

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



Regeneración de híbridos de papaya (*Carica papaya* L. var.

Maradol x *Carica* sp) mediante embriogénesis somática

TESIS PROFESIONAL

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

Sonia Angélica García Peña

Las Agujas, Zapopan, Jal., Octubre de 2013



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD. BIOL. 192/2012

**C. SONIA ANGÉLICA GARCÍA PEÑA
PRESENTE**

Manifetamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción: **Tesis**, con el título "**Regeneración de híbridos de papaya (*Carica papaya* L. var. *Maradol* x *Carica* sp) mediante embriogénesis somática**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director(a) de dicho trabajo al **Dra. Antonia Gutiérrez Mora**, y como asesor a **Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 26 de septiembre, del 2012.

**DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Verónica Palomera Gu.

**M.C. VERÓNICA PALOMERA AVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

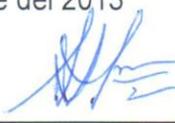
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e informes, opción Tesis con el título: **"Regeneración de híbridos de papaya (*Carica papaya* L. var. *Maradol* x *Carica* sp) mediante embriogénesis somática"** que realizó la pasante **Sonia Angélica García Peña** con número de código **207395388** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

ATENTAMENTE

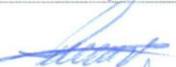
Las Agujas, Zapopan, Jal., 5 de septiembre del 2013


 Dr. Antonia Gutiérrez Mora
 Director de Tesis


 Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba
 Asesor




 5-Sept-2013

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Liberato Portillo Martínez		05 sep '13
Dr. Ana Lilia Viguera Guzmán		05/septiembre/2013
Dr. Rafael Soltero Quintana		5/SEPT/2013
Supl. Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba		5/SEPT-13

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), dentro del proyecto “Regeneración de híbridos de papaya tolerantes al virus de la mancha anular de la papaya mediante embriogénesis somática”, dirigido por la Dra. Antonia Gutiérrez Mora. Clave del proyecto 118442 del Fondo Complementario a Investigadores en Proceso de Consolidación del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guadalajara por mostrarme el camino de la carrera que me ha dado grandes satisfacciones.

A mi director de Tesis, la Dra. Antonia Gutiérrez Mora por su confianza para sacar adelante este trabajo.

A mis sinodales el Dr. Liberato Portillo Martínez, Dra. Ana Lilia Viguera Guzmán, M. en C. Rafael Soltero Quintana por brindarme su apoyo, tiempo, consejos y entusiasmo para seguir adelante y no rendirme.

A mi Asesor el Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba por sus correcciones, consejos y tiempo.

DEDICATORIAS

Mis padres, mis pilares, mi TODO...

María Guadalupe Peña Altamirano gracias por enseñarme a ser mejor persona, a mantener la bondad, honradez y sencillez ante todo, por ser mi principal motor en todo momento. Gracias mamita.

Arturo García Martínez de ti he aprendido muchas cosas, entre ellas el carácter que me ha servido para forjarme y no rendirme nunca, que a pesar de que me he caído, me has enseñado a levantarme, sin importar lo doloroso que pueda ser. Por brindarme el mejor consejo de todos "Lo que sea que hagas en la vida, hazlo bien". Gracias papito, por todo esto y más.

Eva Altamirano, mi segunda madre, mi abuelita que a pesar de la distancia te llevo siempre conmigo.

Patricia Peña que ha demostrado que la edad no tiene límites para seguir superándose y aprendiendo.

Familia Peña Altamirano que me han ayudado desde pequeña, impulsándome a seguir estudiando, por su ejemplo y tiempo dedicado.

Juan Carlos Tamayo desde el día q iniciamos este camino, me has motivado a no rendirme, por ser un gran apoyo y no perder la fe.

Rene y Maika mis pequeñas que siempre me mostraran que hay alguien que con un movimiento de colita cambian el sentido del día.

ÍNDICE

Índice	i
Índice de Figuras	iv
Índice de Cuadros	vi
Resumen	vii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Taxonomía de la papaya	3
2.1.1 Origen y distribución	3
2.1.2 Descripción botánica.....	4
2.1.3 Cultivo y su importancia económica	5
2.2 Virus de la mancha anular (VMAP)	6
2.3 Micropropagación	7
2.4 Regeneración	8
2.5 Embriogénesis somática	8

3. Justificación	13
4. Objetivo general.....	14
4.1 Objetivos específicos	14
5. Hipótesis	15
6. Material y métodos.....	16
6.1 Inducción de embriogénesis somática a partir de integumentos de semillas inmaduras (ISI)	17
6.1.1 Material vegetal	17
6.1.2 Selección de semillas	18
6.1.3 Inducción de embriogénesis somática	20
6.1.4 Expresión de embriones somáticos	21
6.2 Inducción de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos maduros (ECM)	21
6.2.1 Material vegetal	21
6.2.2 Inducción de embriogénesis somática	22
6.2.3 Expresión de embriones somáticos	23
6.2.4 Germinación de embriones	24
6.2.5 Crecimiento de plantas	24

6.3 Análisis de datos	25
7. Resultados y discusión	26
7.1 Inducción de embriogénesis somática en integumentos de semillas inmaduras (ISI).....	26
7.1.1 Expresión de embriones somáticos	32
7.2 Inducción de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos maduros (ECM)	34
7.2.2 Expresión y maduración de embriones somáticos.....	38
7.2.3 Germinación de embriones somáticos y crecimiento de plántulas ..	40
8. Conclusiones	44
9. Bibliografía	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de diseño experimental	16
Figura 2. Semillas inmaduras de híbridos de papaya en frascos listas, para ser diseccionadas.	19
Figura 3. Corte horizontal en semillas inmaduras de híbridos de papaya. a semilla con endospermo. b semilla sin endospermo.....	20
Figura 4. Sarcotesta de semillas de híbridos de papaya tras dos meses en inducción de ES. a sin callo. b pequeños cúmulos de células desorganizadas alrededor de la sarcotesta (flecha). c Integumento sin la formación de callo (flecha).....	27
Figura 5. Callo alrededor de la sarcotesta (flecha), línea RC3 13.....	28
Figura 6. Obscurecimiento de semilla inmadura.	29
Figura 7. Porcentaje de integumentos de semillas inmaduras con producción de callo en medio M1 con dos concentraciones de 2,4-D (4 mg/L y 2 mg/L)....	30
Figura 8. Callo oxidado.	32
Figura 9. Transcurso de inducción de embriogénesis somática en ECM. a embrión cigótico maduro. b cotiledones separados (flechas). c formación de callo embriogénico.	35
Figura 10. Porcentaje de producción de callo en embriones cigóticos maduros en dos medios, M1 (4mg/L de 2,4-D) y en medio A10 (10 mg/L de 2,4-D)	36

Figura 11. Embriones somáticos. a embriones en fase de torpedo maduros, embrión en estado de corazón (flecha). b embrión completamente maduro. ..	39
Figura 12. Embriones somáticos germinados a. Embriones germinados. b. primera hoja y raíces largas.....	42
Figura 13. Porcentaje de inducción de embriogénesis somática. En ECM (embriones cigóticos maduros) *ISI (Integumentos de semillas inmaduras) formación de callo en sarcostesta.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Trabajos de embriogénesis somática en papaya 10

RESUMEN

La papaya ha cobrado importancia en los últimos años a nivel mundial, sin embargo es atacada por un patógeno que afecta el cultivo en tiempo relativamente corto, el virus de la mancha anular VMAP. Es por ello que desde hace tiempo se ha trabajado en el CIATEJ en protocolos para la micropropagación de *Carica papaya* L. var. Maradol \times *Carica* sp. para obtener híbridos sanos de VMAP. mediante mejoramiento genético tradicional, por cruzas y retro cruzas. El objetivo de este trabajo regenerar estos híbridos mediante embriogénesis somática utilizando dos explantes: integumentos de semillas inmaduras y embriones cigóticos maduros; y como medio de cultivo el medio M1 que es el medio basal MS a la mitad de la concentración de los elementos mayores y menores, vitaminas Chen y adicionado con dos concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (2 mg/L y 4 mg/L) para la inducción de embriogénesis somática, el medio M2 con los reguladores de crecimiento modificados de 2,4-D (0.02 mg/L + 0.02 mg/L de cinetina) y M3 que es medio M2 + 0.2 mg/L de ácido abscísico para la expresión y maduración de embriones somáticos. Para la germinación se utilizó el medio MG, que es el medio basal MS con vitaminas de Yie y Liaw (1977) adicionado con Difco® Bacto agar, Floridzin y AG₃ para obtener embriones somáticos óptimos para su desarrollo. Se seleccionaron y se colocaron en el medio de crecimiento MG, sin la adición de Floridzin y AG₃. Se logró inducir a la formación de callo no embriogénico en la sarcotesta de las semillas inmaduras en el medio M1 con la concentración

de 2,4-D 4.0 mg/L y no fue posible inducir la formación de callo en los integumentos. En los explantes de embriones cigóticos maduros se logró la embriogénesis somática y la regeneración de híbridos de papaya.

1. INTRODUCCIÓN

La papaya es una fruta tropical que ha cobrado importancia a nivel mundial, se consume como fruta fresca y los productos derivados de la misma (Teixeira-da-Silva, y col., 2007). En una década (del año 1999 a 2010) la India cuadruplicó su producción de 1'666,470 a 4',196,000 ton (FAO, 2010). México refleja la importancia del cultivo, incrementando su producción en una década hasta en un 8%, su obtención de 569,230 ton (FAO, 1999) a 616,215 ton (FAO, 2010).

Sin embargo, los cultivos se ven afectados por el virus de la mancha anular (VMAP), llegando a causar pérdidas totales, e incluso la improductividad al año del cultivo.

Este virus se transmite de forma no persistente, principalmente por áfidos como *Aphis gossypii* y el insecto *Myzus persicae* (Purcifull y col., 1984 citado en Gutiérrez-Mora, 2002), afectando directamente el cultivo. Los síntomas van desde hojas y nervaduras con clorosis, enroscamiento, deformación y mosaico, aparecen manchas anulares en los frutos, manchas aceitosas en los peciolos y tallos, la planta comienza a encogerse impidiéndole crecer, cambia el sabor de los frutos y si es una planta en estado inmaduro, puede ocasionar que no produzca frutos (Conover, 1964). Hay especies de *Carica* sp que tienen la tolerancia a este virus de manera natural. Dentro de los diferentes métodos de propagación, la biotecnología ha resultado ser una herramienta efectiva para transferir esta resistencia, a través de la

regeneración, ingeniería genética, y/o en combinación con el mejoramiento genético tradicional.

En la Unidad de Biotecnología Vegetal del CIATEJ, por más de 15 años se ha trabajado con un programa de mejoramiento genético con el fin de desarrollar plantas por medio de cruzas y retrocruzas de *Carica papaya* L. var. Maradol con *Carica* sp.; como resultado de este trabajo se cuenta con líneas (T1P4, RC4 33, RC3 72, RC3 13) que expresaron tolerancia al VMAP y que además presentan las características de la papaya Maradol.

2. ANTECEDENTES

2.1 Taxonomía de la papaya

Reino Plantae; División Magnoliophyta; Orden Violales; Familia Caricaceae; con cuatro géneros: *Cylicomorpha*, *Jacaratia*, *Jarilla* y *Carica*; especie *Carica papaya* L., (CONABIO, 2012). *Carica* es el único género con 22 especies que es aprovechado como árbol frutal, generalmente son usados como árboles ornamentales.

2.1.1 Origen y distribución

Se cree que su distribución tuvo origen en las Costas del Caribe y de ahí se extendió al Sur de México hasta Argentina y Chile (Teixeira da Silva, y col., 2007).

Cylicomorpha es autóctona de África, cuenta con dos especies, en contraste con *Jacaratia* que se encuentra en América tropical con seis especies. En México se encuentra *Jacaratia mexicana*, *Jarilla heterophylla* y *J. rusby* (Diaz-Luna y Lomelí-Sención, 1992).

La papaya es llamada por distintos nombres, como “kapaya” en Las Filipinas, “papaya” en México, “lechosa” en Venezuela, “fruta bomba” en Argentina, “melón zapote”, “papaya”, “papayero” o “paw-paw” en Australia y Jamaica (Teixeira da Silva, y col., 2007).

2.1.2 Descripción botánica

La papaya es arborescente, perennifolia, leñosa, dicotiledónea, de rápido crecimiento, de 2 a 10m de altura, tallo simple, recto, en la base grueso, cilíndrico y hueco, con cicatrices en las hojas, dominancia apical, hojas grandes con peciolo largo de 0.7 a 1.0 m, lámina palmeada, lobulada, generalmente dispuestas en espiral, agrupadas en la corona. De crecimiento monopódico en la juventud y ramificada al madurar (Gil y Miranda, 2005).

Las flores son pistiladas, estaminadas y bisexuales, de color blancuzco a amarillo pálido. Las flores femeninas son de mayor tamaño que las masculinas, solitarias o en grupo de cinco a seis en la base de una hoja; las masculinas en panículas delgadas de 15 a 20 flores, en ocasiones llegan a presentar hasta 100 florecillas por inflorescencia. Los frutos se encuentran agrupados alrededor del tronco, los femeninos son esféricos, el de las hermafroditas es ovalado, algo piriforme, de 15 a 50 cm de largo y de 1 a 20 cm de ancho. Contienen numerosas semillas ovoides, de 5 mm aproximadamente, corrugadas, cubiertas por una capa mucilaginosa llamada sarcotesta, en estado inmaduro su coloración es blanco, al madurar toman el color negro, en estado inmaduro el endospermo es semilíquido, al desarrollarse y madurar, su consistencia cambia a solida. Puede ser dioica (en la papaya silvestre), monoica, hermafrodita o polígama (Teixeira da Silva, y col., 2007; Gil y Miranda, 2005); Monmarson y col., 1995).

2.1.3 Cultivo y su importancia económica

La papaya puede desarrollarse por semilla o asexualmente, generalmente crece en climas tropicales y subtropicales, puede prosperar sobre cañadas, suelos ricos en materia orgánica (Morton, 1987), o suelos con buena permeabilidad y profundidad (Ascencio, 2005). Los papayos vegetan de 3 a 25 años, se desarrollan rápido y generan alto rendimiento los primeros años, fructifica la mayor parte del año.

Para el inicio de plantaciones se utilizan semillas que germinan de 2 a 4 semanas después de ser plantadas, sin embargo el sexo no puede ser determinado hasta 6 meses después, o cuando aparezcan las primeras flores (Perseley y Ploetz, 2003), esto es importante para la posterior selección y poder hacer mejoramiento genético tradicional, mediante cruza y retrocruza.

La FAO en 2010 publicó que la India es uno de los principales productores de papaya con 4,196,000 ton, seguidos de Brasil con 1,871,300 ton y México en sexto lugar con 616,215 ton (FAO, 2010), es una fruta con un alto nivel de importancia económica (SAGARPA, 2009).

Los estados de México con mayor producción al año son Chiapas 140,721.50 ton/ha, Veracruz con 115,056.50 ton/ha, Oaxaca 113,705.25 ton/ha, Jalisco con 12,383.20 ton/ha (SIAP, 2012). Siendo México el principal exportador de papaya a Estados Unidos.

2.2 Virus de la mancha anular (VMAP)

El virus de la mancha anular de la papaya es uno de los principales causantes de una de las enfermedades de mayor importancia en los cultivos de papaya (*Carica papaya*) en todos los países donde se cultiva (Cabrera y col., 2010; Peña, 2008; Fernando y col.,2001; Gutierrez-Rosati y col., 1999).

El VMAP es transmitido por áfidos como el *Aphis citricola*, *A. gossypii*, *A. craccivora*, *A. rumicis*, *Myzus persicae*, *Acyrtosiphon solani*, *Hysteroneura setariae*, *Toxoptera citricidus* y *Macrosiphum rosae* (Peña, 2008; Hernández-Castro y col., 2003). Una vez que se infecta la planta, los síntomas que presenta son mosaico severo, distorsión de las hojas, anillos concéntricos en los frutos y manchas aceitosas en la parte superior de los tallos y en peciolos. Impide el crecimiento de la planta y reduce drásticamente el tamaño y la calidad de los frutos Purcifull (1972) citado en Vegas, (1996), incluso, si se ha infectado el cultivo en los primero dos meses, no se producen frutos (Cabrera y col., 2010).

En lugares como Venezuela y México ha llegado a ocasionar pérdidas totales en las siembras comerciales, viéndose afectados los cultivos de todo el país con esta enfermedad (Noa-Carrazana y col.,2006).

2.3 Micropropagación

La micropropagación es una técnica que ha sido aceptada rápidamente en la industria tanto para especies hortícolas, ornamentales y leñosas. Esta forma de cultivo de tejidos *in vitro* incrementa rápidamente el número de plantas a partir de pocos explantes, que bajo ciertas condiciones, como nutrientes y reguladores de crecimiento adecuados; luz, temperatura, pH, intercambio de gases y otros factores, permiten que la micropropagación se realice en una superficie reducida y en un tiempo económicamente costeable (Abdelnour y Vincent, 1994). Por lo tanto se tiene mayor control sanitario del material que se propaga, mayor uniformidad genética, facilidad de transporte (*in vitro*), de un país a otro y con menos restricciones aduaneras (Abdelnour y Vincent, 1994).

Es por ello que en la biotecnología, en especial la vegetal, que la micropropagación se ha convertido en una herramienta fundamental, que es ampliamente usada debido a que permite la obtención de plantas con mayor estabilidad genética, y en muchos casos, producir plantas libres de patógenos y virus.

2.4 Regeneración

La regeneración es un proceso de morfogénesis que se puede desarrollar a partir de tejido, células gaméticas o células somáticas, donde la totipotencialidad de las plantas da paso a la transformación de estas células a un organismo totalmente nuevo (Litz y Jarret, 1993). Existen tres formas de micropropagación; proliferación de yemas axilares, organogénesis, y embriogénesis somática; las dos últimas pueden ser de manera directa o indirecta vía callos. Para que se pueda realizar este proceso, es trascendente que el tipo de células que se utilizan sean competentes (con capacidad morfogénica) y puedan desdiferenciarse.

2.5 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática (ES) forma parte de los métodos de micropropagación en la biotecnología vegetal, esta es muy parecida a la embriogénesis cigótica, ambas tienen la capacidad de formar una planta después de un proceso de germinación, sin embargo la primera es de forma asexual y la segunda por fusión de gametos (Ascencio-Cabral y col., 2008).

La ES se produce de forma natural y espontánea en algunos géneros de plantas como *Asplenium*, *Kalanchoe*, *Begonia*, entre otros. Se pueden obtener embriones somáticos de diferentes partes de la planta, ya sea de hojas jóvenes, hipocótilos, tallo, semillas inmaduras, cultivos de células en

suspensión, pasan de ser células organizadas a la desorganización y nuevamente a la reorganización de las mismas (Freire, 2003).

Su origen es unicelular y puede ser independiente del resto del tejido. Sus estructuras son completas; cotiledones, meristemo vegetativo y radicular, con tendencia a la uniformidad genética cuando éstos son producidos de manera directa, esto es sin pasar por callo (Gutiérrez-Mora y col., 2012).

En la papaya, la ES se ha inducido a partir de varias fuentes de explantes, como hojas, integumentos de semillas inmaduras, embriones cigóticos inmaduros, embriones cigóticos maduros, entre otros (Lin, 2012; Malabadi y col., 2011; Posada-Perez y Koski, 2007; Cabrera-Ponce y col., 1995; Monmarson y col., 1995; Fitch y Manshardt, 1990) (Cuadro 1), estos últimos explantes de embriones cigóticos inmaduros han obtenido mejores resultados en cuanto a la formación y producción de embriones somáticos.

Cuadro 1. Trabajos de embriogénesis somática en papaya

Año	Especie de Papaya	Tipo de explante	Resultados	Referencia
2012	<i>Carica papaya</i> var. Maradol	Embriones cigóticos maduros y hojas.	El tipo de explante es importante para la inducción de ES.	Lin
2011	<i>Carica papaya</i> (variedades comerciales)	Embriones cigóticos inmaduros.	Se estableció un protocolo donde se utilizó para la inducción de ES diferentes concentraciones de TDZ mas 2,4-D. La desecación de tejido embrionario impulso la formación de embrioides. Otro factor fue que el genotipo es influyente para la ES.	Malabadi y col.
2007	<i>Carica papaya</i> L.	Embriones cigóticos inmaduros.	Obtuvo embriones somáticos a partir de embriones cigóticos,	Posada-Perez y Koski

			sin la formación de callogénesis, y la efectividad del 2,4-D para la inducción de ES	
1995	<i>Carica papaya</i> , L	Embriones cigóticos maduros	Embriones cigóticos maduros. Medio de inducción A10 (10 mg/L de 2,4-D, la mitad de concentración de macro y micronutrientes del MS)	Cabrera-Ponce y col.
1995	<i>Carica papaya</i> , L	Integumentos de semillas inmaduras	Se trabajó con los integumentos de semillas inmaduras, que contienen tejido madre, que resulta buen explante para la ES y consigue la carga genética de interés. Se obtienen los medios M1, M2 y M3.	Monmarson y col.

1990	<i>Carica papaya</i> L.	Embriones cigóticos inmaduros.	A partir de embriones cigóticos inmaduros se obtuvo embriogénesis somática, con una concentración de 5 mg/L de 2,4-D	Fitch y Manshardt
------	----------------------------	--------------------------------------	--	----------------------

3. JUSTIFICACIÓN

Existen patógenos como los virus que afectan severamente cultivos de gran importancia económica a nivel mundial. En la papaya el VMAP afecta directamente los cultivos, disminuyendo su producción e impactando económicamente a los productores.

Anteriormente se han realizado trabajos de mejoramiento genético convencional en los que se hicieron cruces de *Carica papaya* L. var. Maradol X *Carica* sp. La importancia de éstas, radica en que *Carica* sp presenta tolerancia al virus, y esta característica fue transferida a la variedad comercial Maradol, por lo que es necesaria la regeneración de los híbridos que presentan tolerancia al patógeno. La embriogénesis somática es un método por el cual se pueden regenerar una gran cantidad de plantas homogéneas de calidad y tolerantes al VMAP.

4. OBJETIVO GENERAL

- Regenerar mediante embriogénesis somática plantas de papaya tolerantes al virus de la mancha anular, producto de retrocruzas.

4.1 Objetivos específicos

- Inducir la embriogénesis somática de plantas híbridas de papaya utilizando como explantes integumentos de semillas inmaduras y embriones cigóticos maduros.
- Inducir la embriogénesis somática de plantas híbridas de papaya utilizando dos concentraciones de 2,4-D en integumentos de semillas inmaduras.
- Expresar y germinar *in vitro* los embriones somáticos.

5. HIPÓTESIS

Es posible la inducción de embriogénesis somática en integumentos de semillas inmaduras para la regeneración de híbridos de papaya utilizando el Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.

La embriogénesis somática se induce a partir de la regeneración de embriones cigóticos maduros en papaya.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

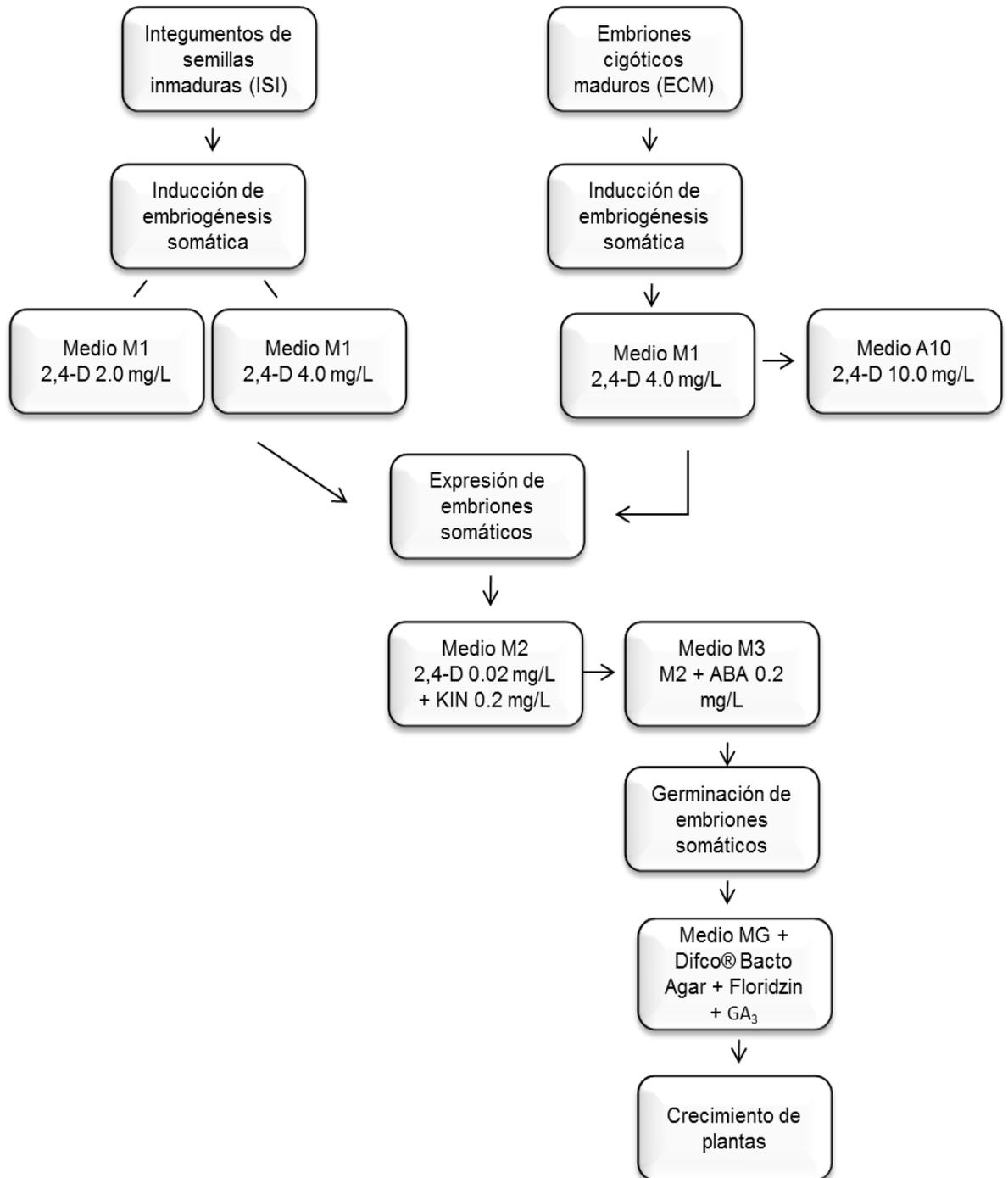


Figura 1. Diagrama de diseño experimental.

En la Figura 1 se presenta el diagrama del diseño experimental de este trabajo, en el cual se utilizaron dos tipos de explantes para la inducción de embriogénesis somática en integumentos de semillas inmaduras y embriones cigóticos maduros.

6.1 Inducción de embriogénesis somática a partir de integumentos de semillas inmaduras (ISI)

6.1.1 Material vegetal

A partir de las cruzas y retrocruzas de *Carica papaya* L. var. Maradol x *Carica* sp. silvestre, se obtuvieron híbridos de las líneas T1P4, RC4 33, RC3 72, RC3 13 y pajarera.

Se trabajó con frutos que se colectaron en estado inmaduro y se llevaron al laboratorio para la toma de semillas.

El trabajo de campo se desarrolló en los terrenos del Campo Experimental Costa de Jalisco del INIFAP, localizado en el km 204 de la carretera Guadalajara Barra de Navidad; en los límites de municipio de La Huerta y Casimiro Castillo, en los 19° 31' 15" latitud norte y 104° 32' 00" longitud oeste, a una altitud de 360 msnm y con tipo climático Aw1 (w), con precipitación media anual de 1100 mm. Temperaturas medias máximas de 34 °C y medias mínimas de 12 °C, por lo que se considera un clima cálido sub húmedo.

6.1.2 Selección de semillas

Se trabajó con 16 frutos inmaduros y de cada uno se tomaron 50 semillas; se situaron lotes (muestras) de 10 semillas en caja Petri con cinco repeticiones ($5 \times 10 = 50$), en total se utilizaron 800 semillas.

Los frutos colectados se lavaron con agua y jabón, se secaron y se limpiaron con etanol de 96° G.L. para introducirlos a la campana de flujo laminar. Una vez dentro, se rociaron con etanol de 96° G.L. y se flamearon repetidas veces. Se cortaron horizontalmente, se extrajeron las semillas y se colocaron en frascos estériles para su uso posterior (Figura 2). Se tomaron 50 semillas de cada frasco. El resto se mantuvieron sellados y en refrigeración a 4°C.



Figura 2. Semillas inmaduras de híbridos de papaya en frascos, listas para ser diseccionadas.

Todo el trabajo se realizó en condiciones de asepsia. El tejido madre (integumentos) se obtuvo a partir de semillas inmaduras con el endospermo en estado semilíquido (Gutiérrez-Mora A., 2002) y (Monmarson y col., 1995), se realizó un corte transversal con pinzas y bisturí, posteriormente se extrajo el endospermo semilíquido junto con el embrión con ayuda de un estereoscopio, dejando sólo la parte de la testa y el integumento (tejido madre) (Figura.3).

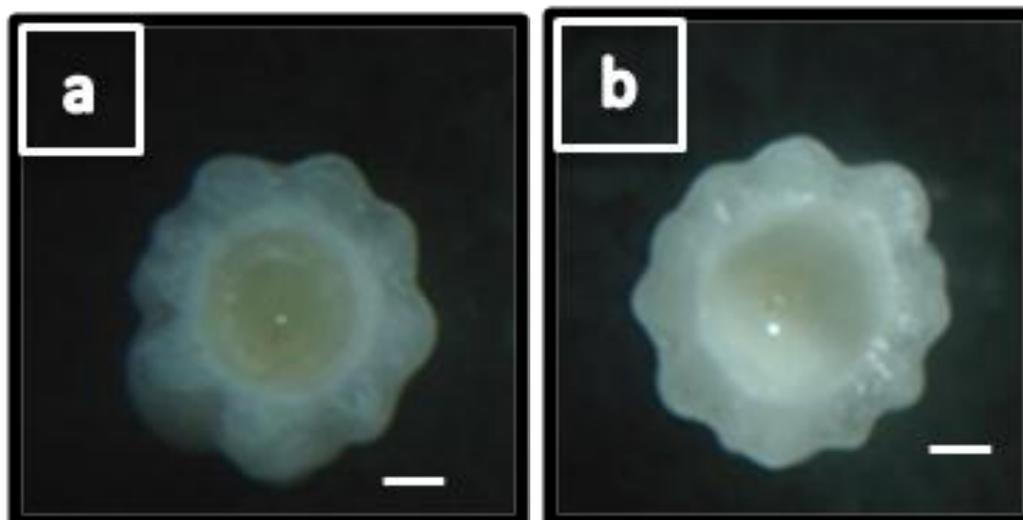


Figura 3. Corte horizontal en semillas inmaduras de híbridos de papaya. a semilla con endospermo. b semilla sin endospermo. Barra = 1.0 mm

6.1.3 Inducción de embriogénesis somática

Las semillas que previamente fueron desprovistas del endospermo y el embrión se colocaron en cajas Petri con medio M1 para inducción. El medio empleado está compuesto por la mitad de la concentración de los elementos mayores y menores del medio MS (Murashige y Skoog, 1962); vitaminas descritas por Chen y Wang, (1987), tiamina 0.5 mg/L, piridoxina 1.0 mg/L, ácido nicotínico 5.0 mg/L, glicina 2.0 mg/L, hidrolizado de caseína 1.0 mg/L; myo-inositol 100 mg/L; además de glutamina 100 mg/L, sacarosa 40 g/L, y dos concentraciones de ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2.0 mg/L y 4.0 mg/L). El pH se ajustó a 5.7, después se agregó el agente gelificante Phytigel® 2 g/L y se esterilizó en autoclave a una presión de 18 Lb/In² por 15 minutos a una temperatura de 121° C.

La incubación se realizó durante dos meses a una temperatura de 27 °C, con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, a una intensidad lumínica de 1300 lux (Ascencio, 2005).

6.1.4 Expresión de embriones somáticos

Una vez formado el callo embriogénico se resembró en medio M2 (M1, con los reguladores de crecimiento modificados: 0.02 mg/L de 2,4-D y 0.2 mg/L de KIN) para iniciar la expresión de embriones somáticos. Bajo las mismas condiciones de pH, esterilización y fotoperiodo ya mencionadas.

Transcurrido un mes el callo se resembró en medio M3 (M2 + 0.2 mg/L de ABA), el ácido abscísico (ABA) fue esterilizado por filtración, debido que éste ácido se desnaturaliza con temperaturas altas; por lo que se añadió al medio a temperatura ambiente, con las mismas condiciones de fotoperiodo ya descritas.

6.2 Inducción de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos maduros (ECM)

6.2.1 Material vegetal

Los frutos obtenidos fueron colectados 6 meses después de las autopolinizaciones. Se trabajó con quince frutos, de los cuales, se tomaron 50 embriones cigóticos maduros (ECM) de cada fruto, para situar diez

semillas por cada caja Petri, con cinco repeticiones (5x10=50), en total se utilizaron 750 ECM.

Los embriones cigóticos fueron tomados de semillas maduras de papayos híbridos provenientes del campo experimental en La Huerta, Jalisco. Productos de cruza y retrocruzas de polinizaciones y autopolinizaciones de *Carica papaya* L. var. Maradol X *Carica sp* (líneas híbridas; 13, 18, 36, 46, 54, 60, 63, 68, 74, 76, 82, 83, 84, 86, 87, 89 y 90).

Las semillas sin sarcostesta fueron desinfectadas durante 1 min en movimiento constante dentro de frascos con etanol al 70%, posteriormente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 50% por 10 min, finalmente se realizaron tres enjuagues en agua destilada estéril.

6.2.2 Inducción de embriogénesis somática

Se utilizó el medio M1 antes mencionado, con una concentración de 2,4-D 4.0 mg/L, en respuesta a la inducción de embriogénesis somática del primer experimento en los integumentos de semillas inmaduras. Se incubó durante un mes y medio, con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, a una intensidad lumínica de 1300 lux.

Los ECM que no produjeron callo embriogénico, al ser un tejido diferente a los integumentos de semillas inmaduras, fueron cambiados al medio A10 descrito por Cabrera-Ponce y col. (1995) y por Gutiérrez-Mora (2002) para

inducir a los embriones cigóticos maduros mediante una elevada concentración de auxinas.

El medio A10 está compuesto por la mitad de la concentración de los elementos mayores y menores del medio MS, vitaminas MS, glutamina 0.4 g/L, sacarosa 60 g/L, 10mg/L de 2,4-D, el pH se ajustó a 5.8, se le agregó el gelificante Phytigel® 2.5 g/L y se esterilizó en autoclave a una presión de 18 Lb/In², por 15 minutos, a una temperatura de 121° C. las condiciones de fotoperiodo e intensidad lumínica fueron las mismas que ya se han mencionado.

6.2.3 Expresión de embriones somáticos

Después de mes y medio de incubación en medio M1 y formado el callo embriogénico, se resembró al medio M2 (medio M1 con reguladores de crecimiento modificados: 0.02 mg/L de 2,4-D y 0.2 mg/L de cinetina) para dar inicio la expresión de embriones somáticos.

Se realizó cambio de medio después de un mes en incubación en medio en M2, los callos se transfirieron al medio de expresión M3 (medio M2 + 0.2 mg/L de ABA). Se incubaron por un mes y medio en M3 con las mismas condiciones de fotoperiodo e intensidad lumínica ya descritas.

6.2.4 Germinación de embriones

Tras mes y medio en M3 los embriones somáticos fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes parámetros: dos cotiledones, sin hiperhidricidad, sin presencia de callo en la raíz y sin embriogénesis secundaria de los embriones somáticos.

Para la germinación se utilizó el medio basal descrito por Lloyd y MC Cown (1980), adicionado con vitaminas descritas por Yie y Liaw (1977); myo-inositol 100 mg/L, tiamina 0.4 mg/L, ácido nicotínico 1 mg/L, piridoxina 1 mg/L y glicina 4 mg/L; el pH se ajustó a 5.7, posteriormente se añadió el gelificante Difco[®] Bacto agar 7.5 g/L, una vez esterilizado el medio se añadieron 3 mg/L de Floridzin y AG₃ 0.35 mg/L (esterilizados por ultrafiltración), este medio se denomina MG (Gutiérrez-Mora 2002).

Los embriones somáticos se colocaron en un incubador con lámparas de amplio espectro, a intensidad luminosa de 1680 lux, 27 °C de temperatura, por mes y medio; con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad (Ascencio, 2005).

6.2.5 Crecimiento de plantas

Los embriones que germinaron al mes y medio se seleccionaron y se pasaron a medio de crecimiento, compuesto como el medio MG pero sin la adición del Floridzin y el AG₃, mas carbón activado 3g/L y vertido en tubos

de ensayo. En las condiciones de luz y temperatura mencionadas anteriormente en el proceso de germinación de embriones.

6.3 Análisis de datos

Los datos de los experimentos se analizaron por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal - Wallis aplicada, mediante el paquete estadístico SAS®, considerando un valor de $P \leq 0.05$ como diferencia significativa.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Inducción de embriogénesis somática en integumentos de semillas inmaduras (ISI)

En total se trabajó con 800 integumentos y se incubaron durante dos meses, se observó que durante este periodo no se presentaron cambios en los integumentos inmaduros; para mantener fresco el medio, se hizo cambio de éste cada 30 días. Después de 4 meses de incubación la mayoría de las semillas no desarrollaron callo en el integumento (Figura c), la sarcotesta fue la única que lo presentó (Figura 4b).

La mayor parte de semillas mantuvieron la forma, el tamaño y el color (blanco), semejante al que presentaban al inicio de la inducción de la embriogénesis somática (Figura 4a); mientras que las semillas de la línea RC3 13, las cuales mostraron desorganización celular, adquirieron un color verde-blanco y aumentaron de tamaño, mantuvieron la forma de semilla y el callo circundante (Figura 5). El resto de las semillas sólo mostró pequeños cúmulos de células desorganizadas (Figura 4b).

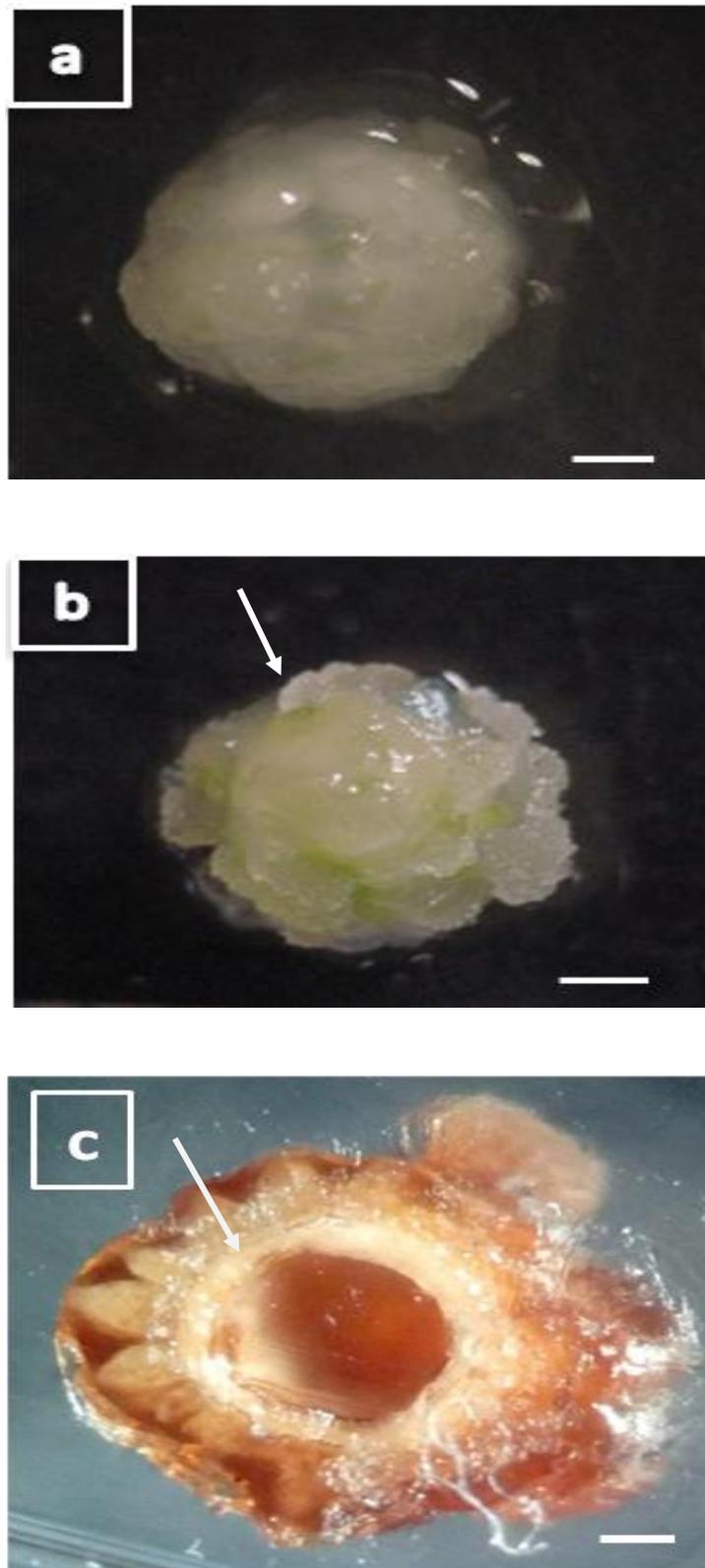


Figura 4. Sarcotesta de semillas de híbridos de papaya tras dos meses en inducción de ES. **a** sin callo. **b** pequeños cúmulos de células desorganizadas alrededor de la sarcotesta (flecha). **c** Integumento sin la formación de callo (flecha) Barra = 1.0 mm

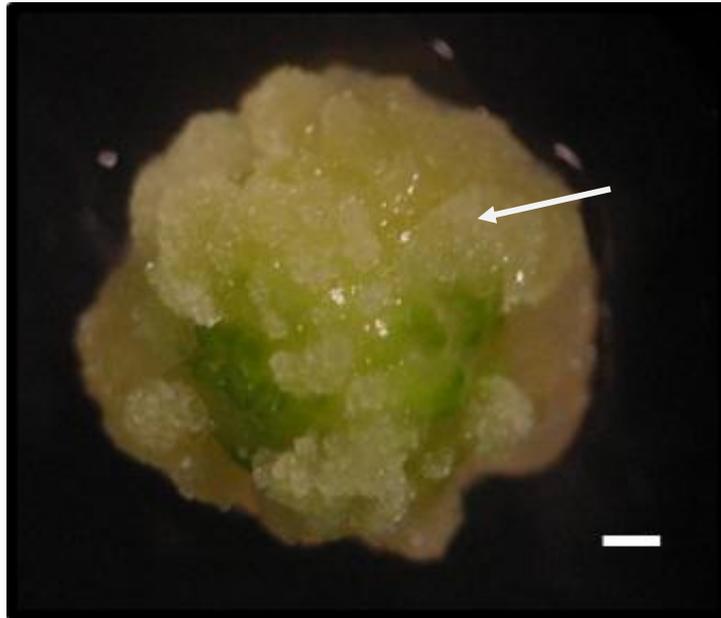


Figura 5. Callo alrededor de la sarcotesta (flecha), línea RC3 13.
Barra = 1.0 mm

Las semillas que no formaron callo adquirieron un ligero color marrón (Figura 6), el resto se contaminó. Se aplicaron 300 mg/L de Rifampicina al medio de cultivo para recuperar las semillas contaminadas por bacteria, más de la mitad sanearon, sin embargo estas siguieron sin mostrar indicios de callogénesis.

Las líneas T1P4, RC4 33, RC3 72 fueron inducidas a embriogénesis somática nuevamente, debido a que se perdieron por contaminación fúngica. Sin embargo se presentó un patrón similar de contaminación y no hubo desdiferenciación celular. La contaminación se pudo deber en parte a que no se realizó un adecuado manejo aséptico en la extracción de semillas del fruto; se observó que al guardarlas en los frascos en el refrigerador a 4 °C no

presentaron hongo, hasta el momento en que las condiciones fueron adecuadas para su desarrollo.

Se encontraron diferencias significativas (Kruskal – Wallis, $P \leq 0.05$) para la formación de callo, fue el medio M1 con una concentración de 2,4-D de 4 mg/L el que obtuvo seis veces mas producción de callo que el medio M1 con una concentración de 2mg/L de 2,4-D (Figura 7).

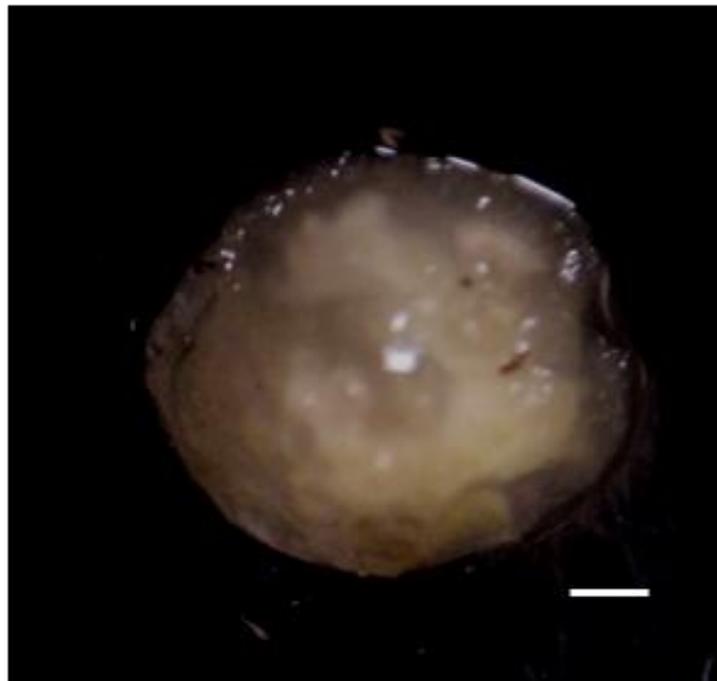


Figura 6. Obscurecimiento de semilla inmadura. Barra = 1.0 mm

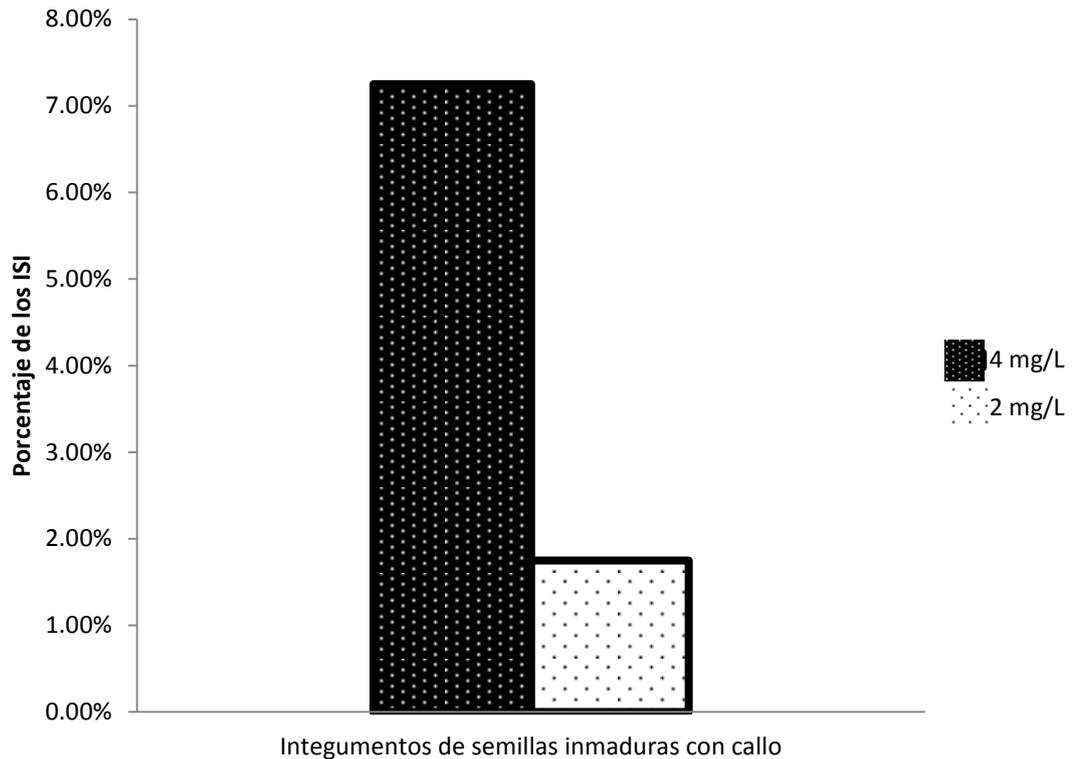


Figura 7. Porcentaje de integumentos de semillas inmaduras con producción de callo en medio M1 con dos concentraciones de 2,4-D (4 mg/L y 2 mg/L).

Monmarson y col. (1995) trabajaron con integumentos de semillas inmaduras de *Carica papaya* L, mientras Cadavid-Ruíz y col. (2006) trabajaron con dos clones de caucho (*Hevea brasiliensis*), ambas investigaciones se enfocaron en la inducción de embriogénesis somática en los integumentos de semillas, sin embargo obtuvieron bajos porcentajes (3-4%). Los datos que ellos reportan confirman que los explantes de ISI si son embriogénicos, y que si se puede regenerar plantas a partir de ellos. Mientras que los resultados de este trabajo indican que la formación de callo se dio en la sarcotesta y no en los integumentos.

Lin (2012); Cornejo-Rodríguez (2009); Farzana y col. (2008); Malabadi y col. (2001); y Fernando y col. (2001) realizaron trabajos relacionados con la inducción de embriogénesis somática en papaya utilizando diferentes concentraciones de 2,4-D; todos los trabajos convergen en que este regulador de crecimiento es un inductor factible de la ES en diferentes explantes como hojas foliares, embriones cigóticos e hipocótilos. En este trabajo se evaluaron 2 concentraciones de 2,4-D, el medio M1 con 4mg/L fue el más efectivo para iniciar la formación de callogénesis, alcanzando porcentajes más altos que los integumentos inmaduros que se encontraban con 2mg/L. En base a este resultado se utilizó el medio M1 con 4 mg/L de 2,4-D, para la inducción de embriogénesis somática en los explantes de embriones cigóticos maduros.

Monmarson y col. (1995) mencionan la importancia del uso de los integumentos de las semillas para la regeneración de híbridos o líneas de interés que ya han alcanzado las características deseadas; la importancia de este trabajo fue regenerar plantas mediante la embriogénesis somática a partir de tejido materno con la intención de clonar el material ya que éstos provienen de plantas con tolerancia al virus de la mancha anular de la papaya.

A pesar del bajo porcentaje de inducción de embriogénesis somática en los integumentos de los híbridos probados, es necesario realizar experimentación con diferentes concentraciones de 2,4-D y con integumentos con diferentes estados de madurez, ya que Monmarson y col.

(1995) expresan que el integumento inmaduro es una buena fuente de explante y en el caso de papaya el endospermo en estado semilíquido es el apropiado para iniciar con la inducción.

7.1.1 Expresión de embriones somáticos

Las semillas inmaduras de papaya que desarrollaron callo se trasplantaron del medio M2 al medio M3, en el cambio de medio no expresaron la formación de embriones somáticos. Después de 3 meses en M3 (con cambio de medio cada 30 días), los callos de color verde brillante-blanco se tornaron marrón oscuro y causaron pérdidas del material de la línea RC3 13 (Figura 8).

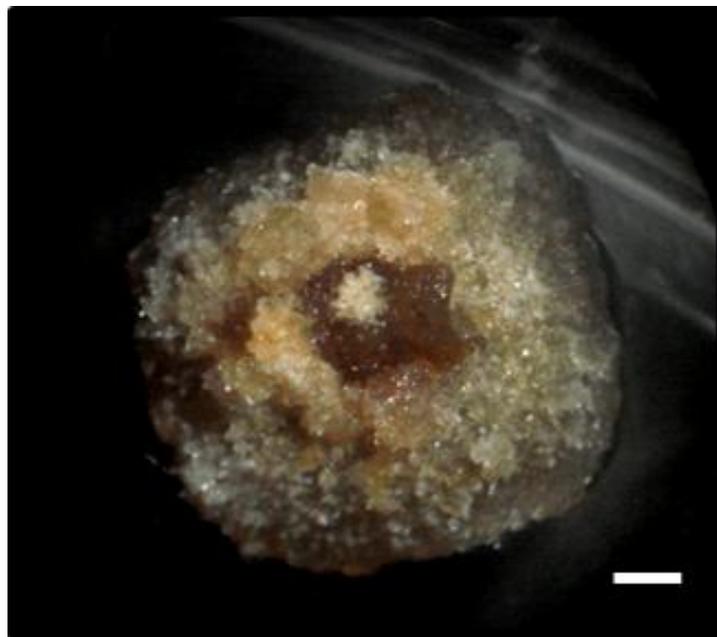


Figura 8. Callo oxidado. Barra = 1.0 mm

Cornejo-Rodríguez (2009) trabajó con explantes foliares de *Carica papaya* L. obteniendo callos de color café-crema y callos blancos, que se volvieron necróticos y no embriogénicos. Cornejo-Rodríguez (2009); y Nevenschwander y Bauman (1991) argumentan que este cambio de coloración se debe a la presencia de sacarosa y que no afecta el proceso embriogénico, sin embargo Cadavid-Ruíz, y col. (2006); y Michaux-Ferrière y Carron (1989) explican que los cambios ocurridos en el callo de los integumentos de las semillas inmaduras puede deberse a compuestos polifenólicos que actúan junto con otros factores como los niveles de hormonas endógenas presentes en la planta, estos factores son los que provocan cambios en la coloración de verde a marrón del callo formado en la sarcotesta y dureza de la semilla, por lo tanto el cambio de coloración y necrosamiento observado en los integumentos de semillas inmaduras concuerdan con lo mencionado anteriormente.

7.2 Inducción de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos maduros (ECM)

En total se utilizaron 750 embriones cigóticos maduros, el 4% (líneas 89 y 90) comenzaron el proceso de inducción de embriogénesis somática en el medio M1 con una concentración de 4 mg/L de 2,4-D.

Los ECM (embriones cigóticos maduros) comenzaron con el proceso de inducción en la embriogénesis somática con un halo blanquecino y espeso alrededor del ECM (Figura 9a), los cotiledones se comenzaron a separar e inició la desdiferenciación celular (Figura 9b). Tras un mes y medio de incubación en el medio M1, se comenzaron a apreciar pequeños cúmulos de células y se formó callo embriogénico lo que indicó el inicio de la ES (Figura 9c).

Se encontraron diferencias significativas (Kruskal – Wallis, $P \leq 0.05$) para la formación de callo, lo cual demuestra que el medio A10 no funcionó para iniciar la inducción de embriogénesis somática en los embriones cigóticos maduros (Figura 10). Confirmando que el medio M1 con 4 mg/L de 2,4-D es efectivo para inducir la formación de callo tanto en la sarcostesta de semillas inmaduras y en los ECM.

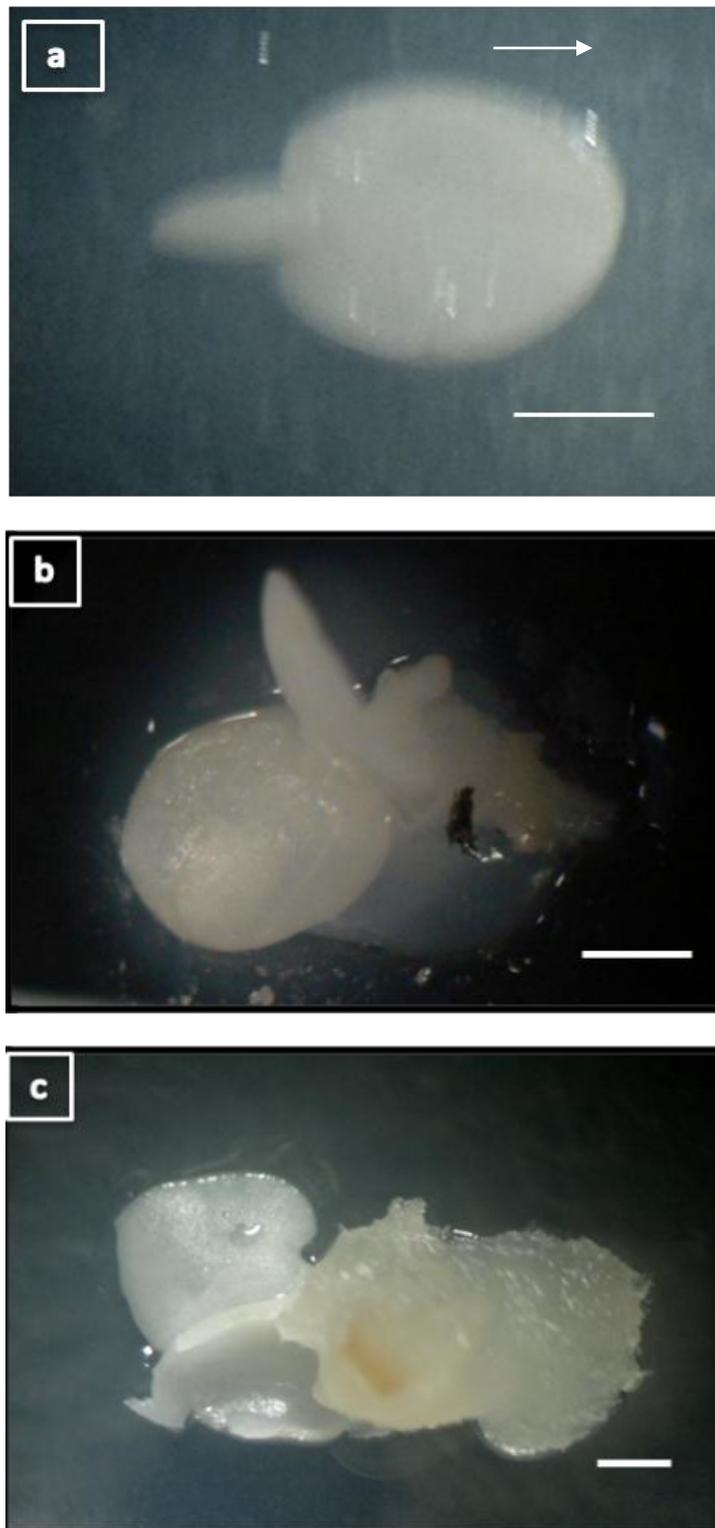


Figura 9. Transcurso de inducción de embriogénesis somática en ECM. **a** embrión cigótico maduro. **b** cotiledones separados (flechas). **c** formación de callo embriogénico. Barra = 1.0 mm

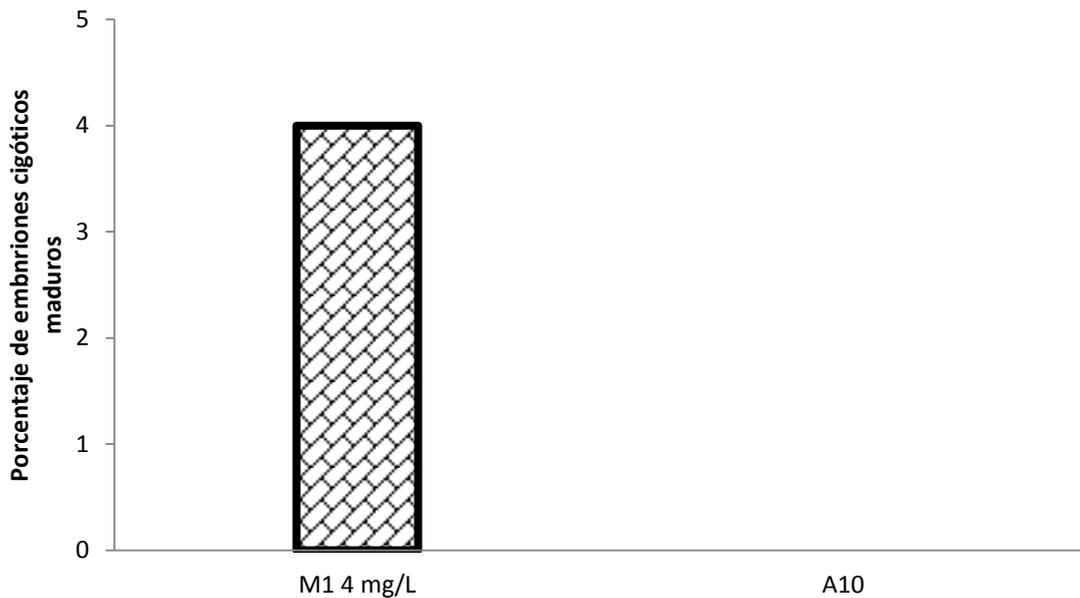


Figura 10. Porcentaje de producción de callo en embriones cigóticos maduros en dos medios, M1 (4mg/L de 2,4-D) y en medio A10 (10 mg/L de 2,4-D).

El 96% de ECM en donde no se indujo la embriogénesis somática fueron trasplantados a medio A10 con una concentración más elevada de 2,4-D (10mg/L) durante mes y medio, esto con la finalidad de probar si una concentración elevada de auxinas lograba iniciar la inducción de ES y observar si estos respondían al tratamiento. Al transcurrir el lapso de tiempo las orillas de los ECM adquirieron un color café-amarillo, se oxidaron y murieron.

.Gutiérrez-Mora, (2002); y Cabrera-Ponce y col. (1995) utilizaron el medio A10 para la inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos, obteniendo formación de callo en los explantes, es por ello que se utilizó este medio para inducir la embriogénesis (10 mg/L de 2,4-D) y estimular las células para la formación de callo. No obstante el medio A10 no logró la inducción y no se observó callogénesis en los embriones cigóticos maduros. Posada-Pérez y Koski (2007); y Fitch y Manshardt (1990) trabajaron con concentraciones altas de esta auxina (de 10 a 25 mg/L) logrando la inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos obteniendo así la formación de callo.

Solo el 4% de los ECM inducidos a la embriogénesis somática dieron los resultados esperados mientras que Malabadi y col. (2011); Posada-Perez y Koski (2007); Fitch y Manshardt (1990), en el que utilizaron embriones cigóticos inmaduros (ECI), reportando que todos fueron viables para la formación de embriones somáticos. Esto se puede deber a que el genotipo influye en la susceptibilidad de la formación de callo en los explantes para la ES de acuerdo a lo que Malabadi y col. (2011) mencionan. Esto concuerda con lo observado, en el que dos líneas híbridas de *Carica papaya* L. var Maradol x *Carica* sp resultaran embriogénicas.

Posada-Perez y Koski (2007) obtuvieron embriogénesis somática en algunas concentraciones menores de 2,4-D (3 y 5 mg/L), donde no fue necesario la callogénesis, que pasó a embriogénesis somática directa, sin embargo

Malabadi y col. (2011) mencionan que el proceso de formación de callo es importante para la embriogénesis somática.

Lin (2012) utilizó ECM sin lograr la inducción de embriogénesis, debido a que los embriones tenían más de 6 meses de almacenamiento en refrigeración, por lo que se volvieron añejos y de difícil inducción, esto supone que si se utilizaron los ECM como explante inicial para la ES, estos deben de ser embriones que no hayan sido almacenados por un periodo de tiempo prologando, ya que en este trabajo se utilizaron como explante, y demostraron ser explanes viables para la regeneración de plantas.

7.2.2 Expresión y maduración de embriones somáticos

En los callos embriogénicos de las líneas 89 y 90 en el medio M2 tras 2 semanas, se hicieron notorias los cambios en la diferenciación del estado de torpedo del embrión somático, los cotiledones comenzaron su desarrollo, en algunos embriones, se formaron más de un par de cotiledones, se elongaron verticalmente y tomaron forma de embrión maduro (Figura 11a). Transcurrido el mes y medio, cuando se pasaron al medio M3, los embriones se encontraban en la etapa de maduración. Fueron seleccionados cuando el embrión fuera de un color marfil o ligeramente verde, los cotiledones se separaron y sin la presencia de múltiples cotiledones, la raíz no presentó callo y sin embriones fusionados (Figura 11b).

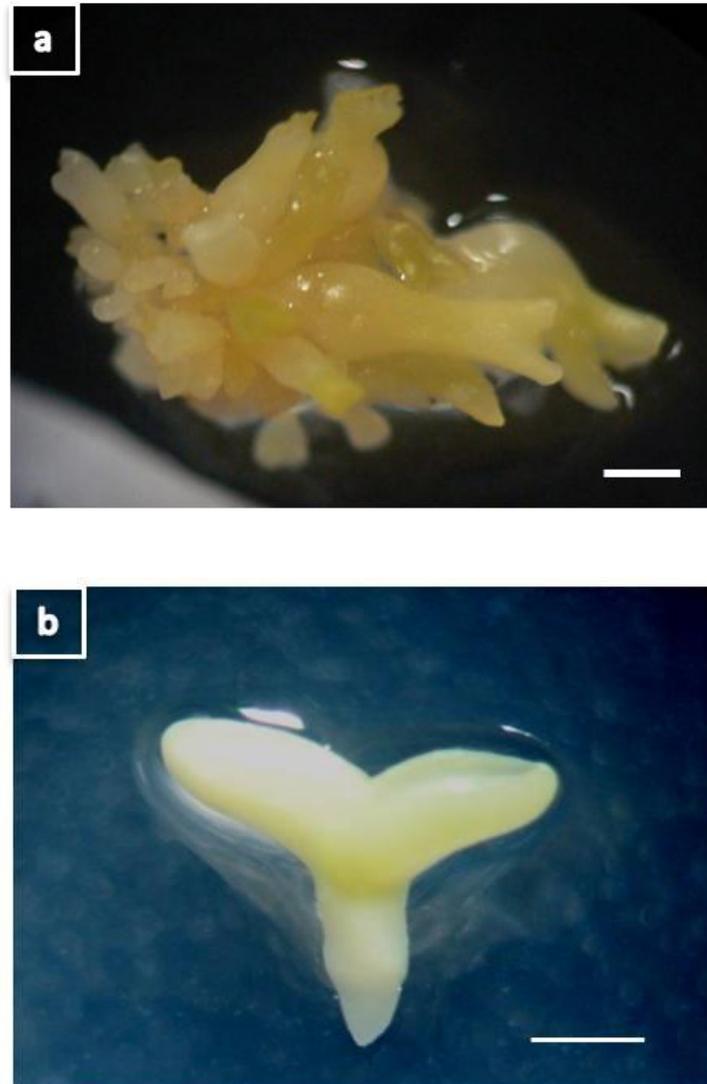


Figura 11. Embriones somáticos. **a** embriones en fase de torpedo maduros, embrión en estado de corazón (flecha). **b** embrión completamente maduro. Barra = 1.0 mm

Cornejo-Rodríguez (2009) no observó cambios en los embriones en la fase de maduración, esto se debió a que no adiciono ácido abscísico (ABA) al

medio de cultivo, esto confirma que este regulador de crecimiento es importante y fundamental para la maduración de los embriones somáticos.

7.2.3 Germinación de embriones somáticos y crecimiento de plántulas

Se lograron obtener embriones somáticos que germinaron (Figura 11a) en el incubador con diferente tipo de luz, lámparas de amplio espectro; después de mes y medio, hubo crecimiento de raíz principal y secundaria, aparecieron las primeras hojas verdaderas (Figura 11b), tras un periodo de tiempo de dos meses se observó que al germinar las nuevas plantas adquirieron un color blanco y presentaron senescencia foliar, esto pudo deberse al etileno acumulado en la parte superior del tubo de ensayo. Anteriormente Magdalita y col. (1997) hicieron pruebas en cultivos *in vitro* de nodos de *Carica papaya* L donde confirmaron que la acumulación del etileno es un causante de la senescencia foliar, y que la temperatura, junto con la altura del recipiente son factores que afectan el desarrollo de la planta y la concentración del etileno.

Ascencio-Cabral y col. (2008), evaluaron el efecto del tipo de luz, en la germinación y crecimiento de embriones somáticos, donde el uso de lámparas de amplio espectro fue fundamental para que los embriones somáticos desarrollaran raíz, y el crecimiento fuera viable para el

acondicionamiento a condiciones *ex vitro*. No se realizaron pruebas para observar cual es la temperatura adecuada en la cual el etileno no provocara la abscisión de las hojas, datos que son reportados por Magdalita y col. (1997) en el cuál, quienes evaluaron dos temperaturas (20 y 30 °C) y determinaron que la temperatura más baja fue la más adecuada para el crecimiento óptimo de la planta y con bajo porcentaje de etileno, lo que evitó la pérdida de sus hojas y de su coloración.

Germinados los embriones somáticos con el desarrollo de raíz, tallo y las primeras hojas verdaderas se trasplantaron al medio de crecimiento adicionado con carbón activado para que éste pudiera adsorber cualquier sustancia de desecho generada por la planta o por el medio de cultivo, el cual presentó contaminación, se añadió un antibiótico (Rifampicina® 500 mg/L), que permitió prevenir futuras contaminaciones por bacteria.

Anteriormente se había demostrado que la adición del Floridzin, AG₃ y el Difco® Bacto agar en combinación de la luz de amplio espectro en la incubación se obtuvieron resultados óptimos de embriones con baja frecuencia de embriogénesis secundaria, sin callo en la raíz, y sin hiperhidricidad (Lin, 2012 y Ascencio, 2005), parámetros que fueron tomados en cuenta en este trabajo.



Figura 12. Embriones somáticos germinados **a.** Embriones germinados. **b.** primera hoja y raíces largas. Barra = 1.0 mm

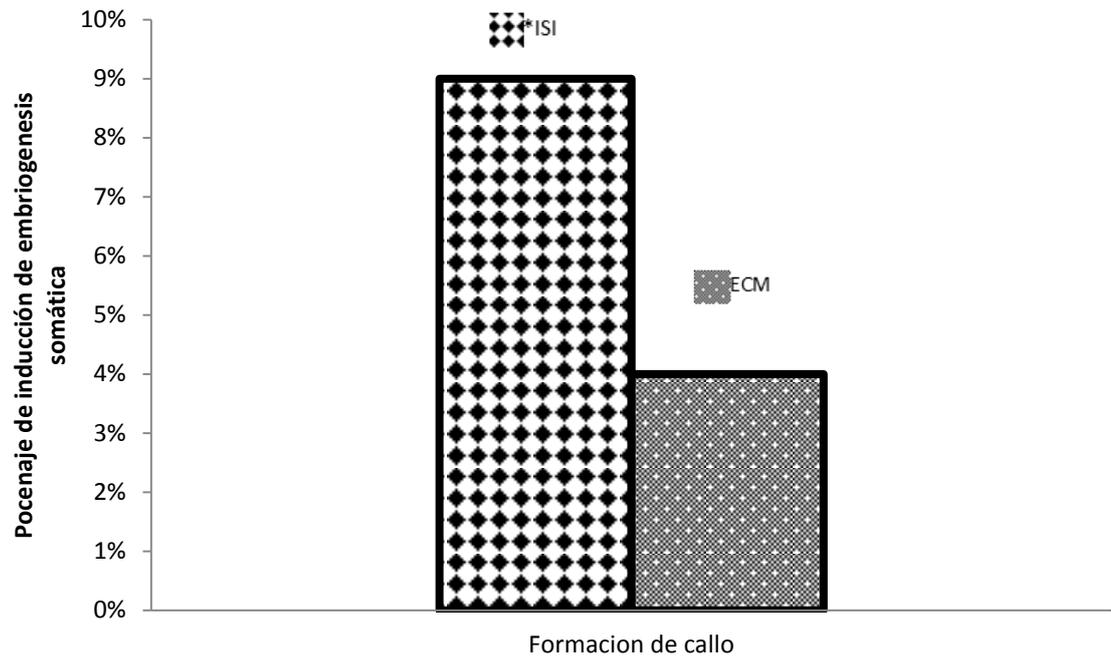


Figura 13. Porcentaje de inducción de embriogénesis somática. En ECM (embriones cigóticos maduros) *ISI (Integumentos de semillas inmaduras) formación de callo en sarcostesta.

8. CONCLUSIONES

Los embriones cigóticos maduros son aptos para la regeneración de plantas de papaya a través de la embriogénesis somática.

El medio de cultivo M1 con concentración de 2,4-D de 4 mg/L resultó efectivo para la inducción de embriogénesis somática en ambos explantes.

El genotipo influye para que los explantes de híbridos de papaya puedan ser inducidos a la embriogénesis somática.

El callo no embriogénico en los integumentos de semillas inmaduras se indujo en la sarcotesta.

El tipo de explantes, el genotipo y otros factores son determinantes para la inducción de la embriogénesis somática para la regeneración en los híbridos de papaya.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, E., y Vincent, E. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico de Investigaciones y Enseñanza. 1-17.
- Ascencio, C. A. (2005). Factores que influyen en la germinación de embriones somáticos de *Carica papaya*. Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias en Procesos Biotecnológicos. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Guadalajara, Jalisco, México.
- Ascencio-Cabral, A., Gutiérrez-Pulido, H., Rodríguez-Garay, B., y Gutiérrez-Mora, A. (2008). Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Sci. Hort.*, 118, 155-160.
- Cabrera, D., Garcia, D., y Portal, O. (2010). Virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-p): Biología, epifitología y diversidad genética como base para el manejo mediante técnicas biotecnológicas. *Biotec. Veg.*, 10, 67-77.
- Cabrera-Ponce, J., Vegas-García, A., y Herrera-Estrella, L. (1995). Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant. Cell Rep.*, 15, 1-7.
- Cadavid-Ruiz, S., Hernández-Rendon, C., Hoyos, S., Medina, S., y Restrepo, L. (2006). Estudios preliminares en la estandarización de un protocolo para la obtención de callos embriogénicos en dos clones de caucho (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) de diferentes orígenes geográficos. *Rev. Col. Biotec.*, 7, 32-47.

-
- Chen, M. H., Wang, P., y Maeda, E. (1987). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue cultures derived from root explants. *Plant. Cell Rep.*, 6, 348-351.
- CONABIO. (2012). Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM), Proyecto de GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad Papaya, *Carica papaya*. Recuperado el 2012, de CONABIO: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20898_sg7.pdf
- Conover, R. (1964). Mild mosaic and faint mottle ringspot, two papaya virus diseases of minor importance in Florida. *Fla. State Hort. Soc.*, 77, 444-448.
- Cornejo-Rodríguez, M. (2009). Inducción de Embriogénesis somática en tejidos foliares obtenidos de plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) in vitro 100% hermafroditas. Zapopan, Jalisco, México.
- CropScience, B. (2012). Problemas (VMAP). (en línea) Recuperado el 03 de Septiembre de 2012. Obtenido de Bayer CropScience: <http://www.bayercropscience.com.pe/web/index.aspx?articulo=350>
- Cruz, M., y Portal, O. (2010). Estrategias para la obtención de plantas transgénicas de papaya con resistencia al Virus de la mancha anular de la papaya (PRSV). *Biotec. Veg.*, 10, 195-207.
- Diaz-Luna, C. L., y Lomelí-Sención, J. A. (1992). Revisión del género *Jarilla Rusby* (Caricaceae). *Acta Bot. Mex.*, 20, 77-99.
- FAO. (1999). FAOSTAT, FAO Statistics Division. Obtenido de Crops production quantity: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- FAO. (2010). FAOSTAT, FAO Statistics Division. Obtenido de Crops production quantity: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
-

-
- Fernando, J., Melo, M., Soares, M., y Appezzato-da-Glória, B. (2001). Somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. Brazilian archives of biology and technology, *44*, 247-255.
- Fitch, M., y Manshardt, R. (1990). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell Rep.*, *9*, 320-324.
- Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotec. Veg.*, *4*, 195-209.
- Gil, A., y Miranda, D. (2005). Morfología de la flor y de la semilla de papaya (*Carica papaya* L.): variedad Maradol e híbrido Tainung-1. *Agronomía Colombiana*, *23*, 217-222.
- Gutiérrez-Mora, A. (2002). Micropropagación y Mejoramiento Genético de Papaya (*Carica papaya*) var. Maradol. Trabajo de grado , Doctor en Ciencias en Procesos Biotecnológicos, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Guadalajara, Jalisco, México.
- Gutiérrez-Mora, A., González-Gutiérrez, A., Rodríguez-Garay, B., Ascencio-Cabral, A., Li-Wei, L. (2012). Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations. En K.-I. Sato, *Embryogenesis* (págs. 229-248). Guadalajara, Jalisco: Intech.
- Gutierrez-Rosati, A., Jiménez, C., y Yepez, J. (1999). Embriogénesis somática en "Papayo" (*Carica papaya* Linnaeus) variedad T-101-B. Universidad Nacional Agraria La Molina, Departamento de Biología, Lima, Perú.
- Hernández-Castro, E., Riestra-Díaz, D., Villanueva-Jiménez, J., y Mosqueda-Vázquez, R. (2003). Análisis epidemiológico del virus de la mancha anular del papayo bajo diferentes densidades, aplicación de extractos acuosos de semillas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) y eliminación de plantas enfermas del cv. maradol roja. *Rev. Chapingo Serie Hort.*, *9*, 55-68.
-

-
- Lin, W. L. (2012). Determinación de la variación genética en plantas regeneradas a través de embriogénesis somática utilizando diferentes explantes de papaya. *Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología Vegetal*. Centro de Investigación en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara., Jalisco., México.
- Litz, R., y Jarret, R. (1993). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En *Cultivo de tejidos en la agricultura* (págs. 144-157). Florida, E.U.
- Lloyd, G., y Mc-Cown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 30, 421-427.
- Magdalita, P., Godwin, I., Drew, R., y Adkins, S. (1997). Effect of ethylene and culture environment on development of papaya nodal cultures. *Plant Cell. Tissue and Organ Cult.*, 49, 93-100.
- Malabadi, R., Kumar, S., y Mulgund, G. S. (2011). Induction of somatic embryogenesis in Papaya (*Carica papaya*). *Research in Biotech.*, 2, 40-55.
- Michaux-Ferrière, N., y Carron, M. (1989). Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* the importance of the timing of subculturing. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, 19, 243-256.
- Monmarson, N., Michaux-Ferrière, M., y Teisson, C. (1995). Production of high-frequency embryogenic calli from integuments of immature seeds of *Carica Ppapaya*, L. *Jour of Horti Sci*, 70, 57-64.
- Morton, J. (1987). Fruits of warm climates. En J. Morton, *Carica papaya L.* (págs. 336-346). Miami, Florida, Estados Unidos: Creative Resource Systems, Inc.
-

-
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Nevenschwander, B., y Bauman. (1991). A novel type of somatic in *Coffea Arabica*. *Plant Cell Rep.*, 10, 608-612.
- Noa-Carrazana, J. C., Gonzalez-de-León, D., y Ruiz-Castro, B. S.-R. (2006). Distribution of Papaya ringspot virus and Papaya mosaic virus in Papaya Plants (*Carica papaya*) in México. *Plant Dis.*(90), 1004-1011.
- Peña, B. (2008). Enfermedades virales en el cultivo del papayo (*Carica papaya* L.). *Rev. CitriFrut*, 25, 13-23.
- Perseley, D., y Ploetz, R. (2003). Diseases of Papaya. En R. Ploetz, *Diseases of tropical fruit crops* (págs. 373-412). St. Paul, MN: CABI Publishing.
- Posada-Perez, L., y Koski, R. G. (2007). Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. var. Maradol rojo. *Biotec. Veg.*, 7, 131-138.
- SAGARPA. (2009). *Estudio de oportunidades de mercado e inteligencia e identificación de la Papaya Mexicana e identificación de necesidades de infraestructura logística*. Obtenido de SAGARPA: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudiospromercado/PAPAYA2009.pdf>
- SIAP. (2012). *Anuario estadístico de la producción agrícola. (en línea)*. Recuperado el 03 de Septiembre de 2012. Obtenido de SIAP: [http://www.siap.gob.mx/agricola siap/icultivo/index.jsp](http://www.siap.gob.mx/agricola%20siap/icultivo/index.jsp)
- Teixeira da Silva, J., Rashid, Z., Nhut, D., Sivakumar, D., Gera, A., Teixeira-Souza, M., y Tennant, P. (2007). Papaya (*Carica Papaya* L) Biology and Biotechnology. *Tree and Forest. and Biotech.*(1), 47-73.
- Vegas, G. A. (1996). Control del Virus de la Mancha Anillada de la Lechosa via cultivo de tejidos, protección cruzada e ingeniería genética.
-

Universidad Central de Venezuela Facultad de Agronomía., Maracay.,
Venezuela: Trabajo en grado, Doctor en Ciencias Agrícolas.

Yie, T. S. y Liaw, I. (1977). Plant regeneration from shoot tips and callus of
Papaya. *In Vitro*, 13, 564-568.