



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DESARROLLO *IN VITRO* DE EMBRIONES DE *Vasconcellea pubescens*
PARA LA GENERACIÓN DE PLÁNTULAS

Autora

Esmeralda Endara Chiriboga

Año
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DESARROLLO *IN VITRO* DE EMBRIONES DE *Vasconcellea pubescens* PARA
LA GENERACIÓN DE PLÁNTULAS

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

Ph.D. Fabio Marcelo Idrovo Espín.

Autora

Esmeralda Endara Chiriboga

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Desarrollo *in vitro* de embriones de *Vasconcellea pubescens* para la generación de plantas, a través de reuniones periódicas con el estudiante, Esmeralda Endara Chiriboga, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Fabio Marcelo Idrovo Espín

Doctor en Ciencias Biológicas: Biotecnología

CI: 1705952255

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Desarrollo *in vitro* de embriones de *Vasconcellea pubescens* para la generación de plántulas, del estudiante Esmeralda Endara Chiriboga, en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los trabajos de Titulación”.

Fernando Xavier Rivas Romero

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular en Plantas

CI: 1718092701

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Esmeralda Endara Chiriboga

CI: 1712996121

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos mis seres queridos por su apoyo y aliento incondicional en el transcurso de todos estos años.

Al Dr. Fabio Marcelo Idrovo Espín, por su apoyo y mentoría en este trabajo.

Y finalmente, agradezco al Ministerio del Ambiente del Ecuador por el contrato marco MAE-DNB-CM-2017-006 proporcionado para la realización de este trabajo.

RESUMEN

Vasconcellea es un género que cuenta con 21 especies dentro de la familia de las Caricáceas, 16 de ellas se encuentran distribuidas en las regiones andinas del Ecuador. Algunas de estas se encuentran en la Lista Roja de Especies amenazadas de la Unión Internacional de la Conservación de la Naturaleza y Recursos Nacionales, por tanto, es de suma importancia contar con un protocolo de cultivo *in vitro* que podría usarse en su conservación. El objetivo del presente estudio fue la obtención *in vitro* de plántulas de *V. pubescens* mediante la inducción de la embriogénesis somática. El estudio se dividió en 3 fases: inducción de la embriogénesis somática, maduración de embriones somáticos, y finalmente la germinación de dichos embriones a plántulas. Se realizó un ensayo donde se evaluaron tres tiempos de exposición (28, 49 y 62 días) al fitorregulador. En dicho ensayo se evaluó el número de proembriones, número de embriones somáticos maduros, y por último el número de hojas formadas en las plántulas obtenidas. Se empleó un DBCA (bloques completos al azar), y los resultados fueron analizados mediante la herramienta estadística R-commander (Rcmdr). Como resultado, se obtuvieron proembriones a los 27 días de siembra en todos los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento T28 presentó un desarrollo tanto en la cantidad de embriones globulares, como en la formación de raíces por plántulas y en la formación de hojas, seguido por el tratamiento T62. En conclusión, el mejor tiempo de exposición a la 2,4-D fue el tratamiento T28, sin embargo, no se puede excluir a los tratamientos restantes debido a que generaron respuesta esperada.

ABSTRACT

There are 21 species in the *Vasconcellea* genus that are within the *Caricaceae* family, and 16 of these are located among the Andean region of Ecuador. Some of these species are listed in the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List of Threatened Species, and therefore, it is of the utmost importance to have an *in vitro* culture protocol which could be used for its conservation. The objective of this investigation was to obtain *in vitro* seedlings of the species *V. pubescens* through the induction of somatic embryogenesis. The investigation took place in three different phases: induction of somatic embryogenesis, the ripening process of the somatic embryos, and finally the germination from said embryos into seedlings. An essay was carried out where three exposure times (28, 49 and 62 days) were evaluated to the phytohormone. In this trial the number of proembryos, the number of mature somatic embryos, and lastly the number of leaves which formed in the obtained seedlings were evaluated. A Randomized Block Design was used, and the results were analyzed through the R-commander statistics tool (Rcmdr). As a result, proembryos were obtained on the 27th day after sowing in all treatments. Nevertheless, the 28 day exposure period treatment displayed a better development, in globular embryo quantity, in the capacity of the seedlings to form roots, and in the capacity to form leaves. In conclusion, the most effective exposure time to the 2,4-D was the 28 day treatment, yet the remaining exposure times (49 and 62 days) cannot be excluded, since they did generate the desired response as well.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 <i>Vasconcellea</i> spp.....	1
1.1.2 Cultivo <i>in vitro</i> en <i>Vasconcellea</i>	3
1.2 Planteamiento del problema	4
1.3 Justificación de la investigación.....	5
1.4 Objetivos	6
1.4.1 Objetivo General	6
1.4.2 Objetivos Específicos.....	7
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 <i>Vasconcellea</i> spp. vs <i>Carica papaya</i>	7
2.2 <i>Vasconcellea pubescens</i>	8
2.3 Datos sobre producción	11
2.4 Cultivo <i>in vitro</i>	12
2.5 Embriogénesis somática: Ventajas	15
2.6 Fitorreguladores.....	19
2.6.1 Auxinas	19
2.7 Totipotencia	23
2.8 Embriogénesis somática en frutales	24
3. METODOLOGÍA.....	26
3.1 Diseño del plan experimental.....	26

3.2 Obtención de muestras de <i>V. pubescens</i>	27
3.3 Desinfección de frutos	27
3.4 Embriogénesis somática.....	28
3.4.1 Extracción de embriones cigóticos de <i>Vasconcellea pubescens</i>	29
3.4.2 Ensayo.....	29
3.4.2.1 Medio de inducción	29
3.4.2.2 Medio de maduración	30
3.4.2.3 Medio de germinación.....	30
3.5 Análisis estadístico	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1 Ensayo.....	31
4.1.1 Medio de inducción	31
4.1.2 Medio de maduración	34
4.1.3 Medio de germinación.....	37
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	45
5.1 Conclusiones	45
5.2 Recomendaciones	45
REFERENCIAS.....	47

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Vasconcellea* spp.

Vasconcellea es un género perteneciente a la familia de las Caricáceas, dentro de la cual existen 21 especies. Esta es también denominada “papaya de alta montaña” debido a que tiene como preferencia habitar en regiones andinas con grandes altitudes, en comparación a la papaya común (Kyndt et al., 2005; Scheldeman et al., 2011, p. 213). Las especies de “papaya de alta montaña” se encuentran distribuidas de acuerdo a sus preferencias climáticas a lo largo de América del Sur, específicamente en bosques siempre verdes, bosques nublados y áreas semi desérticas (Carvalho, 2014, p. 77). Ecuador es el país donde se puede encontrar mayor diversidad de las mismas, ya que posee 16 especies de las 21 existentes (figura 1), albergándolas hasta los 3000 m de altura (Duarte & Paull, 2015, p. 202; Scheldeman et al., 2011, p. 217).



Figura 1. Distribución de *Vasconcellea* en América Latina. Las áreas con coloración intensa presentan mayor cantidad de diversidad del género.

Tomado de (Scheldeman et al, 2007, p. 1875).

En este género, la más conocida es *Vasconcellea heilbornii*. Esta prefiere hábitats con temperaturas que oscilan entre los 15 a 22° C. Esto debido a que temperaturas demasiado bajas generarían daño en toda la planta. Los cultivos de *Vasconcellea* al localizarse en sitios con una precipitación bien distribuida, no requieren de irrigación adicional; mientras que si la precipitación es baja, van a requerir un riego más constante. Por otro lado, la iluminación y humedad relativa son factores relevantes para los cultivos miembros del género. Las plantas del género *Vasconcellea*, al recibir una iluminación adecuada producen un mayor número de frutos. Además, éstas al presentar un escaso desarrollo de raíces, y por su gran superficie foliar presentan grandes pérdidas debido a la transpiración, razón por la cual requieren condiciones ambientales con un 70 a 80 % de humedad (Scheldeman et al., 2011, pp. 217-218; Scheldeman, 2002, pp. 53-54).

En general, la familia Caricaceae posee árboles que se caracterizan por ser poco ramificados, su madera es suave; la base de los troncos es fornida y poseen un sistema bien desarrollado de laticíferos articulados (Scheldeman, 2002, p. 39-50). Los tallos poseen un xilema secundario, mientras que su madera está formada por floema; razón por la cual su tronco es fornido. La posición de sus largas y palmeadas hojas es de manera alternada y las puntas de las ramas generalmente tienen una forma de espiral. La planta es dioica. Sus flores poseen 5 pétalos, 5 sépalos; en flores macho se puede encontrar 10 anteras, mientras que las flores hembra poseen un ovario súpero (Carvalho, 2014, p. 5). Las semillas, dentro de las Caricáceas, poseen una capa de cobertura gelatinosa denominada mucilago. El fruto es una baya (Duarte & Paull, 2015, p. 201).

La familia Caricaceae es de gran importancia económica en varios sectores industriales, ya que sus frutos son fuente de enzimas proteolíticas las cuales están contenidas en su látex (liberadas como mecanismo de defensa hacia los depredadores), tales como: caricaina, quimopapaína y papaína (Kyndt, Van Damme, & Van Beeumen, 2006; Scheldeman, 2002, p. 56). Todas ellas son denominadas colectivamente como "papaína", sin embargo hay que mencionar

que son un grupo de proteinasas en el que destaca la proteinasa IV, que presenta una alta especificidad sobre un enlace peptídico con glicina (Scheldeman et al., 2011, p. 216).

Esta enzima es empleada en la industria cervecera para la clarificación de la cerveza, en la industria alimenticia como ablandador de carne, en la preparación de quesos y para el enriquecimiento proteico de cereales. También es conocida por sus aplicaciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos que afectan a la piel y al aparato digestivo, e incluso es empleada para la manufactura de reactivos y adyuvantes para antibióticos y vacunas (Scheldeman et al., 2007, 2011, p. 216). La papaína proveniente de frutos de algunas variedades de *Vasconcellea* ecuatorianas, poseen una actividad de amidasa proteolítica mayor que la que se obtiene a partir de *Carica papaya*, atribuida a la presencia de cisteína proteinasa (enzima encargada del catabolismo y procesamiento de proteínas) (Kyndt et al., 2006; Scheldeman et al., 2011, p. 228; Verma, Dixit, & Pandey, 2016).

Las enfermedades y plagas que afectan a este género son generalmente fúngicas y causadas por oomicetos, en donde *Phyitium* spp. puede generar una pérdida total de los cultivos. De la misma forma afectan *Fusarium oxysporum*, *Oidium* spp., entre otros. Estos patógenos atacan mayormente a *V. heilbornii*, debido a que esta especie es la que más se comercializa, siendo las restantes especies del género más resistentes a ellos (Scheldeman, 2002, pp. 50-51).

1.1.2 Cultivo *in vitro* en *Vasconcellea*

Vasconcellea normalmente es cultivada en invernaderos dentro de zonas andinas, en donde existe un control de plagas y ciertas enfermedades que afectan a dicho género, para así obtener tener frutos óptimos para la comercialización (AAIC, 2003, p. 11). El agricultor generalmente no posee todas las herramientas para controlar y manipular ciertos factores de su cultivo a totalidad. Sin embargo, gracias a la Biotecnología vegetal se podría contar con

la herramienta del cultivo *in vitro* para así asegurar que la producción sea siempre homogénea y de buena calidad.

Un ejemplo en campo es el del babaco, que al ser cultivada para su comercialización, aqueja un problema principalmente enfocado a su forma de reproducción, debido a que ésta es manejada en forma de estacas. Este tipo de multiplicación vegetal se ha visto que genera escaso enraizamiento (AAIC, 2003, p. 15), por lo tanto, en la investigación de Guerrero, Bazantes, Gómez & Bermúdez (2016), optimizaron un protocolo para el establecimiento *in vitro* de brotes de *V. helbornii* mediante pretratamientos de desinfección. Asimismo, brotes axilares meristemáticos de babaco han sido cultivados *in vitro*, sin embargo se ha visto que esta especie presenta dificultad, debido especialmente a su baja respuesta morfogénica. No obstante, empleando embriogénesis somática mediante el uso de callos morfogénicos y callos derivados de suspensiones celulares, permitieron la obtención de embriones somáticos, lo cual permite que su propagación se facilite (Scheldeman, 2002, p. 47-52).

Considerando a *V. pubescens*, nuestro grupo de trabajo ha avanzado en el protocolo de micropropagación por embriogénesis somática. Cabe mencionar que no se han reportado trabajos similares hasta la fecha.

1.2 Planteamiento del problema

Como se mencionó anteriormente, el género *Vasconcellea* se encuentra distribuido en toda la región Andina, cada cual con distinto nicho ecológico. Esto indica que las 21 especies requieren de diferentes condiciones de conservación. Algunas especies de *Vasconcellea*, al ser endémicas o al encontrarse distribuidas en regiones limitadas se encuentran en peligro de extinción o erosión genética. Un ejemplo más concreto acerca de este tema: cinco de estas especies (*V. pulchra*, *V. horovitziana*, *V. palandensis*, *V. sprucei* y *V. omnilingua*) han sido colocadas dentro de la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional de la Conservación de la Naturaleza y

Recursos Nacionales (IUCN). Las amenazas más significativas se deben a la destrucción del hábitat mediante la deforestación y conversión de éstos en tierras dedicadas a la agricultura (Kyndt et al., 2005; Scheldeman et al., 2011, p. 218).

La propagación de *Vasconcellea* se puede realizar de varias maneras. Sin embargo, existen ciertas limitaciones referentes a varios factores. La viabilidad de las semillas es uno de ellos. Además, ciertos híbridos existentes al momento de propagarse presentan problemas fitopatológicos (Scheldeman, 2002, p. 46).

La conservación de este género en el país se basa netamente en conservación *ex situ* mediante colecciones de germoplasma, en forma de semilla o en campo (Coppens d'Eeckenbrugge, Drew, Kyndt, & Scheldeman, 2014, p. 72). Sin embargo, estas técnicas aquejan varias dificultades referentes tanto del alto costo que representa este tipo de conservación, como a la adaptación de los individuos, debido a que pueden existir problemas de latencia, dificultad en la germinación o recalcitrancia (Engelmann & González-Arno, 2013). Incluso, se ha observado que las semillas de una misma especie en almacenamiento poseen diferentes comportamientos de adaptación, por lo que podrían no adecuarse a las condiciones ambientales dadas. Además, cabe mencionar que las colecciones en campo pueden verse afectadas por desastres naturales, sin posibilidad de rescate alguno de los individuos (Hunter & Heywood, 2011, pp. 276-277).

1.3 Justificación de la investigación

Por los problemas anteriormente mencionados, se hace necesaria la búsqueda de soluciones para nuestra realidad. Se ha reportado que el cultivo *in vitro* es una herramienta útil para la conservación de especies en peligro de extinción (Engelmann & González-Arno, 2013; Reed, Sarasan, Kane, Bunn, & Pence, 2011) y los procesos de embriogénesis somática son más efectivos que otros debido a que se puede realizar una multiplicación rápida de un individuo a partir de un único explante, y la competencia embriogénica adquirida de cada clon

puede ser conservada por extensos periodos de tiempo. Asimismo, la embriogénesis somática es útil para la elaboración de semillas artificiales, conservación por germoplasma y la criopreservación (Benson, 2003, p. 295; Sarasan et al., 2006).

Cabe recalcar que en Ecuador no existe investigación de embriogénesis somática con respecto a esta especie, por lo tanto, se pretende establecer un protocolo de embriogénesis para su conservación con fines biotecnológicos futuros. Según Ming & Moore (2014, p. 49) los componentes biológicos de *Vasconcellea* a nivel genético y molecular (ej. papaína y la resistencia al virus de la mancha angular), son superiores a *C. papaya*, por lo que podría representar un rubro económico importante.

Esta investigación pretende complementar la información generada previamente por nuestro grupo de trabajo y que es requerida para establecer un protocolo de micropropagación de un miembro de la familia *Vasconcellea* común en nuestro entorno. La investigación podría ser extrapolada a otras especies de *Vasconcellea* endémica del Ecuador.

Finalmente, *Vasconcellea* al ser una familia de gran interés económico por sus compuestos bioquímicos, los procedimientos derivados de esta investigación podrían usarse para la multiplicación *in vitro* de plántulas de *Vasconcellea* con la finalidad de extraer estos compuestos que tienen alto potencial de comercialización.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General:

Desarrollar embriones *in vitro* de *Vasconcellea pubescens* para generar plántulas.

1.4.2 Objetivos Específicos:

- Establecer el tiempo adecuado de exposición al fitorregulador para la generación de plántulas en embriones somáticos de *Vasconcellea pubescens*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Vasconcellea* spp. vs *Carica papaya*

Las especies de *Vasconcellea* tienen la tendencia a hibridarse de manera interespecífica, por lo que algunas variedades presentan partenocarpia; es decir, se obtienen frutos sin semilla como el babaco (Coppens d'Eeckenbrugge et al., 2014, p. 54) o poco contenido de semilla, y esta es la razón por la cual la hibridación es un factor limitante (Scheldeman, 2002, pp. 44-45). Cabe destacar que la hibridación entre *C. papaya* y *Vasconcellea* no es capaz de llevarse a cabo debido a la incompatibilidad genética entre ambos (Scheldeman, 2002, p. 34).

Mediante varios análisis y estudios genéticos, se ha podido determinar la existencia de una divergencia evolutiva temprana, en el periodo del Oligoceno (Carvalho & Renner, 2012), entre los géneros de *Carica papaya* y *Vasconcellea* (Aradhya, Manshardt, Zee, & Morden 1999; Kyndt, Van Damme, & Van Beeumen, 2006; Ming & Moore, 2014, p. 39; Van Droogenbroeck et al., 2002). Esto quiere decir que existen diferencias tanto morfológicas como genéticas entre sí. Como ejemplo *C. papaya* posee un ovario unilocular (una sola cavidad), su tallo es hueco, mientras que en *Vasconcellea* el ovario presenta cinco cavidades, el tallo es medular con abundante almacenamiento de agua, entre otras características morfológicas distintivas (Duarte & Paull, 2015, p. 203; Scheldeman, 2002, p. 40; Sharma & Tripathi, 2016 p. 219).

El cultivo de *C. papaya* presenta varias fitopatologías que afectan directamente a su producción. Con la finalidad de contrarrestar los efectos negativos de los fitopatógenos, se han desarrollado algunas variedades de papaya que poseen resistencia a los mismos. Como ejemplo, se han obtenido mediante hibridación intergenética entre *Vasconcellea* y papaya, variedades de papaya resistentes al virus de la mancha anular de la papaya. Esto se debe a que *Vasconcellea* presenta resistencia genética al virus, debido a que posee un gen dominante para el efecto (Carvalho, 2014, p. 15; Ordaz et al., 2017; Siar, Beligan, Sajise, Villegas, & Drew, 2011). Asimismo, *Vasconcellea* posee tolerancia al frío y características organolépticas como el sabor y aroma, que le diferencian de *C. papaya* (Duarte & Paull, 2015, p. 206; Scheldeman, et al., 2007).

Los frutos de *Vasconcellea* tienen altos niveles de vitamina C y potasio, mientras que los niveles de acidez son bajos. Sin embargo, las concentraciones de azúcar son bajas, motivo por el cual se limita el consumo directo de su fruto (Scheldeman, 2002, p. 55), en comparación con la papaya que tiene altos niveles de vitamina A, C y E (Wall, 2006), es una gran fuente de calcio y hierro (Vijj & Prashar, 2015), y además contiene un alto índice de azúcares, razón por la cual es consumida directamente. Los frutos de *Vasconcellea* son consumidos frescos, en forma de jugo, mermeladas, conservas, entre otras (Scheldeman et al., 2011, p. 215). De forma interesante el INIAP clasificó a estos entre otros frutales, como un pilar fundamental en la seguridad alimentaria debido a que poseen recursos genéticos poco explorados y explotados (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2004).

2.2 *Vasconcellea pubescens*

Dentro del género *Vasconcellea*, tan solo *V. pubescens*, *V. monoica* Desf., *V. goudotiana* y *V. quercifolia* son especies comestibles, sin contar con el híbrido *V. heilbornii*. En Ecuador *V. pubescens* es conocido comúnmente como chamburo. El chamburo posee alta resistencia contra enfermedades (ej. el virus de la mancha anular) y muestra tolerancia al frío. Aunque esta cruce presentaría un

cultivo con mayor resiliencia, genera especies con descendencia estéril y con tamaños de frutos pequeños y rendimientos de producción bajos (Duarte & Paull, 2015, pp. 201-202).

V. pubescens es una planta herbácea entre 3 a 6 metros de alto. Su tallo es meduloso y engrosado debido a la gran cantidad de agua almacenada en su interior; el cual presenta una parte basal ancha. En las terminaciones de sus ramas posee hojas de gran tamaño (figura 2), por lo que la parte apical del árbol presenta una densidad foliar grande. Sus hojas son lobuladas. Esta especie se caracteriza por poseer tricomas en la parte inferior de cada hoja. En cuanto a las flores, éstas presentan tres tipos de formas sexuales: hermafroditas, pistiladas y por último estimadas; las dos últimas no presentan respuesta a los cambios de estación, a diferencia de éstas, las flores hermafroditas sí dependen de la estación (Duarte & Paull, 2015, pp. 203-204).

El fruto posee una forma elipsoidal de cinco lados; éste mide entre 6 a 15 cm de largo, mientras que su anchura es de 3 a 8 cm (figura 2). La cáscara de la fruta de chamburo posee un color verde, que al empezar a madurar cambia a una tonalidad amarillenta. Su aromática y blanca pulpa de 1 cm de ancho posee una consistencia semi sólida, que al madurar se torna igualmente amarilla. Dentro de los frutos se hallan abundantes semillas puntiagudas de color café, las cuales se encuentran recubiertas de mucílago. El proceso de germinación se lleva a cabo en 30 días, y solo el 60% logra desarrollarse como plantas (Duarte & Paull, 2015, pp. 204-205).



Figura 2. Las hojas y fruto de *V. pubescens*.

Tomado de (Duarte & Paull, 2015, p. 204).

Esta es una especie nativa en varios países, como: Venezuela, Perú, Colombia, Ecuador, entre otros. Asimismo, fue distribuida alrededor de todo el mundo, sin embargo, su cultivo no es comercialmente significativo para su completa expansión (Benítez et al., 2013). En los Andes, el cultivo de esta planta en particular no es muy conocido. Generalmente, es cultivada en zonas rurales como una planta ornamental, o para el consumo propio del agricultor; con la excepción de Chile donde sí se comercializa su fruto. Se lo encuentra en áreas que varían entre secas y ventosas, con una elevación de 1500 a 3000 msnm. En los países mencionados anteriormente, cultivaban *V. pubescens* mucho antes de que *C. papaya* fuera introducida especialmente para el consumo de su fruto (Duarte & Paull, 2015, pp. 202-205).

V. pubescens no posee la capacidad de tolerar la sequía, debido a que esto le causa una pérdida foliar considerable; incluso es sensible a las heladas, ya que la planta puede llegar a su senescencia. La temperatura ideal requerida para el crecimiento del chamburo oscila entre los 12 a 22° C, debido a que generalmente estos árboles se los encuentra en áreas de bosque seco. Las temperaturas generan daño foliar y la maduración del fruto se ve afectada. Por otro lado, el

cultivo de ésta requiere de un suelo rico en material orgánico (Duarte & Paull, 2015, pp. 202-203).

2.3 Datos sobre producción

La evolución de la humanidad inicialmente estuvo relacionada con el consumo de frutas y vegetales, lo cual posteriormente resultó en la selección de variedades específicas a ser cultivadas. Los alimentos son una gran fuente de nutrientes, antioxidantes y demás compuestos que brindan un sinnúmero de beneficios para el cuerpo humano y su salud. Entre todos ellos, las frutas son consideradas como alimentos de alto costo. Es por esta razón que una parte de la población mundial no tiene acceso a las mismas (Paliyath et al., 2008, p. 2).

La producción, tanto de frutas, vegetales y flores se ha convertido en un sector importante en la agricultura mundial, debido a que su comercio contribuye con aproximadamente \$600 billones de dólares a la economía alrededor del mundo (Paliyath et al., 2008, p. 1). El hemisferio Norte, al presentar cambios climáticos durante todo el año, no tiene la capacidad de producir rutinariamente ciertas frutas, por lo tanto las obtienen por importación desde países Sur y Centroamericanos. Estadísticas canadienses estimaron que el total de frutas disponible para el consumo en dicho país incrementó de 117 kg en 1993 a 133 kg per cápita al 2004 (Paliyath et al., 2008, pp. 1-3).

En Ecuador la producción de frutas es vasta, puesto que los microclimas que presenta nuestro país son diversos y permiten la producción y abasteciendo a todo el mercado nacional. Sin embargo, no se logra llegar a niveles internacionales por la falta de técnicas de producción adecuadas (Uzcátegui, s.f, p. 16).

Ecuador y Colombia son los únicos países de todo el mundo donde se cultiva y comercializa babaco (*V. heilbornii*) durante todo el año, mientras que las otras especies de *Vasconcellea* son cultivadas a baja escala y son comercializadas en

zonas locales. Las provincias en donde existe un mayor cultivo de esta planta son Loja y Tungurahua; mientras que en Azuay, Pichincha y Cotopaxi hay cultivo en invernaderos de alto consumo (Scheldeman, 2002, p. 59). Su exportación ha ido variando durante los años, por ejemplo, en 1999 se exportaron 240.77 toneladas métricas, mientras que en el 2003 tan solo se exportaron 12.78 toneladas métricas de babaco, debido a que éstos no cumplían con ciertos requisitos fitosanitarios de exportación (Uzcátegui, s.f, p. 24).

Otra especie del género *Vasconcellea* es *V. pubescens*, de la cual no se conoce exactamente el rendimiento de producción por unidad de área; sin embargo, Duarte & Paull (2015, p. 207) mencionan que en Chile (mayor productor de frutas en el continente Sudamericano) (Paliyath et al., 2008, p. 3) una planta de *V. pubescens* posee una vida útil que oscila entre 5 a 8 años, donde se producen aproximadamente de 15 a 30 toneladas por hectárea al año. En el país, este fruto no es mayormente explotado, ya que es una fruta con poca valoración. Es por esta razón que se la encuentra y comercializa en mercados populares. El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias en el 2008 realizó un informe acerca del estado de ciertos cultivos dentro del país, indicando que el Chamburo no es un cultivo de mucho interés para el ecuatoriano, sin embargo, señala que en ese año se estaban realizando mejoramientos del cultivo, y desarrollo de mercados para la misma (Paliyath et al., 2008, pp. 55-91).

2.4 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales es un conjunto de técnicas empleadas para la micropropagación de los mismos, con el fin de manipularlos y así generar plantas completas (Caponetti et al., 2005, p. 9). Además, esta técnica es utilizada para diversos fines, entre ellos están: preservación de especies en peligro de extinción, la generación de individuos fértiles genéticamente modificados, ingeniería metabólica de compuestos, entre otras (Loyola & Vázquez, 2006, p. 4). Esto a su vez permite una mejora notable de la calidad del tejido/célula, tanto para la obtención de material genético

homogéneo, como la seguridad que éste se encuentre libre de patógenos en su totalidad (Espinoza, 2009). Al poder controlar estos factores, se puede garantizar la obtención de un producto que no generará pérdidas económicas.

El empleo de las técnicas de cultivo *in vitro* ha generado varias ventajas en cuanto a los métodos tradicionales de cultivo. Una de estas es el empleo de explantes, esto quiere decir que se emplea una pequeña muestra del material vegetal madre para su propagación, teniendo como resultado plántulas libres de microorganismos y enfermedades, debido a que las condiciones de crecimiento son asépticas (Evert, 2006, p. 115), sin requerir mayor cantidad de espacio y energía. Es posible obtener clones a partir de plantas que generalmente presentan dificultad en cuanto a su crecimiento (George & Debergh, 2008, pp. 30-31).

Existen varias técnicas para el cultivo *in vitro* de plantas, las cuales se clasifican acorde al tipo de explante: 1) por multiplicación de brotes axilares, 2) por la formación de brotes adventicios o embriones somáticos adventicios, ya sea directamente de un explante o indirectamente de tejidos (cultivo de callos) o ya sea por células desorganizados (cultivo en suspensión). Todo este tipo de explantes son empleados en la micropropagación vegetal (George & Debergh, 2008, p. 31).

La micropropagación consta de varias fases, entre ellas están: a) fase cero, en la cual se selecciona el material vegetal madre, el cual preferiblemente debe estar libre de enfermedades y contaminantes para que de esta manera el cultivo *in vitro* sea exitoso; b) fase uno o establecimiento del cultivo, indica que se debe establecer un cultivo estéril, donde el explante debe encontrarse completamente estéril para continuar con su crecimiento; c) fase dos, conocida como fase de multiplicación, la cual apunta a la obtención de nuevos propágulos, los cuales generarán plantas completas. En esta etapa es donde se realizan los subcultivos de los explantes, que permitirá que el número de éstos aumente en el tiempo; d) fase tres o fase de enraizamiento. En esta etapa se promueve el desarrollo de

raíces adventicias, mediante la presencia de reguladores de crecimiento. Y por último e) fase cuatro, en donde las plántulas *in vitro* previamente enraizadas son transferidas a un ambiente *ex situ*, lo cual debe llevarse a cabo con especial cuidado para no perder todo el material vegetal, ya que estas se encuentran en condiciones específicas y controladas (George & Debergh, 2008, pp. 31-34; Debergh & Read, 1991).

Por otro lado, la formación de callos es promovida mediante la multiplicación de las células de una planta de forma desordenada por la presencia de reguladores de crecimiento. Entre todos los reguladores de crecimiento, la auxina es indispensable para el desarrollo de un callo (George & Debergh, 2008, p. 49). En este momento, el metabolismo de las células se activa y comienza la división celular, en donde la diferenciación y especialización celular es revertido, teniendo como resultado la formación de tejido nuevo el cual estará compuesto tanto de células meristemáticas como de células no especializadas (George, 2008, p. 13).

Las células de-diferenciadas son células que han perdido ciertas características especiales y el número de componentes subcelulares implicados en la síntesis de ADN y proteínas han aumentado. Durante la de-diferenciación celular existe la formación de meristemas, los cuales formarán a su vez células parenquimatosas, las cuales promoverán el desarrollo de estructuras aéreas vegetativas (Evert, 2006, p. 110; George, 2008, p. 13).

La diferenciación celular depende de dos aspectos: el primero está controlado por la expresión de genes, mientras que el segundo está involucrado con la posición final del organismo en desarrollo. Esto quiere decir que a pesar de que en cada planta existen líneas celulares con una organización ya establecida, existen células no diferenciadas que, al cambiarlas de posición a una nueva, se diferenciará en una célula apropiada para su posición actual, sin afectar a la organización de la planta en sí (Evert, 2006, p. 119).

La embriogénesis somática es un proceso morfogénico, el cual implica el desarrollo de los embriones somáticos. Estos poseen las mismas etapas de desarrollo de un embrión cigótico (globular, corazón, torpedo y cotiledón), sin la unión de gametos de por medio. Los embriones somáticos presentan bipolaridad, al igual que los embriones cigóticos, esto quiere decir que hay desarrollo de un meristemo apical de tallo, y un meristemo radical de raíz. Estas tienen la capacidad de generar plantas completas (Berthouly, 1987, p. 89; Melgarejo, Hernández, Barrera, & Carrillo, 2006, p. 213).

La formación de callos embriogénicos se genera a partir de explantes con células predeterminadas con potencial embriogénico durante la fase inicial del cultivo, los cuales presentan una apariencia nodular (George & Debergh, 2008, p. 51).

2.5 Embriogénesis somática: Ventajas

La embriogénesis somática brinda la posibilidad de formar embriones, excluyendo el fenómeno natural de la unión de gametos (Bhojwani & Dantu, 2013, p. 75; Kessel, 2008). Los embriones cigóticos son explantes que poseen un grupo de células con alta competencia embriogénica (Thorpe & Stasolla, p. 279, 2001) probando así ser un explante eficiente para la producción de embriones somáticos (Vilasini, Latipah, & Salasiah, 2000). Los embriones somáticos pueden diferenciarse a partir de explantes directamente sin la fase intermedia en donde se forman callos, o indirectamente después de la formación del mismo. Para que cualquiera de estos dos procesos se lleve a cabo, se deben aplicar tratamientos físicos y químicos en tiempos determinados (Von Arnold, 2008, p. 342).

El explante que permite una inducción a la embriogénesis somática por excelencia es el embrión cigótico inmaduro, dado a que éste presenta células embriogénicas competentes, mientras que los explantes con células más diferenciadas deben ser inducidas embriogénicamente (Bhojwani & Dantu, 2013, p. 77).

Las plantas, microsporas, óvulos y embriones son los explantes con más probabilidad de que se produzca la embriogénesis directa (Von Arnold, 2008, p. 342). Este proceso generalmente no ocurre en condiciones naturales, sin embargo, suele producirse en óvulos y muy raramente en hojas. La embriogénesis en plantas inicia a partir de un cigoto, seguido de varias etapas características (Von Arnold, 2008, p. 335).

La embriogénesis somática es un método de reproducción asexual, el cual es empleado para evitar factores ambientales y genéticos que generalmente causan infertilidad (Stasolla, 2006, p. 87). En sí permite la regeneración total de plantas. Esto se debe a que las células somáticas de estas poseen la información genética necesaria para generar una planta completamente funcional, debido a que son células genéticamente determinadas (Evert, 2006, p. 115; Von Arnold, 2008, p. 343). Asimismo, este proceso brinda una automatización en cuanto a la propagación de los cultivos, permite sembrar de manera directa y tener disposición de semillas artificiales (Kessel, 2008).

Para dar por iniciada a la inducción a la embriogénesis somática, el ADN del explante comienza a metilarse por la influencia del fitorregulador (auxina), induciendo a la de-diferenciación celular, y sumado el estrés exógeno, se genera una reprogramación de la expresión de los genes (Bhojwani & Dantu, 2013, p. 81; Sauer & Friml, 2007, p. 138), dando como resultado una serie de divisiones celulares, que inducen así a dos posibles fenómenos: el crecimiento de callos no organizados, o un crecimiento polarizado el cual lleva a la embriogénesis somática (Von Arnold, 2008, pp. 342-343).

La célula somática de una planta, dependiendo de su posición y función posee ya una morfología, diferenciación fisiológica y bioquímica previamente programada. Por lo tanto, es necesaria la de-diferenciación de estos factores para que la célula sea capaz de recibir señales del nuevo programa de desarrollo que debe seguir. Las células somáticas deben sufrir divisiones celulares, puesto a que así las células son reiniciadas; reorganizando la estructura de la cromatina,

la expresión de genes se reprograma y, por último, existe alteración en el metabolismo celular (Bhojwani & Dantu, 2013, p. 80).

Para la inducción de la embriogénesis es de suma importancia el empleo de auxinas, ya que éstas inducen el desarrollo embriogénico mediante la desactivación de la organización celular común que tenga un tejido (Trigiano & Gray, 2005, p. 203). Los niveles de concentración de auxina deben ser altos (valores entre 0.1 a 10 μM), sin embargo, para iniciar el desarrollo de los embriones la concentración de la auxina en el medio de cultivo debe ser reducida. Posterior a la etapa donde las células totipotentes forman embriones somáticos, la auxina se vuelve inhibitoria. Es por esta razón que estas deben ser removida del medio de cultivo (Machakova et al., 2008, pp. 185-187; Moshkov et al., 2008, p. 265).

Como fuente de carbono normalmente se emplea sacarosa. La concentración de ésta depende de la concentración de la auxina en el medio, ya que estas interactúan entre sí (Bhojwani & Dantu, 2013, p. 78).

Los cultivos embriogénicos de varias especies con genotipos determinados, pueden ser subcultivados por largos periodos al contener sustancias reguladoras de crecimiento en el medio de cultivo, y aun así mantener su potencial embriogénico (Von Arnold, 2008, p. 344).

La embriogénesis somática es un proceso complejo, donde la calidad del producto final, es decir, la regeneración de una planta va a depender de las condiciones dadas en etapas tempranas del mismo. Los embriones maduros que hayan acumulado una cantidad de material de almacenamiento suficiente; y que además posean una tolerancia a la desecación, al final de la maduración se convertirán en plantas capaces de adaptarse a un desarrollo *ex vivo* normal (Von Arnold, 2008, p. 345).

Los embriones somáticos al final de proceso, se desarrollarán en pequeñas plantas únicamente cuando el medio de cultivo no contenga sustancias reguladoras de crecimiento (Von Arnold, 2008, p. 346).

La formación de embriones se genera en etapas marcadas, las cuales pueden ser distinguidas en cuanto a su conformación. Existen los pro-embriones que son un agrupamiento de células meristemáticas del cual surge el embrión somático, posteriormente, está la etapa globular; donde un gran grupo de células todavía no poseen la forma de un embrión definitivo. Después, se encuentra la etapa corazón; donde los cotiledones se elongan, seguida de la etapa torpedo, la cual difiere a la etapa mencionada anteriormente en cuanto a que las estructuras del embrión se elongan aún más (figura 3). Y, por último, la formación de una plántula, que poseen raíces y brotes primarios (Gahan & George, 2008, p. 370; Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2015, p. 343).

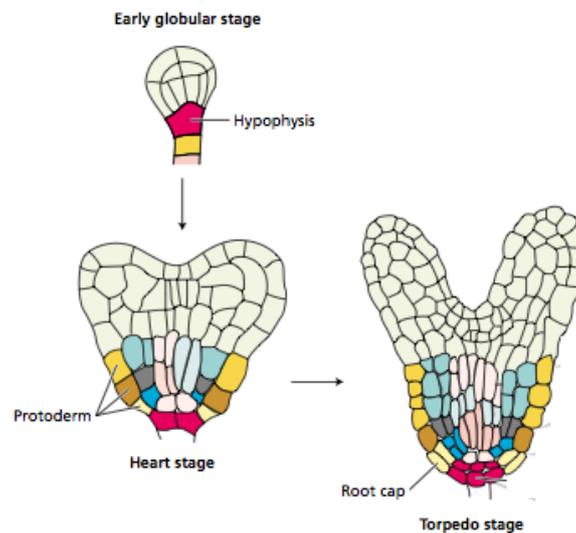


Figura 3. Etapas de embriones en embriogénesis somática: Etapa globular, etapa corazón y por último etapa torpedo.

Tomado de (Taiz et al., 2015, p. 344).

2.6 Fitorreguladores

Son sustancias químicas reguladoras producidas de manera endógena por parte de las plantas (Mehdi, 2002, p. 501), producidas en un tejido específico y transportadas a otros, generando una respuesta fisiológica (Heldt et al., 2011, p. 451). Cualquiera que sea su origen, los fitorreguladores ayudan a coordinar el desarrollo y crecimiento, debido a que actúan en forma de mensajeros entre las células vegetales (Evert, 2006, p. 120; Machakova et al., 2008, p. 175). Además controlan el cambio que realiza el metabolismo de la planta frente a las condiciones en las que se encuentre, como la cantidad de agua, la temperatura, entre otras (Heldt et al., 2011, p. 451).

La respuesta a cierto fitorregulador dependerá no solo de la estructura química del mismo, sino también cómo lo interpreta el tejido al cual va dirigido (Mehdi, 2002, p. 501). Un fitorregulador puede inducir diversas respuestas en diferentes tejidos o en distintas etapas de desarrollo del mismo. Algunas sustancias fitorreguladoras son capaces de intervenir en la síntesis de otra sustancia fitorreguladora, o simplemente puede interferir en la transducción de su señal (Evert, 2006, p. 120).

Existen varias clases de fitorreguladores que poseen actividad biológica, entre las cuales se citan: ácido abscísico, citoquininas, auxinas, etileno y giberelinas, de las cuales las más destacadas tanto para la regulación de crecimiento como la morfogénesis de una planta en cultivo *in vitro* son las citoquininas y las auxinas (Evert, 2006, p. 121; Machakova et al., 2008, p. 175).

2.6.1 Auxinas

Son sustancias orgánicas de bajo peso molecular, que contienen en su estructura un anillo aromático o indólico (Gaba, 2005, p. 88; Heldt, Piechulla, & Heldt, 2011, p. 460). Son sustancias cristalinas, solubles en solventes orgánicos,

ácidos débiles y soluciones alcalinas. Son ligeramente soluble en agua (Machakova, Zazimalova, & George, 2008, p. 177).

La palabra auxina (origen griego: *auxein*) quiere decir crecimiento o alargamiento (Mehdi, 2002, p. 502). Estas son muy empleadas como nutrientes en el cultivo de tejidos de plantas. Promueven el crecimiento de callos, suspensión de células, y además regulan la dirección de la morfogénesis (Attwood et al., 2006, p. 61; Machakova et al., 2008, p. 175). Celularmente, las auxinas controlan procesos básicos como la elongación y la división celular, por ende, la formación de meristemas (Bhojwani & Dantu, 2013, p. 81; Evert, 2006, p. 122).

Las plantas producen auxinas endógenamente, las cuales se encuentran en diferentes órganos de las mismas, sobre todo en hojas jóvenes, órganos florales, frutos y semillas, donde se las puede encontrar en grandes cantidades (Heldt et al., 2011, p. 461). Esto nos indica que las células meristemáticas son sitios activos para la biosíntesis de los factores de crecimiento, por lo tanto, el crecimiento celular (Machakova et al., 2008, pp. 177-178).

La auxina ácido indol-3-acético (IAA) es una auxina natural endógena que es detectada en tejidos vegetales en forma de metabolitos y precursores, por lo que es rápidamente metabolizado y absorbido por parte de la planta y el medio, respectivamente (Gaba, 2005, p. 88). Es sintetizada en hojas jóvenes y primordios de hoja (Attwood et al., 2006, p. 61; Evert, 2006, p. 121). Al emplear IAA para inducción a la formación de callo se generan brotes o embriones a medida que la concentración de la misma vaya disminuyendo (Gaba, 2005, p. 89).

Una de las características más relevantes de esta auxina es que en un medio de cultivo tiende oxidarse, por lo tanto existen sustancias sintéticas que tienen la función de una auxina. Estas son agregadas exógenamente al medio de cultivo, en donde cumplen el rol de controlar el crecimiento y organización de los tejidos vegetales tratados (Bhojwani & Dantu, 2013, p. 82), afectando directamente a

los niveles de las auxinas endógenas. Dicho evento es causado debido a la inhibición de la enzima IAA oxidasa (Machakova et al., 2008, p. 179). Una de las más utilizadas es la auxina sintética denominada 2,4-ácido-diclorofenoxiacético (2,4-D) la cual no solo posee la propiedad de no oxidarse, sino que adicionalmente se puede convertir en un conjugado con glucosa y es más efectiva que IAA. (Machakova et al., 2008, pp. 176-177).

El transporte de auxinas en los tejidos de planta se realiza por vía vascular a través del floema (Evert, 2006, p. 121), por medio de un transporte polar activo. Este es llevado a cabo en las células parenquimatosas. La auxina IAA libre encontrada en el floema es sintetizada y exportada desde hojas maduras presentes en la planta (Machakova et al., 2008, p. 182). Las plantas al no poseer un sistema nervioso, su señalización es basada en un sistema "hormonal" del cual depende el funcionamiento de varios procesos en cuanto al desarrollo vegetal (Heldt et al., 2011, p. 461). La señalización reguladora de auxina se realiza en tres pasos: 1) percepción de la señal del fitorregulador, en donde los receptores de células vegetales captan la señal, lo cual lleva a iniciar una cadena de eventos moleculares generando así una respuesta fisiológica; 2) la ruta de transducción de la señal, en el cual se da la degradación de la proteína blanco, es decir, se regula la ruta de la ubiquitina mediante las auxinas, y por último 3) la iniciación de la respuesta fisiológica final (Machakova et al., 2008, p. 184).

A bajas concentraciones de auxina el efecto de la misma se incrementa, mientras que a concentraciones altas se genera un efecto inhibitorio, ya que la producción de etileno a su vez aumenta (Mehdi, 2002, p. 504). A nivel celular, esta activa la elongación de cada célula en el tejido al incrementar el flujo de protones y también la expresión de genes en respuesta a la sustancia química. A nivel de tejido o planta, las auxinas estimulan la diferenciación de haces vasculares, brotes y raíces. Asimismo, promueve la formación de raíces adventicias mediante la división celular, y a través de su transporte polar el fitorregulador llega a todas las células, manteniendo así el equilibrio de la planta y sus órganos en general (Machakova et al., 2008, p. 185).

Las auxinas, al momento de interactuar con otras sustancias fitorreguladoras, como por ejemplo la citoquinina, generan efectos en el desarrollo vegetativo de una planta debido a que las dos se encargan de la morfogénesis en general. Las auxinas generan un efecto en la replicación del ADN; las citoquininas controlan la mitosis, por lo tanto, el efecto de los dos fitorreguladores en conjunto da como resultado la regulación de la división celular y tanto de la formación como crecimiento de brotes (Machakova et al., 2008, pp. 184-185).

En cuanto a la concentración de auxina en cultivo de tejidos se refiere, esta puede variar dependiendo del tipo de crecimiento requerido. La aplicación de auxina (2,4-D mayormente utilizada para este fin) para la inducción a callos va a generar una alteración en la fisiología genéticamente ya programada en la planta, donde los tejidos ya poseen un estado de diferenciación determinado (Bhojwani & Dantu, 2013, p. 78; Heldt et al., 2011, p. 463). La respuesta celular origina una de-diferenciación y comienza la división celular. Esto se debe a que las auxinas causan una mayor metilación del ADN, por lo tanto, las células se reprograman (Machakova et al., 2008, p. 186).

En cultivo de tejidos, el objetivo de emplear reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas es la reprogramación de las células somáticas, las cuales poseen ya un estado único de diferenciación. Así, por ejemplo, una célula destinada a formar parte de la raíz se convertirá en embriogénica, y producirá embriones somáticos (Gaba, 2005, p. 89).

La absorción de los reguladores de crecimiento sintéticos en cultivos de tejidos, como es el 2,4-D, es rápida en medios de cultivo que poseen pHs entre 5 a 6 (Bhojwani & Dantu, 2013, p. 78). Las moléculas de los compuestos son absorbidas enteras mediante difusión. Su posterior disociación genera que estos se retengan en la célula, debido a la impermeabilidad de la membrana plasmática a los aniones de la auxina (Machakova et al., 2008, p. 188).

2.7 Totipotencia

Los organismos multicelulares se derivan de un cigoto unicelular que se dividirá mitóticamente y finalmente se diferenciará. Las células provenientes de animales se diferencian en células específicas, perdiendo el potencial de reconstituir un nuevo organismo, mientras que las células vegetales que si poseen este potencial, son capaces de retornar a un estado meristemático y así formar una planta nueva (Bhojwani & Dantu, 2013, p. 63; Taiz et al., 2015, p. 404).

Cada célula vegetal posee la información genética tanto para la formación, como diferenciación de un individuo completo. El grado de diferenciación y especialización celular, así como el impacto que posee un tejido sobre la expresión génica en un tejido adyacente influyen en la capacidad de las células para expresar la totipotencia. La capacidad que posee una célula de formar un brote o un individuo, dependerá de si esta es competente o recalcitrante (Gahan, 2007, p. 9).

Las células, al inicio de su ciclo poseen la particularidad de encontrarse en fase unicelular, la cual después de varios ciclos de seguidas divisiones generará un individuo nuevo (Loyola & Vázquez, 2006, p. 3). Es por esta razón que la totipotencia es una característica especial que poseen las células, tanto de tejidos jóvenes como los meristemos. Sintetizando, la formación de plantas completas, debido a la potencialidad de las células diferenciadas se denomina como totipotencia celular (George, 2008, p. 2).

El cultivo de tejidos es una de las mejores técnicas para aprovechar la totipotencia celular del material vegetal, debido a que esta logra regenerar plantas completas a partir de células de explantes vegetales. La totipotencia en cultivos de tejidos generalmente es aprovechada vía organogénesis o embriogénesis (Bhojwani & Dantu, 2013, pp. 63-64).

El restablecimiento de las plantas mediante células diferenciadas inicia al momento en que estas se convierten en células meristemáticas (fenómeno denominado como de-diferenciación), y luego mediante divisiones, se genera un callo no organizado. La regeneración de las plantas a partir de callos, o bien de células meristemáticas preexistentes se denomina como re-diferenciación (Bhojwani & Dantu, 2013, p. 63).

Las únicas células no capaces de realizar la de-diferenciación, son aquellas que han perdido su núcleo, asimismo las células en estado de madurez que se encuentren muertas (Taiz et al., 2015, p. 357).

2.8 Embriogénesis somática en frutales

El objetivo de propagar plantas mediante cultivo de tejidos es la generación de clones a gran escala, lo cual se puede llevar a cabo mediante tres maneras: 1) brotes primordiales, los cuales crecen y se proliferan, 2) posterior a la morfogénesis de los brotes, estos son inducidos a formar tejidos no organizados, y 3) mediante la formación de embriones somáticos (George, 2008, p. 2; Von Arnold, 2008, p. 335).

Éste está basado en el cultivo de tejidos mediante la regulación de ciertos factores abióticos como la luz, temperatura, al igual que fitorreguladores, dando como resultado la formación de callos que contienen células totipotentes capaces de formar embriones somáticos. (Sauer & Friml, 2007, p. 71; Trigiano & Gray, 2005, p. 202). Este proceso ha sido aplicado en varios tipos de plantas, debido a que el empleo de este ayuda a regenerar material vegetal, y de esta manera poder realizar múltiples investigaciones con diferentes fines. Además de generar un aporte a la agricultura en general (Kessel, 2008).

Los frutales son plantas de gran interés en la agricultura, debido a que nuestra alimentación, en cierta parte se basa en los nutrientes que las frutas nos proporcionan (Hernández & González, 2010). Además, las frutas ayudan a

neutralizar la acidez que ciertos alimentos nos causan, fomentan la eliminación de líquidos; en general ayudan a purgar y mantener el funcionamiento del cuerpo humano (Kessel, 2008).

Un claro ejemplo, es la investigación presentada por Chen y colaboradores (1991); donde al conocer el riesgo que presenta *C. papaya* al verse afectada por el virus de la mancha anular, aplicó el proceso de embriogénesis somática en embriones inmaduros, creando un híbrido de *C. papaya* x *C. cauliflora* para su regeneración *in vitro* y mejora genética, ya que *C. cauliflora* presenta una resistencia dominante hacia esta enfermedad. De manera similar Shukla y colaboradores (2016), realizó un protocolo de embriogénesis somática para la micropropagación de mango (*Mangifera indica* L.) inmaduro a partir de su tejido nucelar. Esto debido a que este cultivo generalmente presenta enfermedades fúngicas y salinidad, por lo tanto estas plantas resistentes son capaces de reemplazar al cultivo dañado.

El guayabo (*Psidium guajava*), requiere de multiplicación *in vitro* debido a que es una especie leñosa recalcitrante, que al crecer en campo requiere de varios años y de varias generaciones para lograr un buen rendimiento genético, aunque escaso. Por esta razón, al inducir a embriogénesis somática en su investigación se logró obtener embriones somáticos en presencia de 2,4-D a varias concentraciones, donde la concentración 1,0 mg/L fue la concentración donde se desarrollaron el mayor número de embriones (Vílchez et al., 2002).

Existen varios casos de frutales cítricos, como el de la mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.), en donde la embriogénesis somática es un procedimiento indispensable para su posterior regeneración *in vitro*. Esto se debe a que en la embriogénesis somática se emplean medios de cultivo diseñados para abastecer las necesidades de cada planta, para así facilitar su desarrollo. En la investigación dirigida por Hernández, Diosdado, Cabrera, & Coll (2010) donde se evaluó el uso de nuevos biorreguladores, que pretenden substituir auxinas y citoquininas para así obtener embriones somáticos a partir

de óvulos fecundados de *C. reshni* Hort. Ex Tan. dando como resultado un incremento en el desarrollo de los callos inducidos. Esto se refiere a que tanto el crecimiento y la formación de las estructuras embriogénicas se vieron beneficiadas.

Finalmente, la planta de aguacate (*Persea americana* Mill.) ha sido sometida a varios métodos de cultivo *in vitro*, entre ellos la embriogénesis somática, donde en estudios anteriores se demostró que al emplear embriones cigóticos como explantes, no existe una conservación de ciertas características organolépticas propias de la especie. Por esta razón Suárez, Litz & Jaraba (2004) emplearon tejido somático nucelar, obteniendo como resultado clones de la planta madre, lo cual no se genera cuando se emplea embriones sexuales como explantes.

3. METODOLOGÍA

3.1 Diseño del plan experimental

Se emplearon 4.5 mg/L del fitorregulador 2,4-D y un ensayo control con concentración 0.0 mg/L. Principalmente se evaluó el tiempo de exposición a 2,4-D: 28 días (T28), 49 días (T49) y 62 días (T62) durante la fase de inducción a callos. La variable estudiada se centró en el número de embriones maduros generados y el número de plántulas generadas.

Se utilizó un diseño BCA (bloques completos al azar) para los tres niveles del factor tiempo con cinco repeticiones cada uno, con 4 embriones por repetición, con un total de 20 embriones por ensayo.

Este estudio llegó a la fase tres de la micropropagación, es decir, hasta la obtención de plántulas de *Vasconcellea pubescens*.

3.2 Obtención de muestras de *V. pubescens*

Los frutos de carácter comercial (Figura 4) se obtuvieron en la localidad de Sangolquí, provincia Pichincha, cantón Rumiñahui. La muestra estuvo constituida por frutos de *Vasconcellea pubescens*, de los cuales se extrajeron las semillas para realizar la embriogénesis somática. El traslado de los frutos no requirió de ningún procedimiento en particular, ya que se procesaron las semillas únicamente.



Figura 4. Individuos de la fruta de *Vasconcellea pubescens*, de éstos fueron extraídas las semillas empleadas en el estudio.

3.3 Desinfección de frutos

Posterior a la recolección de los frutos, estos fueron sometidos a un lavado con detergente líquido. Se preparó una disolución de 600 ml de hipoclorito de sodio al 10%, y dentro de la cámara de flujo laminar, se desinfectaron los frutos sumergiéndolos durante 10 minutos en dicha solución (figura 5a). Cada fruto fue cortado por la mitad (figura 5b) con la ayuda de un bisturí estéril, en donde se procedió a retirar el mucílago de cada semilla sobre una toalla de papel autoclavado. Una vez obtenidas las semillas, se las colocó en un matraz estéril. Las semillas fueron desinfectadas mediante inmersión en 50 ml de una disolución de etanol al 70% por 3 minutos (figura 5c). Posteriormente, se desechó esta solución dentro de un vaso de precipitación sin dejar caer a las semillas; luego éstas fueron nuevamente sumergidas en 50 ml de una disolución

de hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos (figura 5d). Se realizaron 3 lavados con agua destilada grado II autoclavada. Se procedió a secar las semillas en papel debidamente autoclavado, para posteriormente almacenarlas dentro de un envase estéril.

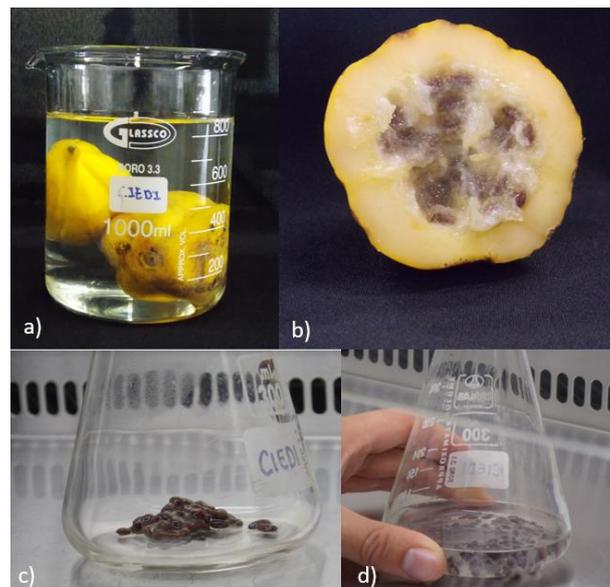


Figura 5. Procedimiento de desinfección del fruto y semillas de *V. pubescens*:

a) Frutos sumergidos en hipoclorito de sodio al 10%.

b) Se realiza un corte transversal del fruto, para así retirar las semillas y proceder a retirar el mucílago.

Posteriormente, se procede a desinfectarlas mediante lavados de hipoclorito de sodio al 10% y etanol al 70%, como se puede observar en c) y d).

3.4 Embriogénesis somática

El protocolo que se empleó fue de Cai y colaboradores (1999), el cual fue elaborado para transformación y regeneración de embriones de *Carica papaya*. Sin embargo, se lo adaptó para la obtención de plántulas de *Vasconcellea pubescens*.

Además, se tomó como referencia un trabajo previo de embriogénesis somática en *V. pubescens* realizado en la Universidad de Las Américas, en donde fueron evaluadas varias concentraciones del fitorregulador 2,4-D para determinar la mejor respuesta. A partir de esta, fue tomada una concentración de dicha sustancia reguladora de crecimiento (4.5 mg/L), con la finalidad de evaluar el mejor el mejor tiempo de exposición (T28, T49 y T62) al fitorregulador para la obtención de plántulas.

3.4.1 Extracción de embriones cigóticos de *Vasconcellea pubescens*

La extracción de los embriones cigóticos fue realizada en una cámara de flujo laminar en una caja Petri, con la ayuda de una pinza y un bisturí previamente autoclavado. Luego, estos fueron colocados en el medio de cultivo de inducción.

3.4.2 Ensayo

3.4.2.1 Medio de inducción

Se prepararon dos medios de cultivo: el primero a una concentración de 4.5 mg/L del fitorregulador 2,4-D y un control con 0.0 mg/L de 2,4-D. Para el primer medio de cultivo se colocaron 2.2 g/L de sales Murashige y Skoog, 50 mg/L de mioinositol, 0.5 mg/L de ácido nicotínico, 0.5 mg/L de clorhidrato de piridoxina, 0.4 mg/L de clorhidrato de tiamina, 2 mg/L de glicina, 400 mg/L de glutamina, 60 g/L de sacarosa en un vaso de precipitación con agua destilada. Se agregó el fitorregulador hasta llegar a la concentración requerida y posteriormente se reguló el pH a 5.8 y se colocó 8 g/L de bacto agar. Para la elaboración del medio de cultivo control se colocaron 8 g/L de bacto agar y se ajustó el pH a 5.8. Una vez elaborados los medios de cultivo, estos fueron autoclavados para posteriormente ser dispensados en cajas Petri. Los embriones se mantuvieron en este medio de cultivo durante los diferentes tiempos definidos por ensayo: 28 días, 49 días y 62 días, donde se realizaron cambios de medio cada dos semanas.

3.4.2.2 Medio de maduración

Al concluir los tiempos de estudio (28, 49 y 62 días) en el medio de inducción para cada ensayo, se pasó al medio de maduración. Este medio fue realizado con los mismos reactivos y la misma concentración de los empleados en el medio de inducción, pero sin la suplementación del regulador de crecimiento. El pH fue regulado a 5.8, y por último se añadió 8 g/L de bacto agar. Una vez autoclavado fue dispensado en cajas Petri. Los embriones del medio de inducción de cada ensayo fueron trasladados a este medio de cultivo dentro de la cámara de flujo laminar y permanecieron hasta el día 101 de experimentación, con cambios de medio cada dos semanas.

3.4.2.3 Medio de germinación

Al finalizar el tiempo de experimentación en el medio de maduración, se pasaron los callos embriogénicos y embriones al medio de germinación. Este medio se preparó con 4.4 g/L de sales Murashige y Skoog, 100 mg/L de mioinositol, 0.4 mg/L de clorhidrato de tiamina, 30 g/L de sacarosa en un vaso de precipitación con agua destilada. Se reguló el pH a 5.8 y finalmente se colocó 8 g/L de bacto agar. Este fue autoclavado y posteriormente dispensado en cajas Petri. Los embriones somáticos germinados fueron pasados a cajas tipo Magenta para cultivo *in vitro* con el medio de cultivo de germinación. Los embriones permanecieron en este medio de cultivo hasta el día 196 de experimentación, donde se realizaron cambios de medio pasando dos semanas.

3.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron sometidos a pruebas de normalidad mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Los datos que no se ajustaron a la normalidad se normalizaron mediante ajuste $\sqrt{1+x}$. Con los datos se ejecutó un análisis de varianza (ANOVA) un factor con un alfa de 0,1. Finalmente, se realizaron con pruebas estadísticas Duncan y Tukey para generar

comparaciones entre tratamientos y determinar a los mejores. Los datos fueron evaluados mediante la herramienta estadística R-commander (Rcmdr).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayo

4.1.1 Medio de inducción:

En este ensayo, a los 4 días posteriores de la inducción a la embriogénesis, se observó el inicio de la apertura de los cotiledones en el 70% de los embriones cigóticos (figura 6), al igual que la investigación realizada por Kabir, Rahman & Mamun (2016), en donde se sometió a inducción a embriones cigóticos de *C. papaya* empleando 2,4-D como fitorregulador de crecimiento.



Figura 6. Apertura de embrión cigótico a los 4 días de la siembra en medio de cultivo de inducción.

Los cotiledones de los embriones cigóticos control al día 6 de la siembra, presentaron una coloración verdosa, y no presentaron ningún indicio de formación de callo embriogénico.

Al día 12 de la siembra se observó que el 90% de los cotiledones de los ensayos con 2,4-D ya se encontraban completamente abiertos. También se observó el engrosamiento de las radículas y en menor grado de los cotiledones. Este engrosamiento se debe a la proliferación celular causada por divisiones celulares, tal como lo menciona Fernando, Melo, Soares & Appezzato-da-Glória (2001) en su estudio, generándose así células de aspecto "hinchado". La inducción a la embriogénesis somática inicia al interrumpir el patrón de la expresión de genes en un explante, es decir, generación de estrés (Fehér, Pasternak, & Dudits, 2003). Esto reprograma la expresión de los genes mediante la metilación de ADN por la influencia de los reguladores de crecimiento, como es el 2,4-D. Las divisiones celulares que ocurren a partir de este evento, van a inducir a la formación de callos desorganizados (Von Arnold, Sabala, Bozhkov, Dyachok, & Filonova, 2002), es decir que en esta etapa, las células del explante adquieren competencia embrionaria lo cual conlleva a la de-diferenciación celular y a al desarrollo de embriones somáticos (Feher, Pasternak, & Dudits, 2003; Jiménez, 2005). Farzana, Palkadapala, Meddegoda, Samarajeewa, & Eeswara (2008) registraron la formación de callo después de 15 días de la siembra de embriones cigóticos de papaya, al igual que Anandan, Sudhakar, Balasubramanian, & Gutierrez-Mora (2012), mientras que Kabir, Rahman, & Mamun (2016) reportaron que la inducción a callo embriogénico ocurrió al mes de la siembra, al igual que el desarrollo de embriones somáticos. Por otro lado, los embriones cigóticos control tienen una coloración verde, y se observa el desarrollo de raíz.

Después de 27 días de la siembra, los embriones cigóticos control se observaron con una coloración completamente verde. Sin embargo, estos embriones no presentaron formación de callo ni generación de embriones somáticos debido a la ausencia de 2,4-D, solo desarrollaron raíz y hojas incipientes. En cambio, los cotiledones, en presencia del fitorregulador, tuvieron un aspecto hinchado y de coloración blanco-amarillento con pocas manchas cafés (figura 7), es decir, un claro indicio de la formación de callos embriogénicos. Esto se debió a la presencia de 2,4-D, ya que este promueve la proliferación de callos e inhibe la

diferenciación celular (Deo, Tyagi, Taylor, Harding, & Becker, 2010). Con una diferencia de una semana Fitch & Manshardt (1990), registraron el inicio del proceso de la embriogénesis en sus cultivos de *C. papaya* "Sunset". Todo esto nos indica que el tipo de tejido es significativo para la inducción de la embriogénesis somática, puesto que Fitch (1993) al emplear hipocótilos y raíces de *C. papaya* como explantes obtuvo embriones somáticos en tres y catorce semanas respectivamente.



Figura 7. Desarrollo de callo embriogénico en embriones cigóticos a los 27 días de siembra.

Los callos embriogénicos que aún se encontraban en medio de inducción (32 días), ya presentaron embriones somáticos inmaduros transparentes o proembriones. Del mismo modo, Malabadi, Kumar, Mulgund, & Nataraja (2011) a las 4 semanas de la inducción de sus cultivos de *C. papaya* en un medio suplementado con tidiazuron y 2,4-D pudieron observar áreas embriogénicas en estado proembrionario, es decir, grupos de pequeñas células agrupadas en los callos embriogénicos.

4.1.2 Medio de maduración

Los resultados de la maduración de los embriones en medio de maduración se pueden observar en la figura 8.

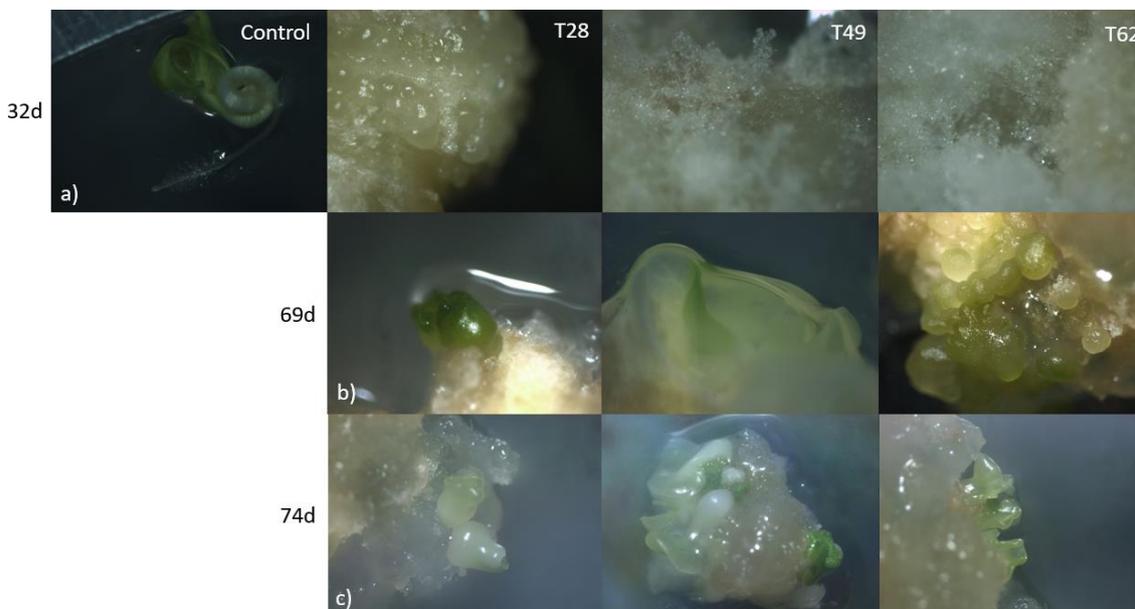


Figura 8. Diferentes estadios de embriones somáticos en medio de maduración respecto a los días de siembra.

- a) Día 32: tratamientos control, T28, T49 y T62; pelos radiculares en tratamientos control, embriones globulares en T28, proembriones en T49 y T62.
- b) 69 días de siembra: T28 embriones corazón maduros, T49 embriones corazón blancos verdosos, T62 embriones globulares maduros.
- c) 74 días de siembra: todos los tratamientos presentan embriones corazón de manera dispersa en los callos, unos son más maduros que otros.

Los embriones control presentaron pelos radiculares a los 32 días de la siembra (figura 8a), mientras que a los 58 días se tornaron cafés alcanzando únicamente el nivel de germinación, mas no continuaron su normal desarrollo.

Con respecto a los otros tratamientos, a los 28 días de siembra se trasladó al primer tratamiento (T28) al medio de maduración. Los callos embriogénicos de T28 presentaron una gran cantidad de proembriones, y un solo callo presentó

embriones somáticos maduros o en etapa globular de mayor tamaño. Este suceso se produce cuando el agregado celular ha sufrido varias divisiones rápidas en un corto periodo de tiempo, dando como resultado la formación de embriones en etapa globular (Freire, 2003). Dhekney y colaboradores (2016) afirman que la producción de los embriones somáticos se da a partir de los 28 días de la inducción a la embriogénesis. Al realizar embriogénesis somática directa (sin la formación de callo embriogénico) en cultivares de *C. papaya*, Bhattacharya, Khuspe, Renukdas, & Rawal (2002) obtuvieron una gran cantidad de embriones en estado globular a los 28 días de la inducción, al igual que la obtenida en este estudio realizado mediante embriogénesis indirecta.

Según Farzana, Palkadapala, Meedegoda, Samarajeewa, & Eeswara (2008) afirman que únicamente los callos con características embriogénicas al encontrarse en un medio de cultivo libre de sustancias reguladoras de crecimiento tienden a crecer, y los embriones formados en estos callos siguen su curso normal de desarrollo. La maduración de estos embriones se da cuando finalmente se han adquirido sus reservas de carbohidratos, lípidos y proteínas, han reducido la respiración celular y han adquirido tolerancia a la desecación, siendo esta una fase transitoria e indispensable para la germinación (Deo, Tyagi, Taylor, Harding, & Becker, 2010; Jiménez, 2005).

Al día 49 de la siembra inicial se trasladó al segundo ensayo (T49) al medio de maduración, teniendo 21 días de diferencia con el primero. Se obtuvo una gran cantidad de proembriones, pero en un número menor comparado con el de T28. Esto pudo deberse a que el tratamiento T49 estuvo expuesto al 2,4-D por mayor tiempo que T28. La exposición a este fitorregulador suele generar cambios genéticos y epigenéticos, comprometiendo el crecimiento y desarrollo normal del explante en sí (Benson, 2000). Sin embargo, los tres tratamientos se encuentran dentro del intervalo óptimo de desarrollo del callo, puesto que la formación de proembriones podría darse dentro de un periodo de 84 días (Dhekney et al., 2016).

Con respecto a la evolución del tratamiento T62 en el medio de inducción en el día 49 de la siembra, no hubo mayor cambio morfológico en comparación a los tratamientos T28 y T49. Es por esta razón que al momento de realizar el análisis de varianza, tampoco se encontró significancia.

Todos los ensayos ya trasladados al medio de maduración se pueden observar en la figura 8b. A los 69 días de siembra, todos los tratamientos presentaron varias características: en T28, el 75% de las repeticiones del ensayo presentaron varios embriones globulares, y uno solo en etapa corazón. El 10% de los ensayos de T49 presentaron embriones en etapa corazón dispersamente distribuidos entre los callos, de idéntica forma en T62, donde se presentaron pocos embriones en etapa corazón. Si bien se pudo identificar que T28 tuvo más proembriones en cuanto a la maduración, los otros dos tratamientos son más eficientes, esto puede explicarse claramente por el tiempo de exposición al fitorregulador. Como hipótesis se plantea que, al exponer a los explantes por un tiempo prolongado en el medio de inducción, podría generar mejores embriones. Sin embargo esto no significa que estos maduren de mejor manera en el tiempo, ya que como se mencionó anteriormente, la exposición de un explante al 2,4-D podría generar alteraciones en su desarrollo (Benson, 2000; Farzana et al., 2008).

En la figura 8c se puede evidenciar el resultado final de la etapa de maduración. Al día 74 de la siembra, T28 presentó en su mayoría embriones globulares verdes y un embrión en etapa corazón de coloración verde. Al realizar el conteo de embriones maduros, se contabilizaron en promedio 68 embriones maduros por tratamiento en el T28. En T49 se contabilizaron en promedio 13 embriones maduros por tratamiento; y por último se obtuvieron 11 embriones maduros por tratamiento en promedio en T62. Cabe recalcar que al final de esta etapa, algunos embriones de T28 empezaron a presentar raíces, mientras que los embriones en T49 y T62 no presentaron cambios. Según el análisis de varianza (ANOVA) el tiempo si es un factor influyente en la formación de embriones

somáticos maduros. Por consecuencia a esto, la mayoría de estos embriones tienen la posibilidad de desarrollarse en plántulas (figura 10).

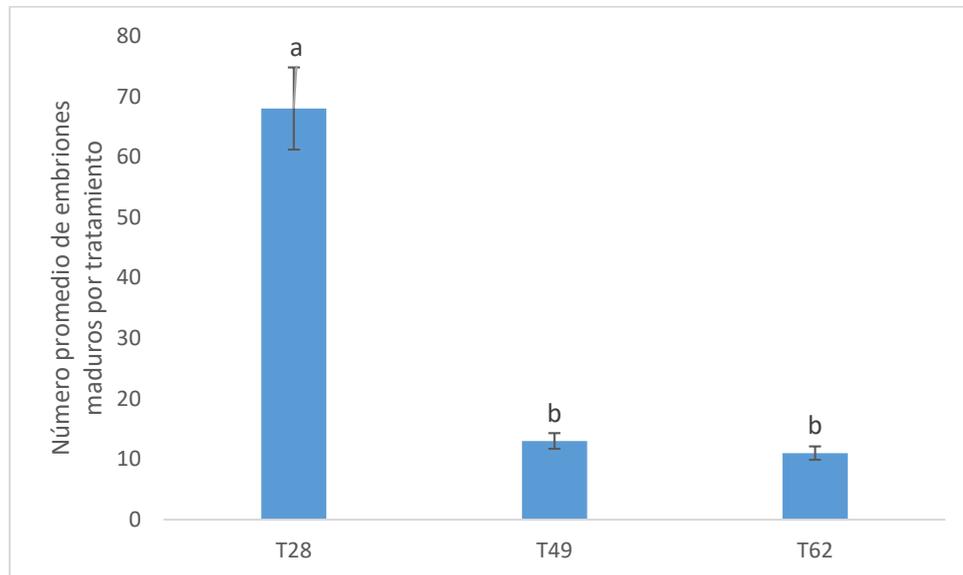


Figura 10. Gráfico de barras de todos los tratamientos al día 74 de siembra. Maduración de embriones. A los 74 días T28 mostró ser el tratamiento con mayor cantidad de embriones (68 en total). Los tratamientos T49 y T62 no mostraron una diferencia significativa entre ellos.

4.1.3 Medio de germinación

El medio de germinación consiste en un cultivo libre de sustancias reguladoras de crecimiento, en donde los embriones somáticos llevan su desarrollo a la formación de plántulas (Von Arnold, Sabala, Bozhkov, Dyachok, & Filonova, 2002). En la figura 11 se puede apreciar el resultado del medio de germinación. A los 102 días, T28 demostró un notorio desarrollo de radículas y embriones. Los callos embriogénicos que no lograron desarrollar embriones globulares perdieron su estructura compacta, es decir, se volvieron no friables. En cuanto a los tratamientos T49 y T62, no se registraron cambios significativos entre ellos, ni frente a T28. Esto se debió a que su germinación fue lenta, como se pueden apreciar en resultados anteriores.

A partir de los 123 días de siembra, se consideró a algunos embriones de T28 como plántulas, debido a se pudieron observar estructuras vegetativas ya formadas. En todos los tratamientos, ya en medio de germinación, se pudieron observar radículas en algunos embriones germinados (figura 11b). Se realizó el conteo de embriones germinados, valores con los cuales se pudo determinar el número total de los embriones que siguieron su curso de desarrollo; el 4.96% de los embriones para T28, 0.74% para T49 y 1.12% para T62. Kabir, Rahman, & Mamun (2016) evaluó diferentes medios de cultivos para medios de germinación en presencia y ausencia de reguladores de crecimiento, en donde a los 30 días de exposición al mismo, se produjo un mayor porcentaje de embriones maduros de *C. papaya* en un medio de cultivo de la misma composición al usado en este trabajo de investigación (completa ausencia de regulador de crecimiento).

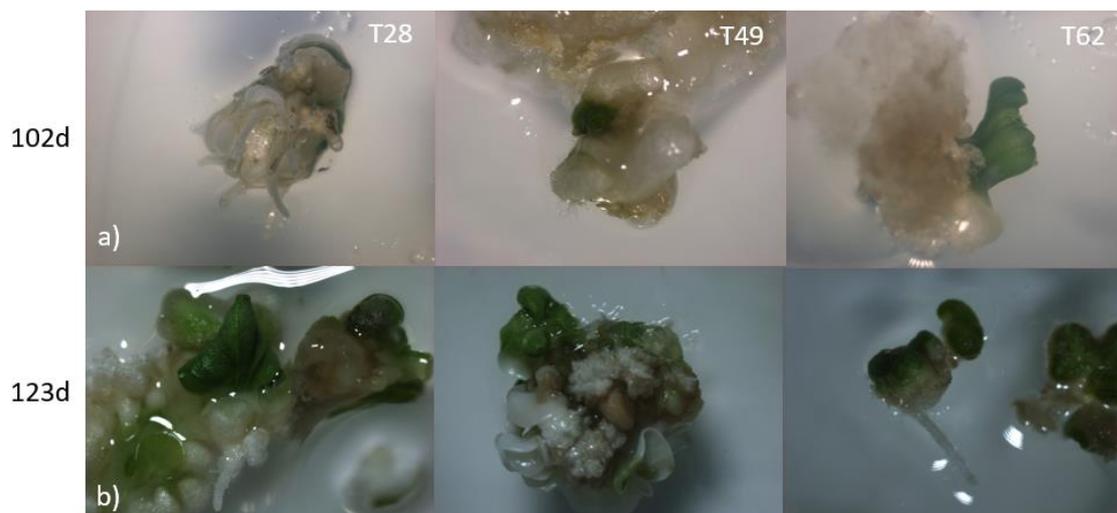


Figura 11. Diferentes estadios de embriones somáticos respecto a los días de siembra.

- a) A los 102 días T28 ha generado mayor número de raíces; T49 aparición de pelos radiculares y por último en T62 aparición de embrión torpeda bastante elongado.
- b) A los 123 días, se puede apreciar que en T28 y T62 han desarrollado raíces. Los embriones muestran indicios de hojas.

Según el análisis de varianza (ANOVA) el tiempo si es influyente en la germinación de embriones somáticos maduros y por ende en su desarrollo consecutivo a plántula (figura 12). Con estos datos, se determinó que el mejor

tiempo de exposición a 2,4-D es de 28 días (T28), ya que esta generó mayor número de embriones germinados y además son más voluminosos que en los otros dos tratamientos. Y como se mencionó anteriormente, el tiempo ideal de exposición a 2,4-D es de hasta 84 días, según el estudio de Dhekney et al. (2016) en cultivos *in vitro* de papaya. Es por esta razón que los tres tratamientos realizados se encuentran en un rango válido para su proliferación.

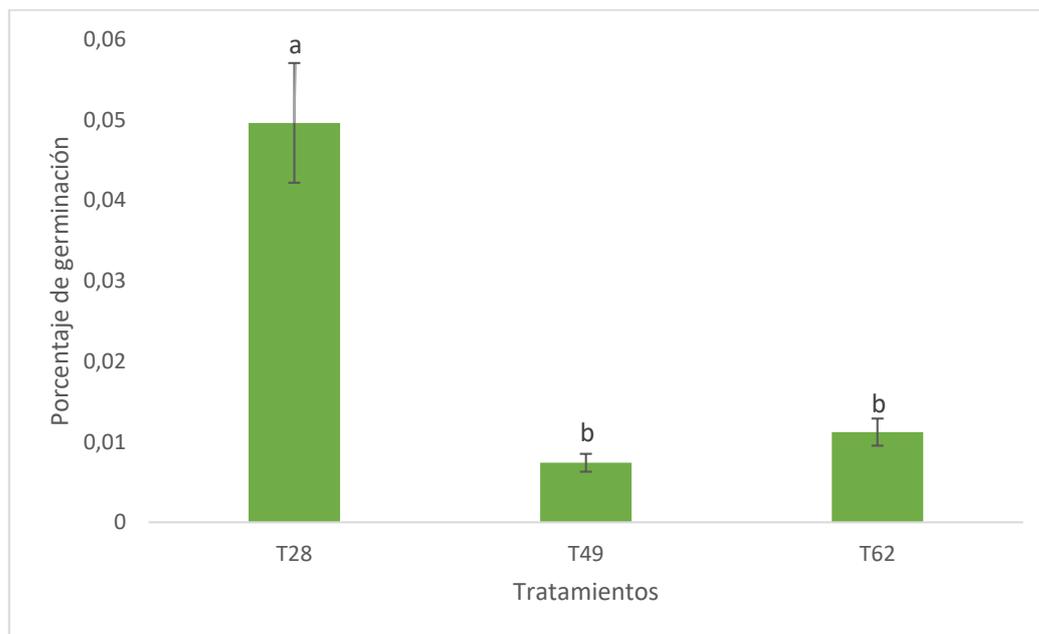


Figura 12. Gráfico de barras del promedio total de embriones maduros producidos en los tres tratamientos a los 123 días de siembra. El tratamiento T28 mostró ser el mejor tratamiento con un promedio de 6,69 embriones maduros a comparación que el tratamiento T49 (promedio: 3,03) y el tratamiento T62 (promedio: 3,5).

Una vez que la totalidad de embriones han germinado y se han convertido en plántulas, se evaluaron algunos parámetros correspondientes a las estructuras vegetativas, entre ellas el número de hojas. A los 138 días, la mayoría de los embriones de T28 ya presentaron estructuras de hoja más visibles (ver figura 13a); la cantidad de embriones torpedo ha disminuido, las raíces ya existentes se elongaron y ciertas plántulas que no poseían raíz ahora la tienen. En T49 se puede ver que pocos de los embriones torpedo de igual manera han

evolucionado su estructura a la de una hoja. Por otro lado, T62 también ha evolucionado, las raíces presentan mayor número de pelos radiculares y también ha incrementado el número de raíces entre plántulas. A los 146 días de siembra, las plántulas de T28 presentan un número considerable de hojas. Tanto T49 y T62 presentan estructuras de hojas menos prominentes que T28 (figura 13b). En contraste con el presente estudio, Mondal, Gupta, & Baran (1994) obtuvo hojas a los 50 días de exponer a explantes de raíces de *C. papaya* (Var. Honey Dew) en un medio suplementado con BAP y NAA. Se midió el punto cero para determinar la cantidad de hojas que se desarrollaron en dos semanas. El T28 inicialmente comenzó con 31 hojas; T49 presentó 10 hojas y finalmente T62 también presentó 10 hojas. A 153 días se pudo observar que las plántulas elongaron sus pecioloos varios milímetros, mientras que sus hojas han aumentado de tamaño. Como se puede apreciar en la figura 13c, las hojas de mayor tamaño se encuentran en T28 y han desarrollado lóbulos característicos de *V. pubescens*, mientras que las hojas de T49 y T62 simplemente han aumentado su tamaño.

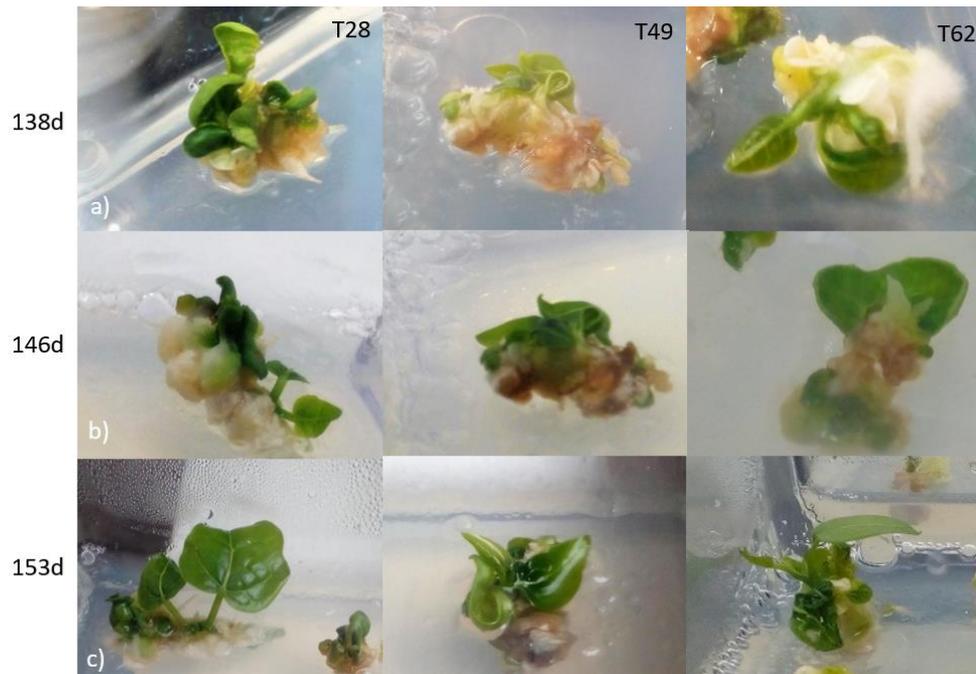


Figura 13. Tratamientos en medio de germinación.

- a) Todos los tratamientos presentan hojas, y pocos como en T62 y T28 a los 138 días presentan ya peciolo no tan desarrollados.
- b) Se puede observar un mayor desarrollo de las hojas (mayor elongación y volumen).
- c) Las hojas de las plántulas en todos los tratamientos aumentaron su tamaño.

En la Figura 14 se aprecian las plántulas finales obtenidas de cada tratamiento a los 196 días, cuando se dio por terminado el experimento. Se puede observar de forma notable que T28 generó una plántula mayormente frondosa, en comparación con los otros tratamientos; T49 presentó el menor número tanto de plántulas; sin embargo, este tratamiento conjuntamente con T62 presentaron plántulas completamente erguidas (figura 14b y 14c, respectivamente), al compararlas con T28. El tratamiento T62 fue el segundo mejor tratamiento en cuanto al número de hojas.

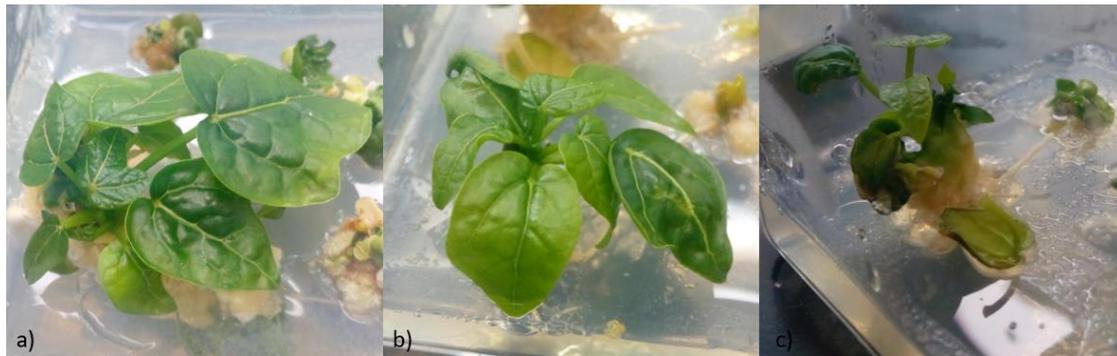


Figura 14. Plántulas finales de *Vasconcellea pubescens* después de dos meses en medio de cultivo de germinación.

- a) Plántula del tratamiento 28 días frondosa, 2 cm de alto al día 168 de siembra.
- b) Resultado final del tratamiento 49 días, 1 cm de alto.
- c) Plántula del T62 con 2 cm de alto.

T28 al cumplir con los dos meses establecidos en el medio de germinación se tomaron los últimos datos respecto al número de hojas en las plántulas: se contabilizaron en promedio 3,0 hojas por plántula; T49 presentó en promedio 1.25 hojas por plántula, y T62 generó en promedio 2,45 hojas por plántula a los 196 días de dar por concluido el experimento. Se realizaron los análisis estadísticos pertinentes, y se determinó que existieron diferencias significativas en la variable número de hojas entre cada tratamiento, siendo el mejor tratamiento de todos el T28 (figura 15).

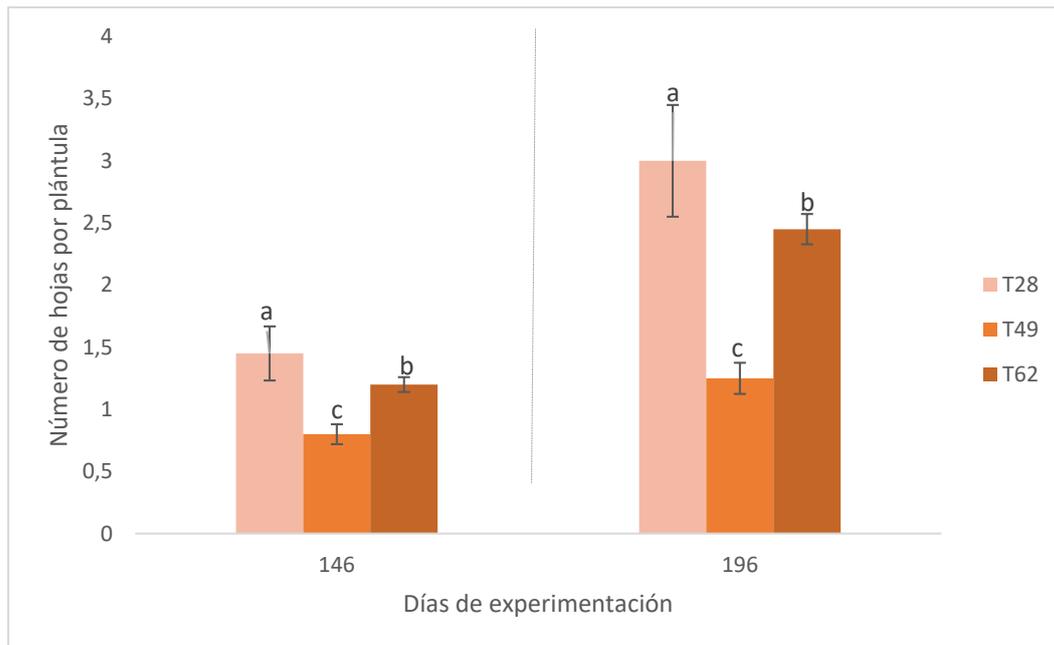


Figura 15. Gráfica de barras de promedio total de la formación de hojas entre tratamientos entre el punto cero (146 días se siembra) hasta el día final del experimento (196 días). Al finalizar los tratamientos T28 tuvieron un promedio de 12 en hojas, el segundo mejor promedio fue el de T62, donde se obtuvo un promedio de 9.8 de hojas, siendo T49 el tratamiento inferior (promedio de 5 en hojas).

Los resultados ya presentados, indican que el tratamiento T28 presentó un mejor desarrollo en la fase de germinación. Como se mencionó anteriormente, T28 generó un mayor número de hojas comparado a los tratamientos restantes. Esto pudo deberse al hecho que los explantes de dicho tratamiento estuvieron expuestos por menor tiempo al fitorregulador. Esto indica la existencia de una relación estrecha entre el tiempo de inducción de los explantes al 2,4-D y el número de hojas generado. Benson (2003) menciona que, un explante no debería permanecer por tiempos prolongados en presencia de 2,4-D, ya que este podría comprometer el desarrollo normal de un explante. Debido a esto, se asume que el desarrollo de los tratamientos T49 y T62 se vio afectado por los tiempos de inducción empleados en cada uno de ellos. Por otro lado, es importante recalcar que las plántulas de tratamiento T28, al haber desarrollado

un mayor número de hojas, que además presentaron mayor área foliar, podrán realizar más fotosíntesis que las plántulas de los tratamientos restantes. Esto podría significar una mayor eficiencia fotosintética, por lo tanto mayor facilidad de adaptación y aclimatación de las plantas en campo (Lissarrague, Baeza, & Sánchez, 2006).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se demostró que, en efecto, se pueden desarrollar embriones *in vitro* en *Vasconcellea pubescens* para la generación de plántulas, con lo cual se ha logrado obtener y establecer un protocolo de micropropagación por embriogénesis somática para esta especie. Este protocolo puede ser empleado en especies de la misma familia ya sea que se encuentran en peligro de extinción, o por fines biotecnológicos.

El mejor tiempo de exposición a concentración 4.5 mg/L de 2,4-D fue T28, ya que este generó un mayor número de plántulas con mejores características en cuanto a morfología y desarrollo de hojas. Sin embargo, los tratamientos restantes no pueden ser excluidos ya que también generaron una respuesta positiva. Cabe mencionar que en el medio de maduración, los tratamientos T49 y T62 presentaron embriones en etapas de desarrollo más avanzado que los de T28, aunque su germinación fue más lenta.

El tiempo de inducción a la embriogénesis somática, es un factor influyente para la generación de plántulas. Si la exposición del explante al fitorregulador es extensa, su crecimiento y desarrollo podrá verse afectado. Es por esta razón que T49 y T62 generaron plántulas inferiores a las obtenidas en el tratamiento T28. En conclusión, el tiempo óptimo de exposición al fitorregulador 2,4-D es de 28 días.

5.2 Recomendaciones

Debido a que el tiempo de realización de los trabajos de titulación son sumamente cortos, no se llegó a contemplar la posibilidad de pasar a la fase de aclimatación de las plántulas de *V. pubescens* obtenidas. Sin embargo, con esta información se podría llegar a tener un trabajo más completo.

Sería interesante realizar una investigación en variación somaclonal a lo largo del proceso de embriogénesis somática en *V. pubescens*, para así evitar la aparición de este fenómeno en próximas investigaciones.

El fitorregulador 2,4-D se debe retirar del medio de cultivo en un periodo de dos meses aproximadamente, debido a que este puede volverse inhibitorio para el proceso de embriogénesis somática. El tiempo de exposición a 2,4-D no debe superar los 84 días, ya que en ese lapso se generan proembriones viables, es por esta razón que en todos los tratamientos se generaron plántulas.

REFERENCIAS

- Anandan, R., Sudhakar, D., Balasubramanian, P., & Gutierrez-Mora, A. (2012). *In vitro somatic embryogenesis from suspension cultures of Carica papaya L. Scientia Horticulturae* 136, 43-49. doi: 10.1016/j.scienta.2012.01.003
- Aradhya, M., Manshardt, R., Zee, F., & Morden, C. (1999). *A phylogenetic analysis of the genus Carica L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. Genetic Resources and Crop Evolution.* 46(6), 579-586. doi: 10.1023/A: 1008786531609.
- Ascencio-Cabral, A., Gutiérrez-Pulido, H., Rodríguez-Garay, B., & Gutiérrez-Mora, A. (2008). *Plant regeneration of Carica papaya L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. Scientia Horticulturae* 118, 155-160. doi: 10.1016/j.scienta.2008.06.014
- Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar (2003). *El cultivo de babaco en invernadero (Carica pentágona)*. Quito: Abya Yala.
- Attwood, T., Cammack, R., Campbell, P., Parish, J., Stirling, J., & Vella, F. (2006). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (2.^a ed.)*. New York: The General Editors.
- Benítez, S., Lobo, M., Delgado, O., & Medina, C. (2013). Estudios de germinación y remoción de latencia en semillas de papayuelas *Vasconcellea acundinamarcensis* y *Vasconcellea goudotiana*. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 14(2), 187-197. Recuperado el 05 de diciembre de 2017 de <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v14n2/v14n2a06.pdf>
- Benson, E. (2003). *Conclusions and future prospects*. En E. Benson. (Ed.). *Plant Conservation Biotechnology*. Philadelphia: Taylor & Francis.
- Benson, E. (2000). *Special Simposium: in vitro plant recalcitrance. In vitro Plant Recalcitrance: An Introduction. In Vitro Cell. Dev. Biol.* 36, 141-148. Recuperado el 17 de mayo de 2018 de <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0029-z>

- Berthouly, M. (1987). *Memoria: II Curso de cultivo de tejidos*. Turrialba: IICA. Recuperado el 31 de julio de 2018 de <https://books.google.com.ec/books?id=DOMNAQAAIAAJ&pg=PA89&dq=embriogenesis+crecimiento+bipolar&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjkoeqhILjcAhUFvVMKHTIDDkIQ6AEIRzAH#v=onepage&q=embriogenesis%20crecimiento%20bipolar&f=false>
- Bhattacharya, J., Khuspe, S., Renukdas, N., & Rawal, S. (2002). *Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo papaya (Carica papaya L. cv. Washington and honey dew)*. *Indian Journal of Experimental Biology* 40, 624-627. Recuperado el 15 de junio de 2018 de <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/17377/1/IJEB%2040%285%29%20624-627.pdf>
- Bhojwani, S., & Dantu, P. (2013). *Cellular Totipotency*. En S. Bhojwani, & P. Dantu. (Ed). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (63-82). Agra: Springer.
- Cai, W., Gonsalves, C., Tennant, P., Fermin, G., Souza, M., Sarindu, N., Jan, F., Zhu, H., & Gonsalves, D. (1999). *A protocol for efficient transformation and regeneration of Carica papaya L. In vitro*. *Cell. Dev. Biol. Plant* 35, 61-69. Recuperado el 23 de mayo de 2017 de <http://www.jstor.org/stable/4293161>
- Caponetti, J., Gray, D., & Trigiano, N. (2005). *History of Plant Tissue*. En R, Trigiano, & D. Gray. (Ed). *Plant Development and Biotechnology* (9). Florida: CRC Press LLC.
- Carvalho, F. (2014). *General Discussion*. En F, Carvalho. (Ed). *Molecular phylogeny, biogeography, and an e-monograph of the papaya family (Caricaceae) as an example of taxonomy in the electronic age*. Munich: Springer.
- Carvalho, F., & Renner, S. (2012). *A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65, 46-53

Recuperado el 24 de junio de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.ympv.2012.05.019>

Chen, M., & Chen, C. (1992). *Plant regeneration from Carica protoplasts*. *Plant Cell Reports* 11, 404-407. Recuperado el 01 de noviembre de 2017 de <https://doi.org/10.1007/BF00234370>

Chen, M., Chen, C., Wang, D., & Chen, F. (1991). *Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of Carica papaya X Carica cauliflora cultured in vitro*. *Can. J. Bot.* 69, 1913-1918 Recuperado el 01 de noviembre de 2017 de <https://doi.org/10.1139/b91-240>

Coppens d'Eeckenbrugge, G., Drew, R., Kyndt, T., & Scheldeman, X. (2014). *Vasconcellea for Papaya Improvement*. En R, Ming, & P, Moore. (Ed). *Genetics and Genomics of Papaya, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* 10 (47-79). New York: Springer.

Debergh, P., & Read, P. (1991). *Micropropagation*. En P, Debergh, & R. Zimmerman. (Ed). *Micropropagation*. Dordrecht: Springer. Recuperado el 28 de junio de 2017 de https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_1

Deo, P., Tyagi, A., Taylor, M., Harding, R., & Becker, D. (2010). *Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding*. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 28, 27-40. Recuperado el 18 de junio de 2017 de <https://doi.org/10.1071/SP10002>

Dhekney, S., Kandel, R., Bergey, D., Sitther, V., Soorinathasundaram, K., & Litz, R. (2016). *Advances in Papaya Biotechnology. Biocatalysis and Agricultural Biotechnonology* 5, 133-142. Recuperado el 14 de octubre de 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.01.004>

Duarte, O., & Paull, R. (2015). *Passifloraceae and Caricaceae*. En O, Duarte, & R, Paull. (Ed). *Exotic Fruits and Nuts of the New World* (201-207). London: Cabi.

- Engelmann, F., & González-Arno, M. (2013). Introducción a la conservación ex situ de los recursos genéticos vegetales. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura*. Recuperado el 05 de junio de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/280638600_Introduccion_a_la_conservacion_ex_situ_de_los_recursos_geneticos_vegetales
- Espinoza, V (2009). *Inducción y germinación in vitro de semillas de Vasconcellea pubescens a partir de diferentes procedencias*. Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía. Recuperado el 23 de mayo de 2017 de <http://dspace.otalca.cl/handle/1950/6133>
- Evert, R. (2006). *Meristems and Differentiation*. En R, Evert. (Ed). *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function and Development (3.ª ed.)* (110-121). New Jersey: Wiley
- Farzana, A., Palkadapala, P., Meddegoda, K., Samarajeewa, P., & Eeswara, J. (2008). *Somatic embryogenesis in papaya (Carica papaya L. cv. Rathna)*. *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka* 36(1), 41-50. doi: 10.4038/jnsfsr.v36i1.132
- Fehér, A., Pasternak T., & Dudits, D. (2003). *Transition of somatic plant cells to an embryogenic state*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74, 201-228. Recuperado el 23 de septiembre de 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1024033216561>
- Fernando, J., Melo, M., Soares, M., & Appezzato-da-Glória, B. (2001). *Anatomy of somatic embryogenesis in Carica papaya L*. *Braz. arch. biol. technol.* 44(3). Recuperado el 18 de octubre de 2017 de <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132001000300005>
- Fitch, M. (1993). *High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 32, 205-212. Recuperado el 19 de octubre de 2017 de <https://doi.org/10.1007/BF00029844>

- Fitch, M., & Manshardt, R. (1990). *Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (Carica papaya L.)*. *Plant Cell Reports* 9, 320-324. Recuperado el 19 de octubre de 2017 de <https://doi.org/10.1007/BF00232860>
- Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Bioteconología Vegetal* 3(4), 195-209. Recuperado el 12 de junio de 2017 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/download/263/237>
- Gaba, V. (2005). *Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture and Development*. En R. Trigiano & D. Gray. (Ed). *Plant Development and Biotechnology*. Florida: CRC Press LLC.
- Gahan, P. (2007). *Totipotency and cell cycle*. En P. Gahan. (Ed). *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. London: Springer.
- Gahan, P., & George, E. (2008). *Adventitious Regeneration*. En E, George, M. Hall, y G, De Klerk. (Ed). *Plant Propagation by Tissue Culture (3.ª ed.) vol 1 The Background*. Dordrecht: Springer.
- George, E. (2008). *Plant Tissue Culture Procedure - Background*. En E, George, M. Hall & G. De Klerk. (Ed). *Plant Propagation by Tissue Culture (3.ª ed.) vol 1 The Background*. Dordrecht: Springer.
- George, E., & Debergh, P. (2008). *Micropropagation: Uses and Methods*. En E. George, M. Hall, & G. De Klerk. (Ed). *Plant Propagation by Tissue Culture (3.ª ed.) vol 1 The Background*. Dordrecht: Springer.
- Guerrero, M., Bazantes, K., Gómez, R., & Bermúdez, I. (2016). Establecimiento in vitro de brotes de *Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo. *Bioteconología Vegetal* 16(2), 67-72. Recuperado el 16 de octubre de 2017 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/511/html>
- Heldt, H., Piechulla, B., & Heldt, F. (2011). *Multiple signals regulate the growth and development of plant organs and enable their adaptation to environmental conditions*. *Plant Biochemistry (4.ª ed.)*. San Diego: Elsevier.

- Hernández, R., Diosdado, E., Cabrera, J., & Coll, F. (2010). Efecto de los biorreguladores del crecimiento en la embriogénesis somática de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.). *Cultivos Tropicales* 31(3), 32-38. Recuperado el 19 de octubre de 2017 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000300015
- Hernández, Y., & González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultrop*. 31(4), 0258-5936. Recuperado el 20 octubre de 2017 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015
- Hunter, D., & Heywood, V. (2011). *Complementary Ex situ Conservation Actions*. En D. Hunter & V. Heywood. (Ed.) *Crop Wild Relatives – A manual of in situ conservation*. New York: Earthscan. Recuperado el 30 de agosto de 2017 de http://www.cropwildrelatives.org/fileadmin/templates/cropwildrelatives.org/upload/In_situ_Manual/Crop-wild-relatives-a-manual-of-In-situ-conservation-full.pdf
- Instituto Nacional de investigaciones Agropecuarias (2008). *Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación en Ecuador*. Recuperado el 20 de junio de 2017 de <http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/Ecuador.pdf>
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (2004). *Diversidad de frutales nativos comestibles Caricaceae-Solanaceae, fenología, usos y recolección de germoplasma en el sur de Ecuador*. Recuperado el 23 de mayo de 2017 de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/>
- Jiménez, V. (2005). *Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis*. *Plant Growth Regulation* 47, 91-110. doi: 10.1007/s10725-005-3478-x

- Kabir, H., Rahman, Z., & Mamun, A. (2016). *Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Zygotic Embryo in Carica papaya L., cv. Red-Lady. Plant* 4(6), 45-50. doi: 10.11648/j.plant.20160406.11
- Kessel, A. (2008). Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales, una vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies. *Cultrop*. 29(3), 0258-5936. Recuperado el 16 de octubre de 2017 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362008000300005
- Kyndt, T., Romeijn-Peeters, E., Van Droogenbroeck, B., Romero-Motochi, J., Gheysen, G., & Goetghebeur, P. (2005). *Species relationships in the genus Vasconcellea (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence. American Journal of Botany* 92(6), 1033-1044. doi: 10.3732/ajb.92.6.1033
- Kyndt, T., Van Damme, E., & Van Beeumen, J. (2006). *Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of Vasconcellea spp. The FEBS Journal* 274(2), 451-642. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05592.x
- Kyndt, T., Van Droogenbroeck, B., Haegeman, A., Roldán-Ruiz, I., & Gheysen, G. (2006). *Cross species microsatellite amplification in Vasconcellea and related genera and their use in germplasm classification. NRC Research Press*, 49(7), 786-798. doi: 10.1139/g06-035
- Lin, C-M., & Yang, J-S. (2001). *Papaya somatic embryo induction from fruit-bearing field plants: effects on root supporting material and position of the root explants. Proc. IV IS on In Vitro Cult. & Hort. Breeding*. Recuperado el 19 de octubre de 2017 de https://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=560_98
- Lissarrague, J., Baeza, P., & Sánchez, P. (2006). *La fotosíntesis*. Recuperado el 31 de agosto de 2018 de <http://ocw.upm.es/produccion-vegetal/viticultura/contenidos/Fotosintesisvid.pdf>

- Loyola, V., & Vázquez, F. (2006). *An Introduction to Plant Cell Culture: Back to the Future*. En V. Loyola & F. Vázquez. (Ed). *Plant Cell Culture Protocols* (2.^a ed.). New Jersey: Humana Press inc.
- Machakova, I., Zazimalova, E., & George, E. (2008). *Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors*. En E. George, M. Hall & G. De Klerk. (Ed). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3.^a ed.) vol 1 *The Background*. Dordrecht: Springer.
- Malabadi, R., Kumar, S., Mulgund, G., & Nataraja, K. (2011). *Induction of somatic embryogenesis in Papaya (Carica papaya)*. *Research in Biotechnology*, 2(5), 40-55. Recuperado el 19 de octubre de 2017 de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.862.7247&rep=rep1&type=pdf>
- Melgarejo, L., Hernández, M., Barrera, J., & Carrillo, M. (2006). *Oferta y Potencialidades de un Banco de Germoplasma del Género Theobroma en el Enriquecimiento de los Sistemas Productivos de la Región Amazónica*. Bogotá: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas-Sinchi.
- Mehdi, S. (2002). *Plant Growth Hormones: Growth Promoters and Inhibitors*. En M. Pessarakli. (Ed). *Handbook of Plant and Crop Physiology* (2.^a ed.). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Ming, R., & Moore, P. (2014). *Genetics and Genomics of Papaya: Crops and Models* (Vol. 10) (39-50). New York: Springer+Business Media.
- Mondal, M., Gupta, S., & Baran, B. (1994). *Callus culture and plantlet production in Carica papaya (Var. Honey Dew)*. *Plant Cell Reports* 13, 390-393. Recuperado el 19 de octubre de 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00234144>
- Moshkov, I., Novikova, G., Hall, M., & George, E. (2008). *Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds*. En E. George, M. Hall & G. De Klerk. (Ed). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3.^a ed.) vol 1 *The Background*. Dordrecht: Springer.

- Ordaz, D., Gámez, J., Hernández, J., Espinosa, E., Rivas, P., & Castro, I. (2017). *Vasconcellea cauliflora* resistance to *Papaya ringspot potyvirus* (PRSV-P) and its introgression in *Carica papaya*. *Mexican Journal of Phytopathology* 35(3), 571-590. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-4
- Paliyath, G., Murr, D., Handa, A., & Lurie, S. (2008). *Postharvest Biology and Technology: An International Perspective*. En G. Paliyath, D. Murr, A. Handa & S. Lurie. (Ed). *Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables, and Flowers*. Iowa: Editorial Offic.
- Quiroz, F., Rojas, R., Galaz, R., & Loyola, V. (2006). *Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86, 285-301. doi: 10.1007/s11240-006-9139-6
- Reed, B., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., & Pence, V. (2011). *Biodiversity conservation and conservation biotechnology tolls*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 47, 1-4. doi: 10.1007/s11627-010-9337-0
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., & Rowntree, J. (2006). *Conservation in vitro of threatened plants – Progress in the past decade*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 42, 206-214. doi: 10.1079/IVP2006769
- Sauer, M., & Friml, J (2007). *In Vitro Culture of Arabidopsis Embryos*. En M. Suárez & P. Bozhkov. (Ed). *Plant Embryogenesis* (71). Málaga: Springer.
- Sauer, M., & Friml, J (2007). *Visualization of Auxin Gradients in Embryogenesis*. En M. Suárez & P. Bozhkov. (Ed). *Plant Embryogenesis* (138). Málaga: Springer.
- Scheldeman, X. (2002). *Distribution and Potencial of Cherimoya (Annona cherimola Mill.) and Highland papayas (Vasconcellea spp.) in Ecuador*. Recuperado el 27 de junio de 2017 de <https://biblio.ugent.be/publication/522063/file/1874191>
- Scheldeman, X., Kyndt, T., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Ming, R., Drew, R., Van Droogenbroeck, B., Van Damme, P., & Moore, P. (2011).

- Vasconcellea*. En C. Kole. (Ed). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Tropical and Subtropical Fruits* (213-251). New York: Springer.
- Scheldeman, X., Willems, L., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Romeijn, E., Restrepo, M., Romero-Motoche, J., Jiménez, D., Lobo, M., Medina, C., Reyes, C., Rodríguez, D., Ocampo, J., Van Damme, P., & Goetgebeur, P. (2007). *Distribution, diversity and environmental adaptation of Highland papayas (Vasconcellea spp.) in tropical and subtropical America. Biodivers Conserv* 16, 1867-1884. doi: 10.1007/s10531-006-9086-x
- Sharma, S., & Tripathi, S. (2016) *Resistance Against Papaya Ringspot Virus in Vasconcellea Species: Present and Potential Uses*. En R, Gaur, N, Petrov, B, Patil & M, Stoyanova. (Ed). *Plant Viruses: Evolution and Management*. Singapur: Springer. DOI 10.1007/978-981-10-1406-2
- Shukla, M., Al-Busaidi, K., Al-Blushi, G., Al-Burashdi, A., Al-Hasani, H., Al-Jabri, M., & Al-Kalbani, B. (2016). *Nucellar embryogenesis and plantlet regeneration in monoembryonic and polyembryonic mango (Mangifera indica L.) cultivars. African Journal of Biotechnology* 15(52), 2814-2823. doi:10.5897/AJB2016.157113
- Siar, S., Beligan, G., Sajise, A., Villegas, V., & Drew, R. (2011). *Papaya ringspot virus resistance in Carica papaya via introgression from Vasconcellea quercifolia. Euphytica* 181(2), 159-168. doi:10.1007/s10681-011-0388-z
- Stasolla, C. (2006). *Somatic Embryogenesis in Picea Suspension Cultures*. En V. Loyola & F. Vázquez. (Ed). *Plant Cell Culture Protocols* (2.^a ed.). New Jersey: Humana Press inc.
- Suárez, I., Litz, R., & Jaraba, J. (2004). Embriogénesis somática en tres cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill.). *Temas Agrarios* 9(2), 32-41. Recuperado el 23 de julio de 2017 de https://www.academia.edu/15563328/EMBRIOGENESIS_SOMATICA_EN_TRES_CULTIVARES_DE_AGUACATE_Persea_americana_Mill._SOMATIC_EMBRYOGENESIS_IN_THREE_AVOCADO

- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I., & Murphy, A. (2015). Growth and Development. En L. Taiz, E. Zeiger, I. Moller & A. Murphy. (Ed). *Plant Physiology and Development (6.^a ed.)*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Thorpe, T., & Stasolla, C. (2001). Somatic Embryogenesis. En S, Bhojwani & W. Soh. (Ed.). *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Dordrecht, Springer. Recuperado el 30 de enero de 2018 de https://doi.org/10.1007/978-94-017-1203-3_12
- Trigiano, R., & Gray, D. (2005). *Plant Development and Biotechnology*. Florida: CRC Press LLC.
- Uzcátegui, C. (s.f). Capítulo 1: Entorno Nacional y Agroindustrial. Recuperado el 17 de abril de 2018 de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2788/1/CD-0604.pdf>
- Van Droogenbroeck, B., Breyne, P., Goetghebeur, P., Romeijn-Peeters, E., Kyndt, T., & Gheysen, G. (2002). *AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. Theoretical and Applied Genetics. 105, 289-297.* doi:10.1007/s00122-002-0983-4.
- Verma, S., Dixit, R., & Pandey, K. (2016). *Cystein Proteases: Modes of Activation and Futre Prospects as Pharmacological Targets. Front Pharmacol. 7(107).* doi: 10.3389/fphar.2016.00107
- Vijj, T., & Prashar, Y. *A review on medicinal properties of Carica papaya Linn. Asian Pac J Trop Dis. 5(1), 1-6.* doi: 10.1016/S2222-1808(14)60617-4
- Vilasini, P., Latipah, Z., & Salasiah, A. (2000). *Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of Eksotika papaya (Carica papaya). J. Trop. Agric. And Fd. Sc. 28(2), 121-126.* Recuperado el 23 de septiembre de 2017 de <http://ejtafs.mardi.gov.my/jtafs/28-2/Somatic%20embryogenesis.pdf>
- Vílchez, J., Albany, N., Gómez, R., & Garcia, L. (2002). Inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a partir de embriones

cigóticos. *Rev. Fac. Agron.* 19, 284-293. Recuperado el 23 de septiembre de 2017 de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182002000400004

Von Arnold, S. (2008). Somatic Embryogenesis. En E. George, M. & Hall, G. De Klerk. (Ed). *Plant Propagation by Tissue Culture (3.^a ed.) vol 1 The Background*. Dordrecht: Springer.

Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). *Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69, 233-249. Recuperado el 15 de mayo de 2018 de <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015673200621>

Wall, M. (2006). *Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (Musa sp.) and papaya (Carica papaya) cultivars grown in Hawaii. Journal of Food Composition and Analysis* 19, 434-445.

