CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A. C.

DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS REGENERADAS A TRAVÉS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA UTILIZANDO DIFERENTES EXPLANTES DE PAPAYA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO

ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOTECNOLOGIA PRODUCTIVA

PRESENTA

ING. LI WEI LIN

GUADALAJARA, JAL. JULIO 2012.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A. C.

DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS REGENERADAS A TRAVÉS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA UTILIZANDO DIFERENTES EXPLANTES DE PAPAYA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO

ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOTECNOLOGIA PRODUCTIVA

PRESENTA

ING. LI WEI LIN

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ANTONIA GUTIÉRREZ MORA

DIRECTOR DE PLANTA

DR. ERNESTO TAPIA CAMPOS

ASESOR

DR. BENJAMÍN RODRÍGUEZ GARAY

GUADALAJARA, JAL. JULIO 2012.

AGRADECIMIENTO:

Primero quiero agradecer a mis padres y a mi hermana por sus apoyos incondicionales tanto en aspecto emocional y motivación para tomar esa oportunidad de estudiar una maestría.

Agradezco al programa de CONACYT que otorgó una beca con número 235661 donde apoyó mi estudio de maestría durante dos años.

Cuando llegué a CIATEJ, era como un bebé en la ciencia, gracias a la paciencia de la Dra. Antonia Gutiérrez, las célebres ilustraciones del Dr. Benjamín Rodríguez y la dedicación del Dr. Ernesto Tapia pude empezar a familiarizar la vida en CIATEJ.

Por otra parte, las clases del Dr. Joaquín Qui, Dr. Rodrigo Barba, Dra. Patricia Dupré y del Dr. Gabriel Rincón me ha llevado paso a paso profundizando en el mar de conocimiento tanto en la teoría y la práctica de laboratorio. Gracias a ellos, sentí apoyo durante este proceso de aprendizaje.

Durante ese periodo, los compañeros de laboratorio y colegas, M.C. Manuel, M.C. Víctor Gomez, M.C. Karina, Verónica, Alejandra Guillermina, Ing. Cristóbal Camarena, Alma García, Adrián todos los que estuvimos juntos en el laboratorio y muchas personas más. Gracias por compartir juntos ese tiempo e ilustrarme en la trayectoria de su compañía.

ÍNDICE

ÍNDICE…… 1
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS …… 3
1. RESUMEN ……5
2. INTRODUCCION……...……...6
3. ANTECEDENTES……..…… 8
3.1 GENERALIDADES DE PAPAYA ……..……8
3.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA ……9
3.2.1 INDUCCIÓN PARA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA ……...9
3.2.2 FUNCIÓN DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO……..11
3.2.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN PAPAYA MARADOL ……...12
3.3 VARIACIÓN SOMACLONAL ……14
3.3.1 GENERALIDADES DE LA VARIACIÓN SOMACLONAL……...14
3.3.2 FACTORES DE LA APARICIÓN DE LA VARIACIÓN SOMACLONAL……15
3.3.3 CAMBIOS GENÉTICOS ……...17
3.4 MARCADORES MOLECULARES …….. 18
3.5 EVALUACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA ……...21
4. HIPÓTESIS …….. 23
5. OBJETIVOS--……... 23
5.1 OBJETIVO GENERAL …….. 23
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..……23
6. METODOLOGÍA ……...……24
6.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA ……..…… 24
6.1.1 INDUCCIÓN A LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA UTILIZANDO EMBRIONES CIGÓTICOS DE HIBRIDOS Y MARADOL…… 25
6.1.2 INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA UTILIZANDO HOJAS Y MERISTEMOS COMO EXPLANTE DE *CARICA SP*. Y DE HIBRIDOS ……..28
6.2 EXPRESIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA ……29
6.3 GERMINACIÓN …….. 30

6.4 ADAPTACIÓN *EX VITRO* ……..31
6.5 MULTIPLICACIÓN DE YEMAS AXILARES DE *CARICA SP*…….. 31
6.6 COLECTA DE MATERIAL, EXTRACCIÓN DE ADN 32
6.7 ANÁLISIS AFLP …… 32
6.8 ELECTROFORESIS Y TINCIÓN …… 33
6.9 ANÁLISIS DE DATOS …….. 34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN …… 35
7.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA …….. 35
7.1.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA UTILIZANDO EMBRIONES CIGÓTICOS DE HÍBRIDOS Y PAPAYA MARADOL …… 35
7.1.2 GERMINACIÓN EN INVERNADERO DE LOS HIBRIDOS Y PAPAYA SP ……... 38
7.1.3. EXPERIMENTO FACTORIAL DE LOS HIBRIDOS ……... 38
7.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA UTILIZANDO HOJAS Y MERISTEMOS COMO EXPLANTE DE HIBRIDO Y *CARICA SP*……... 39
7.3 ANÁLISIS DE AFLP …….. 41
7.3.1 ANÁLISIS PRELIMINAR …… 41
7.3.2 ANÁLISIS DE PLANTAS EMBRIOGÉNICAS PROVENIENTES DE DIFERENTE ORIGEN …… 42
7.3.3 ANÁLISIS DE PLANTAS EMBRIOGÉNICAS PROCEDENTES DE UN MISMO DONADOR …… 44
7.3.4 ANÁLISIS DE PLANTA REGENERADAS DE MARADOL CON DOS DONADORES DISTINTOS …… 47
8. CONCLUSIONES …… 50
9. BIBLIOGRAFÍA ..…… 52
10. ANEXOS …… 63

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO 1. Obtención de embriones somáticos de diferentes explantes de papaya …… 14

FIGURA 1. Esquema de trabajo para el análisis de variación genética de embriones somáticos obtenidos a partir de *Carica papaya* var. Maradol, C. *papaya sp*. y líneas producto de retrocruzas de la variedad Maradol X variedad silvestre. …… 25

CUADRO 2. Combinaciones de ácido giberélico (GA_3) con ácido naftalenacético (ANA) y cinetina (KIN) para la inducción de embriogénesis somática utilizando embriones cigóticos de los híbridos…… 26

CUADRO 3. Combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para la inducción de embriogénesis somática utilizando embriones cigóticos de los híbridos. ……..27

FIGURA 2. Microtúnel para desinfección de plantas de papaya …… 29

FIGURA 3. Embrión somático con dos cotiledones libre de embriogénesis secundaria. …… 30

FIGURA 4. Embrión cigótico de híbrido en experimento de inducción a embriogénesis y en germinación *in vitro*. …… 36

FIGURA 5. Regeneración de *Carica papaya* var. Maradol por embriogénesis somática. ……37

FIGURA 6. A) Plántulas de papaya en charola de 60 cavidades. B) Embriones cigóticos sembrados sin desarrollo de callo……38

FIGURA 7. Embriogénesis somática utilizando hojas y meristemos de *Carica sp* y planta híbrida. …….....40

CUADRO 4. Combinaciones de cebadores y niveles de polimorfismo obtenido en individuos de papayas de T1P4 y T3P3 obtenidas por germinación de

semilla en el invernadero…….. 41

FIGURA 8. Dendrograma de agrupamiento (UPGMA), de individuos de papaya Maradol generados a partir de embriogénesis somática utilizando marcadores AFLP (coeficiente Jaccard) …….. 44

FIGURA 9. Dendrograma de agrupamiento (UPGMA), de individuos de papaya sp. generados a partir de embriogénesis somática utilizando marcadores AFLP (coeficiente Jaccard)…….. 46

CUATRO 5. Resultados reportados por diferentes autores, quienes analizaron la relación genética entre diferentes variedades de papaya……. 47

FIGURA 10. Dendrograma de agrupamiento (UPGMA), de individuos de papaya Maradol generados a partir de embriogénesis somática utilizando marcadores AFLP (coeficiente Jaccard)…….....……. 49

1. RESUMEN

La embriogénesis somática es un método eficiente para la micropropagación de plantas, sin embargo, su proceso conlleva distintos factores que provocan variación somaclonal, lo cual no es deseable para una producción clonal comercial. El presente trabajo fue realizado con el propósito de evaluar la variación genética con la técnica de análisis de Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) en plantas de papaya regeneradas por medio de embriogénesis somática indirecta utilizando distintas fuentes de explantes.

En este trabajo, se realizaron dos experimentos: en el primer experimento se utilizaron embriones cigóticos de *Carica papaya* var. Maradol como explantes y en el segundo se utilizaron hojas y meristemos de *Carica* sp silvestre como explantes. En el proceso de inducción de embriogénesis utilizando embriones cigóticos el uso de 2mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) resultó mejor como regulador de crecimiento. Por otra parte, la inducción de embriogénesis somática utilizando hojas y meristemos, el mejor resultado se obtuvo con la combinación de 1mg/L de ácido naftalenacético (ANA), 1 mg/L de cinetina (KIN) y 1mg/L de ácido giberélico (GA_3). Después de 10 meses se obtuvieron plantas regeneradas adaptadas en el invernadero para llevar acabo el análisis de AFLP.

Las mejores combinaciones de cebadores para el análisis de AFLP fueron: E-ACG + M-CTG, E-ACT + M-CAT, E-ACT+ M-CAG. Las plantas de *Carica* sp. regeneradas a partir del mismo explante donador presentaron alta similitud (95%). Por otra parte, cuando se analizaron plantas regeneradas a partir de diferentes explantes donadores en papaya Maradol esta similitud fue menor (87%). Con los resultados se puede considerar que las plantas regeneradas por medio de embriogénesis somática presentan variación genética, sin embargo, ésta no es mayor que cuando se propaga por métodos convencionales.

2. INTRODUCCÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es considerada de origen Americano, específicamente de Centroamérica, entre México y Costa Rica (León, 1987). En el año 2010 en México se cultivaron 16,227 has de papaya, principalmente en los estados de Chiapas, Michoacán, Veracruz y Tabasco con una producción de 616,000 toneladas (SAGARPA, 2010). Las variedades de papaya cultivadas más extensamente en México han sido la criolla o tipo "Cera" y Maradol; sin embargo, las variedades Maradol y Hawaiana son las más demandadas en el mercado de exportación. En 2010, México exportó 123,000 ton con ingresos por 525 millones de dólares americanos colocándose como el primer lugar de exportación a escala mundial. (SAGARPA, 2010).

El virus de la Mancha Anular de la Papaya (VMAP), se ha reportado como el principal factor limitante en este cultivo y se encuentra en todas las áreas donde se cultiva esta fruta. En el mundo, se han desarrollado muchas variedades de *Carica papaya*, sin embargo, la que más se consume a nivel mundial es la variedad Maradol pese a que es la más susceptible a este virus (Cabrera *et al*., 2010).

Actualmente, las técnicas modernas de biotecnología vegetal como el cultivo de tejidos pueden ayudar a solucionar problemas relacionados con la sanidad de las plantas, de esta forma, por medio de la micropropagación se pueden reproducir plantas libres de enfermedades y conservar características deseadas entre otros usos. Existen diferentes métodos de micropropagación tales como organogénesis, proliferación de yemas axilares y embriogénesis somática. El método de embriogénesis somática indirecta puede ser una fuente importante de material biológico para regenerar grandes cantidades de plantas. Esta ventaja se logra al obtener la formación de callo embriogénico, donde se producen grandes cantidades de embriones en tiempo casi continuo.

Sin embargo, algunos autores han reportado la existencia de variación somaclonal en los materiales generados por esta vía (Gesteira *et al*., 2002; Medina

et al., 2007; Sharma *et al.*, 2007). Con respecto a esta variación se ha propuesto que el uso de reguladores de crecimiento utilizados para la formación de callo embriogénico es el principal factor de inducción (Pontaroli y Camadro, 2005; Mohanty *et al*., 2008).

Por otra parte, existen diversas publicaciones científicas que reportan la regeneración de plantas de papaya por medio de embriogénesis somática (Cabrera-Ponce *et al*., 1995, Gutiérrez-Mora, 2002, Bhattacharya *et al*., 2003, Renukdas *et al*., 2003). Sin embargo, estos estudios carecen de análisis de estabilidad genética de las plantas regeneradas. Con el propósito de realizar este tipo de análisis, actualmente el uso de marcadores moleculares se ha reportado útil para detectar la variación generada por el cultivo de tejidos. En este sentido, se han empelado marcadores RAPDs para detectar variación genética en especies como *Cymbopogon flexuosus*.(Bhattacharya *et al*., 2008) y *Glycine max* (L.) Merr (Gesteira *et al*., 2002). Con el mismo propósito, se utilizaron marcadores RFLP para evaluar variación en *Camellia sinensis* (L.) O. Kunttze (Devarumath *et al*., 2002). Los marcadores AFLP (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados) se pueden considerar como la técnica más afín para detectar variación somaclonal (Vendrame *et al*., 1999; Cervera *et al*., 1998; Cabrita *et al*., 2001). Debido a sus características y a que no necesitan información previa de las secuencias, pueden generar grandes cantidades de bandas altamente reproducibles, permitiendo identificar bandas polimórficas entre diferentes individuos.

3. ANTECEDENTES

3.1 GENERALIDADES DE LA PAPAYA

La papaya (*Carica papaya* L.) es una planta de origen americano que se ha extendido por amplias regiones tropicales y subtropicales del mundo, con una producción significativa en Brasil, India, Indonesia, México, Nigeria y Tailandia (Mora-Aguilera *et al*., 1993).

La papaya pertenece a la División Anthophyta, a la Clase Dicotiledonea, Subclase Cloripetala y al Orden Parientales. El género *Carica* comprende cinco especies, entre las más conocidas se encuentran *Carica pubescens* (*C. candamarcensis*), *C. monoica* y el híbrido ecuatoriano *Carica* x *Heilbornii* (Babaco), producto del cruce entre *C. pubescens* y *C. stipulata*; sin embargo, la especie más importante de todas es *Carica papaya* (Papaya) (Guzmán-Díaz, 1998).

Según Morton (1987), común y erróneamente al papayo se le ha considerado como un árbol, aún cuando la planta propiamente dicho es una “hierba alta”, ya que es herbácea, pudiendo crecer en el primer año de 1.8 a 3m y llegar a medir de 6 a 9 m, el tallo mide aproximadamente 30 a 40 cm de diámetro. La papaya es una planta considerada perenne, pero de vida corta. Las hojas parecidas a la palma emergen del tallo, sostenidas por largos pecíolos. Las flores se desarrollan en las axilas de las hojas, teniendo un olor agradable. Los pétalos miden de 2.5 a 5.1 cm (Chia *et al*., 1989). Existen tres tipos de plantas con respecto al sexo: hermafroditas, hembras y machos. La planta hembra siempre producirá flores femeninas por lo cual, si no existen plantas masculinas o hermafroditas cercanas, ésta no produce frutos (Pereira de Araujo, 1987). Por el contrario, en las plantas masculinas que usualmente no producen frutos, en raras ocasiones tienen flores con expresiones femeninas pudiendo producir algunos frutos (Chia *et al*., 1989).

3.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

3.2.1 GENERALIDADES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

En las últimas décadas, se ha presentado un rápido avance en el desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* para el uso en la propagación clonal de plantas. Las técnicas de cultivo *in vitro* permiten lograr vías de regeneración a partir de células o tejidos, reproducibles, aplicables a distintos genotipos y altamente productivas, y generalmente producen un material genéticamente fiel. Básicamente, las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas consisten en el cultivo bajo condiciones asépticas utilizando determinadas porciones de la planta donante denominadas explantes, bajo condiciones de luz ambiental y temperaturas controladas para su desarrollo (Bonga y Park, 2003).

La micropropagación como una alternativa presenta una serie de ventajas frente a las técnicas tradicionales: la multiplicación *in vitro* es más rápida que la multiplicación *in vivo*, en ocasiones permite propagar especies que no pueden ser multiplicadas *in vivo* de forma convencional, permite una multiplicación libre de enfermedades, supone importantes ahorros en combustible, superficie de invernadero, etc. y elimina el efecto estacional, consiguiéndose una producción homogénea a lo largo del año (Hernandez-Sánchez, 2007).

La micropropagación supone la manipulación del explante inicial, de la composición del medio de cultivo (sobre todo nutrientes y reguladores de crecimiento) y de otros factores del cultivo, para tratar de dirigir el crecimiento de los tejidos hacia el desarrollo de respuestas morfogénicas de interés y finalmente, regenerar en un corto periodo de tiempo un gran número de plantas completas, genéticamente idénticas al material de partida, utilizando un espacio físico reducido y con independencia de la época del año. Existe una serie de factores que pueden afectar a la capacidad de regeneración del explante: los que principalmente vienen determinados por las condiciones de la planta madre (la edad y el estado fisiológico de la planta donadora, el tipo de explante y la posición que ocupa en la planta, la época de colección del material vegetal y el genotipo) y los que se refieren a las

condiciones ambientales de los cultivos como la composición del medio de cultivo, el tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento, el volumen del envase, la calidad y la cantidad de luz y la temperatura, entre los más importantes. (Hernández-Sánchez, 2007).

La embriogénesis somática (ES) se debe a la totipotencia de las células, la cual es una característica que teóricamente tienen todas las células vegetales para desarrollar nuevos individuos a partir de una célula (George, 1993; Lackie y Dow, 1989). Es un proceso donde las células somáticas se convierten en estructuras que se asemejan a los embriones cigóticos (estructura bipolar) por medio de una serie ordenada del estado embriogénico sin la fusión de gametos. Hoy en día, es conocido como una de las técnicas para la regeneración de plantas a partir de cultivo de tejidos en condición *in vitro* (Jiménez, 2001).

Steward y Reinert en 1958 lograron inducir, obtener y desarrollar embriones somáticos *in vitro* a partir de tejidos de zanahoria, a esta especie modelo para el estudio de la ES hasta la fecha ha realizado más estudios en diferentes especies.

En la mayoría de las especies, la ES se obtiene a partir de embriones cigóticos inmaduros, sobre todo en coníferas (Klimaszewska y Cyr, 2002). Por ello, una de las limitaciones más importantes por el momento, es que se ha logrado en muy pocas especies la formación de embriones somáticos en tejidos procedentes de individuos adultos, y por tanto con posibilidades de ser seleccionados con fiabilidad. Sin embargo, con el paso del tiempo diversas publicaciones científicas han reportado la inducción de ES a partir de tejidos no embrionarios: por ejemplo en hojas procedentes de plantas jóvenes de *Quercus suber* (Fernández-Guijarro *et al*., 1994), de *Q. rubra* (Rancillac et al., 1996) y de *Q. robur* (Cuenca *et al*., 1999), así como en otras especies como *Ulmus minor* Mill (Conde *et al*., 2004) y *Quercus robur* (Toribio *et al*., 2004).

Existen dos tipos de ES *in vitro*: directa e indirecta. La forma directa implica la existencia de células somáticas predeterminadas a seguir la vía embriogénica y las células del explante primario se desarrollan para formar embriones (Smith y Wood, 1998). La forma indirecta implica la necesidad de una inducción para que las

células sigan la vía embriogénica, tras pasar por una fase celular proliferativa (callo) y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis (Agúndez *et al*., 1999).

La ES presenta una serie de ventajas sobre la organogénesis: se obtienen tasas de multiplicación mayores; los embriones somáticos son estructuras bipolares con meristemos apical y radicular, por lo que no es necesaria la inducción del órgano radicular complementario; lo cual permite conexiones vasculares raíz-tallo perfecta. Los embriones somáticos pueden ser encapsulados, dando lugar a semillas artificiales que permitan, por ejemplo, reforestaciones a gran escala; pueden ser conservados en nitrógeno líquido (crioconservación) más fácilmente que los brotes axilares o adventicios, lo que supone una ventaja para el desarrollo de la propagación clonal (Bonga y Park, 2003).

3.2.2 FUNCIÓN DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO

Una de las etapas más importante en el proceso de ES es la inducción. Para lograr este objetivo se requiere del uso de reguladores de crecimiento. Los reguladores de crecimiento son las fitohormonas vegetales endógenas pero sintetizadas químicamente. En la naturaleza, estas fitohormonas desempeñan diferentes funciones en las diversas etapas de desarrollo de las plantas. Algunas de sus características más importantes son: 1) existen en bajas concentraciones en la planta, generalmente 10^{-3} a 10^{-12} M en el sitio de acción y se inhibe su acción con alta concentración de sí misma; 2) cuando el sitio de síntesis no es el sitio de acción, son transportadas mayormente por el sistema vascular (floema, xilema); y 3) para producir efecto debe existir capacidad de respuesta en el sitio de acción (Öpik y Rolfe, 2005). Existen varios tipos de reguladores de crecimiento entre las que se encuentran auxinas, citocininas, ácido abscísico y giberelinas entre otros.

Las auxinas son conocidas como los agentes responsables para el establecimiento de la polaridad celular. Se considera que el transporte polar de auxinas en el embrión globular temprano es esencial para el establecimiento de la simetría bilateral durante la embriogénesis (Liu *et al*., 1993). Pasternak *et al*. (2002) y Shinoyama *et al*. (2004) propusieron que la auxina (2,4-D) induce un estrés en la

respuesta de las células para poder iniciar la ES. El uso potencial de 2,4-D ha sido reportado como el regulador de crecimiento más eficiente para utilizar en ES en *Eleutherococcus sessiliflorus* (Choi *et al*., 1999)*, Gymnema silvester* (Ashok Kumar *et al*., 2002)*, y Paspalum scrobiculatum,* (Vikrant y Rashid, 2002) entre muchas otras especies.

Las citocininas se utilizan en combinación con auxinas para la inducción de la ES y su principal papel en el proceso consiste en la extensa proliferación de células. En la ES de algunas especies como chícharo, frijol de soya y coronilla varía, la adición de citocininas inhibe el efecto de inducción de la auxina (Lakshmanan y Taji 2000). Aunque para algunas especies como *Zoysia japonica* (Asano *et al*., 1996), *Begonia gracilis* (Castillo y Smith 1997), *Oncidium sp.* (Chen y Chang 2001), el uso de citocininas favorece la inducción a la ES.

Por otra parte, después de la etapa de la inducción a la ES, se utiliza el ácido abscísico para la inhibición de la germinación precoz del embrión somático y genera estímulo para la generación y maduración de los embriones somáticos. Sin embargo, Bozhkov *et al*. (2002) mencionaron que la exposición prolongada a ácido abscísico suprime el crecimiento de las plantas formadas. Una vez obtenidos los embriones somáticos, la adición de ácido giberélico (GA_3) al medio de cultivo favorece y acelera la regeneración y la germinación de los embriones somáticos (Li y Qu, 2002).

3.2.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN PAPAYA MARADOL

Existe información que menciona la obtención de ES a partir de diferentes explantes y variedades de papaya, utilizando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, sin embargo, en ninguno de estos reportes se hace mención de la dificultad para la obtención de embriones somáticos de calidad, tales como la producción de callo en la base del embrión, la posterior degeneración de la raíz una vez que hay regeneración y la hiperhidricidad de la plántula regenerada. Se ha publicado trabajo referente al uso de explantes procedentes de la raíz de la planta de papaya, yema apical, tallo y embriones cigóticos, entre otros, para inducir

la ES en algunos cultivares, así como el uso de reguladores de crecimiento y de diversas fuentes de carbono (Cuadro 1).

Por otra parte, se ha demostrado la inducción de embriones somáticos de papaya procedentes de embriones híbridos inmaduros de *C. papaya x C. cauliflora* (Cuadro 1), que puede llegar a desarrollarse en plantas mediante la manipulación de reguladores de crecimiento y ser transplantadas exitosamente en campo (Chen *et al*., 1991). Por otro lado, se ha reportado que la producción de callos embriogénicos es favorecida con bajas concentraciones de 2,4-D (Cuadro 1) (Monmarson *et al*., 1995).

La obtención de embriones somáticos de papaya y la regeneración a partir de embriones cigóticos variando la concentración de ácido bórico, que es un micronutriente usado en el cultivo de tejidos vegetales se ha reportado por Renukdas *et al*. (2003) y la regeneración efectiva mediante la obtención de embriones somáticos a partir de anteras provenientes de plantas femeninas variando el contenido de sacarosa (Rimberia *et al*., 2005). En el trabajo reportado por Ascencio-Cabral *et al*. (2008), se utilizó floridzin con una concentración de 3 mg/L en el medio de la germinación de los embriones somáticos como regulador de crecimiento con el fin de evitar la vitrificación y la formación de callo embriogénico secundario y de esta manera garantizar un buen resultado en la germinación.

Cuadro 1. Obtención de embriones somáticos de diferentes explantes de papaya.

Papaya cv.	**Procedencia de Explante**	**Referencia**
Sunrise	Raíz, yema apical y tallo.	Chen *et al*., 1987
Solo	Raíz, yema apical y tallo.	Chen *et al*., 1987
Carica cauliflora x Costa rica Red	Embriones cigóticos inmaduros	Chen *et al*., 1991
Solo	Integumentos de semillas inmaduras.	Monmarson *et al*., 1995
Maradol	Embriones cigóticos	Cabrera-Ponce *et al*., 1995
Maradol x *Carica* sp.	Embriones cigóticos	Gutiérrez-Mora, 2002
Washington y Money Dew	Embriones cigóticos inmaduros	Bhattarcharya *et al*., 2003
Money Dew	Embriones cigóticos inmaduros	Renukdas *et al*., 2003
Tainung No.2 y PRSV-CP líneas trasgénicas 16-0-1, 17-0-5 y 18-0-9 gen npt II	Raíces de brotes micropropagados *in vitro*.	Yu *et al*., 2003
Wonder Blight	Anteras	Rimberia *et al*., 2005
Maradol	Embriones cigóticos inmaduros	Asencio–Cabral *et al*. , 2008
Carica papaya L. cv. Rathna	Embriones cigóticos inmaduros	Farzana *et al*., 2008.

3.3 VARIACIÓN SOMACLONAL

3.3.1 GENERALIDADES DE LA VARIACIÓN SOMACLONAL

Las plantas que se originan de un algún tipo de cultivo de tejido vegetal son llamadas somaclones. La variación genética que se puede presentar entre los somaclones es llamada variación somaclonal (George, 1993). Se define como la

variación fenotípica y genética entre plantas propagadas clonalmente a partir de un clon donador simple (Kaeppler *et al*., 2000). La variación somaclonal es de interés práctico debido a su uso potencial en el mejoramiento de plantas; sin embargo, si el principal objetivo es la propagación clonal *in vitro* o la transformación, este tipo de variación es un fenómeno no deseado (Polanco y Ruiz, 2002). Este fenómeno es frecuente en todos los sistemas de regeneración que incluyan una fase de callo, ya sea por organogénesis o a travé de ES (Maniatis *et al*., 1989.).

3.3.2 FACTORES DE LA APARICIÓN DE VARIACIÓN SOMACLONAL

Existen varios factores que son considerados como posibles causas de la aparición de variación somaclonal:

El genotipo: Distintos experimentos han puesto en evidencia que genomas diferentes responden de forma diferente al estrés que supone el cultivo *in vitro*. Popescu *et al*., (1997) concluyeron que el genotipo influyó en forma importante en la ocurrencia de variación somaclonal en el cultivo de callo de fresa. En *Musa* spp., la aparición de variación somaclonal fue específica con el genotipo (Stover 1987; Israeli *et al*., 1991), también por la interacción de genotipo y condición de cultivo (Martin *et al*., 2006). Tanto la frecuencia como el espectro de las variaciones observadas en las plantas regeneradas parecen estar influenciadas por la ploidía del material de partida (Karp, 1991).

Vía de regeneración y tipo de explante: El sistema de regeneración puede ser un factor muy importante en la variación somaclonal (Saito y Suzuki, 1999). Hay una frecuencia elevada de variabilidad en plantas regeneradas a partir de protoplastos, frente a valores menores para plantas regeneradas directamente a partir de otros explantes (Yamagishi *et al*., 1996). La frecuencia de variación aumentaría con el grado de desdiferenciación y desorganización en las fases de crecimiento de los tejidos por los que pasa el cultivo (Rani y Raina, 2000). Los sistemas sujetos a inestabilidad y crecimiento desorganizado demostraron que la variación somaclonal está relacionada con el crecimiento desorganizado (Karp 1994; Sivanesan 2007). Los tejidos altamente diferenciados como la raíz, la hoja y

tallo generalmente producen mayor variación que la yema axilar y el meristermo (Sharma *et al*., 2007). Sin embargo, en plátano, el cultivo de meristemos provocó mayor variación genética (Israeli *et al*., 1996).

Duración y número de subcultivo: La frecuencia de mutaciones producidas por el cultivo *in vitro*, parece aumentar con la duración de los cultivos, como lo demuestran varios estudios (Müller *et al*., 1990; Nehra *et al*., 1992). Rodriguez *et al*., (1998) mencionaron que *Musa spp* después del quinto subcultivo, el porcentaje de la aparición de variación somaclonal fue de 1.3 % y aumentó hasta 3.8 % después del onceavo subcultivo. Bairu *et al* (2006) observaron un incremento de variación somaclonal en plátano después de un progresivo proceso de subcultivo. Sin embargo, en cultivo de chícharos utilizando meristermos mantenidos durante 24 años fue genéticamente estable comparando con el genotipo original (Smýkal *et al*., 2007).

Composición del medio de cultivo: En la composición del medio de cultivo resulta particularmente importante el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento empleados (Nehra *et al*., 1992). Bogani *et al*. (1995, 1996) utilizando la técnica de PCR-RAPDs para el análisis de la variabilidad genética en cultivos de tomate a largo plazo, realizados en medios con distintas concentraciones de auxinas y citocininas, observaron que la composición del medio afectaba a la tasa de variabilidad. También, el uso de 2,4-D en alta concentración para la inducción de callo ha sido considerado como una causa de la variación somaclonal en fresa (Nehra *et al*, 1992), en frijol (Gesteira *et al*., 2002) y en algodón (Jin *et al*., 2008). No obstante, Venkatachalam *et al*. (2007) no encontraron cambio genético en plantas regeneradas de plátano cv. Nanjanagudu Rasabale con RAPD e ISSR como marcador utilizando una alta concentración de benciladenina (BA) o cinetina.

Conocer las causas y orígenes de la variación somaclonal es un aspecto importante para un óptimo aprovechamiento del cultivo *in vitro* ya sea como herramienta para generar diversidad genética, o para cuando se pretende conservar y mantener un genotipo determinado a través de la micropropagación masiva.

3.3.3 CAMBIO GENÉTICO

CAMBIO A NIVEL DE CROMOSOMAS

Cambios generales como variación en el nivel de ploidía, el número de cromosomas y los cambios estructurales representan importantes alteraciones en el genoma y que se generan durante la poliferación y la diferenciación *in vitro*. Ploidía se refiere al número de juegos de cromosomas en una célula. Los organismos poliploides tienen varios conjuntos de cromosomas en el genoma, distinto a los organismos diploides normales (Leal *et al*., 2006). La aneuploidía se refiere a cromosomas individuales en números diferentes al número de cromosomas originales en una especie (Jin *et al*., 2008). Los cambios estructurales se encuentran asociados a deleciones, duplicaciones, inversiones o translocaciones de segmentos cromosomales específicos (Larkin y Scowcroft, 1981; Morgens *et al*., 1984). En general, la alteración estructural cromosómica es observada frecuentemente en las plantas regeneradas (Kaeppler y Phillips 1993).

El uso de diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas y citocininas ha sido demostrado que afectan los números cromosómicos y nivel de ploidía en algunas especies y genotipos (Bairu *et al*., 2011). Altas concentraciones de 2,4-D provocan la generación de ploidía mixta y tetraploide en el cultivo en suspensión de pepino (Ladyzynski *et al*., 2002).

CAMBIOS EN LA SECUENCIA DE ADN.

La variación en la secuencia de ADN como cambio en pares de bases e inserción son predominantes en las progenies generadas por cultivo de tejidos (Jiang *et al*., 2011). Este cambio podría surgir por la desaminación de una citosina metilada a timina. Además, la eficiencia de la replicación de ADN y la capacidad de reparación se altera debido a la reducción de los controles celulares (Phillips *et al*., 1994). Jiang *et al*. (2011), estudiaron con bases moleculares la variación somaclonal en una población de plantas regeneradas a partir de un explante de raíz en condición *in vitro* de *Arabidopsis*. El patrón de la sustitución de base simple fue significativamente diferente a la mutación espontánea encontrada en plantas propagadas sexualmente.

ANTECEDENTES

AMPLIFICACIÓN Y TRANSPOSICIÓN DE GEN

La amplificación genética se refiere a la multiplicación selectiva de secuencias específicas de ADN en el genoma, repeticiones en tandem (repetición de la misma secuencia una y otra vez) en el mismo locus o aquellos dispersos por todo el genoma (Linacero *et al*., 2000). Los elementos transponsables son elementos que tienen la habilidad de transponer a una locación genómica no nativa. En maíz, la extensión de transposon polimórfico en planta generada *in vitro* fue menos importante a pesar de su abundancia en el genoma (Yu *et al*., 2011). Ellos constituyen el 85% del genoma de maíz (Neelakandan y Wang, 2011). La mayoría de los elementos transposables son latentes durante el crecimiento normal y son movilizados bajo condiciones especiales como el cultivo de células (Grandbastien 1998; Hirochika 1993), radiación (Nakazaki *et al*., 2003), presión hidrostática (Lin *et al*., 2006) e infección de patógenos entre otros (Pouteau *et al*., 1994). Los cultivos a largo plazo y subcultivos repetidos activan a los elementos transponsables y provocan inactivación progresiva de los genes en el sitio de inserción (Ozeki *et al*., 1997).

3.4 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores son caracteres que diferencian a un organismo de otro y tienen gran importancia en estudios evolutivos y de variabilidad, usándose principalmente en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos, taxonómicos y mejora genética (Rico–Cabañas, 2005).

Existen tres tipos de marcadores: morfológicos, bioquímicos y moleculares. Los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de métodos de identificación basados en marcadores moleculares que superan casi todas las limitantes de los morfológicos, principalmente las influencias del medio ambiente.

Los marcadores más usados son los análisis de patrones de isoenzimas, microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR), Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP por sus siglas en inglés), Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés), Polimorfismo en la

Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP por sus siglas en ingles), etc. (Azofeifa–Delgado, 2006; Rico–Cabañas, 2005; Ude *et al*., 2002). Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos (Azofeifa–Delgado, 2006).

El análisis RFLP es una técnica usada en los programas de investigación desde los años 1970. Inicialmente fue empleada para el mapeo físico de los adenovirus (Grodzicker *et al.,* 1974) y en la construcción de un mapa genético de ligamiento para humanos (Botstein *et al*., 1980). Valadez y Kahl (2000) definen los RFLPs como la variación en la longitud de los fragmentos de ADN producida por una endonucleasa de restricción específica a partir de ADNs genómicos de dos o más individuos de una especie. En la técnica RFLP, la digestión de ADN extraído se procesa con enzimas de restricción y los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en un gel de acuerdo con su tamaño (Karp *et al*., 1996).

RFLP fue una de las primeras técnicas utilizadas para estudiar la variación somaclonal, por ejemplo, en palma aceitera (Jaligot *et al*., 2002), *Coffea arabica* (Rani *et al*., 2000) y *Camellia sinensis* (Devarumath *et al*., 2002). Sin embargo, Rani y Raina (2000) consideran que la determinación de la posible variación genética mediante estos marcadores también tiene sus limitaciones, ya que resulta difícil determinar las enzimas de restricción específicas que corresponde.

El método de RAPD fue descrito en detalle por Williams *et al*., 1990. Los RAPDs generan un número grande de banda polimórfica y, al contrario de los RFLPs, no requieren de sondas específicas para cada especie y la cantidad de ADN necesaria para el análisis es mucho menor (Phillips *et al.,* 1995). Técnicamente, RAPD ha sido descrito como una versión de PCR utilizando cebadores arbitrarios para detectar la variación de ADN (Weising *et al*., 2005).

El método RAPD ha sido utilizado con éxito para evaluar la relación genética en muchas plantas, por ejemplo, caña de azúcar (Devarumath *et al*., 2007), sorgo (Singh *et al*., 2006) y manzana (Bernardo Royo y Itoiz, 2004). También ha sido utilizado para identificar variación somaclonal en durazno (Hashmi *et al*., 1997), caña de azúcar (Taylor *et al*., 1995), orquídea mariposa (Chen *et al*., 1998) y plátano (Bairu et al., 2006). Como limitación, la técnica también tiene baja reproducibilidad y fiabilidad (Jones *et al*., 1997), también, son menos informativos en comparación con la técnica de Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) (Vos *et al*., 1995).

En cambio, el análisis por AFLP (Vos *et al*., 1995), que es esencialmente la combinación de una digestión con enzimas de restricción, adición de adaptadores y de amplificación por PCR, presenta un grado de reproducibilidad mucho mayor. Los AFLP representan una combinación del poder de RFLP y la flexibilidad de la técnica basada en PCR (Agarwal *et al*., 2008). Este marcador dominante es una herramienta mucho más poderosa que los RAPDs porque permite amplificar secuencias más largas de oligonucleótidos (lo que incrementa significativamente la especificidad), además de que no requiere información previa de la secuencia del ADN (Picca *et al*., 2004).

Los AFLPs son utilizados para estudiar la variación somaclonal inducida durante el cultivo de tejidos tales como café (Sánchez–Teyer *et al*., 2003), *Echinacea purpurea* (Chuang *et al*., 2009), alcornoque (Hornero *et al*., 2001) y plátano (James *et al*., 2004). Sin embargo, esta técnica requiere mayor trabajo de optimización y es relativamente más cara que RAPD (Weising *et al*., 2005).

En papaya se han utilizado distintos tipos de marcadores para una gran cantidad de estudios. Magdalita *et al*. (1997) diferenciaron híbridos mediante análisis de caracteres morfológicos, citológicos y RAPD. Van Droogenbroeck *et al*, (2002 y 2004) utilizaron AFLPs y RFLPs, respectivamente para establecer relaciones filogenéticas entre *Vasconcellea* y *Carica*. Kim *et al*.(2002), estudiaron la diversidad genética entre variedades de *Carica papaya* mediante marcadores AFLPs, logrando obtener mapas de relaciones genéticas del género.

Los marcadores moleculares más utilizados en papaya son los microsatélites y RAPD, los cuales se han aplicado en la determinación del sexo, mediciones de diversidad genética, desarrollo de mapas de ligamiento e identificación de híbridos. Magdalita *et al*. (1997) identificaron híbridos de *Carica papaya X C. cauliflora* mediante RAPD; Parasnis *et al*. (1999) revelaron diferencias específicas del sexo en papayas utilizando microsatélites; Urasaki *et al*. (2000) identificaron marcadores RAPD específicos para papayas hembras y machos.

Por otra parte, el empleo de los microsátelites (SSR) se considera apropiado para detectar y cuantificar la variabilidad genética en *Carica papaya* (Pérez *et al*., 2006) y la determinación del sexo en plantas de papaya (Ma *et al*., 2004; Oliveira *et al*., 2007; Sánchez y Núñez, 2008).

3.5 EVALUACIÓN DE LA VARIACIÓN GENETICA

Kim *et al*. (2002), analizaron la diversidad genética de 63 plantas de papaya de diferente variedades usando marcadores AFLP, encontrando una similitud genética (mientras mayor sea el valor los individuos son más idénticos) promedio de 88%. Entre las variedades más cercanas se observó una similitud máxima de 92.1 % y 91.2 % y mínima de 40 %. Medina *et al*. (2007) tomaron dos plantas de *Hevea brasiliensis* como donadoras de explantes para inducción de ES, analizaron la relación entre 6 plantas regeneradas por ES y su planta donadora usando marcadores AFLP, y encontraron una similitud máxima entre dos plantas regeneradas por embrión somático de 93 %, sin embargo, presentaron una distancia genética enorme entre las plantas regeneradas con su planta donadora, con una similitud de 35 %. Mientras se acerca a 100% las plantas son idénticas.

Por otra parte, en 2009, Esquivel *et al*., realizaron la caracterización molecular de doce plantas de papaya almacenadas en el banco de germoplasma de papaya en Cuba y provenientes de diferentes partes del mundo por medio de la técnica AFLP, ellos encontraron un 73.3 % de polimorfismo en las bandas identificadas y la similitud que existe entre una variedad u otra de papaya máxima

de 80%. Por ello, podemos considerar que la similitud entre una variedad u otra es alrededor de 80 a 88 % como dos variedades distintas.

En 2007, Hernández-Sánchez analizó siete plantas de alcornoque (*Quercus suber* L.) regenerada por ES de una misma donadora con la técnica de AFLP, encontrando una similitud máxima de 87%. Por otra parte, Hornero *et al*. (2001), quienes hicieron análisis de la misma especie reportaron un porcentaje de polimorfismo de 65.3%.

Por otro lado, Camarena 2007 analizó por el método de RAPD 15 plantas que fueron producto de retrocruza dos de *Carica papaya* Maradol y *Carica sp*. Estas plantas que fueron propagadas por método tradicional se encontraron una similaridad máxima de 94.8 % y una similaridad mínima de 82 % entre las plantas analizadas.

4. HIPÓTESIS

La variación somaclonal en plantas de papaya regeneradas por embriogénesis somática no es superior a la encontrada por otros métodos de propagación.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la variación genética en plantas regeneradas a través de ES.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Regenerar plantas de papaya mediante ES.
2. Analizar la variación genética en las plantas regeneradas usando marcadores AFLP

6. METODOLOGÍA

Durante más de 15 años, la Unidad de Biotecnología Vegetal del CIATEJ ha llevado a cabo un programa de mejoramiento genético con el fin de desarrollar plantas de papaya *Carica papaya var.* Maradol tolerantes al virus de mancha anular transfiriendo la tolerancia por medio del método de retrocruzas utilizando *Carica sp*. como fuente tolerante . El presente trabajo se dividió en dos etapas para la inducción de ES.

La primera etapa consistió en el uso de veinte embriones cigóticos de las siguientes líneas: T1P4, T3P3 (producto de la autofecundación de la retrocruza 3 de Maradol y *Carica sp*.), RC434, RC433 (producto de retrocruza 4 de Maradol y *Carica sp*.) y Maradol como referencia.

Tras no obtener embriogénesis en la primera etapa (solo Maradol logró la inducción), se sembraron doce semillas de cada una de las siguientes líneas T1P4, T3P3, RC434RC433 y *C. papaya sp.*) para la germinación *in vivo* con el fin de utilizar hojas y meristemos como explantes.

6.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Para el proceso de ES se utilizaron distintos explantes de los diversos materiales genéticos antes descritos, siguiendo el esquema de trabajo mencionado en la figura 1.

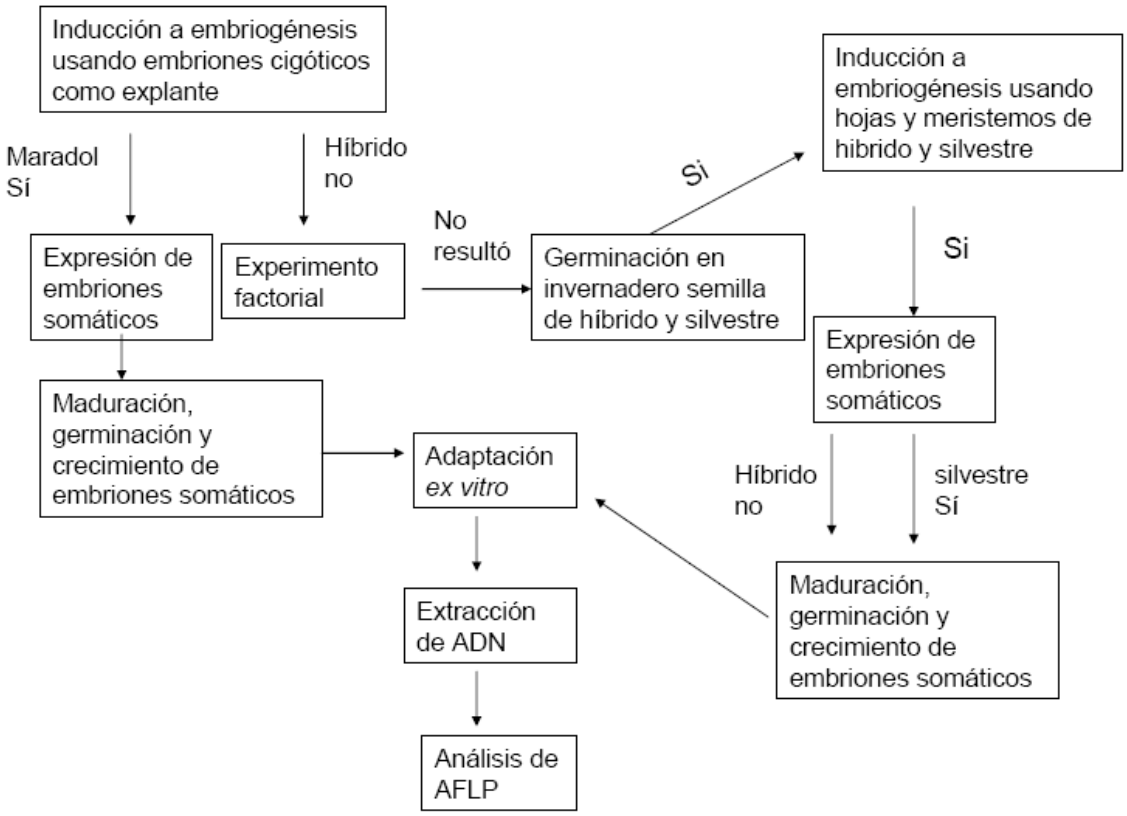

Figura 1. Esquema de trabajo para el análisis de variación genética de embriones somáticos obtenidos a partir de *Carica papaya* var. Maradol, *C. papaya sp*. y líneas producto de retrocruzas de la variedad Maradol X variedad silvestre.

6.1.1 INDUCCIÓN A LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA UTILIZANDO EMBRIONES CIGÓTICOS DE HIBRIDOS Y MARADOL.

Las semillas fueron lavadas con detergente diluido y enjuagado hasta eliminarlo completamente, inmediatamente después fueron sumergidas en solución de hipoclorito de sodio al 6% bajo condiciones asépticas durante 8 min. Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron finalmente con papel absorbente estéril. Los embriones cigóticos fueron extraídos de las semillas desinfectadas ya mencionadas y sembrados en el medio descrito por Gutiérrez-Mora (2002) y Ascencio-Cabral *et al*. (2008) para la inducción de la ES (Medio M1). El medio fue compuesto por la mitad de la concentración de los elementos mayores y menores del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas descritas por Chen *et al*. (1987) (0.5 mg/L tiamina; 1.0 mg/L piridoxina; 5.0 mg/L

ácido nicotínico; 2.0 mg/L glicina; 1.0 mg/L hidrolizado caseína; 100 mg/L myo-inositol), 100 mg/L glutamina, 40 g/l sacarosa, 2.0 g/L Phytagel® y 2.0 mg/L de 2,4-D, el pH se ajustó a 5.7. Se incubaron a 27 ± 2ºC durante un mes, con fotoperiodo de 16 hrs luz-8 hrs oscuridad y una intensidad luminosa de 1300 luxes.

Debido a que no se obtuvieron resultados de inducción a partir de embriones cigóticos de los híbridos (T1P4, T3P3, RC434, RC433) con el medio M1, se realizaron dos experimentos factoriales para la inducción de ES utilizando embriones cigóticos. En el primer experimento se tomó como referencia el medio que utilizó Chen *et al*. (1987) que contenía ácido giberélico (GA_3) en combinación con cinetina y ácido naftalenacético (ANA). Se hizo la combinación de cuatro concentraciones de cinetina (0.25, 0.50, 1.00, 1.50 mg/L) y cuatro concentraciones de ANA (0.50, 1.0, 2,3 mg/L) como se muestra en la Cuadro 2. Se sembraron cinco embriones cigóticos de cada línea en cada combinación y se incubaron durante un mes con las condiciones mencionadas anteriormente.

Cuadro 2. Combinaciones de ácido giberélico (GA_3) (todas las combinaciones contiene 1mg/L de GA_3)con ácido naftalenacético (ANA) y cinetina (KIN) para la inducción de embriogénesis somática utilizando embriones cigóticos de los híbridos.

ANA(mg/L) KIN(mg/L)	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0
0.0	0 ANA 0 KIN	0.5 ANA 0 KIN	1.0 ANA 0 KIN	2.0 ANA 0 KIN	3.0 ANA 0 KIN
0.25	0 ANA 0.25 KIN	0.5 ANA 0.25 KIN	1.0 ANA 0.25 KIN	2.0 ANA 0.25 KIN	3.0 ANA 0.25 KIN
0.5	0 ANA 0.5 KIN	0.5 ANA 0.5 KIN	1.0 ANA 0.5 KIN	2.0 ANA 0.5 KIN	3.0 ANA 0.5 KIN
1.0	0 ANA 1.0 KIN	0.5 ANA 1.0 KIN	1.0 ANA 1.0 KIN	2.0 ANA 1.0 KIN	3.0 ANA 1.0 KIN
1.5	0 ANA 1.5 KIN	0.5 ANA 1.5 KIN	1.0 ANA 1.5 KIN	2.0 ANA 1.5 KIN	3.0 ANA 1.5 KIN

Para el segundo experimento se tomó como referencia el trabajo de Farzana *et al*. (2008) donde se planteó la combinación de cuatro concentraciones de 2,4-D

(1, 2, 3, 4 mg/L) con cuatro concentraciones de ANA (1, 2, 3, 4 mg/L) como se muestra en la Cuadro 3. Se sembraron cinco embriones cigóticos de cada línea en cada combinación y se incubaron durante un mes con las condiciones mencionadas anteriormente.

Cuadro 3. Combinaciones de Ácido naftalenacético (ANA) y Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). para la inducción de embriogénesis somática utilizando embriones cigóticos de los híbridos

ANA(mg/L) 2,4-D(mg/L)	Control	1.0	2.0	3.0	4.0
Control	0 ANA 0 2,4-D	1.0 ANA 0 2,4-D	2.0 ANA 0 2,4-D	3.0 ANA 0 2,4-D	4.0 ANA 0 2,4-D
1.0	0 ANA 1.0 2,4-D	1.0 ANA 1.0 2,4-D	2.0 ANA 1.0 2,4-D	3.0 ANA 1.0 2,4-D	4.0ANA 1.0 2,4-D
2.0	0 ANA 2.0 2,4-D	1.0 ANA 2.0 2,4-D	2.0 ANA 2.0 2,4-D	3.0 ANA 2.0 2,4-D	4.0 ANA 2.0 2,4-D
3.0	0 ANA 3.0 2,4-D	1.0 ANA 3.0 2,4-D	2.0 ANA 3.0 2,4-D	3.0 ANA 3.0 2,4-D	4.0 ANA 3.0 2,4-D
4.0	0 ANA 4.0 2,4-D	1.0 ANA 4.0 2,4-D	2.0 ANA 4.0 2,4-D	3.0 ANA 4.0 2,4-D	4.0 ANA 4.0 2,4-D

Debido a que se presentaron algunos problemas con la inducción de la ES en los embriones cigóticos producto de las autofecundaciones y retrocruzas, se optó por iniciar con otra fuente de explante (hojas, tallos y raíz), por lo que fue necesario germinar semillas en condiciones *in vitro* e *in vivo.* En el caso de la germinación de semillas *in vitro* éstas se desinfectaron siguiendo el proceso de desinfección mencionado anteriormente en la sección 6.1.1, se sembraron en 1/10 de medio MS con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979) en frascos de vidrio. Se hizo un corte en la parte del hipocotilo para facilitar el paso de los nutrientes. Se incubaron durante un mes bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

Por otro parte, para tener una fuente de diferentes explantes en condiciones *in vivo*, se sembraron 25 semillas en invernadero en charolas de unicel de 60 cavidades (como 40 cm^3 cada uno) utilizando semillas de las diferentes líneas

(T1P4, T3P3, RC434, RC433 y *Carica sp*. como referencia). El sustrato (70-30, musgo-vermiculita) se esterilizó en autoclave y después que se enfrió se rellenó la mitad de cada cavidad. Se sembraron doce semillas de cada línea y se rellenó la cavidad con el sustrato. Las semillas sembradas se regaron cada tercer día en el invernadero.

Con la finalidad de adelantar los experimentos en cuanto al tipo de explante a utilizar en sustitución de los embriones cigóticos, como un ensayo preliminar se utilizaron hojas, tallos y raíz de plantas provenientes de ES de la var. Maradol, mismas que se mantenían en condiciones *in vitro*. Estos explantes fueron sembrados en el medio M1 y A-10 (condición idéntica del medio comparando con M1 solo con 10mg/L de 2,4-D) y fueron incubados en las condiciones mencionadas anteriormente.

6.1.2 INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA UTILIZANDO HOJAS Y MERISTEMOS COMO EXPLANTE DE *Carica sp* Y DE HÍBRIDOS

Anteriormente fueron sembradas 25 semillas de cada línea (T1P4, T3P3, RC433, RC434, *Carica sp*), a pesar de la baja tasa de germinación se obtuvo material vegetal de cada línea para utilizar hojas y meristemos como explantes.

Se hizo un proceso de desinfección donde se formó un espacio cerrado como microtúnel y se aplicó fungicida y bactericida cada cuatro días durante una semana. (Figura 2) Posteriormente se cortaron las hojas jóvenes y meristemos apicales. Los explantes se colocaron en una solución acuosa con 300mg/L de rifampicina durante 24hrs en agitación con objetivo de desinfectar (método descrito por Reuveni *et al*., 1990).

Los explantes fueron sumergidos en solución de hipoclorito de sodio al 6% bajo condiciones asépticas durante 8 min. Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y finalmente se secaron con papel estéril para sembrarlos en el medio de cultivo compuesto con la mitad de la concentración de los elementos mayores y menores del medio MS, vitaminas descritas por Chen *et al*., (1987) (0.5 mg/L tiamina; 1.0 mg/L piridoxina; 5.0 mg/L ácido nicotínico; 2.0

mg/L glicina; 1.0 mg/L hidrolizado de caseína; 100 mg/L myo-inositol), 100 mg/L glutamina, 40 g/L sacarosa, 2.0 g/L Phytagel® y añadieron 1mg/L ANA , 1 mg/L cinetina y 1mg/L GA_3, el pH se ajustó a 5.7. Se incubaron a 27 ± 2ºC durante un mes, con fotoperiodo de 16 hrs luz-8 hrs oscuridad y una intensidad luminosa de 1300 luxes.

Figura 2. Microtúnel para desinfección de plantas de papaya

6.2 EXPRESIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

En un experimento, en la inducción de ES se utilizaron embriones cigóticos sólo de la var. Maradol que lograron producir callo embriogénico en el medio M1. Éstos fueron resembrados en el medio M2 (M1 conteniendo 0.02 mg/L de 2,4-D y 0.2 mg/L de cinetina).

Por otra parte, en otro experimento, para la inducción de ES se utilizaron hojas y meristemos como explantes de *papaya sp*. Una vez que se logró la obtención de callo embriogénico, la mitad de éstos se sembraron en el medio M2 y la otra mitad se resembraron en el mismo medio de inducción. Después de un mes todos los explantes se resembraron en medio M3 (medio M2 con la adición de 0.2 mg/L de ácido abscísico) para la expresión de los embriones somáticos. El ácido abscísico (ABA) se esterilizó por filtración y se adicionó al medio de cultivo después

de esterilizado antes de que este gelificara. Los cultivos se incubaron con fotoperíodo de 16 h luz: 8h oscuridad y una intensidad luminosa de 1300 luxes, durante 1 mes en cada uno de los medios mencionados a una temperatura de 27±2ºC.

6.3 GERMINACIÓN

Los embriones expresados en el medio M3, con dos cotiledones sin hiperhidricidad y libres de embriogénesis secundaria (Figura 3), fueron resembrados en un medio de cultivo con la mitad de la concentración de los elementos mayores y menores del medio MS, vitaminas descritas por Chen *et al*. (1987), (0.5 mg/L tiamina; 1.0 mg/L piridoxina; 5.0 mg/L ácido nicotínico; 2.0 mg/L glicina; 1.0 mg/L hidrolizado de caseína; 100 mg/L myo-inositol), 100 mg/L glutamina, 40 g/l sacarosa y 2.0 g/l Phytagel® el pH se ajustó a 5.7 y se esterilizó en autoclave con condiciones anteriormente mencionadas. Después, se agregaron 0.35 mg/L de GA_3 esterilizado por filtración. Además se agregaron 3mg/L de floridzin también esterilizado por filtración. Los cultivos se incubaron a 27 ± 2ºC durante un mes, con fotoperiodo de 16 h luz:8 h oscuridad y una intensidad luminosa de 1300 luxes.

Figura 3**.** Embrión somático con dos cotiledones libre de embriogénesis secundaria. Barra = 1mm.

Una vez germinados los embriones y cuando las plántulas alcanzaron una altura de aproximadamente 1 cm se transfirieron al medio de crecimiento el cual consistió en el mismo medio de germinación pero sin ácido giberélico ni floridzin, agregando 3g/L de carbón activado.

6.4 ADAPTACIÓN A CONDICIONES *EX VITRO*

Cuando las plantas producidas por ES (plantas ES) alcanzaron una altura de 3-4 cm se transplantaron a macetas conteniendo sustrato de mezcla de 70:30 (musgo: vermiculita) previamente esterilizado en autoclave, cubriendo las macetas con bolsas de plástico con el fin de controlar la humedad relativa. Dentro del incubador se abrió una esquina de la bolsa después de una semana del transplante, a la semana siguiente se abrió la otra esquina y tras tres semanas se descubrió la maceta totalmente. Posteriormente se pasaron a condiciones normales de invernadero.

6.5 MULTIPLICACIÓN DE YEMAS AXILARES DE *Carica sp*.

Los meristemos del experimento mencionado en la sección 7.1.2 después de dos meses de incubación formaron yemas axilares y con el fin de conservar la fuente de explantes como hojas y meristemos en condiciones *in vitro*, fueron resembrados en el siguiente medio de cultivo con la mitad de la concentración de los elementos mayores y menores del medio MS, vitaminas descritas por Chen et al., (1987) (0.5 mg/L tiamina; 1.0 mg/L piridoxina; 5.0 mg/L ácido nicotínico; 2.0 mg/L glicina; 1.0 mg/L hidrolizado de caseína; 100 mg/L myo-inositol), se adicionaron los reguladores de crecimiento descritos por Reuveni *et al*. (1990) (0.5mg/L benciladenina, 0.1mg/L ANA y 160 mg/L sulfato adenina), 100 mg/L glutamina, 40 g/L sacarosa, 2.0 g/L Phytagel® El pH se ajustó a 5.7 y se esterilizó en autoclave. Después de 15 días se observó contaminación por bacterias y fueron resembradas en el mismo medio de multiplicación con la adición de 200mg/L de rifampicina.

6.6 EXTRACCIÓN DE ADN

El proceso fue realizado de acuerdo con el protocolo del Genomic DNA Miniprep Kit de Gen Elute Plant de SIGMA utilizando hojas jóvenes de las plantas regeneradas por ES. El ADN obtenido se evaluó su calidad por medio de electroforesis de gel agarosa 1%.

6.7 ANÁLISIS AFLP

El análisis mediante AFLP se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Vos *et al*. (1995), con algunas modificaciones. Se cortaron alrededor de 500 ng de ADN genómico con dos enzimas de restricción, una "frecuente" cortadora *Mse* 1 (2.5 U) y una "rara" cortadora *Eco*RI (2.5 U), en un volumen final de 50 µL por 3 h a 37ºC. El ADN cortado se ligó por 5 h a temperatura ambiente adicionando 10 µL de la mezcla de ligación que contenía 1 U de T4 DNA ligasa (Invitrogen®) y 1 µL de cada adaptador *Eco*RI y *Mse*I previamente alineados.

La amplificación selectiva se efectuó usando el ADN ligado y usando cebadores complementarios a los adaptadores pero con una base selectiva +1 (*Mse* + C y *Eco* + A). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 94ºC por 1 min, 65ºC por 1 min, 72ºC por 1 min y una extensión final de 5 min a 72ºC. El producto de la preamplificación se diluyó 1:5 para usarse en la amplificación selectiva usando cebadores complementarios a los adaptadores pero ahora con tres bases selectivas (*Mse* + 3 y *Eco* + 3). En esta fase se usaron tres combinaciones de cebadores +3. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 94ºC por 2 min y 13 ciclos de 94 ℃ por 1 min, 65 ℃ a 56 ℃ por 1 min (disminuyendo 0.7 ℃ cada ciclo) y 72 ℃ por 1 min; finalmente 26 ciclos de 94 ºC por 30 s, 56 ºC por 30 s, 72 ºC por 60 s. Todas las amplificaciones se desarrollaron en un termociclador Techne® (modelo TC-412).

El análisis preliminar: Para definir las mejores combinaciones de cebadores (*Eco* +3 y *Mse* + 3) a utilizar en el trabajo, se realizó un análisis preliminar empleando ADN proveniente de plantas T1P4 y T3P3 obtenidas por germinación de semilla en el invernadero para probar cuatro combinaciones de cebadores de

las cuales, algunas fueron reportadas por Kim et al. (2002): E-ACG + M-CTG, E-ACT + M-CAT, E-ACT+M-CAG, E-ACT+M-CTG.

Análisis de plantas producidas por ES y provenientes de diferentes donadores de papaya Maradolol: una vez definidas las mejores combinaciones de cebadores, estas fueron probadas en nueve plantas generadas a partir de diferentes embriones somáticos de la variedad Maradol (identificadas como P1 a P9).

Análisis de plantas producidas por ES y provenientes de un solo explante de papaya sp.: se realizó el análisis de AFLP con 20 plantas germinadas por embriones somáticos de la misma planta madre de papaya sp. identificadas como S1 a S20 para evaluar la posible variación somaclonal producto del sistema de propagación empleado. Este mismo procedimiento se realizó en diez plantas producidas por ES de la variedad Maradol provenientes del mismo embrión donador Identificadas como M1 a M10 (con más veces de subcultivo) al igual que seis plantas germinadas de embriones somáticos que provienen dedel mismo embrión donador de papaya Maradol distinto y reciente (Mr1, Mr12, Mr13, Mr2, Mr22, Mr23).

6.8 ELECTROFORESIS Y TINCIÓN

Los productos de PCR generados a partir de la amplificación selectiva para cada combinación se mezclaron con 8 µL de búfer de carga (98% formamida, 10 mM EDTA, 0.05% Xylene cyanol, 0.05% azul de bromofenol), desnaturalizados por 5 min a 95ºC y colocados en hielo. Los fragmentos se separaron en geles de acrilamida al 6 % en una cámara de secuenciación (Sequi-Gen® GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell), cargando 8 µL de la muestra por pozo, usando 1X de búfer TBE, a 50 Watts por 2 h. Después de este tiempo, los vidrios de la cámara se separaron y los fragmentos se visualizaron por tinción con nitrato de plata usando el procedimiento descrito por Bassam y Caetano-Anolles (1993).

6.9 ANÁLISIS DE DATOS

Las bandas observadas para cada combinación de cebadores AFLP se codificaron asignando el valor de 1 a la presencia de una banda dada y 0 a su ausencia; formando así, una matriz de ceros y unos la cuál se utilizó para realizar los análisis correspondientes. El análisis se realizó mediante el uso del paquete computacional Sistema de Análisis Multivariado y Taxonomía Numérica (NTSYS-pc), versión 2.1, en el cual se efectuaron los cálculos de similitud entre las muestras con el programa de Similitud para Datos Cualitativos (SIMCUAL), posterior a esto se construyó un dendrograma por el método secuencial aglomerativo jerárquico y de agrupamiento de anidamientos (SAHN Sequential, Aglomerative, Hierarchical and Nested Clustering Method). Se estimó el coeficiente de correlación cofenética para determinar la veracidad del arreglo de los agrupamientos entre las matrices de similaridad y cofenética (Rohlf, 2000).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

7.1.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA UTILIZANDO EMBRIONES CIGÓTICOS DE HÍBRIDOS Y PAPAYA MARADOL

Después de casi dos meses (55 d) de incubación no se observó la inducción de callo embriogénico, todos los embriones cigóticos de T1P4, T3P3, RC434, RC433 presentaron un color amarrillo y se observó una descomposición del medio donde fueron sembrados (Figura 4A). Alrededor del embrión cigótico se licuó el medio de cultivo, aparentemente se produjo un cambio de pH o la liberación de algún compuesto que provocó dicha descomposición. Se consideraron dos posible causas para la no inducción de callo embriogénico: primero, el estado de madurez de los embriones cigóticos; esto es, en la mayoría de los reportes de ES de papaya en los que se han utilizado embriones cigóticos como fuente de explante han sido embriones cigóticos inmaduros (Chen *et al*., 1991; Cabrera-Ponce *et al*., 1995; Bhattacharya *et al*., 2003) y en este trabajo se utilizaron embriones cigóticos maduros. A pesar de la variedad de explantes que pueden ser utilizados para la inducción de la ES, el estado de desarrollo adecuado de los explantes es un factor crucial para la inducción (Deo *et al*., 2010).

El tipo y la edad del explante tienen un gran impacto, las células jóvenes, en división y menos diferenciadas son más afines para la inducción que las células maduras (Deo *et al*., 2010). Anteriormente las plantas de donde provienen los frutos de los cuales se extrajeron las semillas para la obtención de los embriones cigóticos de T1P4, T3P3, RC434 y RC433 fueron sometidas a evaluación de tolerancia al virus de la mancha anular para ser seleccionados una vez que ya madurara el fruto. Posteriormente fueron almacenados por más de 6 meses en refrigeración a 4℃ antes de ser utilizadas para la inducción. En segundo lugar, es probable que debido a que se trataba de semillas producto de retrocruzas y autofecundación se requiere de ciertos cambios en la composición de medio y/o de la concentración de los reguladores de crecimiento en el medio de inducción. De acuerdo a los resultados, se hizo una modificación en el medio de cultivo y se

realizó un diseño factorial. Kim *et al* (2003) reportaron que solo dos de los cinco híbridos de *Rosa hybrida* L fueron útiles para inducir la ES. MacLean y Nowak (1998), reportaron un fenómeno similar en trébol rojo. Al mismo tiempo, las semillas germinaron en condiciones *in vitro* donde se utilizó un medio que contenía 1/10 de los componentes MS y suplementado con vitaminas L2. Como se puede apreciar en la Figura 4B, la germinación *in vitro* tampoco tuvo éxito. En la gran mayoría se presentó contaminación y ausencia de germinación. Todas las semillas, aún contaminadas, se pasaron a charolas en el invernadero para la germinación *in vivo* en las condiciones mencionadas en el capítulo de material y método.

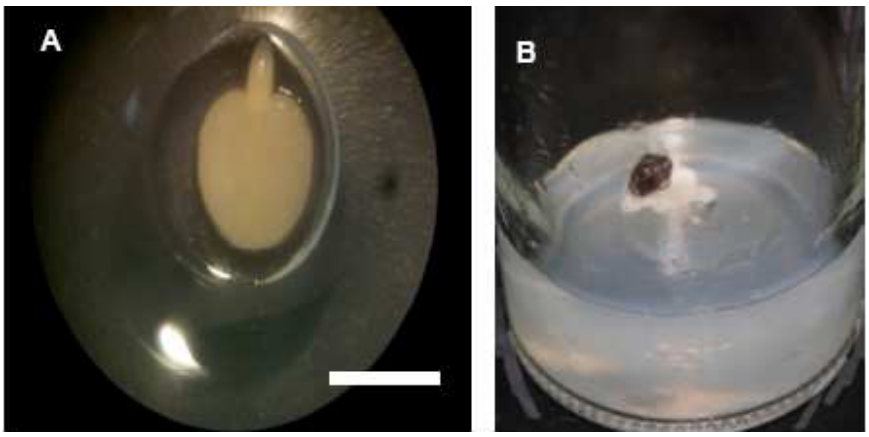

Figura 4. Embrión cigótico de híbrido en experimento de inducción a embriogénesis y en germinación *in vitro*. A) Embrión cigótico de las semillas maduras almacenadas por más de 6 meses, después de sembrar por 2 meses en el medio Barra = 0.5cm. B) Semilla de papaya sembrada en medio Murashige y Skoog 1/10 con vitaminas L2 en la cual se presentó contaminación.

Al mismo tiempo, se realizó el experimento de la inducción utilizando semilla inmadura de *Carica papaya* Maradol comercial, en el cual en el 80% de los embriones después de 1 mes de incubación se logró la inducción del callo embriogénico (Figura 5A) y tras 3 meses siguiendo el protocolo anteriormente descrito, se inició la formación de embriones somáticos (Figura 5B, y 5C). Fue muy importante que se seleccionaran embriones somáticos que estaban libres de masa de callo embriogénico para evitar posteriormente la formación de embriogénesis secundaria.

Los callos embriogénicos fueron resembrados repetidamente durante 2 meses en el medio de expresión (M3) para conservar la fuente de producción de

embriones somáticos. En el medio de germinación, el uso de floridzin permitió disminuir la formación de embriogénesis secundaria y la aparición de hiperhidricidad. Este resultado fue similar a lo reportado por Ascencio–Cabral *et al*.(2008), quienes observaron que por el uso de floridzin en el medio de germinación de embriones somáticos de papaya Maradol, se obtuvo 70% de los embriones germinados sin hiperhidricidad. Los embriones germinados que ya habían desarrollado raíz y con una altura de 1.5 cm aproximadamente fueron resembrados en medio de crecimiento (Figura 5D). Durante 1.5 mes, la plántula se desarrolló hasta una altura de 4–5 cm y algunas con raíces más desarrolladas (Figura 5E y 5F). En algunos casos, durante el desarrollo, en la base de la raíz, se observó la aparición de ES secundaria.

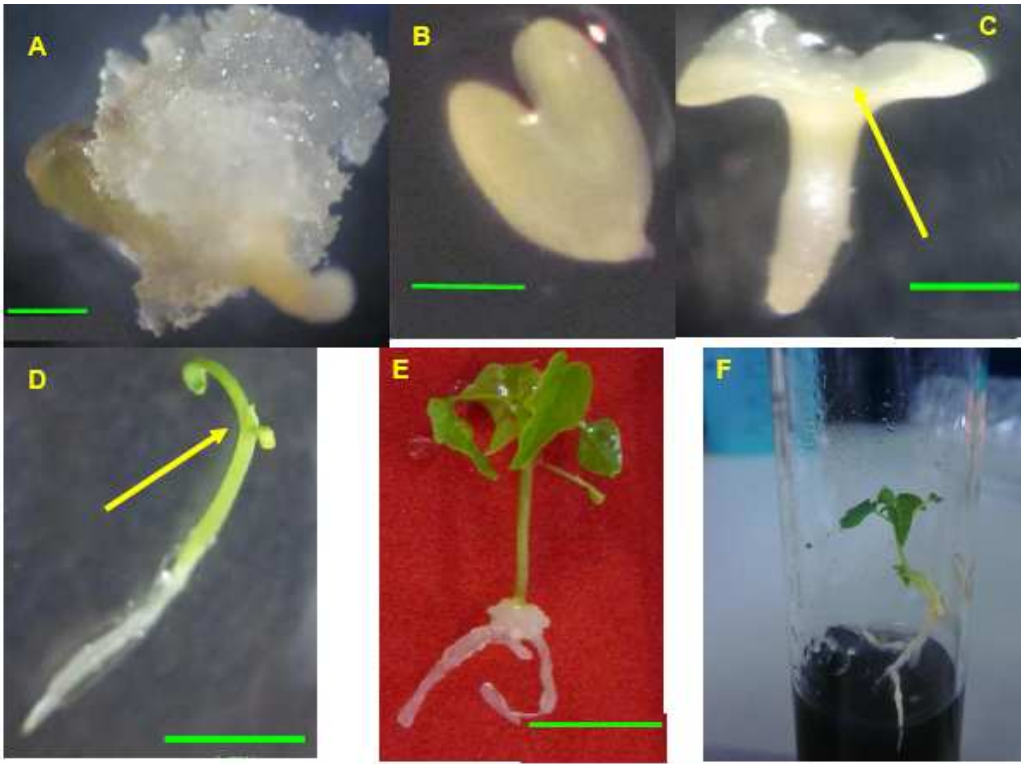

Figura 5 Regeneración de *Carica papaya* var. Maradol por embriogénesis somática. A) Formación de callo embriogénico. Barra =0.5 cm, B) embrión somático en estado de torpedo. Barra =0.5 mm, C) Embrión somático maduro en medio de formación de embrión somático. Flecha amarilla: meristemo apical. Barra = 1 mm, D) Planta germinada en medio de germinación. Flecha amarilla: meristemo apical. Barra = 0.5 cm.E) Planta desarrollada en medio de crecimiento. Barra = 1 cm. F) Planta en medio de crecimiento. Barra =1cm.

7.1.2 GERMINACIÓN EN INVERNADERO DE LOS HÍBRIDOS Y PAPAYA SP.

Por otra parte, las semillas sembradas en charolas de unicel, en condiciones *in vivo* mostraron un bajo porcentaje de germinación (Figura 6A), después de 2 meses sólo germinaron ocho plantas de T1P4, dos plantas de RC433, dos plantas de RC434, tres plantas de T3P3 y seis plantas de papaya sp., debido probablemente a las temperaturas relativamente bajas que se registraron en el invernadero. La temperatura óptima de germinación de semillas de papaya es de entre 24 y 30℃ según Bhattacharya (2001) y las temperaturas registradas fueron de aprox. 18-20℃. Fue evidente que cuando las temperaturas se elevaron, la germinación y el crecimiento fueron mejores.

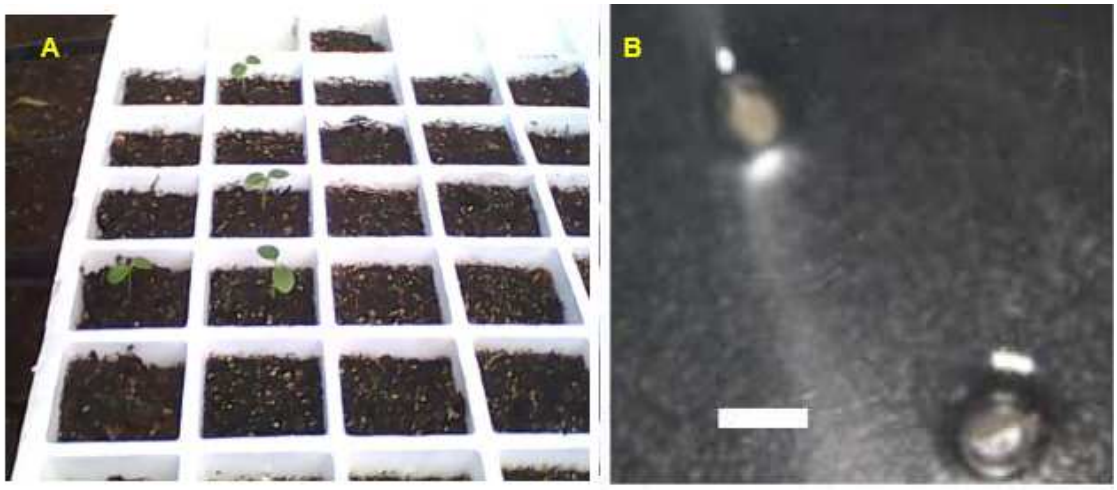

Figura 6: A) Plántulas de papaya en charola de 60 cavidades. B) Embriones cigóticos sembrados sin desarrollo de callo. Barra =0.5cm

7.1.3. EXPERIMENTO FACTORIAL DE LOS HIBRIDOS

Por otra parte, en los dos experimentos factoriales para la inducción de ES con embriones cigóticos diseñado con los reguladores de crecimiento descritos por Chen *et al.* (1987), y los reguladores de crecimiento descritos por Farzana *et al*. (2008) no se obtuvieron resultados favorables. En ninguno de los cincuenta tratamientos (dos experimentos factoriales, cada uno con 25 tratamientos) se logró la inducción. Todos los embriones cigóticos sembrados se marchitaron y tomaron

una coloración amarilla y presentaron una descomposición del medio como se muestra en la Figura 6B. La combinación de reguladores de crecimiento descrito por Chen *et al*. (1987) fue apto para explante como hojas y meristemo, es probable que dicha combinación de reguladores no sea la indicada para la inducción de embriones cigóticos de híbridos. El largo tiempo de almacenamiento de los embriones cigóticos pudo haber sido la causa de este resultado y por otra parte es posible que la combinación de los reguladores no fuera adecuada para lograr la inducción de ES.

7.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA UTILIZANDO HOJAS Y MERISTEMOS COMO EXPLANTE DE HIBRIDO Y *Carica sp*

Con la técnica de desinfección aplicada se obtuvo un 93% de explantes en condición libre de contaminación para la inducción de ES.

En el experimento donde se utilizaron hojas, tallos y meristemos como explantes para la inducción de ES, después de 1.5 mes de incubación se pudo observar la formación de callo en diferentes partes de los explantes tales como pecíolo, borde de la hoja, nervaduras, envés y meristemo (Figuras 7A, 7B y 7C). Sin embargo, a pesar de la formación de callo embriogénico, los explantes hojas y meristemos provenientes de T1P4, T3P3, RC434 y RC433 no lograron producir embriones somáticos tras ser cultivados en los medios de cultivo M2 y M3. En la. *Carica* sp. a los tres meses se obtuvieron embriones somáticos a partir de la formación de callo embriogénico (Figura 7D). Posteriormente, se germinaron todos los embriones provenientes del mismo explante hasta obtener plantas adaptadas en el invernadero y posteriormente se recolectaron hojas jóvenes para realizar los análisis de AFLP (Figuras 7E y 7F).

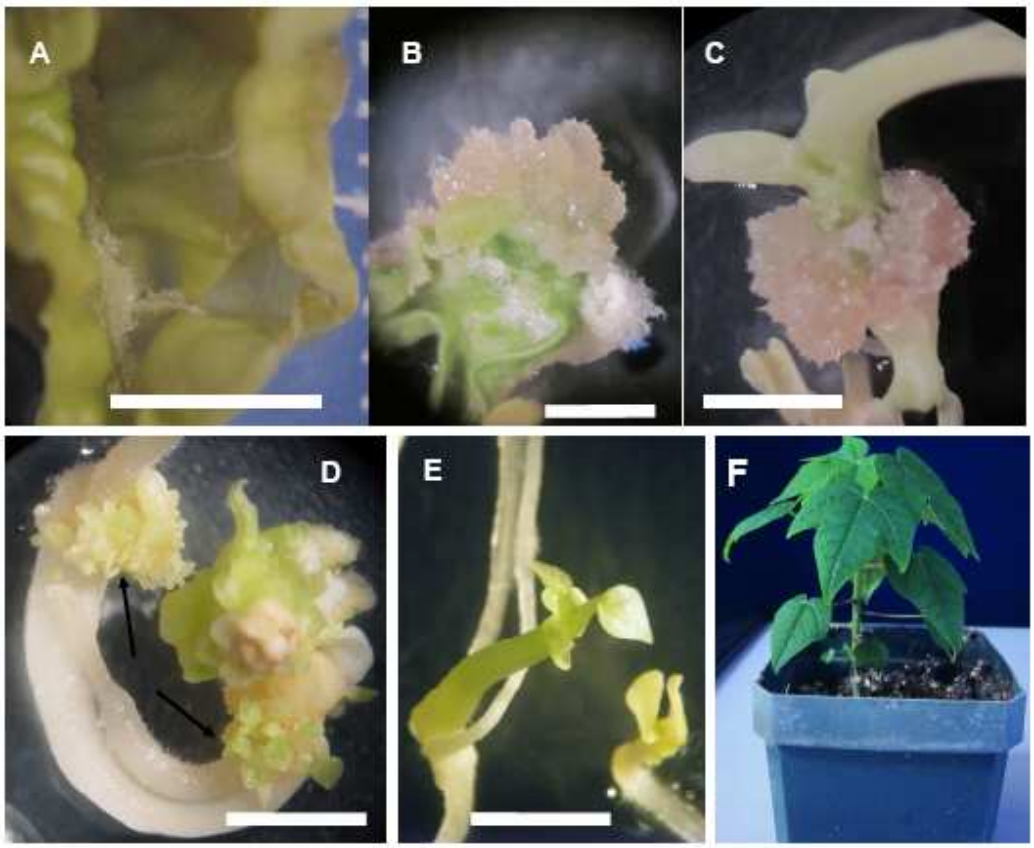

Figura 7: Embriogénesis somática utilizando hojas y meristemos de Carica sp y planta híbrida. A) Formación de callo en las nervaduras de la hoja. Barra =5mm; B) Formación de callo en toda la hoja. Barra =5mm. C) Formación de callo en el meristemo. Barra = 5mm. D) Explante de papaya sp. con embriones somáticos desarrollados (flechas). Barra =5mm. E) Planta germinada. Barra =1cm. F) Planta adaptada para pasar al invernadero.

Para la ES utilizando embriones cigóticos, el protocolo en el que se logró obtener plantas regeneradas fue utilizando los medios descritos por Ascencio–Cabral et al. (2008) que contenía auxina (2,4-D) en el medio de inducción, citocinina y ácido abscísico en el medio de expresión y GA_3 y floridzin para el medio de germinación. En cambio, para la inducción de la ES utilizando hojas, tallo y meristemo se utilizó el medio descrito por Chen *et al*. (1987) con ANA, citocinina y GA_3 (T1P4, T3P3, RC433, RC434 y silvestre). Posteriormente, se utilizaron los medios de expresión y germinación descritos por Ascencio–Cabral *et al*. (2008). De esta manera, solo se logró obtener plantas regeneradas de papaya sp., en los híbridos (T1P4, T3P3) y de las retrocruzas (RC433, RC434) no se lograron obtener embriones somáticos.

Chen *et al*. (1987) en su experimento utilizaron el mismo medio de inducción tanto para la expresión como para la germinación. Después de 3 meses de subcultivo en el mismo medio de inducción se obtuvo la regeneración de plantas. Con la combinación de los dos protocolos se obtuvieron resultados positivos con la papaya sp. pero no con las plantas de híbridos ni retrocruzas. Es probable que para la genética de los híbridos y retrocruzas se requiera otro tipo y/o concentración de reguladores de crecimiento.

7.3 ANÁLISIS DE AFLP:

7.3.1 ANÁLISIS PRELIMINAR:

Para el análisis preliminar para definir las mejores combinaciones de cebadores AFLP a utilizar en todo el experimento se emplearon cinco plantas de T1P4 y T3P3 obtenidas por germinación de semilla en el invernadero y cuatro combinaciones de cebadores (Cuadro 4). La imagen del gel de AFLP se puede ver en el anexo (Figura 1 de anexo).

Cuadro 4: Combinaciones de cebadores y niveles de polimorfismo obtenido en individuos de papayas de T1P4 y T3P3 obtenidas por germinación de semilla en el invernadero.

Combinación	Bandas polimórficas	Bandas totales	% de bandas polimórifcas
E-ACG+ M-CTG	20	53	37.7%
E-ACT + M-CAT	14	55	25.4%
E-ACT+ M-CAG	13	62	21.0%
E-ACT + M- CTG	5	40	13.0%

Con las cuatro combinaciones evaluadas se obtuvo un total de 210 fragmentos, con un promedio de 52.5 fragmentos por combinación y un porcentaje de polimorfismo de 24.7%. La combinación que mayor cantidad de fragmentos genero fue la E-ACT + M-CAG (21% de polimorfismo), sin embargo la combinación E-ACG+ M-CTG fue la que presentó un mayor porcentaje de polimorfismo (53 fragmentos y 37.7% de polimorfismo), seguida de la combinación E-ACT + M-CAT

(con 55 fragmentos y 25.4% de polimorfismo). Aunque el número de fragmentos generados por combinación es importante para definir aquellas combinaciones que más información pudieren arrojar al analizar los datos, el nivel de polimorfismo también es una característica deseable para cualquier técnica de marcadores empleados (Azofeifa-Delgado 2006) El número de fragmentos obtenido con las combinaciones evaluadas coincide con lo reportado en la literatura por Vos *et al*., (1995) quienes reportan que con una combinación de cebadores selectivos se puede obtener de 50 – 100 fragmentos. Por su parte, Pang *et al*. (2006) evaluaron la diversidad genética de 69 accesiones de *Poncirus* con AFLP, reportan en promedio 85 bandas por combinación y en la caso de *Taxus canadienses* (especie de propagación vegetativa) Corradini *et al*. (2002) reportan 79 bandas por combinación. Por otro lado, Esquivél, *et al*., (2009) reporta 71 bandas por combinación en *Carica papaya* L. mientras que Hernández-Sánchez, 2007, reporta 105 fragmentos en promedio por combinación en *Quercus suber* L. En este trabajo, la prueba preliminar demostró que las tres primeras combinaciones (53, 55, 62 bandas) coincidieron con el margen normal de las bandas identificadas por combinación. En cuando las bandas polimórficas, Esquivel (2009) reportó con un 40 % o mayor de polimorfismo *Carica papaya* L. y Kim *et al*., (2002) analizaron 63 accesiones de papaya reportaron que el número de bandas polimórficas varían desde 11 a 36 y es dependiente de las combinaciones. Con base en estos resultados, las siguientes evaluaciones se realizaron solo con las mejores tres combinaciones de cebadores selectivos: E-ACG + M-CTG, E-ACT + M-CAT, E-ACT+M-CAG.

7.3.2 ANÁLISIS DE PLANTAS EMBRIOGÉNICAS PROVENIENTES DE DIFERENTE ORIGEN:

En el primer análisis de las nueve plantas germinadas por embriones somáticos de papaya Maradol sin tomar en cuenta el embrión cigótico de origen, por lo que es posible que varias plantas provenía de mismo donador o todas son proveniente de disitintos donadores. Con las tres combinaciones de cebadores

evaluadas se generaron 160 bandas de los cuales 56 fueron polimórficos, representando un 35 % de polimorfismo. Donde la combinación E-ACG+ M-CTG presentó el mayor polimorfismo. Lo que se parece con lo obtenido en las pruebas preliminares.

Similaridad entre individuos

La matriz de similaridad se recomienda para comparar accesiones cuyas características son evaluadas en una escala nominal o de datos de doble estado (presencia o ausencia) de las características medidas. Los valores que se obtienen de los coeficientes de similitud varían entre uno (1) y cero (0), siendo el valor 1 el de máxima similitud y el valor 0 el de mínima. Entre los índices más usados se tienen 'Simple Matching Coefficient' (SM), Jaccard (J), La distancia modificada de Rogers (R), y Dice (D) y el coeficiente de Nei (N) (Hidalgo, 2003; Mohammadi y Prasanna, 2003). La matriz de similaridad obtenida a partir de los nueve individuos embriogénicos analizados se presenta en la Cuadro 1 del anexo.

La similaridad promedio entre pares de individuos fue de 86.3%, los valores más bajos de similaridad fue entre las plantas 2 y 9 (0.75 de similaridad); mientras que, el valor más alto lo tuvieron las plantas p3 y p8 (0.98). Este fenómeno concuerda con Medina *et al*, 2007, quienes reportan una similitud entre callos provenientes de distintos donadores de *Hevea brasiliensis* de 85 % máximo y 70 % mínimo.

El analisis de agrupamiento realizado en los individuos analizados se presenta en la Figura 8. El análisis de agrupamiento se refiere a un grupo de técnicas multivariadas cuyo principal propósito es agrupar individuos u objetos basados en las características que estos poseen, por lo que aquellos individuos con descripciones similares están matemáticamente insertos en el mismo grupo. El conglomerado resultante de individuos debe exhibir una homogeneidad interna (dentro del conglomerado) alta y una heterogeneidad externa (entre grupos) alta (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Con base en el dendrograma generado a partir de la matriz de similaridad genética (Figura 8) se observa que el individuo p9 fue el que se mostró menos

relacionado con el resto de y de hecho fue el que presentó los niveles de similaridad menores respecto al los mismos. Por otro lado, debido a que no existieron individuos que presentaran un patron de bandas idénticas no hubo plantass que se agruparan a un nivel de similaridad de 1 (lo que indicaria que son idénticos), sin emabrgo, los individuos p3 con p8 y los individuos p4 y p5 presentaron los valores de similaridad más altos (0.98) y en el dendrograma se agrupan muy cercanos.

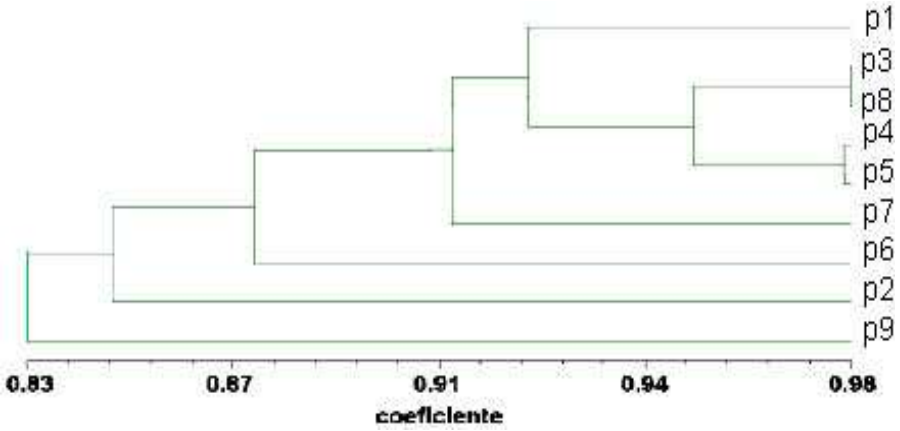

Figura 8. Dendrograma de agrupamiento (UPGMA), de individuos de papaya Maradol generados a partir de embriogénesis somática utilizando marcadores AFLP (coeficiente Jaccard)

Como no tenía control de los donadores de las plantas, se observó una mayor distancia genética, por lo que en los otros experimentos posteriores se establecieron control y distintas medidas para evaluar más específica la variación existente.

7.3.3 ANÁLISIS DE PLANTAS EMBRIOGÉNICAS PROCEDENTES DE UN MISMO DONADOR

Para descartar la existencia de variación somaclonal en los individuos de papaya propagados por ES se procedió a analizar individuos embriogénicos procedentes de un mismo explante donador. En este análisis se estableció bajo las siguientes condiciones para observar mejor la ocurrencia de variación somaclonal.

1. De un mismo origen genético: todas las plantas regeneradas provinieron de una sola planta donadora.
2. Aumentar el número de las muestras: utilizaron veintes plantas como muestras con el fin de ampliar la población analizada y poder proporcionar resultados más coherentes.
3. Condición similar de regeneración: todas las plantas fueron subcultivadas en el mismo medio de cultivo y fueron regeneradas durante un periodo de 6-9 meses.

En este análisis, aparte de las veintes plantas regeneradas de papaya sp., se evaluaron junto con la planta donadora un individuo de la variedad Maradol. Con las tres combinaciones de cebadores evaluadas se generaron 133 bandas de las cuales catorce fueron polimórficos, representando un 10.5 % de polimorfismo. De acuerdo con estos resultados, el uso de esas tres combinaciones de cebadores demuestra que casi no existen variación genética entre las veinte plantas regeneradas respecto a la planta donadora.

Las plantas germinadas por embriones somáticos presentan altas similitudes con la planta donadora, de acuerdo con la dendrograma de agrupamiento generado (Figura 9). Las plantas S20, S6 y S9 presentaron un valor de similaridad del 100% respecto a la planta donadora. La mayoría de las plantas junto con la planta donadora (18 de las 20 plantas) manifestaron una similitud de 95.5% entre ellas (Figura 9) superior a lo reportado por Hernández-Sánchez (2007) con una similaridad máxima de 87% entre plantas regeneradas de alcornoque. Dos plantas (S2 y S12) presentaron los valores más bajos de similaridad (92 %). La similaridad promedio, que se presentó la planta donadora en relación con las 20 plantas regeneradas a partir de ésta fue alto (97.5 %), comparando con Medina *et al.*, 2007, quienes reportan una similaridad máxima de 93 % y mínima de 70 % entre plantas *Hevea brasiliensis* regeneradas de un mismo donador; sin embargo, en su trabajo las plantas regeneradas solo tenía una similaridad de 35 % con la planta donadora. De acuerdo con estos resultados, se considera que no existe variación genética entre la planta donadora y las veinte plantas regeneradas. Por

otro lado, la similaridad promedio de las veintes plantas regeneradas y la planta donadora, manifestaron una similitud de 87.5 % respecto al control externo de la variedad Maradol. Los valores máximos de similitud entre las plantas regeneradas fue de 100 % entre las plantas S6, S9 y S20 así como entre las planta S3 y S5; mientras que, los valores mínimos de similaridad fueron de 90.2 % entre las plantas S12 con planta S3 y S5). En comparación con el análisis anterior, las plantas regeneradas con el mismo donador presentaron mayores similaridades entre todas las plantas y menor variación somaclonal entre sí.

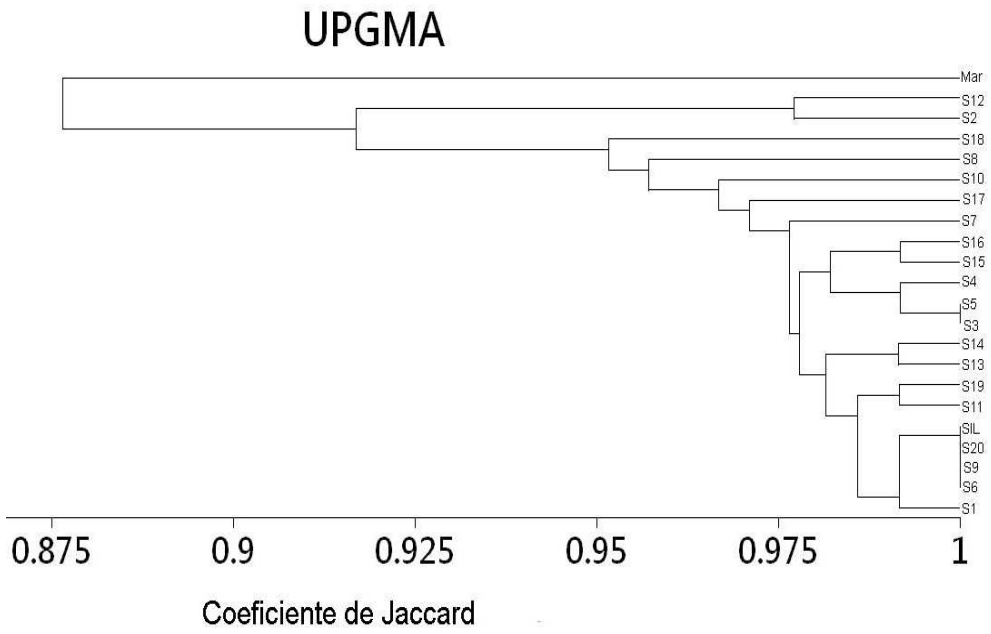

Figura 9. Dendrograma de agrupamiento (UPGMA), de individuos de papaya sp. generados a partir de embriogénesis somática usando marcadores AFLP (coeficiente Jaccard). S1- S20, plantas regeneradas embriones somáticos. Sil: planta donadora, Mar: papaya Maradol regenerado por embrión somático como referencia.

Para discutir los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de similaridad encontrados respecto a lo reportado por otros autores se elaboro el cuadro 5. En el se muestran los niveles de similaridad reportados por tres autores que utilizaron marcadores AFLP en papaya.

Cuadro 5 Resultados reportados por diferentes autores, quienes analizaron la relación genética entre diferentes variedades de papaya.

	Kim *et al*., 2002	Esquivel *et al*., 2009	Van Droogenbroeck *et al*., 2002
Similitud máxima entre diferente variedad	92.1%	78.5%	82.0%
Similitud mínima entre diferente variedad	43.0%	29.9%	30.0%
Similitud máxima entre plantas de misma variedad	100%	No reporta	100%
Similitud mínima entre plantas de misma variedad	90.0%	No reporta	90.0%

La similitud máxima entre las veinte plantas regeneradas fueron de 100% y mínima de 90.2%, similar con lo que reportaron Kim *et al.* (2002) y Van Droogenbroeck *et al.* (2002) y superior con lo que reportó Camarena (2007) que analizó plantas propagada en método tradicional con una similaridad máxima de 94.8% y mínima de 82 % donde esa variación genética es considerada de carácter natural. Por otra parte, se observó una similitud de promedio de 87.5 % con respecto a la variedad Maradol que se usó de control externo valor que fue superior a lo reportado por Esquivel *et al*. (2009) y Van Droogenbroeck *et al*. (2002), quienes reportaron una similitud máxima entre diferentes variedades de 78.5% y 82% respectivamente; y concuerda con lo que reportó Kim *et al*., 2002(92.1% a 43%). Donde se pudo observar que la planta Maradol y las plantas regeneradas de *Carica sp*. presentaron diferencia significativa.

7.3.4 ANALISIS DE PLANTAS REGENERADAS DE MARADOL CON DOS DONADORES DISTINTOS

Al analizar las plantas regeneradas de la variedad Maradol, se obtuvieron 159 fragmentos de los cuales 33 resultaron polimórficos (20.7 % de polimorfismo), con la combinación E-ACG + M-CTG se obtuvieron 47 fragmentos de los cuales 18

resultaron polimórficos (38.3% de polimorfismo) similar a lo obtenido en el análisis de plantas regeneradas de Maradol con distintos orígenes (35% de polimorfismo) usando la misma combinación. Sin embargo, la misma combinación en el análisis de las plantas de papaya sp. sólo identificó cinco fragmentos polimórficos de 36 fragmentos totales.

En general, los tres análisis (nueve plantas de Maradol proveniente de distinto origen, veinte plantas de silvestres con el mismo donador y planta regenerada de Maradol con dos donadores distintos) presentaron bajo porcentaje de polimorfismo (35 %, 18 %, 20.7 % respectivamente) comparado con otros estudios, Hernández-Sánchez (2007) con alcornoque reportó 62.1 %; Medina *et al*., (2007) con *Hevea brasiliensis* 95.4%. Ambos trabajos analizaron plantas regeneradas por ES, sin embargo, el alto porcentaje de polimorfismo reportado por Medina *et al*., (2007), pudo ser causado por los diferentes donadores. Es necesario considerar probar otras combinaciones que probablemente identificaran mayor bandas polimórficas.

El dendrograma generado a partir de plantas embriogénicas provenientes de un mismo donador se presenta en la Figura 10. Las seis plantas de un mismo donador (identificadas Mr) presentaron una similaridad máxima de 100% (entre planta Mr 22 y Mr1) y mínima de 95.8% entre las seis (Figura 10), resultado superior a lo reportado por Medina *et al* (2007) en *Hevea brasiliensis*, quienes reportan una máxima similaridad de 93 % entre seis plantas regeneradas de mismo donador y mínima de 70 %. Por otro lado, las plantas regeneradas provenientes del segundo donador (identificadas con M) presentaron mayor dispersión. La planta M6 y M7 con una similaridad de 100 % y agrupado con M10 y M3 con una similaridad de 96.5% entre sí. Las plantas M8 y M9 tenían una similaridad de 99 % pero estaban más agrupados con las plantas Mr con una similaridad de 98.7 %. Comparando con el cuadro 1, se puede considerar que poseen características de la misma variedad aunque fueron regeneradas de dos donadores diferentes.

Doce plantas de las dieciséis analizadas presentaron una similaridad de 94% con la planta usada como referencia (papaya Maradol germinado por semilla).

Según lo que reportaron Kim *et al*., (2002) y Van Droogenbroeck *et al*., (2002), quienes reportan una similaridad máxima de 100 % y mínima de 90 % entre plantas de misma variedad, se sugiere que estas doce plantas y la referencia mantuvieron las mismas características de Maradol.

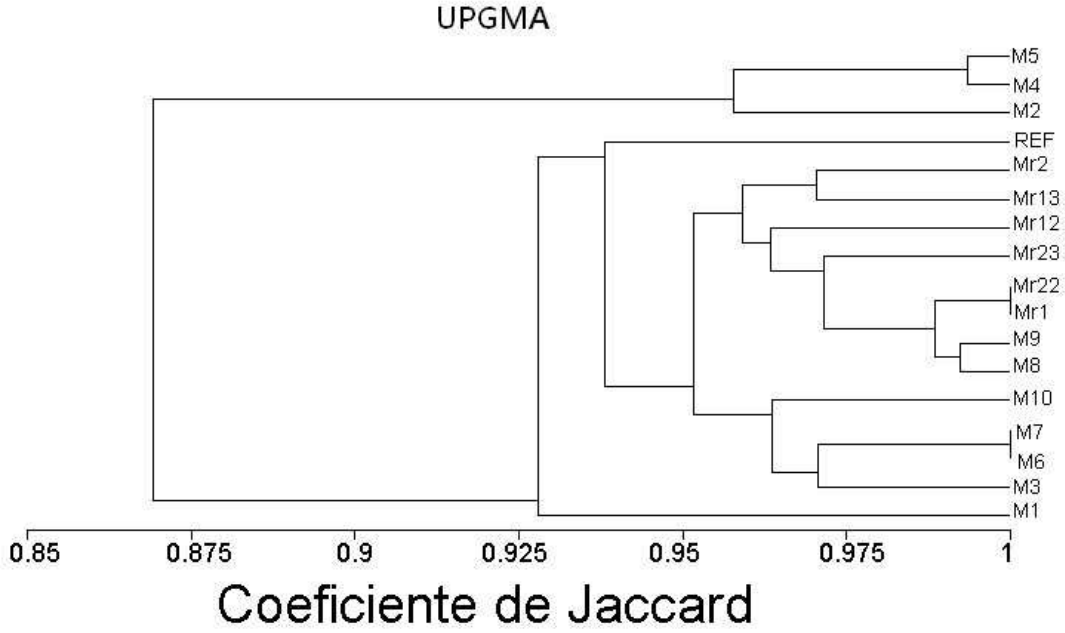

Figura 10. Dendrograma de agrupamiento (UPGMA), de individuos de papaya Maradol generados a partir de embriogénesis somática utilizando marcadores AFLP (coeficiente Jaccard). M1- M10, plantas regeneradas embriones somáticos de mismo donador. Las plantas Mr(1, 12, 13, 2, 22, 23) fueron regeneradas por otro donador. REF: planta Maradol germinado por semilla como referencia.

Las plantas M2, M4 y M5, se encontraron agrupados con una similaridad de 96% pero separado con todo el resto con una similaridad de 87%. De acuerdo con los reportados en cuadro 1, esas plantas pueden ser consideradas como otras variedades debido a la variación somaclonal encontrada. Este resultado pudo haber sido por el largo tiempo de cultivo y gran cantidad de subcultivo como mencionó Nehra *et al*., (1992). Sin embargo, cabe mencionar que la variación genética encontrada al nivel molecular no siempre se traduce en diferencia morfológica o alguna modificación no deseada. García-Águila *et al*., (2007) analizaron morfológicamente más de 6000 plantas del híbrido 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) obtenidas por ES, reportando una ocurrencia de variación somaclonal de 0.015 %. Mientras que otros autores reportaron variación morfológica del 1 hasta el

22 % en plantas obtenidas por cultivo de tejidos atribuible a la variación somaclonal (Shchukin *et al*., 1998, Kosky *et al*.,2006).

8. CONCLUSIONES:

El tipo de explante fue un factor importante para la inducción de ES en las especies estudiadas de tal modo que en el caso de la especie silvestre el mejor explante fue el meristemo, mientras que en el caso de la var. Maradol fueron los embriones cigóticos.

Para la inducción de embriogénesis utilizando embriones cigóticos de Maradol, el mejor medio fue la composición con la mitad de la concentración de los elementos mayores y menores del medio MS, vitaminas descritas por Chen *et al*. (1987), 100 mg/L de glutamina, 40 g/L de sacarosa, 2.0 g/L de Phytagel® y 2.0 mg/L de 2,4-D,..

Para la inducción de embriogénesis utilizando explantes como hojas y meristemos, el mejor medio fue la composición con la mitad de la concentración de los elementos mayores y menores del medio MS, vitaminas descritas por Chen *et al*. (1987), 100 mg/L de glutamina, 40 g/L de sacarosa, 2.0 g/L de Phytagel® y añadiendo 1mg/L de ANA , 1 mg/L de cinetina y 1mg/L de GA_3, con pH de 5.7.

Para la expresión de embriones somáticos, el mejor medio fue con la misma base de medio MS y vitaminas con ácido abscísico 0.2 mg/L, 0.02 mg/L de 2,4-D y 0.2 mg/L de cinetina.

El mejor medio para la germinación fue con la misma base de medio MS y vitaminas con 0.35 mg/L de ácido giberélico esterilizado por filtración. Además se agregaron floridzin 3mg/L esterilizado por filtración.

No se pudo lograr la ES de los híbridos (T1P4, T3P3, RC433, RC434), probablemente por el largo tiempo de almacenamiento de las semillas, o porque los reguladores de crecimiento empleados no fueron los idóneos ya que estos son reportados para la variedad Maradol.

Los individuos embriogénicos de la especie silvestre mostraron similitudes cercanas al 100% respecto al material original por medio del análisis de AFLP, lo que indica una alta estabilidad genética de estos. Por lo que se recomiendan analizarlas con más combinaciones de cebadores y/u otro métododistinto de análisis.

En el caso de los individuos embriogénicos de la variedad Maradol los niveles de variación fueron mayores (similaridad de 95% entre plantas regeneradas con donadores distintos) respecto a los obtenidos en los individuos embriogénicos de la especie silvestre. Esta variación pudiera atribuirse al mayor tiempo de cultivo al que estos explanes fueron sometidos. Sin embargo, las variaciones genéticas encontradas en ambas no fueron superiores a la reportada en *Carica papaya* propagada por métodos convencionales (similaridad máxima de .94.8% y mínima de 82% en papaya reportado por Camarena 2007).

La ES en las especies de *Carica* evaluadas es un método útil para la propagación masiva de material valioso dado que la presencia de variación genética atribuible a este tipo de propagación fue mínima. Sin embargo será necesario evaluar en campo qué tanto afectan estas variaciones en el fenotipo de las plantas así como el nivel de variación después de un mayor número de subcultivos.

9. BIBLIOGRAFIA

Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Pnat Cell Rep 27:617 – 631.

Agúndez D., Cervera M.T., Alba N., Martínez J.M., Grau J.M. 1999. Genetic identification of commercial clones of Populus based on isozymes and AFLPs. In: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel, S.; Ritter, E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, España. pp. 549-552.

Asano Y., Katsumoto H., Inokuma C., Kaneko S., Ito Y. and Fujiie A. 1996. Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and *a*-ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysiajaponica* Steud. J Plant Physiol. 149: 413–417.

Ascencio-Cabral A., Rodríguez-Garay B., Gutiérrez-Pulido H., Gutiérrez-Mora A. 2008. Plant regeneration of *Carica papaya* through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. Sci Hort 118:155–160.

Ashok Kumar H.G., Murthy H.N., Paek K.Y. 2002 Somatic embryogenesis and plant regeneration in Gymnema sylvestre. Plant Cell Tiss Organ Cult 71:85–88.

Azofeifa–Delgado A. 2006. Uso de Marcadores Moleculares en Plantas; Aplicaciones en Frutales del Trópico Agronomía Mesoamérica. 17: 221 – 242.

Bairu M.W., Fennell C.W., van Staden J. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. Zelig) Sci Hortic 108: 347 – 351.

Bairu M.W., Aremu A.O., Staden J.V. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regul 63: 147 – 173.

Bassam B.J., Caetano-Anollés G., and Gresshoff P.M. 1993. Fast and sensitive silver staing of DNA in polyacrylamide geles. Anal Biochem, 196: 80-83.

Bernardo Royo J., Itoiz R. 2004. Evaluation of the discriminance capacity of RAPD, isoenzymes and morphologic markers in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and the congruence among classifications. Genet Resour Crop Evol 51:153 – 160.

Bhattacharya J., Khuspe S.S. 2001. *In vitro* and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. Sci Hort 91 (2001):39-49.

Bhattacharya J., Khuspe S.S. Renukdas N.N., Rawal S.K. 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo explants of papaya cv. Washington and Honey Dew. Indian J Exp Biol 40: 624–627.

Bhattacharya S., Dey T., Bandopadhyay T., Ghosh P. 2008. Genetic polymorphism analysis of somatic embryo-derived plantlets of *Cymbopongon flexuosus* through RAPD assay. Plant Biotechnol Rep. 2: 245 – 252.

Bogani P., Simoni A., Bettini P., Mugnai M., Pellegrini M.G., Buiatti M. 1995. Genome flux in tomato auto- and auxo-trophic ce11 clones cultured in different auxin/cytokinin equilibrium. I DNA multiplicity and methylation levels. Genome 38: 902-912.

Bogani P., Simoni A., Lio P., Scialpi A., Buiatti M. 1996. Genome flux in tomato ce11 clones cultured in different physiological equilibrium. II A RAPD analysis of variability. Genome 39: 846-853.

Bonga J.M., Park Y.S., 2003. Clonal Propagation, Forest Trees. En: Encyclopaedia of Applied Plant Sciences (Thomas B., Murphy D., Murray B., eds). Elsevier (Academic Press), Oxford, UK. pp.1395-1402.

Botstein D., White R., Skolnick M., Davies R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet. 32: 314 – 331.

Bozhkov P.V., Filonova L.H., von Arnold S. 2002. A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. Biotechnol Bioeng. 77: 658–667.

Cabrera-Ponce J.L., Vega-Gracia L., Herrera-Estrella L. 1995. Herbicidal resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. Plant Cell Rep 15:1-7.

Cabrera D., García D., Portal O. 2010. Virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-p): Biología, epifitiología y diversidad genética como base para el manejo mediante técnicas biotecnológicas. Biotecnol Veg. 10: 67-77.

Cabrita L.F., Aksoy U., Hepaksoy S., Leitao J.M. 2001. Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*ficus carica* L.) clones. Sci Hort 87: 261 – 273.

Camarena C. 2007. Caracterización molecular de híbridos de papaya. Tesis de licenciatura. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias división de ciencias biológicas y ambientales. Guadalajara México.

Castillo B., y Smith M.A.L. 1997. Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. Plant Cell Rep 16: 385–388.

Cervera M.T., Remington D., Frigerio J.- M., Storme V., Ivens B., Boerjan W., Plomion C. 2000. Improved AFLP analysis of tree species. Can J For Res 30: 1608 – 1616.

Chen J.T., y Chang W.C. 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium*‘ Gower Ramsey’. Plant Growth Regul. 34 :229–232.

Chen M.H., Wang P.J., Maeda E. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. Plant Cell Rep 6: 348-351.

Chen M.H., Chen C.C., Wang D.N., y Chen F.C. 1991. Somatic embryogenesis from inmature embryos of *Carica papaya x Carica cauliflora* cultured *in vitro*. J Bot 69: 1913-1918.

Chen W.H., Chen T.M., Fu Y.M., Hsieh R.M., Chen W.S. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. Plant Cell Rep. 18:7 – 13.

Chia C.L., Nishina M.S. y Evans D.O. 1989. Papaya Hawaii Agri Ext Ser Bul Pa-3(A).

Choi Y.E., Yang D.C., Yoon E.S. 1999. Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of seedlings. Plant Cell Tiss Organ Cult 58:93–97.

Conde P., Loureiro J., Santos C. 2004. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. Plant Cell Rep 22: 632-639.

Corradini P., Edelin C., Bruneau A., and Bouchard A. 2002. Architectural and genotypic variation in the clonal shrub *Taxus canadiensis* as determined from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism. Can J Bot 80:205-219.

Cuenca B., San-José M.C., Martínez M.T., Ballester A., Vieitez A.M. 1999. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. Plant Cell Rep 18: 538-543.

Deo P.C., Tyagi A.P., Taylor M., Harding R.M., Becker D.K. 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. SPJNPS. 28: 27 – 40.

Devarumath R.M., Nandy S., Rani V., Marimuthu S., Muraleedharan N., Raina S.N. 2002. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam – India type). Plant Cell Rep 21: 166 – 173.

Devarumath R.M., Doule R.B., Kawar P.G., Naikebawane S.B., Nerkar Y.S. 2007. Field performance and RAPD analysis to evaluate genetic fidelity of tissue culture raised plants vis–a-vis conventional setts derived plants of sugarcane. Sugar Tech 9: 17 – 22.

Esquivel M.A., Bautista Alor M., Ortiz García M., Quiroz Moreno A., Rohde W., Sánchez Teyer L.F. 2009. Characterising Cuban papaya accessions (*Carica papaya* L.) by AFLP markers. Rev. Colomb. Biotecnol. 6(2): 31-39.

Farzana A.R.F., Palkadapala P.G.V.N., Meddegoda K.M.M.N., Samarajeewa P.K. and Eeswara J.P. 2008. Somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L. cv. Rathna). Natural Science Foundation Sri Lanka 2008 36 (1) : 41-50.

Fernández-Guijarro B., Celestino C., Toribio M. 1994. Somatic embryogenesis in Quercus suber L. En: Biotecnology of Trees (Pardos J.A., Ahuja M.R., Elena Rossello R., eds). Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. Fuera de Serie n.º 4. INIA. Madrid, España. pp. 105-110.

Freitas M.E. 1998. Estudio de la variabilidad producida en cultivos *in vitro* de *Secale cereale* L. y *Sinapidendron* spp. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

García-Águila L., León M., Kosky R.G., Orellana P., González R. 2007. Evaluación en campo de la estabilidad genética en plantas obtenidas por embriogénesis somática de cv. híbrido “FHIA 21” (*Musa* AAAB). Biotec Veg. 7(3): 143-147.

George E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exegetics. Part 1. 574p .

Gesteira A.S., Otoni W.C., Barros E.G., Moreira M.A. 2002. RAPD – based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. Plant Breed 121: 269 – 271.

Grodzicker T., Williams J., Sharp J., Sambrook J. 1974. Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Biological Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., USA. Cold Spring Harbor Press. 39: 439 – 449.

Gutiérrez-Mora A. 2002. Micropropagación y mejoramiento genético de papaya (*Carica papaya* L.). Tesis Doctorado. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. México.

Guzmán Díaz G.A. 1998. Guía para el cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.) Sistema Unificado de Información Institucional, San José, Costa Rica: MAG

Hashmi G., Huettel R., Meyer R., Krusberg L., Hammerschlag F. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus caultures of peach. Plant Cell Rep. 16: 624 – 627.

Hernández Sánchez I. 2007. Regeneración clonal de alcornoques adultos (*Quercus suber* L.) mediante embriogénesis somática. Tesis doctorado. Departamento de Biología Celular y Genética de Facultad de Biología. Universidad de Alcalá, Madrid, España.

Hidalgo R. 2003. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. *In:* Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. T.L. Franco y R. Hidalgo (eds.). Boletín Técnico No. 8. IPGRI. Cali, Colombia. pp. 2-26.

Hornero J., Martínez I., Celestino C., Gallego F.J., Torres V., Toribio M. 2001. Early checking of genetic stability of cork oak somatic embryos by AFLP analysis. Int J Plant Sci. 162 (4): 827 – 833.

Ibaraki Y., Murata K. 2001. Automation of somatic embryo production. Plant Cell Tiss Org 65:179-199.

Israeli Y., Reuveni O., Lahav E. 1991. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. Sci Hortic. 48: 71 – 88.

Israeli Y., Ben- Bassat D., Reuveni O. 1996. Selection of stable banana clones which do not produce dwarf somaclonal variants during in vitro culture. Sci Hortic. 67: 197 – 205.

Jaligot E., Beulé T., Rival A. 2002. Methylation- sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation – associated polymorphism. Theor Appl Genet. 104: 1263 – 1269.

Jiang C., Mithani A., Gan X., Belfield E.J., Klingler J.P., Zhu J – K., Ragoussis J., Mott R., Harberd N.P. 2011. Regenerant *Arabidopsis* lineages display a distinct genome – wide spectrum of mutations conferring variant phenotypes. Curr Biol. 21: 1385 – 1390.

Jin S., Mushke R., Zhu H., Tu L., Lin Z., Zhang Y., Zhang X. 2008. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers Plant Cell Rep 27: 1303 -1316.

Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sala F., van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevschi A., Marmiroli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Mol Breeding 3: 381 – 390.

Kaeppler S.M., Phillips R.L. 1993. DNA methylation and tissue culture – induced variation in plants. In Vitro Cell Dev Biol. 29: 125 – 130.

Kaeppler S.M., Kaeppler H.F., y Rhee Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants, Plant Mol Biol. 43: 179.

Karp A. 1991. On the current understanding of somaclonal variation. Oxford surveys of Plant Molecular and Cell Biology 7: l-58.

Karp A. 1994. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds) Plant cell and tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 139 – 152.

Karp A., Seberg O.L.E., Buiatti M. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity Ann Bot. 78: 143 – 149.

Kim C.K., Chung J.D., Jee S.-O. Oh J—Y. 2003. Somatic embryogenesis from *in vitro* grown leaf explants of Rosa hybrida L. J Plant Biotechnol 5: 169 – 172.

Kim M.S., Moore P.H., Zee F., Fitch M.M.M., Steiger D.L., Manshardt R.M., Paull R.E., Drew R.A., Sekioka T., y Ming R. 2002. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. Genome. 45: 503 – 512.

Klimaszewzka K., Cyr D.R. 2002. Conifer somatic embryogenesis: I. Development. Dendrobiology 48: 31-39.

Lackie J.M., Dow J. A.T. 1989. The dictionary of cell biology. Ed. Academic Press. 388 .

Ładyżyński M., Burza W., Malepszy S. 2002. Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber. Euphytica 125: 349 – 356.

Lakshmanan P., y Taji A. 2000. Somatic embryogenesis in leguminous plants. Plant Biol, 2(2):136-148.

Larkin P.J., Scowcroft W.R. 1981. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor Appl Genet 60: 197 – 214.

Leal F., Loureiro J., Rodriguez E., Pais M.S., Santos C., Pinto – Carnide O. 2006. Nuclear DNA content of Vitis vinifera cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo – derived plants obtained from anther culture. Plant Cell Rep. 25: 978 – 985.

León J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Segunda edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), San José. Pp. 375 – 379.

Li L. y Qu R. 2002. *In vitro* somatic embryogenesis in turftype bermudagrass: roles of abscisic acid and gibberellic acid, and occurrence of secondary somatic embryogenesis. Plant Breed. 121: 155–158.

Linacero R.E., Alves F., Vazquez A.M. 2000. Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation. Theor Appl Genet. 100: 506 – 511.

Liu C.-M., Xu Z.-H., and Chua N.-H. 1993. Auxin polar transport is esential establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. The Plant Cell 5: 621 – 630.

Ma H., Moore P.H., Liu Z., Kim M.S., Yu Q., Fitch M.M.M., Sekioka T., Paterson A.H., Ming R. 2004. High density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in papaya. Genetics 166: 419-436.

Magdalita P.M., Drew R.A., Adkins S.W. y Godwin I.D. 1997. Morphological, molecular and cytological analysis of *Carica papaya* x *C. cauliflora*. Interspecific hybrids. Theor Appl Genet. 95: 224- 229.

Maniatis T., Fritsch E.F., y Sambrook J. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Martin K., Pachathundikandi S., Zhang C., Slater A., Madassery J. 2006. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. grande naine and its propagation via shoot tip culture. In Vitro Cell Dev Biol Plant 42: 188 – 192.

McLean y Nowak J. 1998. Inheritance of somatic embryogenesis in red clover (*Trifoliumpratense* L.). Theor Appl Genet 97: 557 – 562.

Medina C., García I., Caro M., Aristizábal F.A. 2007. Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. Rev Col Cienc Quím Farm 36(1) : 70 – 80.

Mohammadi S.A., and Parsanna B.M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. Crop Sci. 43: 1235- 1248.

Mohanty S., Panda M., Subudhi E., Nayak S. 2008. Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatica* and in vitro detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis. Biol Plant 52: 783 – 786.

Monmarson S., Michaux-Ferriere N., Teisson C. 1995. Cals embryoge`nes haute fre'cuence issus de plantules de semis chez *Carica papaya* L.: Obtention et germination des embryons somatiques. Fruits 49, 279–288.

Mora-Aguilera G., Nieto-Angel D., Téliz-Ortiz D., Campbell C.L. 1993. Development of a prediction model for papaya ringspot in Veracruz, Mexico. Plant Disease, St. Paul, v.77, n.12, p.1205-1211.

Morgens P.H., Grabau E.A., Gesteland R.F. 1984. A novel soybean mitochondrial transcript resulting from a DNA rearrangement involving the 5S rRNA gene. Nucleic Acids Res 12: 5665 – 5684.

Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15, 472–497.

Müller E., Brown l7.H., Hartke S., L&z H. 1990. DNA variation in tissue-culture-derived rice plants. Theor Appl. Genet. 80: 673-679.

Morton J. 1987 Papaya Fruits of Warm Climates p. 336-346. Miami Fl USA. URL: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/papaya_ars.html

Neelakandan A.K. y Wang K. 2011. Recent progress in the understanding of tissue culture – induced genome level changes in plants and potential applications. Plant Cell Rep. 31(4): 597- 620.

Nehra N.S., Kartha K., Stusnoff C., Giles K. 1992. The influente of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. Plant Cell Tiss Org Cult 29: 257-268.

Oliveira E. J., Dantas J. L. L., Castellen M. da S., Lima D. S., Barbosa H. S. e Motta T. B. N. 2007. Marcadores moleculares na predicao do sexo em plantas de mamoeiro. Pesq Agropec Bras 42 (12): 1747-1754.

Öpik H., y Rolfe S. 2005. Plant growth hormones In: The physiology of flowering plants 4thedition. Willis A. J. pp. 177 – 202, Cambridge, New York, USA.

Pang X. M., Wen X. P., Hu C.G., and Deng X.X. 2006. Genetic diversity of Poncirus accessions as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). J. Hort. Sci. & Biotech. 81: 269-275.

Parasnis A.S., Ramakrishna W., Chowdari K.V., Gupta V.S., Ranjekar P.K. 1999. Microsatellite (GATA)n reveals sex-specific differences in papaya. Theor Appl Genet 99:1047–1052

Perez J.O., Dambier D., Ollitrault P., Eeckenbrugge D'., Brottier G.C., Froelicher P.S., Risterucci A-M. 2006. Microsatellitte markers in *Carica papaya* L.: isolation, characterization and transferability to *Vasconcellea* species. Molecular Ecology Notes 6: 212-217.

Phillips G.C., y Collins G.B. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Sci. 19 : 59-64.

Phillips R.L., Kaepler S.M., Olhoft P. 1994. Genetic instability of plant tisuue cultures: breakdown of normal controls. Proc Natl Acad Sci USA 91: 5222 – 5226.

Picca A., Helguera M., Salomón N., Carrera A. 2004. Marcadores moleculares. *In* Echenique, V. Rubinstein, C. Mroginski, L. eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la Información yel Desarrollo de la Biotecnología. Argentina, Ediciones INTA. pp. 61-68.

Polanco C., y Ruiz M.L. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants, Plant Science, 162, 817.

Pontaroli A.C., Camadro E.L. 2005. Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regerated by organogenesis from long – term callus cultures. Genet Mol Biol. 28:423 – 430.

Popescu A.N., Isac V.S., Coman MS M.S.R. 1997. Somaclonal variation in plants regenerated by organogenesis from callus cultures of strawberry (*Fragaria x ananassa*). Acta Hortic. 439: 89 – 96.

Rancillac M., Klinguer A., Klinguer S., Millet B. 1996. Preliminary investigations on somatic embryogenesis from leaf discs of red oak (*Quercus rubra* L.) Plant Growth Regul 20, 67-73.

Rani V., Raina S. 2000. Genetic fidelity of organized meristem – derived micropropagated plants: a critical reappraisal. In Vitro Cell Dev Biol Plant 36: 319 – 330.

Renukdas N., Mohan M.L., Khuspe S.S., Rawal S.K. 2003. Influence of boron on somatic embryogenesis in papaya. Biol Plant. 47, 129–132.

Reuveni O., Shlesinger D.R., Lavi U. 1990. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. Plant Cell Tiss Org 20: 41-46.

Rodrigues P.H.V., Tulmann Neto A., Cassieri Neto P., Mendes B.M.J. 1998. Influence of the number of subcultures on somaclonal variation in micropropagated Nanico (*Musa* spp., AAA group). Acta Hortic 490: 469 – 473.

Rohlf F.J. 2000. NTSYS–PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. 189 p. Exeter Publications, New York, USA.

Rico–Cabanas L. 2005. Nuevos retrotransposones de naranjo. Desarrollo de marcadores basados en retrotransposones para la evaluación de la biodiversidad de los cítricos. Tesis doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Barcelona. España. 1-222.

Rimberia F.K., Sunagawa H., Urasaki N., Ishimine Y., Adaniya S. 2005. Embryo induction via anther culture in papaya and sex analysis of the derived plantlets. Sci. Horti. 103: 199–208.

Rivas-Valencia P., Mora-Aguilera G., Téliz-Ortiz D., Mora-Aguilera A. R. 2008. Colegio de Posgrado, Montecillo: Colegio de Postgraduados, Summa phytopathol. vol.34 no.4 Botucatu Oct./Dec. 2008 34:4.

Saghai-Maroof M., Soliman K., Jorgensen R., & Allard R. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamic. Proc.Natl. Acad. Sci. 81: 8014-8018.

Saito A., y Suzuki M. 1999. Efficient shoot-regeneration from calli of apple rootstock [*Malus x prunifolia* var. ringo Asami Mo84A] and cultivar [*Malus x domestica* CV. Fuji]. J Plant Physiol 155: 620-624.

Sanchez E., Nunez V. M. 2008. Evaluación de marcadores moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de papaya (*Carica papaya L*.). Revista Corpoica –Ciencia y Tecnologia Agropecuaria 9 : 31-36.

Sanchez – Teyer L.F., Quiroz – Figueroa F., Loyola – Vargas V., Infante D. 2003. Culture – induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. Mol Biotechnol. 23: 107 – 115.

Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Sistema integral de información agroalimentaria y pesquera. Ciudad de México: SAGARPA, 2010. http://www.siap.gob.mx/

Sharma S., Bryan G., Winfield M., Millam S. 2007. Stability of potato (Solanum tuberosum L.) plants regerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. Planta 226: 1449 – 1458.

Shinoyama H., Nomura Y., Tsuchiya T. y Kozuma T. 2004. A simple and effecient method for somatic embriogénesis and plant regeneration from leaves of chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura]. Plant Biotechnol 21: 25 – 33.

Singh M., Chaudhary K. Singal H., Magill C., Boora K. 2006. Identification and characterization of RAPD and SCAR markers linked to anthracnose resistance gene in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Euphytica 149: 179 – 187.

Sivanesan I. 2007. Shoot regeneration and somaclonal variation from leaf callus cultures of *Plumbago zeylanica* Linn. Asian J Plant Sci. 6: 83 – 86.

Smith C., Wood J.E. 1998. Biología molecular y biotecnología.Addison Welsley Longman. España. p. 247

Smýkal P., valledor L., Rodríguez R., Griga M. 2007. Assessment of genetic and epigenetic stability in long – term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.) Plant Cell Rep 26:1985 – 1998.

Stover R.H. 1987. Somaclonal variation in Grande Naine and Saba bananas in the nursery and in the field. In: Persley GJ, De Langhe E (eds) ACIAR proceeding no. 21, Canberra.

Taylor P.W.J., Geijskes J.R., Ko H.L., Fraser T.A., Henry R.J., Birch R.G. 1995. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. Theor. Appl. Genet. 90: 1169 – 1173.

Toribio M., Fernández C., Celestino C., Martí-Nez M.T., San-José M.C., Vieitez A.M., 2004. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. Plant Cell Tissue Org Cult 76: 283-287.

Ude G., Pillay M., Nwakanma D., y Tenkouano A. 2002. Análisis of genetic diversity and sectional relationships in Musa using AFLP markers. Theor Appl. Genet. 104 : 1239-1245.

Urasaki N., Tokumoto M., Tarora K., Ban Y., Kayano T., Tanaka H. , Oku H., Chinen I., y Terauchi R. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.) Theor. Appl. Genet. 104: 281-285.

Valadez M.E., Kahl G. 2000. Huellas de DNA en Genomas de Plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Ed. Mundi – Prensa. México, D.F. pp 147.

Van Droogenbroeck B., Breyne P., Goetghebeur P., Romeijn- Peeters E., Kyndt T., y Gheysen G. 2002. AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. Theor. Appl Genet. 105: 289 – 297.

Van Droogenbroeck B., Kyndt T., Maertens I., Romeijn- Peeters E., Scheldeman X., Romero – Motochi J. P., Van Damme P., Goetghebeur P., y Gheysen G. 2004. Phylogenetic analysis of the highland papayas (Vasconcellea) and allied genera (Caricaceae) using PCR – RFLP. Theor. Appl Genet. 108: 1473 – 1486.

Vendrame W.A., Kochert G., Wetzstein H.Y. 1999. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. Plant Cell Rep. 18: 853 – 857.

Venkatachalam L., Sreedhar R.V., Bhagyalakshmi N. 2007. Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. In Vitro Cell Dev Biol Plant 43: 267 – 274.

Vikrant & Rashid A. 2002. Somatic embryogenesis from immatureand mature embryos of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. Plant Cell Tiss Org Cult. 69: 71–77.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA finger printing. Nucleic Acids Res. 23: 4407–4414.

Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. CRC Press, New York.

Williams J.G.K., Kubelik A.E., Levak K.J., Tingey S.C. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18: 6531 – 6535.

Yamagishi M., Otani M., Shimada T. 1996. A comparison of somaclonal variation in rice plants derived and not derived from protoplasts. Plant Breed. 115: 289-294.

Yu T.-A., Yeh S.-D., Yang J.-S. 2003. Comparison of effects of kanamycin and geneticin on regeneration of papaya from root tissue. Plant Cell Tiss Org Cult. 74: 169–178.

Yu X., Li X., Zhao X., Jiang L., Miao G., Pang J., Qi X., Liu B. 2011. Tissue culture – induced genomic alteration in maize (*Zea mays*) inbred lines and F1 hybrids. Ann Appl Biol. 158: 237 – 247.

10. ANEXO

Figura 1: Gel de archilamidas de prueba preeliminar con 4 pares de cebadores: E-ACG + M-CTG, E-ACT + M-CAT, E-ACT+M-CAG, E-ACT+M-CTG.

Cuadro 1: Matriz de similitud de nueve plantas de papaya Maradol con diferente donador.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
P1	1								
P2	0.85	1							
P3	0.939	0.904	1						
P4	0.931	0.869	0.974	1					
P5	0.925	0.863	0.948	0.981	1				
P6	0.844	0.794	0.948	0.888	0.881	1			
P7	0.894	0.831	0.904	0.913	0.919	0.825	1		
P8	0.9	0.825	0.983	0.956	0.938	0.856	0.919	1	
P9	0.813	0.75	0.913	0.844	0.838	0.844	0.806	0.85	1

}

Cuadro 2: Matriz de similitud de las veintes plantas de papaya sp., su planta de origen y planta de Maradol como referencia. Sil: la planta silvestre de origen, mar: planta de Maradol como referencia.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	sil	mar
S1	1																					
S2	0.922	1																				
S3	0.983	0.922	1																			
S4	0.992	0.915	0.992	1																		
S5	0.983	0.922	1	0.992	1																	
S6	0.992	0.93	0.975	0.983	0.975	1																
S7	0.975	0.93	0.975	0.983	0.975	0.983	1															
S8	0.967	0.938	0.967	0.959	0.967	0.959	0.944	1														
S9	0.992	0.93	0.975	0.983	0.975	1	0.983	0.959	1													
S10	0.959	0.93	0.959	0.967	0.959	0.967	0.967	0.944	0.967	1												
S11	0.975	0.93	0.959	0.967	0.959	0.983	0.967	0.944	0.983	0.983	1											
S12	0.901	0.977	0.902	0.894	0.902	0.908	0.909	0.931	0.908	0.909	0.908	1										
S13	0.992	0.914	0.975	0.983	0.975	0.983	0.967	0.959	0.983	0.967	0.983	0.893	1									
S14	0.983	0.907	0.983	0.992	0.983	0.975	0.975	0.951	0.975	0.975	0.975	0.886	0.992	1								
S15	0.983	0.922	0.983	0.992	0.983	0.975	0.975	0.952	0.975	0.975	0.975	0.902	0.975	0.983	1							
S16	0.992	0.93	0.975	0.983	0.975	0.983	0.967	0.959	0.983	0.967	0.983	0.908	0.983	0.975	0.992	1						
S17	0.983	0.938	0.967	0.975	0.967	0.975	0.959	0.967	0.975	0.944	0.959	0.916	0.975	0.967	0.967	0.975	1					
S18	0.951	0.953	0.952	0.944	0.952	0.959	0.96	0.937	0.959	0.944	0.959	0.931	0.959	0.951	0.936	0.944	0.936	1				
S19	0.983	0.922	0.967	0.975	0.967	0.992	0.975	0.951	0.992	0.975	0.992	0.901	0.992	0.983	0.967	0.975	0.967	0.967	1			
S20	0.992	0.93	0.975	0.983	0.975	1	0.983	0.959	1	0.967	0.983	0.908	0.983	0.975	0.975	0.983	0.975	0.959	0.992	1		
sil	0.992	0.93	0.975	0.983	0.975	1	0.983	0.959	1	0.967	0.983	0.908	0.983	0.975	0.975	0.983	0.975	0.959	0.992	1	1	
mar	0.879	0.855	0.88	0.887	0.88	0.887	0.888	0.866	0.887	0.873	0.872	0.85	0.871	0.879	0.88	0.872	0.88	0.866	0.879	0.887	0.887	1

Cuadro 3: Matriz de similitud de los 17 plantas de papaya Maradol.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	mr1	mr12	mr13	mr2	mr22	mr23	ref
M1	1																
M2	0.882	1															
M3	0.944	0.893	1														
M4	0.866	0.955	0.877	1													
M5	0.872	0.961	0.882	0.993	1												
M6	0.929	0.892	0.971	0.863	0.868	1											
M7	0.929	0.892	0.971	0.863	0.868	1	1										
M8	0.921	0.872	0.949	0.843	0.849	0.962	0.962	1									
M9	0.929	0.878	0.956	0.85	0.855	0.97	0.97	0.992	1								
M10	0.951	0.926	0.964	0.895	0.901	0.964	0.964	0.942	0.949	1							
mr1	0.914	0.865	0.941	0.837	0.842	0.955	0.955	0.992	0.985	0.934	1						
mr12	0.914	0.865	0.941	0.837	0.842	0.97	0.97	0.962	0.969	0.934	0.969	1					
mr13	0.943	0.892	0.956	0.863	0.868	0.97	0.97	0.962	0.97	0.964	0.97	0.97	1				
mr2	0.916	0.905	0.942	0.876	0.882	0.956	0.956	0.948	0.956	0.95	0.955	0.955	0.97	1			
mr22	0.914	0.865	0.941	0.837	0.842	0.955	0.955	0.992	0.985	0.934	1	0.969	0.97	0.955	1		
mr23	0.922	0.872	0.935	0.844	0.85	0.934	0.934	0.97	0.962	0.942	0.977	0.947	0.963	0.934	0.977	1	
ref	0.937	0.887	0.936	0.871	0.877	0.949	0.949	0.928	0.935	0.93	0.934	0.934	0.949	0.964	0.934	0.914	1