

Enraizamiento y aclimatización de plantas transgénicas de papaya var. Maradol roja

Maylin Cruz^{1*}, Ana L. Darías², Dariel Cabrera³, Amado Pérez⁴, Mileidy Cruz-Martín⁴, Tatiana Pichardo⁴, Rafael G. Kosky⁴, Orelvis Portal⁴ * Autor para correspondencia

¹Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carretera a Maleza km 2.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
e.mail: lpsvvc@enet.cu

²Centro de Análisis y Procesos (CAP). Facultad de Química-Farmacía, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

³Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

⁴Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

RESUMEN

La enfermedad causada por el *Virus de la mancha anular de la papaya* es la más importante del cultivo de la papaya en el mundo. El empleo de las técnicas biotecnológicas, como herramienta auxiliar, ha contribuido al mejoramiento genético en este cultivo, aunque tiene dificultades durante las fases de enraizamiento y aclimatización. Tomando como base estas problemáticas se desarrolló el presente trabajo con el objetivo de lograr el enraizamiento y aclimatización de líneas transformadas de papaya. Se determinó la influencia de dos medios de cultivo con diferentes concentraciones de ácido indol-3-butírico (AIB) sobre el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de plantas de papaya transformadas. Además, se valoró la influencia de la aplicación del biopreparado de *Trichoderma harzianum* en su aclimatización. Se logró el enraizamiento *in vitro* de plantas de papaya transgénicas al utilizar 2 mg.l⁻¹ de ácido indol-3-butírico en el medio de cultivo, así como el enraizamiento *ex vitro* con altos porcentajes de supervivencia. Se demostró la factibilidad de la aplicación del biopreparado de *T. harzianum* al sustrato, previo a la plantación, por su efecto estimulante.

Palabras clave: *Carica papaya*, *ex vitro*, *in vitro*, *Trichoderma harzianum*

ABSTRACT

The disease caused by *Papaya ringspot virus* is the most important in papaya worldwide. The use of biotechnological techniques, as auxiliary tools, has facilitated the genetic improvement in papaya. Nevertheless, this species has a lot of constraints, mainly during rooting and acclimatization phases. For that reason we developed the present work. The *in vitro* and *ex vitro* rooting was evaluated. Culture media with different concentrations of indol-3-butiric acid hormone were used in the *in vitro* rooting. The influence of *Trichoderma harzianum* bioproduct in the acclimatization of plants was also studied. The *in vitro* rooting of transgenic plants was achieved by applying 2 mg.l⁻¹ of indol-3-butiric acid in the culture medium. The *ex vitro* rooting with high percentages of plants survival was also obtained. The applications of *T. harzianum* bioproduct on the substrate, previous to the plantation, demonstrated its stimulating effect.

Key words: *Carica papaya*, *ex vitro*, *in vitro*, *Trichoderma harzianum*

INTRODUCCION

El cultivo de la papaya (*Carica papaya*) está cobrando una mayor importancia económica a nivel mundial debido a que se puede consumir como fruta fresca o procesarse para obtener otros productos como dulces, jaleas, licuados y encurtidos, además, por su alto contenido de nutrientes. También posee un gran potencial de industrialización en el área farmacéutica, culinaria, médica, industria cervecera y bebidas no alcohólicas (Acuña, 2005).

El *Virus de la mancha anular de la papaya* (PRSV) es el causante de la enfermedad más importante del

cultivo de la papaya en el mundo. Es un obstáculo para la producción de papaya de calidad exportable en las regiones productoras del mundo.

Se han desarrollado muchas estrategias de manejo, tanto del vector trasmisor de la enfermedad como del virus, que han resultado ineficientes. El manejo de la enfermedad con labores agrotécnicas de diversa índole no han logrado disminuir sus efectos. La obtención de plantas con resistencia al PRSV en papaya también ha sido un tema ampliamente trabajado. Sin embargo, la resistencia natural encontrada en especies silvestres de *Carica* no ha podido ser utilizada para cruzamientos con las

variedades comerciales por su incompatibilidad. Igualmente, la protección cruzada con aislados atenuados tampoco ha sido viable por los elevados niveles de divergencia del virus en diferentes regiones geográficas (Thomas y Dodman, 1993; Tennant *et al.*, 1994; Gonsalves, 1998; Rezende y Pacheco, 1998; Chen *et al.*, 2001).

La creación de resistencia artificial ha rendido importantes resultados, lo cual ha contribuido significativamente a las expectativas de éxito en la lucha contra las virosis en papaya. Una de las principales estrategias seguidas para lograr resistencia al PRSV en el cultivo de la papaya han sido las que emplean la resistencia derivada del patógeno (Sanford y Johnston, 1985) mediante la introducción en el hospedero del gen de la proteína de la cápsida en sus diferentes variantes (Gonsalves, 1998; Tripathi *et al.*, 2008). Para este fin ha sido necesario el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos. Según Drew y Manshardt (1997) la multiplicación *in vitro* de la papaya solo se justifica económicamente si la misma se realiza para un genotipo híbrido. Uno de los grandes problemas que tiene esta metodología a nivel internacional es el alto nivel de contaminación *in vitro* cuando se emplean como explantes iniciales ápices o meristemas de plantas adultas cultivadas en campo (Brar y Khush, 1994; Wilson, 1996), además de las numerosas pérdidas de material vegetal que se producen en las fases de enraizamiento y aclimatización (Lucas, 2007). Posada *et al.* (2004) lograron establecer *in vitro* ápices de un híbrido de papaya (IBP-4299) y Gallardo *et al.* (2002) estudiaron las fases de multiplicación, enraizamiento y aclimatización para este material vegetal y propusieron una metodología para su micropropagación. Desde hace más de una década en el Instituto de Biotecnología de las Plantas se viene trabajando en la obtención de líneas transgénicas de papaya con resistencia al PRSV. Partiendo de estas experiencias y la necesidad de estudiar el desarrollo de estas fases en plantas transgénicas de papaya se desarrolló este trabajo que tuvo como objetivo: lograr su enraizamiento y aclimatización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para el enraizamiento y aclimatización se emplearon plantas de papaya variedad Maradol roja transformadas, que portaban una variante no traducible del gen de la proteína de la cápsida del PRSV. Para la transformación se empleó una pistola de genes de baja presión siguiendo la metodología propuesta por Mas *et al.* (2002). Las plantas estaban en fase de multiplicación y se encontraban en el 7^{mo} u 8^{vo} subcultivo.

Enraizamiento *in vitro*

Para determinar el medio de cultivo más adecuado para el enraizamiento *in vitro* de las plantas transgénicas de papaya se compararon dos medios de cultivo. Uno de los medios de cultivo utilizados fue el propuesto por Drew (1988) [medio de cultivo A] que contenía las sales Murashige y Skoog (MS) a la mitad de su concentración (Murashige y Skoog, 1962) y 2 mg.l⁻¹ de ácido indol-3-butírico (AIB). El segundo medio de cultivo [medio de cultivo B] fue el recomendado por Posada (1995), quien utilizó también las sales MS a la mitad de su concentración y 5 mg.l⁻¹ de AIB. Ambos medios de cultivo se solidificaron con Phytigel (Duchefa) 3.5 g.l⁻¹. Cuando se utilizó el medio de cultivo A, las plantas *in vitro* se mantuvieron durante 20 días y en el medio de cultivo B, 10 días.

Se emplearon 20 frascos de vidrio por tratamiento, con capacidad de 250 ml y 30 ml de medio de cultivo y se ubicaron cinco plantas en cada uno a las que se les eliminó de 1-2 mm de la base del tallo para favorecer la emisión de las raíces (Drew y Miller, 1990; Kataoka e Inoue, 1991). Posteriormente, se transfirieron a un medio de cultivo MS sin regulador de crecimiento durante 20 días para la formación de raíces. Pasado este tiempo se realizaron evaluaciones de las siguientes variables: longitud de la raíz más larga (cm), número de raíces por planta, número de hojas por planta y plantas enraizadas (%).

Enraizamiento *ex vitro*

El enraizamiento *ex vitro* ha sido usado por Kataoka e Inoue (1991) con el objetivo de enraizar plantas de papaya debido a los altos costos de esta fase en el proceso de propagación *in vitro*. Basados en este hecho y en las experiencias de Posada (1995) quien utilizó 8 mg.l⁻¹ de AIB en solución acuosa con este fin, se realizaron tres tratamientos donde se emplearon soluciones acuosas de AIB a las concentraciones de 0 (control), 5 y 8 mg.l⁻¹.

Las plantas de papaya fueron lavadas en su base para eliminar los restos de Phytigel del medio de cultivo y se les eliminó de 1-2 mm de la base del tallo. Se colocaron en las soluciones de enraizamiento durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, fueron enjuagadas con agua desionizada estéril y trasladadas para su plantación inmediata en bandejas de polietileno de 70 alveolos (121 cm³ cada uno).

El sustrato empleado fue una mezcla de cachaza (40%), humus de lombriz (40%) y zeolita (20%) esterilizado en autoclave durante una hora a 121°C y 1.5 atm de presión. Cada planta se cubrió con un frasco de vidrio transparente de 250 ml de capacidad para mantener la humedad relativa lo más próximo al 100% (Gallardo *et al.*, 2002). Se efectuó un riego diario al sustrato sin retirar los frascos para evitar que

el agua cayera sobre las plantas. Se programaron cuatro riegos diarios por aspersión (7 am, 11 am, 3 pm y 7 pm).

Se realizaron observaciones diarias. A los 15 días de plantadas se evaluaron las siguientes variables: longitud de la raíz más larga (cm), número de raíces por planta, número de hojas por planta, plantas enraizadas (%) y a los 30 días se evaluó la supervivencia (%).

Efecto de *Trichoderma harzianum*

El objetivo fue evaluar el efecto de la aplicación de un biopreparado de *T. harzianum* en la aclimatación de las plantas transgénicas de papaya. Se compararon las plantas de papaya aclimatizadas con la aplicación de *T. harzianum* y sin el empleo de este hongo antagonista.

El biopreparado fue obtenido en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Villa Clara, con una concentración de 3.10^8 conidios.ml⁻¹.

El tratamiento se realizó mediante la aplicación al sustrato de cada alveolo de 10 ml de una solución del biopreparado. La solución fue preparada mezclando un kilogramo del biopreparado en 10 l de agua desionizada estéril (Stefanova, 2006).

Se sembraron 100 plantas por tratamiento en las mismas condiciones que en el experimento de enraizamiento *ex vitro*. Se empleó una solución acuosa de AIB (5 mg.l⁻¹).

Las evaluaciones se realizaron a los 30 días de cultivo y se evaluó: longitud de la raíz más larga (cm), número de raíces por planta, número de hojas por planta, número de plantas enraizadas y número de plantas vivas (se expresó como porcentaje de supervivencia).

Procesamiento estadístico

Para el procesamiento estadístico de los resultados se realizó la prueba de ANOVA de clasificación simple para los efectos fijos. Para determinar los grupos

homogéneos y/o significativamente diferentes a un nivel de 5% se utilizaron las pruebas de Tuckey, Mann Whitney y Kruskall Wallis.

El procesamiento estadístico de los datos se realizó con la ayuda del paquete estadístico computacional SPSS/PC versión 13.0 para Windows 2000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Enraizamiento *in vitro*

Al comparar los medios de cultivo y realizar el análisis de los resultados de los tratamientos se comprobó que los mejores resultados el enraizamiento *in vitro* de las plantas transgénicas se alcanzaron con el tratamiento que emplea el medio de cultivo propuesto por Drew (1988) donde se obtuvo un 95% de plantas enraizadas (Tabla 1).

Se encontraron diferencias significativas en todas las variables evaluadas en los dos tratamientos. En el medio de cultivo propuesto por Drew (1988) se logró un mayor número de raíces por planta y raíces más largas, con medias de 3.24 y 1.97 respectivamente. Se observó geotropismo positivo.

Winnaar (1998) y Drew *et al.* (1991) obtuvieron buenos resultados con la aplicación de AIB para el enraizamiento de papaya *in vitro*, lo que lo convierte en el regulador de crecimiento muy usado para esta especie por su estabilidad, mayor espectro de acción y menor fotooxidación.

En cuanto al número de raíces por planta, los resultados concuerdan con los planteados por Rahaman *et al.* (1992), Islan *et al.* (1993) y Vianna (1996), lo que corroboró que el empleo de concentraciones más bajas del regulador de crecimiento, favorece la emisión de raíces. Taiz y Zeiger (2002) refirieron que altas concentraciones de auxinas no solo retarda el alargamiento celular sino que inhibe la formación de raíces. En relación con el largo de las raíces, los resultados se asemejan a los de Pires de Almeida *et al.* (2000) quienes lograron una media de 1.25 cm para esa concentración del regulador de crecimiento (2 mg.l⁻¹).

Tabla 1. Comparación de dos medios de cultivo para el enraizamiento *in vitro* de líneas transgénicas de papaya var. Maradol roja.

Medio de cultivo	Longitud de la raíz (cm)	Número de raíces/planta	Número de hojas/planta	Plantas enraizadas (%)
A	1.972 a	3.24 a	4.38 a	95
B	0.104 b	2.41 b	0.63 b	37
Error estándar	± 0.074	± 0.201	± 0.195	-

Medias con letras desiguales, en una misma columna, difieren significativamente según prueba de Tukey para $p \leq 0.05$ Medio de cultivo A: (Drew, 1988), Medio de cultivo B: (Posada, 1995).

Con el empleo del medio de cultivo propuesto por Posada (1995) se observó que el 63% de las plantas, a los 10 días de colocadas en el medio de cultivo sin el regulador del crecimiento, se mostraban cloróticas y con pérdida de las hojas por lo que fueron eliminadas. La abscisión de los órganos de las plantas es un fenómeno relacionado con el efecto de las auxinas (Taiz y Zeiger, 2002).

El aumento de la concentración de auxinas en el medio de cultivo provocó la caída de las hojas en las plantas cultivadas *in vitro*. Según Wächter *et al.* (1999) el incremento de este regulador del crecimiento produce un aumento de la síntesis de etileno, que conlleva a la abscisión de las hojas. Según Taiz y Zeiger (2002), las auxinas intervienen en la síntesis de etileno por su influencia en la formación de ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxilo sintasa. La transcripción de los genes encargados de la síntesis de esta proteína se ve favorecida por la aplicación exógena de auxinas en las plantas. El empleo de una alta concentración de AIB en el medio de cultivo debe influenciar en el desencadenamiento de este proceso. El etileno es una hormona gaseosa por lo que las condiciones de cultivo *in vitro* propician su acumulación dentro de los frascos de cultivo. El etileno activa la síntesis de clorofilasas (Taiz y Zeiger, 2002) lo que explica la apariencia adquirida por las plantas cultivadas en el medio de cultivo con mayor concentración del regulador de crecimiento. Ambas teorías apoyaron los resultados.

Solo el 37% de las plantas completaron el enraizamiento en medio de cultivo propuesto por Posada (1995) y no mostraban suficiente vigor para sobrevivir en la fase de aclimatización. La acción de los reguladores de crecimiento auxínicos en las raíces es similar a la acción que ejerce en los tallos, con la diferencia que la concentración estimuladora para el tallo es inhibitoria para la raíz. Se ha demostrado que la aplicación de altas concentraciones no solo retardan el alargamiento

celular sino que inhiben la formación de raíces. A bajas concentraciones, estimula la formación de esbozos radiculares (Davies, 2004). Pires de Almeida *et al.* (2000) emplearon concentraciones de 1, 2 y 3 mg.l⁻¹ de AIB para el enraizamiento *in vitro* de papaya y obtuvieron los mejores resultados con la concentración de 1 mg.l⁻¹.

El número de hojas por planta, donde también existieron diferencias significativas entre los tratamientos es un parámetro que influye en el enraizamiento según los resultados de Drew (1988) y Reuveni *et al.* (1990) quienes obtuvieron más del 85% de plantas enraizadas empleando plantas con 3-5 hojas en crecimiento activo. Los resultados coinciden con lo planteado por Suksa *et al.* (1998) quienes lograron valores por encima de cuatro hojas solo con la adición de 2.0 mg.l⁻¹ de AIB.

La respuesta de las plantas en el tratamiento donde se emplea una menor concentración del regulador de crecimiento (2 mg.l⁻¹), mostró mejores resultados en cuanto a las variables evaluadas. Se logró un 95% de plantas enraizadas y se obtuvieron plantas con mayor número de hojas, raíces y mayor longitud. Drew *et al.* (1991) plantearon que el AIB a esta concentración, tanto en medio de cultivo semisólido como líquido, estimuló conjuntamente con el contenido citoquinínico endógeno, un balance auxina-citoquinina favorable a los procesos de división, diferenciación y elongación celular. Pires de Almeida *et al.* (2000) (1-3 mg.l⁻¹), Melo *et al.* (2001) (1mg.l⁻¹) y Mosqueda *et al.* (2003) (2 mg.l⁻¹) recomendaron la utilización de concentraciones bajas de AIB para especies lechosas de difícil enraizamiento como la papaya.

Enraizamiento *ex vitro*

Se logró el enraizamiento *ex vitro* de las líneas transgénicas con el empleo de AIB a las concentraciones de 5 y 8 mg.l⁻¹ (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del AIB en el enraizamiento *ex vitro* de plantas transgénicas de papaya variedad Maradol roja.

Tratamientos AIB (mg.l ⁻¹)	Longitud de la raíz (cm)		Número de raíces/planta		Número de hojas/planta		Plantas enraizadas (%)	Supervivencia (%)
	MR	RM	MR	RM	MR	RM		
0 (control)	0	31.70 b	0	35.75 b	2.35	32.50 b	0	0
5	2.50	29.90 a	3.58	31.48 a	3.51	28.38 a	72	63
8	2.57	29.90 a	3.65	23.89 a	3.48	30.74 a	75	65

Rangos medios con letras desiguales, en una misma columna, difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $p \leq 0.05$.

MR: Medias reales

RM: Rangos medios

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en los que se aplicó el regulador de crecimiento y el que no se aplicó en todas las variables evaluadas. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre las dos concentraciones del regulador de crecimiento empleadas en ningún caso.

Al evaluar el número de hojas por plantas, con las concentraciones de 5 y 8 mg.l⁻¹ de AIB se obtuvo una media de 3.51 y 3.48 hojas por planta respectivamente, aspecto que repercutió al final del proceso. En el tratamiento sin la aplicación del regulador de crecimiento la media fue significativamente menor al evaluar este parámetro a los 15 días.

Las plantas que murieron a los 15 días en los tratamientos en los que se empleó el regulador, mostraban los esbozos radiculares. Grattapaglia y Machado (1998) plantearon el empleo de altas concentraciones de AIB para el enraizamiento *ex vitro* en especies donde esta fase del proceso es difícil, sin embargo, el empleo de 5 mg.l⁻¹ fue suficiente para inducir el enraizamiento y alcanzar valores aceptables de plantas enraizadas así como su supervivencia.

La supervivencia de las plantas a las que no se les aplicó el regulador de crecimiento fue 0% a los 30 días. Este resultado demostró que es difícil que las plantas sin inducción del enraizamiento, logren la emisión de raíces y la supervivencia en condiciones *ex vitro*.

Los resultados reafirmaron lo planteado por Kataoka e Inoue (1991) sobre la factibilidad del empleo del enraizamiento *ex vitro* en la papaya, no solo por los altos costos del proceso *in vitro* sino, por la poca funcionalidad de las raíces obtenidas por esta vía.

El enraizamiento *ex vitro* puede representar un ahorro significativo por concepto de tiempo y reactivos. Según Orellana (1998) poder realizar esta fase *ex vitro*, representa una disminución entre el 20 y 25% de costos y un incremento de alrededor del 50% de la capacidad de las cámaras de cultivo *in vitro*. El desarrollo del enraizamiento en estas condiciones tiene ventajas tanto en la papaya como en otras especies propagadas mediante cultivo *in vitro*: a)

facilidad al manipular plantas sin raíces, b) el sistema de raíces producidas *in vitro* no siempre son funcionales, c) la posibilidad de dañar las raíces a la hora de extraerlas del frasco y durante la siembra es real, lo cual da la posibilidad para la penetración de patógenos y d) es más fácil y económico.

La aplicación del biopreparado de *T. harzianum* en el sustrato favoreció la aclimatización de las plantas transgénicas de papaya. Se pudo comprobar que el empleo de *T. harzianum* contribuyó de forma significativa a la adaptación a condiciones *ex vitro* de las plantas transgénicas de papaya (Tabla 3).

Se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos, tanto en largo de las raíces como en el número de estas. Los resultados confirmaron lo planteado por Stefanova *et al.* (1999) y Stefanova (2006) quienes plantearon que este hongo antagonista actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes del sustrato, producción de metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas, micoparasitismo y además produce sustancias promotoras de crecimiento de las plantas por lo que su aplicación directa al suelo ofrece incluso una protección mayor a los cultivos.

Los resultados confirman lo planteado por Herrera (1997) quien señaló a *Trichoderma* sp. como estimulador del crecimiento por el efecto que realiza sobre los procesos fisiológicos de la planta. Méndez (2006) planteó la influencia del *T. harzianum* en la absorción de nutrientes a través del mejoramiento y desarrollo radicular, aumentando la disponibilidad de nutrientes necesarios para la planta y como protector del sistema radicular del ataque de hongos patógenos y plagas.

Se comprobó la presencia de las hifas de *T. harzianum* en las raíces de las plantas de papaya mediante el empleo de un microscopio estereoscópico cuando se comparó con el control (sustrato donde no se había adicionado *T. harzianum*). Esta observación coincide con lo referido por Deacon (2006) que planteó que *T. harzianum* exhibe una fuerte competencia rizosférica, pues es capaz de colonizar todo el sistema radical y persistir durante todo el desarrollo del cultivo.

Tabla 3. Influencia de la aplicación de *Trichoderma harzianum* al sustrato en la aclimatización de plantas transgénicas de papaya variedad Maradol roja.

Tratamientos	Longitud de la raíz (cm)	Número de raíces/planta	Plantas enraizadas (%)	Supervivencia (%)
sin biopreparado	1.54 b	2.48 b	71	65
con biopreparado	2.62 a	4.24 a	95	92
Error estándar	± 0.939	± 0.074	-	-

Medias con letras desiguales, en una misma columna, difieren según prueba de Tuckey para $p \leq 0.05$.

Stefanova *et al.* (1999) comprobaron que la forma más eficiente para su utilización sin duda es la transportación del bio-agente junto con el sustrato donde el mismo se encuentra previamente establecido como micobiota normal de la rizosfera. Este principio se aplica de manera efectiva a la tecnología de producción de postura en cepellones. La fase de aclimatización del proceso de micropropagación de plantas también ofrece la posibilidad de utilizar los beneficios de la aplicación de *T. harzianum* en cultivos que se propagan por esta vía.

CONCLUSIONES

Se logró el enraizamiento *in vitro* de plantas transgénicas de papaya al utilizar el medio de cultivo 2 mg.l⁻¹ de AIB durante 20 días. A su vez, fue posible el enraizamiento *ex vitro* de plantas transgénicas de papaya mediante la inmersión de la base de las plantas en una solución de AIB a una concentración de 5 mg.l⁻¹ e incrementar los porcentajes de supervivencia mediante la aplicación del biopreparado de *T. harzianum* al sustrato previo a la plantación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer la valiosa contribución de la Dra. Novisel Veitía (IBP) en el análisis estadístico de los resultados de esta investigación.

REFERENCIAS

- Acuña, LE (2005) El cultivo de Mamón (*Carica papaya*) [en línea] En: http://www.inta.gov.ar/montecarlo/info/documentos/alternativos/cultivo_mamon.pdf [consulta: 6 de Diciembre 2005]
- Brar, DS y Khush GS (1994) Cell and tissue culture for plant improvement. En: Basra, A (Ed.) Mechanisms of plant growth and improved productivity: Modern approaches, pp. 229-278. Marcel Dekker, New York
- Chen, G, Ye CM, Huang JC e I, BJ (2001) Cloning of the papaya ringspot virus (PRSV) replicase gene and generation of PRSV-resistant papaya through the introduction of the PRSV replicase gene. Plant Cell Reports 20: 272-277
- Davies, PJ (2004) Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action. 3ra Edición. Cornell University, Ithaca, NY
- Deacon, J (2006) Fungal interaction: mechanisms and practical exploitation. En: Deacon, J (Ed) Fungal Biology- 4ta Edición, pp. 237-255. Blackwell Publishing, London
- Drew, RA (1988) Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field growth trees. Horticulture Science 23 (3): 609-611
- Drew, RA y Manshardt RM (1997) Biotechnology of Papaya. Proceedings of the International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. R. A. Drew (Ed). Queensland, Australia. 29 Septiembre-3 Octubre, pp. 514
- Drew, RA, McComb JA y Considine JA (1991) Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya* L. *in vitro* in relation to auxin sensitive phase and use of riboflavin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33(1): 1-7
- Drew, RA, Miller RM (1990) Effect of explant type on proliferation of *Carica papaya* L. *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21(1): 39-44
- Gallardo, J, Posada-Pérez L, Kosky RG, Más L, Reyes M, Herrera I (2002) Micropropagación del híbrido cubano de papaya IBP 42-99. Biotecnología Vegetal 2(4): 211-215
- Gonsalves, D (1998) Control of *Papaya Ringspot Virus* in Papaya: A case study. Annual Reviews Phytopathology 36: 415-437
- Grattapaglia, D, Machado MA (1998) Micropropagação En: Torres AC, Caldas LS y Buso JA (Ed.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, pp. 183-260. EMBRAPA, Brasília
- Herrera, L (1997) Efectividad del antagonista *Trichoderma harzianum* sobre el crecimiento y desarrollo de vitroplantas en la fase de aclimatización, pp. 45-46XII Seminario Científico del INCA. La Habana. Cuba
- Islan, R, Rahman SM, Hossain M y Joarder OI (1993) *In vitro* clonal propagation of papaya (*Carica papaya* L.). Pakistan Journal of Botany 25(2): 189-192
- Kataoka, I, Inoue H (1991) Rooting of tissue cultured papaya shoots under *ex vitro* conditions. Journal of Tropical Agricultural 35(2): 127-129
- Lucas, E (2007) Manipulación de plantas madre para enraizamiento. Biotecnología Vegetal. Monografía. [en línea] En: http://www.Monografías100cia_com.mht [consulta: marzo 2007]
- Mas, L, Chong B, Kosky RG, Gallardo J, Herrera I, Reyes M (2002) Parámetros óptimos en la transformación de embriones somáticos de papaya empleando una pistola de genes de baja presión. Biotecnología Vegetal 2(2): 101-105
- Melo B, Pinto J, Luz J, Peixoto J y Juliatti F (2001) Effects of NAA and IBA *in vitro* on the length and weights of the dry matters of the roots and aerial part of the guarirobeira seedling [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] Bioscience Journal 17(1): 49-59
- Méndez, J (2006) Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Paecilomyces lilacinus* en el rendimiento de la lechuga orgánica. Taller Latinoamericano Biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* y otros antagonistas. Memorias. 28-31 Marzo. Ciudad de la Habana. Cuba
- Mosqueda, R, Becerra E, Arellano G, De Los Santos F, Rosas X, Villegas A (2003) Selección de plantas tolerantes al virus de la mancha anular del papayo (VMAP) y su clonación *in vitro*. [en línea] En: <http://www.ecologia.edu.mx/sigolfo/> [consulta: 22 marzo de 2007]
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497
- Orellana, PA (1998) Propagación vía organogénesis. En: Pérez, JN (Ed) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología, pp. 151-178. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara
- Pires de Almeida, E, Pedroso de Oliveira R, Loyola J (2000) Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 35(10): 2017-2024
- Posada, L (1995) Desarrollo de la embriogénesis somática en la fruta bomba (*Carica papaya* L.) Trabajo de Diploma. UCLV. Ciencias Agropecuarias
- Posada-Pérez, L, Kosky RG, Gallardo CJ, Reyes VM, Herrera OI (2004) Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas de campo del híbrido cubano de Papaya IBP 42-99. Biotecnología Vegetal 4(3): 153-158

- Rahaman, SM, Hossain M, Joarder OI, Islan R (1992) Rapid clonal propagation of papaya through culture of shoot apices. *Indian Journal of Horticulture* 49(1): 18-22
- Reuveni, O, Shlesinger DR, Lavi U (1990) *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 41-46
- Rezende, JAM, Pacheco DA (1998) Control of papaya ringspot virus type-W in zucchini squash by cross protection in Brazil. *Plant Disease* 82: 171-175
- Stefanova, M (2006) Producción y aplicación de *Trichoderma* spp. como antagonista de hongos fitopatógenos. [en línea] En: <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/TRICHODE.htm>. [consulta: 8 de Noviembre 2006]
- Stefanova, M, Leiva A, Larrinaga L y Coronado MF (1999) Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad Agronomía (LUZ)* 16: 509-516
- Suksa, A, Kataoka P, Fujime Y y Subhadrabandhu S (1998) *In vitro* propagation of papayo. *Journal of Tropical Agricultural* 41(1): 7-13
- Taiz, L, Zeiger E (2002) *Plant Physiology*. 3ra Edición.
- Tennant, PF, Gonsalves C, Ling KS, Fitch M, Manshardt R, Slightom JL, Gonsalves D (1994) Differential protection against *Papaya ringspot virus* isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathology* 84: 1359-1366
- Thomas, JE, Dodman RL (1993) The first record of *Papaya ringspot virus* type P in Australia. *Australian Plant Pathology* 22: 2-7
- Tripathi, S, Suzuki JY, Ferreira SA, Gonsalves D (2008) Papaya ringspot virus-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Molecular Plant Pathology* 9(3): 269-280
- Vianna, GR (1996) Micropropagação do mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando ápices caulinares de plantas adultas. Viçosa: UFV. 65p. Dissertação de Mestrado
- Wächter, R, Fischer K, Gäbler R, Kühnemann F, Urban W, Bögemann GM, Voesenek LACJ, Blom CWPM, Ullrich CI (1999) Ethylene production and ACC-accumulation in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumours and their impact on tumour and host stem structure and function. *Plant Cell Environment* 22: 1263-1273
- Winnaar, W (1998) Clonal Propagation of papaya *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 12(3): 305-310