados por las plantas (Salisbury, 2000). Las dos clases de hormonas más importantes son las auxinas y las citocininas las cuales controlan la formación de la raíz, del tallo y el callo (Hartmann, 1992). Las citocininas son compuestos de adenina sustituidos que promueven la división celular en los sistemas tisulares cultivados *in vitro*, tal como los cultivos de médula de tabaco, floema de zanahoria o tallos de soja (Salisbury, 2000). Las citocininas que más se emplean son: KIN, BAP, y ZEA (Hartmann, 1992).

Existen también giberelinas que son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis). El Acido giberélico GA3 fue la primera de esta clase de hormonas en ser descubierta (EFN.UNCOR, 1999).

El etileno, es un hidrocarburo muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Se sabe que el efecto del etileno sobre las plantas y secciones de las plantas varía ampliamente. Ha sido implicado en la maduración, abscisión, senectud, floración y otras respuestas; parece ser producido esencialmente por todas las partes vivas de las plantas superiores, y la tasa varía con el órgano y tejidos específicos y su estado de crecimiento y desarrollo. Se ha encontrado que las alteraciones en la tasa sintética de etileno están asociadas cercanamente al desarrollo de ciertas respuestas fisiológicas en plantas y sus secciones, por ejemplo, la maduración de frutas climatéricas y la senectud de flores. A diferencia de otras hormonas, el etileno se difunde fácilmente fuera de la planta porque es gaseoso. Esta emanación pasiva del etileno fuera de la planta parece ser la principal forma de eliminar la hormona (EFN.UNCOR, 1999).

3.6 Las auxinas

Grupo de hormonas vegetales que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal. Comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos. La auxina estimula la iniciación de raíces en tallos, pero puede inhibir o reducir el crecimiento subsecuente de las raíces (Roca, 1991).

Existen varias auxinas llamadas naturales, que incluyen el AIA, compuesto de mayor utilización. También se utiliza un buen número de sustancias que provocan un efecto fisiológico

similar y que se han producido sintéticamente, entre las cuales 2,4-D, el ANA y el AIB que se utilizan comúnmente (Roca, 1991).

El ácido indolacético, AIA, la auxina más común, se suele formar cerca de los brotes nuevos, en la parte superior de la planta, y fluye hacia abajo para estimular el alargamiento de las hojas recién formadas. Los científicos han obtenido compuestos químicos, llamados estimulantes del crecimiento, basados en las auxinas naturales. Estas sustancias sintéticas, que se aplican en forma de aerosol o de polvo, se usan para frenar el brote de los ojos o yemas de las patatas almacenadas, para destruir las malas hierbas de hoja ancha y para evitar la caída prematura de frutos y pétalos de flores. Las sustancias de crecimiento se usan también para obtener frutos sin semillas, como tomates, higos y sandías, y para estimular el crecimiento de las raíces en los esquejes (Microsoft Encarta, 2003).

El AIB se utiliza para causar la formación de raíces aún más a menudo que el ANA o cualquier otra auxina. El AIB es activo pese a que se metaboliza con rapidez a AIB -aspartato y al menos otro compuesto conjugado con un péptido. Se ha sugerido que la formación de conjugado almacena al AIB y que su liberación gradual mantiene niveles adecuados de concentración de AIB, especialmente en las etapas finales de la formación de la raíz. El AIB, en un principio se pensó que era sólo una auxina sintética activa, pero está presente naturalmente en hojas de maíz y en varias dicotiledóneas (Salisbury, 2000).

3.7 Efectos de las auxinas sobre las raíces y la formación de raíces

Como se demostró por primera vez en la década de los treinta, la administración de auxinas promueve la elongación de secciones escindidas de raíces e incluso de raíces intactas de muchas especies, pero sólo en concentraciones extremadamente bajas. Con concentraciones mayores, casi siempre se inhibe la elongación. La suposición es que las células de la raíz suelen contener auxina suficiente o casi suficiente para la elongación normal. Se cree que parte de esta inhibición se debe al etileno, ya que todos los tipos de auxinas estimulan la producción de etileno en muchas clases de células vegetales, especialmente cuando se añaden cantidades de auxina relativamente grandes. Evidencias indican que las auxinas de los tallos influyen de forma acusada en la iniciación de la raíz y estimulan el desarrollo de raíces secundarias en los tallos. En 1935, Went y Kenneth V. Thimann demostraron que el AIA estimula la iniciación de las raíces a partir de cortes de tallo. La auxina sintética ANA suele ser más eficaz que el AIA (Salisbury, 2000).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El material vegetal que se utilizó para este estudio consiste en brotes de papaya producidos *in vitro* por organogénesis indirecta (a partir de callo), con ayuda del regulador del crecimiento BAP. Sin embargo, estos brotes no desarrollaron sistema radicular debido a que para su multiplicación y para eliminar el callo remanente, se debe cortar la base. Los brotes fueron transferidos sucesivamente a medios de cultivo libres de BAP para reducir el efecto acumulativo de esta hormona en las plántulas y para permitir que las concentraciones del ácido indolbutírico (AIB) del ensayo tengan efecto para la inducción de enraizamiento.

Para fines del estudio principal de AGROCYT-ANACAFE, los brotes de papaya debían estar enraizados para poder proceder a la inoculación *ex vitro* de micorrizas arbusculares. Por lo tanto, por medio de este estudio se evaluó el efecto del AIB para la inducción de raíz en las plántulas de papaya o (los brotes).

5. JUSTIFICACION

Este estudio es importante ya que es un estudio piloto que servirá para evaluar el procedimiento para el enraizamiento de brotes de papaya *in vitro*. Los brotes de papaya deben desarrollar un sistema radicular antes de ser aclimatados para proceder a su inoculación con micorrizas arbusculares lo cual es el objetivo del proyecto de investigación principal de AGROCYT-ANACAFE. Para evaluar el procedimiento de enraizamiento *in vitro*, se evaluará el efecto del AIB y tiempos de incubación en oscuridad para la inducción de raíz en los brotes de papaya. Según los resultados, observaciones y recomendaciones de este estudio, se procederá a aplicar el procedimiento en el estudio principal de AGROCYT-ANACAFE.

6. OBJETIVOS

General

- Establecer una metodología de enraizamiento *in vitro* en una muestra de brotes de papaya de *Carica papaya* var. Hawaiana Aloha Pride, para su posterior utilización en toda la población de brotes de papaya del proyecto AGROCYT-ANACAFE.

Específicos

- Evaluar el efecto de cuatro concentraciones de ácido indolbutírico (AIB) para la inducción de raíz en brotes de papaya *Carica papaya* var. Hawaiana Aloha Pride
- Evaluar tres tiempos de incubación para la inducción de raíz en brotes de papaya *Carica papaya* var. Hawaiana Aloha Pride

7. HIPOTESIS

El uso de diferentes concentraciones de auxina en medios de cultivo *in vitro* en combinación con diferentes tiempos de incubación en oscuridad, inducirá al desarrollo de raíces en brotes de papaya.

8. MATERIALES Y METODOS

8.1 Universo de Trabajo

8.1.1 Investigadoras

Evelyn Xiomara Agvik España
Licda. Ana Silvia Martínez

8.1.2 Lugar de Trabajo

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de ANACAFE

8.1.3 Material Vegetal

Los brotes de papaya *Carica papaya* var. Hawaiana Aloha Pride desarrollados *in vitro* en el medio basal de Murashige & Skoog mantenidas en cultivo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de ANACAFE bajo condiciones ambientales controladas.

8.2 Procedimientos

8.2.1 Medios de Cultivo

Preparación de Medio de cultivo Murashige & Skoog (MS), (ver Anexo 2) para desarrollo de las plántulas de papaya.

8.2.2 Preparación de Medios de Cultivo Modificados

Medio Murashige & Skoog (MS) adicionado con las diferentes concentraciones de AIB (1.25, 2.5, 5 y 10 μ M) del ensayo.

8.2.3 Condiciones de Cultivo

Los viales se colocaron en cuartos de crecimiento con temperatura media de 28°C y diferentes tiempos de incubación en oscuridad (0.5, 1 y 2 semanas) según los tratamientos para la inducción de raíz.

8.2.4 Monitoreo del experimento

Los cultivos fueron observados durante todo el tiempo de cultivo para control de contaminación. Después de dos semanas todos los tratamientos se transfirieron a medio libre de hormona por tres semanas bajo condiciones de luz para desarrollo de raíz. Al final de las tres semanas se tomaron los datos de medición de variables.

8.2.5 Diseño de la Investigación

8.2.5.1 Población y Muestra

Población: brotes de papaya desarrollados *in vitro*.
Muestra: Ciento veinte brotes de papaya.

8.2.5.2 Tratamientos y Diseño del Experimento

Cuatro concentraciones de AIB: 1.25, 2.5, 5 y 10 μ M en tres tiempos de incubación en oscuridad: 0.5, 1 y 2 semanas. Diseño factorial 4x3 con ocho réplicas.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados con las diferentes concentraciones de AIB y tiempos de incubación.

Tratamiento	[AIB] <i>μ</i>M	Tiempo de incubación
1	1.25	0.5
2	1.25	1
3	1.25	2
4	2.5	0.5
5	2.5	1
6	2.5	2
7	5	0.5
8	5	1
9	5	2
10	10	0.5
11	10	1
12	10	2

Nota: en cada tratamiento se incluyeron dos viales sin adición de regulador como controles.

8.2.5.3 Variables

Dependientes: Longitud de raíz, número de raíces y número de plantas con raíz.

Independientes: Tratamientos a evaluar.

8.2.5.4 Análisis de Resultados

De haberse obtenido resultados favorables se hubiera aplicado un Análisis de Varianza y una prueba post-ANDEVA de prueba múltiple de medias de Tukey para determinar estadísticamente cuál tratamiento induce la mayor cantidad de raíces.

8.2.6 Unidad Experimental

Cada tubo de ensayo (vial) que contenía una plántula de papaya.

9. RESULTADOS

Como se observa en la Tabla 1, los resultados que se obtuvieron no fueron significativos para los tratamientos del experimento de enraizamiento *in vitro*. Únicamente un individuo del tratamiento 10, T1S4 (0.5 semanas y 10 μ M AIB) presentó raíz desde el inicio hasta el final del experimento, y después de 3.5 semanas 2 brotes más de este tratamiento presentaron raíz. Este tratamiento fue donde se obtuvo mejores resultados en cuanto a presencia, número y longitud de raíces.

Tabla No. 1 Efecto de las diferentes concentraciones de AIB y diferentes tiempos de incubación para inducción de raíz en plántulas de papaya

Tratamientos		No. de brotes con raíz	No. raíces por brotes	Longitud promedio de raíz (mm)
1	T1/S1	0	0	0
2	T2/S1	0	0	0
3	T3/S1	0	0	0
4	T1/S2	0	0	0
5	T2/S2	0	0	0
6	T3/S2	0	0	0
7	T1/S3	0	0	0
8	T2/S3	0	0	0
9	T3/S3	2	4	16.5
10	T1/S4	1	2	32
11	T2/S4	0	0	0
12	T3/S4	0	0	0

T1: Tiempo 1, 0.5 semanas. S1: Siembra 1, concentración 1.25 μ M
T2: Tiempo 2, 1 semanas. S 2: Siembra 2, concentración 2.5 μ M
T3: Tiempo 3, 1.5 semanas S3: Siembra 3, concentración 5 μ M
T4: Tiempo 4, 2 semanas S4: Siembra 4, concentración 10 μ M

Al transferir los brotes de cada tratamiento con regulador a medio libre de regulador, se observó que los tratamientos 9, T3S3 (1.5 semanas y 5 μ M AIB), y 10, T1S4 (0.5 semanas y 10 μ M AIB) presentaron raíz. En el primero, las raíces eran deformes y en el segundo estaban bien formadas. (Fotos 1, 2 y 3, páginas 28-29).

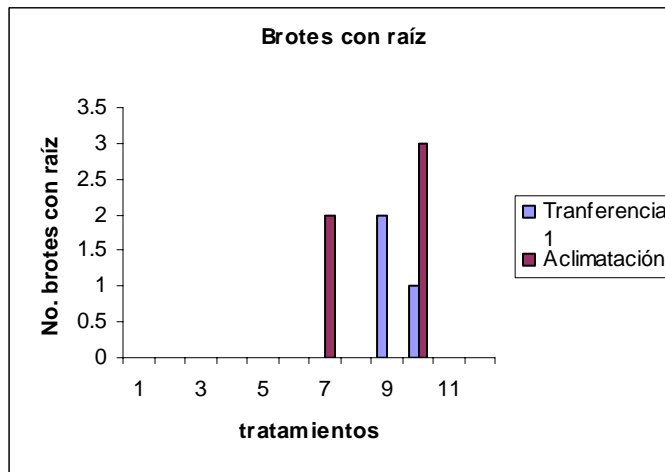


Figura 1. Efecto de las concentraciones de AIB y tiempos de incubación para inducción de raíz en plántulas de papaya, transferidas a medio libre de hormona (transferencia 1) y después de tres semanas (aclimatación).

El número total de brotes que presentaron raíz fue tres: los tratamientos 7, T1S3 (0.5 semanas y 5.0 μM) con dos brotes con raíz, el tratamiento 9, T3S3 (1.5 semanas y 5 μM AIB) con dos brotes con raíz, y el tratamiento 10, T1S4 (0.5 semanas y 10 μM AIB) con tres brotes con raíz (ver Tabla 1).

Comparando las tablas 1 y 2, se puede observar una variación de los resultados al final de tres semanas de cultivo en medio libre de regulador. El tratamiento 10, T1S4 (0.5 semanas y 10 μM AIB) presentó dos brotes más con raíz a las 3.5 semanas, además desarrolló 5 raíces más y la longitud promedio de las raíces incrementó a 20.4 mm. El tratamiento 9 únicamente presentó crecimiento de las raíces de 16.5 a 21 mm de longitud, y el tratamiento 7, T1S3 (0.5 semanas y 5.0 μM) presentó 2 brotes con raíz y 4 raíces nuevas con una longitud promedio de 23.5 mm. Este tratamiento presentó raíces deformes (ver foto 4, página 28). Asimismo, en este tratamiento se procedió a no cortar la base a la mitad de los brotes incluyendo un brote que presentaba raíz, para saber si el corte de la base influía en el desarrollo de la raíz. Sin embargo, al revisarlas nuevamente (un mes después) ninguna de ellas presentaba raíz (ver figuras 1, 2 y 3).

Tabla No. 2. Efecto de las diferentes concentraciones de AIB para inducción de raíz en plántulas de papaya después de tres semanas en medio libre de hormona

Tratamientos		No. de brotes con raíz	No. raíces por brote	Longitud promedio de raíz (mm)
1	T1/S1	0	0	0
2	T2/S1	0	0	0
3	T3/S1	0	0	0
4	T1/S2	0	0	0
5	T2/S2	0	0	0
6	T3/S2	0	0	0
7	T1/S3	2	4	23.5
8	T2/S3	0	0	0
9	T3/S3	2	4	21
10	T1/S4	3	7	20.4
11	T2/S4	0	0	0
12	T3/S4	0	0	0

(T/S)= (Tiempo de incubación/Concentración)

T1= 0.5 semanas S1= 1.25 μ M

T2= 1 semana S2= 2.5 μ M

T3= 2 semanas S3= 5.0 μ M

S4= 10.0 μ M

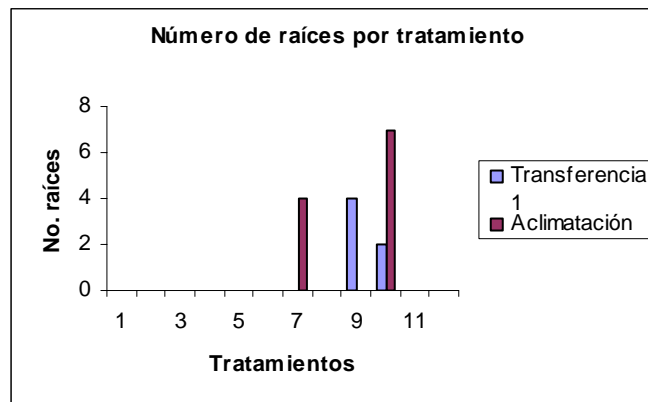


Figura 2. Número promedio de raíces por tratamiento, en plántulas de papaya transferidas a medio libre de hormona (transferencia 1) y después de tres semanas (aclimatación).

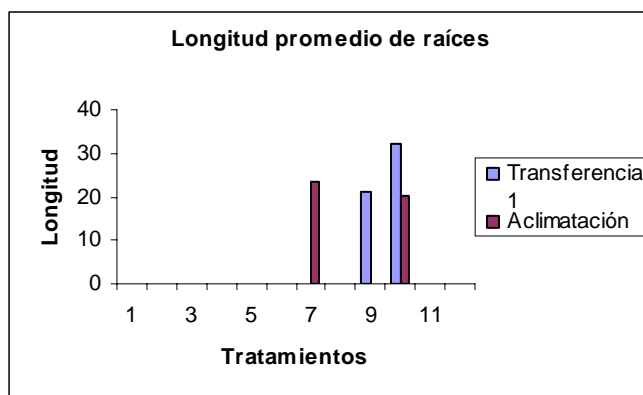


Figura 3. Longitud promedio de raíces por tratamiento, en plántulas de papaya transferidas a medio libre de hormona (transferencia 1) y después de tres semanas (aclimatación).

Como se observa en la figura 4, al ser transferidas las plántulas de papaya a aclimatación se observó un bajo porcentaje (45%) de sobrevivencia. En la primera observación, a los 20 días de aclimatación del primer tratamiento T1S1, los tratamientos 3 T3S1 (1.5 semanas y 1.25 μM), el tratamiento 7, T1S3 (0.5 semanas y 5.0 μM) y 11, T2S4 (1 semana y 10 μM) fueron los mejores con 10 plantas (número inicial) sobrevivientes cada uno. En la segunda observación un mes después de aclimatación para cada uno de los tratamientos, los que presentaron mayor número de plantas sobrevivientes fueron de nuevo el 3 T3S1 (1.5 semanas y 1.25 μM), el tratamiento 7, T1S3 (0.5 semanas y 5.0 μM), así como también el tratamiento 5, T2S2 (1 semana y 2.5 μM) con 9, 9 y 7 respectivamente (ver Tabla No. 3).

Tabla No. 3 Número de plántulas vivas 20 días después de ser transferidas a aclimatación (primera observación) y después de un mes de la transferencia (segunda observación).

	Tratamientos	1a. Observ.	2a. Observ
1	T1/S1	5	5
2	T2/S1	7	6
3	T3/S1	10	9
4	T1/S2	6	6
5	T2/S2	9	7
6	T3/S2	9	4
7	T1/S3	10	9
8	T2/S3	8	3
9	T3/S3	9	4
10	T1/S4	8	6
11	T2/S4	10	4
12	T3/S4	7	5

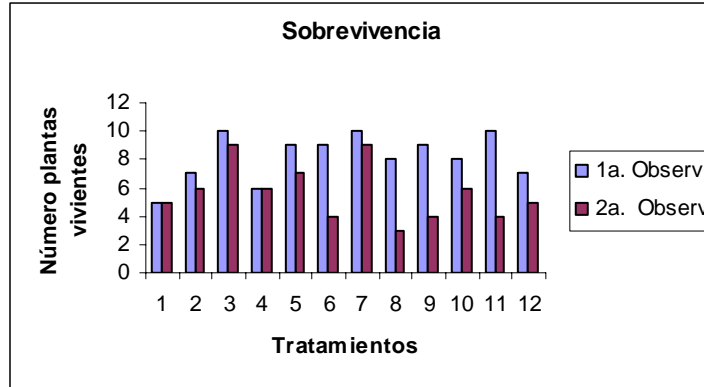
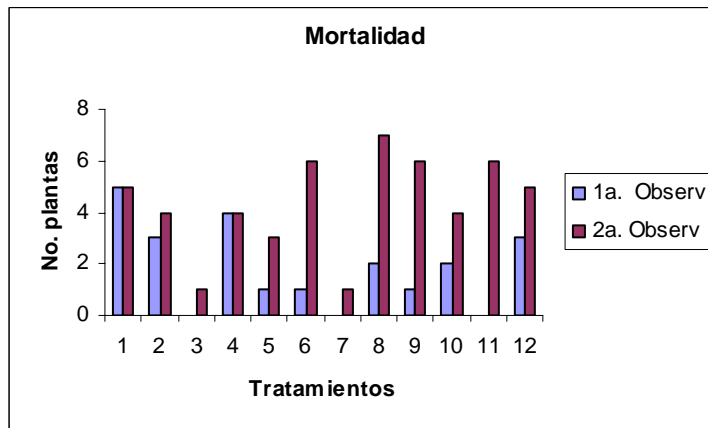


Figura 4. Número de plántulas vivas 20 días después de ser transferidas a aclimatación (primera observación) y después de un mes de la transferencia (segunda observación).

Tabla No. 4 Mortalidad.

	Tratamiento	1a. Observ	2a. Observ
1	T1/S1	5	5
2	T2/S1	3	4
3	T3/S1	0	1
4	T1/S2	4	4
5	T2/S2	1	3
6	T3/S2	1	6
7	T1/S3	0	1
8	T2/S3	2	7
9	T3/S3	1	6
10	T1/S4	2	4
11	T2/S4	0	6
12	T3/S4	3	5

Figura 5. Mortalidad



El tratamiento 10 T1S4 con un total de seis plantas sobrevivientes, únicamente presentó una planta con raíces (3), las cuales eran pequeñas y delgadas.

Los tratamientos evaluados en el experimento fueron comparados con otra muestra de los mismos brotes de papaya tratados con medio de enraizamiento MS modificado (10 mg·L⁻¹ de AIB y 0.012 mg de Riboflavina) en otro experimento llevado a cabo en el laboratorio. Después de un mes en cultivo, las plántulas tratadas con este medio tampoco presentaron enraizamiento *in vitro*.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El bajo porcentaje de individuos que presentaron raíz en todo el experimento (5.8%), debió ser afectado por factores como toxicidad con BAP y el origen de los brotes que se utilizaron para el experimento. Para la multiplicación de los brotes de papaya del experimento, se hicieron varios ciclos de multiplicación con BAP y los brotes obtenidos y multiplicados eran tanto apicales como axilares. DeFossard (1977, en Drew *et al* 1992), indica que muchas especies son difíciles de enraizar después de repetidos subcultivos en medios con citoquinina, y la forma apical dominante puede ser difícil de lograr. Drew y sus colaboradores (1992) enfatizan en su trabajo que los mejores resultados de enraizamiento (>90%) los obtuvieron usando únicamente brotes apicales dominantes y con un solo ciclo de multiplicación con la concentración más baja de BAP (0.5 μ M), pasando luego los brotes a medio de enraizamiento (MS adicionado con 10 μ M AIB) solamente por 3 días.

El tratamiento 10, T1S4 (0.5 semanas y 10 μ M AIB) donde se obtuvo mejores resultados de enraizamiento *in vitro* (30%), difiere de los resultados obtenidos por Yu y sus colaboradores (2000), quienes obtuvieron los mejores resultados (74.4%) con 2.5 μ M de AIB y 1 semana de cultivo en oscuridad. En este trabajo no se menciona acerca de los efectos de citoquininas en el ciclo de multiplicación de los brotes o el tipo de brotes usados. Bhattacharya *et al* (2003/4) obtuvieron los mejores resultados en medio con 14.7 μ M de AIB y tampoco mencionan acerca de los efectos de las citoquininas o del tipo de brotes. No obstante, Yu *et al* (2000), demostraron en su estudio que la iniciación y desarrollo de raíz es mejor con una baja concentración de AIB. Adicionalmente, Drew *et al* (1992) señalan que una exposición prolongada a AIB puede ser inhibitoria y que tres días de exposición a AIB ha mostrado ser el tiempo óptimo para enraizamiento de papaya.

El bajo porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de papaya durante la aclimatación (45%), se atribuye directamente al hecho de que éstas no desarrollaron sistema radicular para soporte de la planta en si absorción de nutrientes. A pesar de que las plántulas sobrevivientes no habían desarrollados raíces, la humedad relativa del ambiente y la fertilización foliar fue suficiente para que se mantuvieran vivas.

Yu y sus colaboradores (2000), determinaron el efecto del desarrollo de raíces en sistemas aireados y no aireados con diferentes tipos de medios después de la exposición con AIB en diferentes tiempos de incubación en oscuridad. El sistema aireado en vermiculita con la mitad de concentración de medio MS durante 3 semanas resultó en el mejor porcentaje de enraizamiento (94.4%) también con el mayor número de raíces y longitudes. Sin embargo, estas raíces eran fácilmente dañadas y tendían a declinar durante la aclimatación, por lo que las raíces obtenidas en el mismo sistema durante 2 semanas fueron sustancialmente mejores durante la aclimatación. Bhattacharya *et al* (2003/4) transfirieron los brotes enraizados a macetas para su aclimatación y cerca de un 76% de ellas sobrevivieron bajo condiciones de invernadero.

11. CONCLUSIONES

- Los tratamientos con AIB y tiempos de incubación en oscuridad, no fueron efectivos para enraizamiento *in vitro* de los brotes utilizados en este experimento.
- Para los brotes de papaya utilizados, los mejores tratamientos para enraizamiento *in vitro* fueron con las mas altas concentraciones de AIB (5 y 10 μm) con tiempos cortos de incubación (0.5 semanas), a excepción del T3S3 con 1.5 semanas.
- El origen de los brotes que se utilizaron y la toxicidad con BAP influyeron en el bajo porcentaje (5.8%) de enraizamiento *in vitro* de papaya desarrolladas en el laboratorio.

12. RECOMENDACIONES

- Utilizar plantas provenientes de brotes apicales y cambiar a medio de enraizamiento inmediatamente después de la multiplicación para que no sean afectadas por intoxicación con BAP.
- Utilizar concentraciones altas de AIB y tiempos cortos de incubación para obtener mejores resultados en la iniciación y desarrollo de raíz de brotes de papaya.
- Desarrollar más ensayos para enraizamiento de brotes de papaya utilizando diferentes tratamientos con reguladores del crecimiento y conociendo el origen de los brotes.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Alquijay, B. & Enríquez, E. 2006. Guía para elaborar el informe final de investigación; Práctica Experiencias Docentes con la Comunidad – EDC. Carrera Biología. Universidad de San Carlos de Guatemala. 5 pp.
- (2) Ashmore, S. 1997. Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Rome, Italy.
- (3) Bhattacharya, J., *et al.* 2003. Multiple shoot regeneration from immature embryo explants of papaya. *Biologia Plantarum* 47(3):327-331, 2003/4.
- (4) Consultas realizadas, personal laboral del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Analab.
- (5) Drew, R. 1992. Improved Techniques for in Vitro Propagation and Germplasm Storage of Papaya. *Hort Science* 27(10):1122-1124.
- (6) EFN.UNCOR. 1999. Hormonas de las Plantas. Acceso mayo 2007. disponible en <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm>
- (7) Enciclopedia Microsoft Encarta 2003.
- (8) Hernández, J., *et al.* 1991. El Cultivo de Tejidos Vegetales (Audiovisual). Facultad de Ciencias, Depto. De Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 25 pp.
- (9) Hartmann, H. & D, Kester. 1992. Propagación de Plantas: Principios y Prácticas. 2d. ed. Prentice Hall, Inc. México. 760 pp.
- (10) Lai *et al.* 2000. Papaya axillary shoots enhanced by ethylene. *Bot. Bull. Acad. Sin.* (2000) 41: 203-212. Acceso julio 2006. Disponible en <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2000/3/bot13-05.html>
- (11) Magdalita, P.M. & S.W. Adkins. 2003. Growth of papaya nodal and rooted shoot cultures as affected by ACC, STS, culture vessel size and incubation conditions. *The Philippine Agricultural Scientist*. Vol. 86 No. 1,6-12
- (12) Mauseth, J. 1998. Botany, an Introduction to Plant Biology. 2d. ed. Jones and Barthlett Publishers Inc. U.S.A.
- (13) Medina, M. 2005. Organismos Vegetales. Fundamentos de la Organografía Vegetal. Acceso agosto 2006. Disponible en http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/FMBvirtual/Micropropana/Micvegetal.htmN.
- (14) Mogollón, J.G. Días & N. Hernández. 2004. Multiplicación clonal y Enraizamiento in vitro de *Ananas comosus* L. “Queen Australia”. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 2004,21 Supl 1:15-21. Acceso agosto 2006. Disponible en http://www.revfacagronluz.org.ve/indsupl_2004.htm
- (15) OIRSA. 2006. Manual Técnico de Buenas Prácticas Agrícolas en Papaya, 2006. Acceso agosto 2006. Disponible en <http://ns1.oirsa.org.sv/Publicaciones/VIFINEX/Manuales/Manuales-2002/El-Salvador/BPA-EN PAPAYA.pdf#search=%22cultivo%20de%20papaya%20en%20Guatemala%22>
- (16) Pinzón, A. 2006. Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cuatro selecciones colombianas de *Carica papaya* L. Acceso agosto 2006. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/ciencias/universitas/vol8n1/MERITOR.htm>
- (17) PROEXANT. 2006. El Cultivo de Papaya. Acceso julio 2006. Disponible en <http://www.proexant.org.ec/Manual%20de%20papaya.htm> y

http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/papaya.htm#4.%20PRÁCTICAS%20CULTURALES

- (18) Raven, P. *et al.* 1999. Biology of Plants. 6th ed. W.H. Freeman and Co. New York U.S.A.
- (19) Roca, W. & M. Luis. 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- (20) Salisbury, F. 2000. Fisiología de las Plantas 3: Desarrollo de las Plantas y Fisiología Ambiental. International Thomson Editores. Madrid, España.
- (21) Scheffer, E. 2006. Auxinas y sus efectos sobre el enraizamiento. Universidad Nacional Agraria La Molina. Acceso agosto 2006. Disponible en <http://www.lamolina.edu.pe/agronomia/horticultura/propagacion/fitohormonas/esheffer.doc>
- (22) Stern, K. 2000. Introductory Plant Biology. 8th. Ed. McGraw-Hill, U.S.A.
- (23) Semillas del Caribe. 2006. Tecnología, Control de Plagas y Enfermedades. Acceso julio 2006. Disponible en <http://www.semilladelcaribe.com.mx/paginas/5-5.htm>
- (24) Yu, T. A. *et al.* 2000. Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 61:29-35.

14. ANEXOS

ANEXO 1. FOTOGRAFÍAS



Foto 1. Plántula de papaya del tratamiento T1S4 que presenta raíces deformes al ser transferida a aclimatación.



Foto 2. Plántula de papaya del tratamiento T3S3 que presenta raíces bien formadas en medio libre de hormona.



Foto 3. Plántula de papaya del tratamiento T3S3 que presenta raíces bien formadas antes de ser transferida a aclimatación.



Foto 4. Plántula de papaya del tratamiento T1S3 que presenta raíces deformes antes de ser transferida a aclimatación.

ANEXO 2.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO MS (Murashige & Skoog)

Para desarrollo de plantas sin hormonas, se usa en banano, plátano, papaya, piña, orquídeas y otros.

COMPONENTE S	CONCENTRACION N	PARA 500 ml	PARA 1000 ml	PARA 2000 ml
Macroelementos	20X	25 ml	50 ml	100 ml
Microelementos	100X	5 ml	10 ml	20 ml
Hierro-EDTA	200X	2.5 ml	5 ml	10 ml
Vitaminas MS	500X	1 ml	2 ml	4 ml
Sucrosa	30%	15 g	30 g	60 g
Phytigel	2.5%	1.25 g	2.5 g	5 g
pH		5.6	5.6	5.6

- En un balón aforado se colocan la sacarosa, macro y microelementos y vitaminas, se afora con agua destilada.
- Se introduce un magneto para que se disuelva y se mezcle.
- Se lleva a pH de 5.6 y se agrega phytigel;
- Se calienta en horno de microondas por 30 minutos en punto de ebullición para disolver el gelificante.
- La solución caliente se vierte con una pipeta en los frascos para cultivo y se tapan.
- Las bandejas con los frascos se llevan a la autoclave por 20 minutos para esterilizar a 250° F y 15 lb/in³.

ANEXO 3. EQUIPO

- 1 Cámara de Flujo Laminar
- 1 Bandeja de Vidrio
- 1 Bisturí
- 1 Caja de Petri
- 2 frascos de Vidrio
- 1 Mechero Bunsen
- 1 Manguera de Gas
- 1 Cilindro de Gas
- 100 Hojas de papel reciclado
- 1 Balón aforado de 2000 ml
- 1 Embudo de Vidrio
- 5 Recipientes plásticos de 50 ml
- 1 Pipeta
- 120 Frascos de Vidrio
- 1 Pesa
- 1 Medidor de pH
- 1 Microondas
- 1 Autoclave
- 1 Estantería de metal
- 1 Regla
- 1 Libreta de campo
- 120 Boletas de registro
- 6 Lápices
- 1 Marcador indeleble
- 1 Computadora
- Tinta para impresora
- 100 Hojas de papel bond
- 1 Cámara digital