



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE “PAPAYA DE ALTA MONTAÑA”
Vasconcellea pubescens A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS

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

Profesor Guía

PhD Fabio Marcelo Idrovo Espín

Autora

Karime Mariana Domínguez Bucheli

Año
2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, 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 (Ciencias Biológicas y Biotecnología)

CI: 1705952255

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”

Karime Mariana Domínguez Bucheli

200009261-5

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por su motivación y su confianza en mí. A la Sra. Rosario Cajas por proporcionarme el material vegetal utilizado en el presente trabajo.

Quiero agradecer al Dr. Fabio Marcelo Idrovo Espín por ser un mentor y un apoyo en este trabajo y pulirme como profesional. A mi amiga Esmeralda Endara por su apoyo y soporte.

De manera general agradezco a la Universidad de las Américas y al Centro de Investigación, Estudios y Desarrollo de ingeniería (CIEDI) por financiar mi trabajo de titulación y su apoyo constante.

DEDICATORIA

A mis padres, Mario Domínguez y Dalila Bucheli, por ser ese sostén y fuerza para seguir adelante, por sus enseñanzas de vida, su paciencia y su apoyo constante.

A mi hermano, Adrián Domínguez, el cual ha sido un ejemplo para mí de madurez y perseverancia.

A mi novio, Jose Sánchez, por sus consejos, su amor y por ser esa persona que siempre creyó en mí.

Y finalmente a todas esas personas que de alguna manera han hecho de mí una mejor persona y han aportado para bien a mi vida, especialmente mi familia y mis amigos.

RESUMEN

Vasconcellea es el género menos estudiado de las caricáceas. Su potencial comercial y biotecnológico ha sido subestimado y es necesario realizar más estudios al respecto. Dieciséis de las 21 especies del género se encuentran distribuidas en el Ecuador. El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo de inducción a la embriogénesis somática en “papaya de alta montaña” *Vasconcellea pubescens*. El protocolo involucra dos etapas, la inducción de embriogénesis somática y la maduración de callos embriogénicos. Se realizaron dos ensayos con medios de inducción (**IND**) a diferentes concentraciones de 2,4-D (Ensayo 1: 4.5, 10, 67.5 y 112.5 mg/L y Ensayo 2: 0.5, 2.5, 4.5, 10 mg/L) para inducir embriogénesis somática en embriones cigóticos de *V. pubescens*. Posteriormente, se utilizaron diferentes composiciones de medios para el desarrollo de embriones considerando dos medios de maduración (**MAD 1** sin hormona y **MAD 2** con 0,019 mM BAP y 0,023 mM ANA) y los medios de inducción de los que provenían los callos embriogénicos obtenidos inicialmente. En todos los casos se determinó el número de embriones somáticos y el peso del callo embriogénico. Se utilizó un DBCA, los resultados se analizaron mediante R-Project empleando el modelo estadístico adecuado. Los embriones cigóticos mostraron respuesta en **IND** entre los 5 a 7 días después de la siembra en el medio. Durante la inducción (Ensayo 1) el mayor peso de callo se obtuvo a 4.5 mg/L de 2,4-D mientras que para el Ensayo 2 se obtuvo a 2.5 mg/L. Durante la maduración (Ensayo 1) el mayor peso de callo embriogénico y el mayor número de embriones se obtuvo a partir de callos que provenían de medio **IND** 4.5 mg/L de 2,4-D ambos del medio **MAD 1**, mientras que para el ensayo 2 el mayor peso y el mayor número de embriones fue con callos que provenían del medio **IND** de 10.0 mg/L de 2,4-D. En conclusión, el rango de concentración de 2,4-D más favorable para la inducción de embriogénesis y la posterior generación de embriones somáticos de *Vasconcellea pubescens* fue entre 2.5 a 10 mg/L mientras que concentraciones mayores provocan una respuesta inhibitoria. Este comportamiento es similar al observado en papaya.

ABSTRACT

Vasconcellea is the least studied genus of Caricaceae, its commercial and biotechnological potential is underestimated and studies in this respect must be undertaken. Sixteen of the 21 species of this genus are distributed in Ecuador. The objective of the present work was to establish a protocol of induction of somatic embryogenesis in “highland papaya” *Vasconcellea pubescens*. The protocol involves two stages, the induction of somatic embryogenesis and the maturation of embryogenic calli. Two trials were performed with induction medium (**IND**) at different concentrations of 2,4-D (Trial 1: 4.5, 10, 67.5 y 112.5 mg/L and Trial 2: 0.5, 2.5, 4.5, 10 mg/L) in order to induce somatic embryogenesis on zygotic embryos from *Vasconcellea pubescens*.

Further, were used different compositions of medium for development of embryos considering two maturation medium (**MAT 1** without hormone and **MAT 2** with 0,019 mM BAP and 0,023 mM NAA) and the induction medium from which the embryogenic calli were originally obtained. In all the number of somatic embryos and the weight of embryogenic calli were determined. A RCBD was used, the results were analyzed with R-Project using the proper statistical model. The zygotic embryos showed response in **IND** between 5 to 7 days after seeding on the medium. During the induction (Trial 1) the highest calli weight was obtained at 4.5 mg/L of 2,4-D while for the Trial 2 was obtained at 2.5 mg/L. During maturation (Trial 1) the highest embryogenic calli weight and the higher number of embryos were obtained from calli that originated from medium **IND** 4.5 mg/L of 2,4-D both from medium **MAT 1**, while for the Trial 2 the highest weight and number of embryos were with calli that originated from medium **IND** 10.0 mg/L of 2,4-D. In conclusion, the range of 2,4-D concentrations suitable for the induction of embryogenesis and further generation of somatic embryos of *Vasconcellea pubescens* was between 2.5 to 10 mg/L while higher concentrations elicit an inhibitory response. This behavior is similar to that seen in papaya.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes	1
Justificación	5
Alcance del Trabajo de Titulación	7
Objetivos.....	8
Objetivo General.....	8
Objetivos Específicos.....	8
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	9
1.1. <i>Vasconcellea</i> y <i>Carica</i>	9
1.2. Potencial agronómico de <i>Vasconcellea</i> spp.	12
1.2.1. <i>Vasconcellea</i> spp. como cultivo frutal tropical y sus usos	12
1.3. Micropropagación.....	15
1.4. Hormonas.....	18
1.4.1. Auxinas.....	19
1.4.1.1. Forma de acción de las auxinas	19
1.4.2. Citoquininas	23
1.4.2.1. Forma de acción de las citoquininas.....	23
1.5. Embriogénesis somática en <i>Caricáceas</i>	25
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1. Diseño experimental.....	28
2.2. Obtención de las muestras de los frutos de <i>V. pubescens</i> ..	29
2.3. Proceso de desinfección.....	30
2.4. Etapa 1: Inducción de la embriogénesis.....	31
2.4.1. Extracción de los embriones.....	31
2.4.2. Desarrollo del Experimento.....	32
2.4.2.1. Preparación de los medios de cultivo	32

2.4.3. Siembra de los embriones	33
2.5. Etapa 2: Maduración de los callos embriogénicos.....	33
2.5.1. Desarrollo del experimento	33
2.5.1.1. Preparación de los medios de cultivo	33
2.5.2. Siembra de los callos embriogénicos	35
2.5.3. Mantenimiento de los ensayos	35
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1. Medio de inducción	36
3.1.1. Ensayo 1: peso de los callos	36
3.1.2. Ensayo 2: peso de los callos	37
3.1.3. Análisis estadístico de la respuesta ensayo 1	40
3.1.4. Análisis estadístico de la respuesta ensayo 2	41
3.2. Medio de maduración.....	45
3.2.1. Ensayo 1: peso de los callos	45
3.2.2. Ensayo 2: peso de los callos	46
3.2.3. Ensayo 1: número de embriones	47
3.2.4. Ensayo 2: número de embriones	51
CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y	
RECOMENDACIONES	54
REFERENCIAS	56
ANEXOS	66

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

***Vasconcellea* spp. o papaya de alta montaña**

El Ecuador posee una extensa riqueza en biodiversidad, es por esto que se han realizado múltiples investigaciones, exploraciones y estudios de interés en la conservación (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 231).

Colectivamente los frutales nativos comestibles poseen un valor agronómico importante, ya que forman parte de la seguridad alimentaria de muchos pueblos y comunidades, debido a su valor nutricional, farmacéutico y económico (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias [INIAP], 2003). Sin embargo, estos recursos no han sido aprovechados de la forma ni la medida adecuada.

Caricaceae es una pequeña familia constituida por seis géneros (*Cylicomorpha*, *Horovitzia*, *Jarilla*, *Jacaratia*, *Carica* y *Vasconcellea*) y 35 especies (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 213). El género *Vasconcellea* es el más grande dentro de la familia y está comprendido por 21 especies de las cuales 19 son árboles (Caetano, Lagos, Sandoval, Posada y Caetano, 2008, p.241; Carvalho y Renner, 2012, p.47; Kyndt *et al.*, 2005, p.1033; Scheldeman *et al.*, 2011, p. 213) y se denomina comúnmente como "papaya de alta montaña" (Consejo Nacional de Investigación, 1989, p. 253) por su preferencia por las regiones andinas (Caetano *et al.*, 2008, p.241; Kyndt *et al.*, 2005, p.1033; Scheldeman *et al.*, 2011, p. 213) y su similitud con la papaya (*Carica papaya* L. G. Don), miembro principal de la familia *Caricaceae* (Consejo Nacional de Investigación, 1989, p. 253).

Debido a la similitud fenotípica entre *Carica* y *Vasconcellea*, éstas se consideraron emparentadas y se estudiaron conjuntamente (Consejo Nacional de Investigación, 1989, p. 253). Entre las primeras referencias conocidas,

Bentham y Hooker, (1867), establecieron que *Carica* y *Vasconcellea* poseían muy pocas diferencias y las incluyeron en el mismo género.

Estudios moleculares como el descrito por Aradhya, Manshardt, Zee y Morden (1999, pp. 579-586) y de tipo morfológico (Badillo 2000, 2001, pp. 74-79) posicionaron a *Vasconcellea* como un género independiente. Investigaciones posteriores determinaron que *Carica* y *Vasconcellea* comparten un ancestro en común (Aradhya *et al.*, 1999, pp.579-586; Van Droogenbroeck *et al.*, 2002, p. 289) y se separaron en una etapa evolutiva temprana en el periodo geológico Oligoceno hace 27 millones de años (Carvalho y Renner, 2012, pp.49-50).

El género *Vasconcellea* spp. se encuentra distribuido a lo largo de Sudamérica, específicamente en la región andina y sus proximidades, a excepción de *V. cauliflora* que se distribuye hasta México (Rodríguez, Marín, Quecan y Ortíz, 2005, p. 3). Ecuador es el país de mayor biodiversidad de las especies de *Vasconcellea* con 16 especies de las 21 conocidas (Figura 1) (Badillo 1993, 2000, p.111).

Los frutos de *Vasconcellea* spp. son atractivos por sus características organolépticas, son consumidos frescos, en mermeladas, jugos, productos lácteos, salsas o se usan como aditivos pasteleros en las comunidades andinas (Consejo Nacional de Investigación, 1989; Banco de Desarrollo de América Latina [CAF], 1992). Adicionalmente son una fuente de papaína (Coppens d'Eeckenbrugge, Drew, Kyndt, y Scheldeman, 2014, pp. 47-79) y por tanto de enzimas proteolíticas útiles en la agroindustria, industria farmacéutica, textil y cervecera. Al respecto, un análisis preliminar realizado por Scheldeman, Romero, Van Damme, Heyens y Van Damme, (2003, pp.76-77) determinó que la papaína en algunas especies de *Vasconcellea* ecuatorianas poseen alta actividad proteolítica en comparación con *Carica papaya*.

Especies endémicas como: *Vasconcellea horovitziana*, *Vasconcellea omnilingua*, *Vasconcellea palandensis*, *Vasconcellea pulchra*, y *Vasconcellea sprucei*, se consideran vulnerables y en peligro de extinción (IUCN, 2016). Esto

se debe al desarrollo urbano, la deforestación, la colonización desorganizada, extracción maderera y conversión de bosques a tierras de cultivo (IUCN, 2016).

Aunque existen colecciones de semillas de *Vasconcellea* en Ecuador se ha observado considerables pérdidas de este recurso natural, a pesar de ser el país con mayor biodiversidad (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 72).

Otro de los problemas que aqueja, es la falta de protocolos de micropropagación. Se han establecido protocolos de criopreservación en pocas especies de *Vasconcellea* (Ashmore, Drew y Azimi, 2007, pp. 541-547).

Vasconcellea es uno de los géneros menos estudiados en la familia Caricaceae, al contrario de *Carica* del cual se han realizado muchos estudios e investigaciones (Teixeira da Silva, 2014, p.156; Schuabb, Moura, Barroso, Santa-Catarina y Silveira, 2013, p.117).

De lo dicho anteriormente, las “papayas de altura” *Vasconcellea* spp. deberían ser conservadas y aprovechadas biotecnológicamente ya que podrían posicionarse en el mercado local e internacional por la importancia comercial y social que tienen (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, pp. 47-79).



Cultivo *in vitro* *C. papaya*

La necesidad de plantas de calidad, con características uniformes, bajo condiciones de crecimiento controlables deseables para el agricultor y la industria, han hecho ineludible el aporte de la Biotecnología. Un ejemplo claro de esto es el cultivo *in vitro* de plantas. Este es un conjunto de técnicas empleadas para la propagación vegetativa, ya sea de células, órganos o tejidos extraídos de las plantas bajo condiciones controladas para obtener un producto final de calidad evitando pérdidas económicas por problemas de enfermedades, plagas, entre otros, y aumentando así la producción en menor tiempo (Bhojwani y Dantu, 2013, p.11-22).

La clonación de plantas a partir de cultivo *in vitro* es una técnica muy útil para la conservación de los recursos genéticos y el mantenimiento de dichas plantas en campo para futuros estudios relacionados (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 236).

La criopreservación ha sido uno de los métodos probados para la conservación del género *Vasconcellea*, aunque se estableció un protocolo de vitrificación de *V. cundinamarcensis* para el resto de las especies de *Vasconcellea* no se ha logrado estandarizar protocolos similares (Ashmore *et al.*, 2007, pp. 541-547).

El cultivo *in vitro* de *Carica papaya* se ha probado exitosamente en diversos estudios (Cai *et al.*, 1999, pp.61-69; Teixeira da Silva, 2014, pp.155-162; Schuabb, *et al.*, 2013, pp.116-124). Entre ellos destaca el procedimiento descrito para embriogénesis somática por Cai *et al.*, (1999).

El protocolo comprende la desinfección de los frutos en hipoclorito de sodio al 20% y Tween 20 y el almacenaje de las semillas a 4°C previo a la extracción de embriones, seguido de tres medios de cultivo consecutivos (Cai *et al.*, 1999, p. 62).

Para la inducción de la embriogénesis somática Cai *et al.*, (1999, pp. 62-63) describieron tres medios secuenciales: A) el de inducción promueve la

formación de callos potencialmente embriogénicos, preparado con sales Murashige y Skoog (1962) al 50% suplementado con 400mg/L glutamina, 50 mg/L mioinositol, 0,4 mg/L tiamina-HCl, 2 mg/L glicina, 0,5 mg/L ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina, 6% de sucrosa y la hormona ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a concentración de 10 mg/L y vitaminas. B) El de maduración induce la formación de embriones somáticos, este medio contiene los mismos reactivos que el medio anterior a excepción de la hormona y C) el medio de germinación para promover el desarrollo de plántulas a partir de embriones somáticos, preparado con sales Murashige y Skoog (1962) suplementado con 100 mg/L mioinositol, 0.4 mg/L tiamina-HCl, 3% sucrosa. El pH de todos los medios se ajusta a 5.8 y en agar al 0.8%.

Debido a que *Carica* y *Vasconcellea* se separaron en una etapa evolutiva temprana y compartieron un ancestro en común (Aradhya *et al.*, 1999, pp. 579-586; Van Droogenbroeck *et al.*, 2002, p.289) es probable que el comportamiento *in vitro* de *Vasconcellea* spp. sea similar al observado en protocolos empleados para miembros del género *Carica*. En base a lo mencionado el presente estudio pretende establecer un protocolo de inducción de la embriogénesis somática de *Vasconcellea pubescens* basado en protocolos de embriogénesis somática conocidos para papaya de manera que se establezcan las mejores condiciones para su desarrollo.

Justificación

De acuerdo con la Organización de Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas [FAO] (2015) la producción de frutales tropicales en el Ecuador aumentó considerablemente entre los años 2010 y 2011, lo que confirma que el potencial y el valor económico de *Vasconcellea* spp. debe ser aprovechado. Adicionalmente, este trabajo podría promover la conservación y manejo *in situ* de los frutales nacionales comestibles del género *Vasconcellea* spp. el cuál, a pesar de su importancia, ecología y distribución ha sido poco estudiado (Scheldeman, *et al.*, 2007, p. 1869). Según Ministerio del Ambiente (2010) hay

una gran importancia social y económica enfocada en los recursos filogenéticos de manera que existan más estudios en base a la diversidad genética vegetal del Ecuador, y se espera que para el 2020 el sector agrícola sea competitivo y productivo, de manera que ingrese al mercado internacional forjando una sostenibilidad ambiental y alimentaria (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP], 2008).

V. omnilingua y *V. horovitziana* se encuentran en peligro de extinción dentro de la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza [IUCN] , así como *V. palandensis*, *V. pulchra*, y *V. sprucei* (Scheldeman *et al.*, 2007, p.1869; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p.4). Tanto *V. chilensis* como *V. weberbaueri*, también deberían incluirse en la lista roja según las investigaciones realizadas por IUCN, de ser así entonces un tercio de las 21 especies conocidas de *Vasconcellea* se encontraría en un estado de riesgo (Benítez, Lobo, Delgado y Medina, 2013, p.188; Kyndt *et al.*, 2005, p.1033; Scheldeman *et al.*, 2007, pp.1869-1873; Scheldeman *et al.*, 2011, pp. 220-221).

En Bolivia se ha reportado el aumento en la quema, el pastoreo, la extensión de áreas de cultivo, en zonas de alta afluencia de *Vasconcellea*, y por consiguiente, se ha producido una disminución de las poblaciones silvestres, lo que puede representar un riesgo para su conservación *in situ* (IUCN, 2016; Benítez *et al.*, 2013, p. 188; Scheldeman *et al.*, 2011, pp. 223-224; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p.71).

V. pubescens y *V. candicans* corresponden a una parte de las especies de *Vasconcellea* las cuales son consideradas poseen gran potencial económico y de mejoramiento vegetal en el Ecuador (Morales y Morales, 2006, p.118).

Existe poca información con respecto a los estudios de conservación de *Vasconcellea*, pero dentro de los métodos de conservación que se han planteado, la conservación *in situ* se ha realizado en áreas de protección, es

decir, un control en los hábitats naturales de dichas especies para recobrar las poblaciones que se han perdido, sin embargo, nueve de las 21 especies conocidas no están dentro del zonas de protección, y de estas nueve, cuatro son parte de la lista roja del IUCN (Scheldeman *et al.*, 2011, pp. 225). Mientras que *ex situ*, ninguna de las especies que se hallan en la lista roja se encuentran protegidas, ni existen colecciones de bancos de genes de las mismas, en cuanto al resto de las especies se mantienen en bancos de semillas o a su vez en el campo, en donde se han reportado considerables pérdidas (Scheldeman *et al.*, 2011, pp. 225-226).

Debido a que *Vasconcellea spp.* es un género silvestre, se pueden encontrar genes de interés biotecnológico para el mejoramiento vegetal de *Carica papaya* (Caetano *et al.*, 2008, pp.241-242; Pereira, Neto, Junior, Rabelo y Pereira, 2014, pp.567-568), como por ejemplo, genes que puedan hacer frente a la infección del virus de la mancha anular al cual *Vasconcellea spp.* es resistente (Badillo, 1993; Pereira *et al.*, 2014, pp.567-568), por lo tanto, el protocolo descrito podría utilizarse además para la obtención del material vegetal para este tipo de investigaciones y llegar así a un mejor entendimiento de su diversidad genética.

Alcance del Trabajo de Titulación

El alcance del presente trabajo consiste en lograr la estandarización de un protocolo de embriogénesis somática en “papaya de alta montaña” *Vasconcellea pubescens*, que permita establecer las condiciones adecuadas para la obtención de callos potencialmente embriogénicos. Eventualmente, en trabajos subsiguientes se podrían obtener plántulas *in vitro* de *Vasconcellea pubescens* estandarizando un protocolo completo para micropropagación. La metodología derivada de este trabajo podría ensayarse en otros miembros del género *Vasconcellea* de manera que estos puedan considerarse como modelos de estudio de plantas frutales tropicales.

Finalmente, este trabajo pionero en el Ecuador, podría ser utilizado en la industria, aprovechando los beneficios potenciales de *Vasconcellea* spp.

Objetivos

Objetivo General

Establecer un protocolo de inducción a la embriogénesis somática en “papaya de alta montaña” *Vasconcellea pubescens*.

Objetivos Específicos

- 1) Inducir embriogénesis somática en embriones cigóticos de *Vasconcellea pubescens* empleando dos grupos de medios de cultivo diferentes anteriormente probados en *Carica papaya*.
- 2) Evaluar la respuesta embriogénica resultante de los correspondientes medios de cultivo empleados mediante análisis estadístico.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. *Vasconcellea* y *Carica*

Las papayas mexicanas/guatemaltecas surgieron de un ancestro de la familia Caricaceae, que se originó en África, a partir del cual se distribuyó a Centro América, y se diversificó a lo largo de Sudamérica en el periodo geológico Oligoceno tardío, posteriormente esta diversificación dio lugar al género *Vasconcellea*, en este período el clima era húmedo y tropical (Carvalho y Renner, 2012, pp.50-51).

En 1867 se determinó que *Carica* y *Vasconcellea* tenían diferencias muy estrechas y por ende se incorporó a *Vasconcellea* en *Carica* como una sección (Bentham y Hooker ,1867). Estudios moleculares y filogenéticos (Aradhya *et al.*, 1999, pp. 579-586) establecieron que *Vasconcellea* debía considerarse un género independiente (Badillo, 2000, 2001, pp. 74-79). Inicialmente se determinó que el número original de 57 especies de *Carica* debía reducirse a 27 (Badillo, 1967). Posteriormente, se estableció que *Carica* debía estar constituida por una especie y *Vasconcellea* por 21 (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 213). Debido a sus semejanzas morfológicas, y sus usos *Carica* y *Vasconcellea* han sido tratados como parientes cercanos (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, p.52; Scheldeman *et al.*, 2011, p. 213).

Se conoce hasta que *Carica* y *Vasconcellea* se separaron hace 27 millones de años, los géneros más cercanos a *Vasconcellea* son *Jarilla* y *Horovitzia* (Carvalho y Renner, 2012, pp.48-49; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p.58). Entre los 23 y 12 millones de años se formó la Cordillera de los Andes que provocó la diversificación del género *Vasconcellea* (Carvalho y Renner, 2012, p.52).

Según un análisis realizado por Pereira y otros (2014, p. 572), *V. cundinamarcensis* y *C. papaya* son más cercanos a comparación con otras especies de *Vasconcellea*, por lo tanto debe ser considerada en programas de mejoramiento de *Carica*.

Caricaceae es una familia que se ha distribuido considerablemente, tanto en Sudamérica y Centro América con 33 especies y dos en la parte tropical de África (Carvalho y Renner, 2012, p.46). *Vasconcellea* es una de los géneros que pertenecen a esta familia, y se distribuyen ampliamente en la parte noreste de los Andes (Carvalho y Renner, 2012, p.46).

Plantas silvestres de *C. papaya* se originaron en Mesoamérica, en la península de Yucatán hasta Guatemala (Manshardt y Zee, 1994) pero, también se ha registrado en la costa del pacífico en Costa Rica, siendo *Carica papaya*, la única especie que se distribuye al norte de Centro América (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 217; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p.52).

Vasconcellea es un género silvestre, sin embargo, algunas especies se han domesticado y semi domesticado en diferentes lugares fuera de sus zonas de origen (Kyndt *et al.*, 2005, p. 1033; Scheldeman *et al.*, 2011, p. 217), adicionalmente, es capaz de volver a su vida silvestre, y poblar zonas de bosques sin vegetación y los bordes de las carreteras de manera no invasiva debido a que no son consideradas ni una amenaza ni una mala hierba (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 217).

Los cultivos de *Vasconcellea* se adaptan fácilmente a regiones templadas pero poseen preferencia por las regiones andinas (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p.51; Rodríguez *et al.*, 2005; Scheldeman *et al.*, 2011, p. 217). *V. pubescens* se inclina por climas más frescos (Moya-León, Moya y Herrera, 2004, pp.211-212). *V. pubescens* es un sinónimo empleado para *V. cundinamarcensis* (Benítez *et al.*, 2013, p.188; Moya-León *et al.*, 2004, pp.211-212).

Vasconcellea definitivamente se asocia a la región andina principalmente al sur de Ecuador, siendo su diversidad de 16 especies de las 21 conocidas (Tabla 1) (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p.51, Scheldeman *et al.*, 2011, p. 217; Scheldeman *et al.*, 2007, p.1868).

Tabla 1. Distribución de especies del género *Vasconcellea*

Especies	País
<i>V. candicans</i>	Ecuador, Perú
<i>V. cauliflora</i>	Colombia, Costa Rica, Venezuela, Nicaragua, Panamá, Guatemala, México, Honduras, El Salvador
<i>V. chilensis</i>	Chile
<i>V. crassipetala</i>	Colombia, Ecuador
<i>V. cundinamarcensis</i>	Colombia, Ecuador, Venezuela, Perú, Bolivia, Panamá, Chile, Costa Rica
<i>V. glandulosa</i>	Bolivia, Argentina, Perú, Brasil
<i>V. goudotiana</i>	Colombia, Ecuador (reciente introducción), Venezuela
<i>V. horovitziana</i>	Ecuador
<i>V. longiflora</i>	Ecuador, Colombia
<i>V. microcarpa</i>	Ecuador, Perú, Colombia, Venezuela, Brasil, Bolivia, Costa Rica, Panamá
<i>V. monoica</i>	Ecuador, Bolivia, Perú, Colombia
<i>V. omnilingua</i>	Ecuador
<i>V. palandensis</i>	Ecuador
<i>V. parviflora</i>	Ecuador, Perú
<i>V. pulchra</i>	Ecuador, Colombia
<i>V. quercifolia</i>	Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú
<i>V. sphaerocarpa</i>	Colombia
<i>V. sprucei</i>	Ecuador
<i>V. stipulata</i>	Ecuador
<i>V. weberbaueri</i>	Ecuador, Perú
<i>V. X heilbornii</i>	Ecuador, Perú

Tomado de Scheldeman, *et al*, 2011, p. 214.

Por otro lado, se registran especies de *V. parviflora* en las costas de Ecuador y Perú y otras especies como *V. pulchra* y *V. chilensis* que tienden a localizarse en climas extremos de humedad y calor (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p.52). Asimismo, *V. cauliflora* que se distribuye de forma silvestre desde México

hasta Ecuador y *V. stipulata* que coloniza la región norte del Perú y la región centro-sur del Ecuador, en provincias como Loja y el Azuay (Carvalho y Renner, 2012, p.48). En cambio, *V. cundinamarcensis* se distribuye de forma precisa en la región andina (Rodríguez *et al.*, 2005, p.5).

La papayuela o *V. cundinamarcensis* se distribuye a lo largo de los países andinos específicamente en Colombia y Chile y el babaco o *V. x heilbornii* se distribuye a lo largo de Ecuador y el sur de Colombia (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 49).

Las papayuelas que se distribuyen en Chile son representativas como una fuente de exportación (Caetano *et al.*, 2008, p.242).

De acuerdo a un estudio realizado por Morales, Medina y Yaguache, (2004, pp. 5-6) se ha establecido que Loja es la provincia del Ecuador con mayor biodiversidad de especies de *Vasconcellea*, debido a su adecuado ecosistema y a sus variados microclimas.

Las regiones templadas en las que se distribuye *Vasconcellea*, alcanza precipitaciones de 800 a 1400 mm (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p.51).

1.2. Potencial agronómico de *Vasconcellea* spp.

1.2.1. *Vasconcellea* spp. como cultivo frutal tropical y sus usos

Vasconcellea es una fruta con un alto potencial agronómico, generalmente en pueblos y comunidades andinas donde se cosecha su fruto, también son apetecidas en el mercado internacional consumidas en jugos, salsas, mermeladas, como fruto fresco y en pastelería (Consejo Nacional de Investigación, 1989; Banco de Desarrollo de América Latina [CAF], 1992; Caetano *et al.*, 2008, p.242; Carrasco *et al.*, 2009, p.332), debido a sus propiedades organolépticas, y su alto potencial como alimento, pues es fuente de proteínas y vitaminas (Morales *et al.*, 2004, p.16).

El virus de la mancha anular es uno de los enemigos que ataca a las plantas de papaya, especialmente al fruto, cuando las infecta detiene su crecimiento y dejan de producir frutos, por lo tanto, se han tomado medidas de control como realizar cruzamientos y desarrollar cultivos transgénicos (Kalam, Rabbani, Amin, 2012, p.17067), sin embargo, la mejor solución actualmente es el desarrollo de una variedad que tolere el virus, y *Vasconcellea* posee el potencial para programas de mejoramiento de *Carica papaya*, respecto al virus de la mancha anular (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p.58; Sengupta, Das, Acharyya, Prasad y Ghose, 2014, pp.1-2; Scheldeman *et al.*, 2003, p.75; Caetano *et al.*, 2008, p.242; Pereira *et al.*, 2014, p.568).

V. cundinamarcensis (sinónimo *V. pubescens*) y *V. x heilbornii* son variedades comerciales (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 49), siendo *V. cundinamarcensis* la menos explotada (Morales *et al.*, 2004, p.16).

Cultivos de *V. cundinamarcensis* (sinónimo *V. pubescens*) han funcionado bien en jardines y pequeñas parcelas en las regiones andinas de Colombia, con intenciones comerciales (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 49). Mientras que, por otro lado variedades como *V. parviflora*, *V. microcarpa*, *V. monoica*, *V. goudotiana*, solo se consumen localmente (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 50).

Según Coppens d'Eeckenbrugge y otros (2014, p. 50), *V. stipulata* debería ser una de las especies domesticadas, por su atractivo aroma, superior al tan solicitado babaco, asimismo, *V. pubescens* (Moya-León *et al.*, 2004, p.212).

En la familia *Caricaceae*, las plantas son latíferas, es decir que, dejan salir látex como modo de defensa ante algún daño provocado por un predador (Konno *et al.*, 2004, p.370), o por daños ambientales, puesto que el látex contiene compuestos que protegen a la planta (Teixeira, Ribeiro, Gomes, Lopes, Salas, 2008, p. 956).

Se contempla que *Vasconcellea* puede ser una primordial fuente de papaína (Scheldeman *et al.*, 2007, p.1869; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 50).

Siendo, las enzimas de *V. cundinamarcensis* (sinónimo *V. pubescens*) las que poseen una actividad proteolítica aun mayor que *Carica*, de 5 a 7 veces más efectiva como látex liofilizado, visto en ensayos preliminares (Tabla 2) (Teixeira *et al.*, 2008, p. 956; Mello *et al.*, 2008, p.238). Y con una actividad enzimática significativa (24.13 U/mg enzima) en comparación con la papaya comercial (Vidal, Finot, Mora y Venegas, 2009, p.101). A su vez, la papaína cruda de *V. cundinamarcensis* sirve como ablandador de carnes (FAO, 1992). Sin embargo, a pesar de su alta actividad proteolítica a comparación de *C. papaya*, la cantidad de látex que es posible extraer de *Vasconcellea* es menor a *Carica*, y esto se debe al pequeño tamaño del fruto (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 229), no obstante, se puede lograr una buena producción de látex de *Vasconcellea*, tomando en cuenta una mayor cosecha (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 229).

La usos de la papaína en *Caricaceae* en la industria y la medicina son diversos, entre ellos están: clarificación de la cerveza, evitar el encogimiento de las telas, en el curtido de pieles (Sengupta *et al.*, 2014, pp.1-2), tratamientos digestivos, como fuente de proteínas en los cereales y en la preparación de quesos, tratamientos dermatológicos como la cicatrización y la limpieza de la piel (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 216).

El látex presente en la papaya tiene una alta toxicidad que actúa como mecanismo de defensa frente a invasores herbívoros Konno *et al.*, (2004, pp.370-371).

También se ha visto la resistencia de *Vasconcellea* a climas fríos (Benítez *et al.*, 2013, p. 188) un ejemplo de esto es *V. cauliflora* (Jacq.) A.DC. que ha permitido preservar otras variedades de papaya de alta montaña en climas tropicales con temperaturas muy bajas (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 50).

Tabla 2. Actividad proteolítica de la papaína de ciertas especies de *Vasconcellea* ecuatorianas

Especies	Actividad proteolítica (mU BAPA/mg látex seco)
<i>Carica papaya</i> (Referencia)	10,4
<i>V. X heilbornii</i> "Babaco"	38,1
<i>V. X heilbornii</i> var.	
<i>chrysopetala</i>	127,6
<i>V. stipulata</i>	129,4
<i>V. cundinamarcensis</i>	57
<i>V. monoica</i>	55,1

Tomado de Scheldeman *et al.*, 2003, p.77.

En lo que respecta a *Vasconcellea*, es su capacidad de tratar úlceras gástricas (Mello *et al.*, 2008, pp.237-244), puede ser empleada para el tratamiento de enfermedades micóticas de la piel, verruga plantar y a su vez para tratar la esclerosis arterial (FAO, 1992), controlar las deposiciones mediante la ingesta de sus semillas (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 51).

Vasconcellea puede llegar a suplantar determinados nichos comerciales a nivel internacional (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 48), se conoce que alrededor de 82 millones de toneladas de fruta fresca se han producido en el año 2014 (FAO, 2016), y solo en Chile se cultivan alrededor de 225 ha de *V. pubescens*, debido a su importancia económica y de exportación (Carrasco *et al.*, 2009, p.332), por tanto, su productividad debe ser aprovechada (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2014, p. 48).

1.3. Micropropagación

Los métodos de cultivo *in vitro* se basan en métodos convencionales, empezando por explantes como embriones o pequeñas partes de las plantas que dan lugar a numerosos clones de la misma planta, por este motivo, se lo conoce como micropropagación (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p. 30).

Cada planta posee células diferenciadas e indiferenciadas, dentro de las indiferenciadas está el tejido parenquimático y las células meristemáticas, los cultivos en suspensión y los callos, mientras que las células diferenciadas están vinculadas al desarrollo de órganos (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, pp. 20-21).

Las células vegetales se agrupan en cuatro tipos fundamentales:

1) meristemáticas poseen una pared celular muy delgada, estas células entran en mitosis para incrementar la longitud o grosor del órgano vegetal al que pertenecen. Esta división celular ocurre de forma prolongada durante el ciclo de vida de la planta. 2) parenquimáticas células de forma variable de pared celular comparativamente delgada y que forman parte del tejido vascular, se consideran no diferenciadas y con la capacidad de re-asumir actividad meristemática, 3) colenquimáticas células elongadas y especializadas para dar soporte a la planta, se encuentra principalmente en tallos jóvenes y peciolo, poseen propiedades de de-diferenciación y actividad meristemática. 4) esclerenquimáticas son células de forma variada que poseen una pared celular secundaria en el interior de la pared primaria, son altamente de-diferenciadas y consideradas como incapaces de re asumir actividad meristemática (Trigiano y Gray, 2005, pp.74-75).

Las plantas poseen la capacidad de totipotencia, puesto que mantienen la capacidad de volver a su fase meristemática, siempre y cuando, mantengan intacto su núcleo y membrana celular (Bhojwani y Dantu, 2013, p.63), a partir de esta fase meristemática se da la formación de un callo indiferenciado (lo cual se denomina de-diferenciación), el cual posteriormente puede dar origen a órganos vegetales o a su vez a una planta completa (Bhojwani y Dantu, 2013, p.63).

La micropropagación puede darse de forma sexual o asexual, la micropropagación sexual involucra el uso de embriones cigóticos originados a partir de la fusión de gametos y dan lugar a las semillas, por otro lado, cuando

ocurre de forma asexual da lugar a plantas clones a partir de embriones somáticos, que se originan de un tejido u órgano de la planta (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, pp. 22, 29).

V. heilbornii es la única especie de *Vasconcellea* que se ha propagado por métodos vegetativos de forma artificial (Scheldeman *et al.*, 2011, p. 217), la propagación vegetativa es la producción de una planta a partir de partes vegetativas con la característica de diferenciación celular y la capacidad de multiplicarse una célula, órgano o tejido (Bhojwani y Dantu, 2013, p.11-22).

La micropropagación a partir de embriones cigóticos posee muchas ventajas, entre ellas, que las plantas que se regeneran a partir de estos embriones serán relativamente baratas por la abundante disponibilidad de semillas, porque se obtienen fácilmente, y además pueden ser almacenadas por largos periodos (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p. 29).

La embriogénesis somática es uno de los procesos del cultivo *in vitro* el cual consiste en la diferenciación de la células somáticas al desarrollo del embrión, (Bahadur, Rajam, Sahijram, Krishnamurthy, 2015, p.317; Bhojwani y Dantu, 2013, p.75), y está dividido en dos fases, la primera es la inducción de la embriogénesis en un medio enriquecido con auxina y la segunda fase es la transferencia a un medio libre de auxina para la maduración de los embriones (Su, Su, Liu y Zhang, 2013, p.168). En ambas etapas de la embriogénesis se necesitan las condiciones adecuadas y el medio de cultivo apropiado, obteniendo mayor cantidad de embriones por caja (Bahadur *et al.*, 2015, p. 318; Bhojwani y Dantu, 2013, p.76).

En el cultivo *in vitro* los callos son estructuras desorganizadas que pueden inducirse a formar embriones, subcultivándolos en un medio de cultivo apropiado para este propósito (Bhojwani y Dantu, 2013, p.39). Los callos pueden presentarse diferentes incluso si provienen del mismo explante, variando su textura (compactos a friables que se desmenuza), color (oscuros o claros), características que dependen del medio de cultivo o del paso del

tiempo (Bhojwani y Dantu, 2013, p.39), por ejemplo, en *Vitis vinífera* las células embriogénicas adoptan coloraciones amarillas o blancas y se identifican a partir de su morfología (Bahadur *et al.*, 2015, p. 319).

1.4. Hormonas

Existen sustancias que se secretan endógenamente que cumplen con un rol regulatorio con fines de crecimiento y desarrollo, las cuales se denominan fitohormonas o sustancias de crecimiento, estas sustancias orgánicas inducen una respuesta fisiológica, como su crecimiento, su diferenciación y desarrollo en bajas concentraciones (Davies, 2013, p.1; George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.175), asimismo otros compuestos sintéticos poseen una capacidad fisiológica similar a las anteriores (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.175).

Las hormonas son la forma más importante de comunicación intercelular dentro de la planta (Hopkins y Hüner, 2009, p. 305). El término hormona fue empleado primeramente en la fisiología animal y su nombre deriva del griego ὁρμῶν (hormon = "excitado") de verbo ὁρμᾶν (horman = excitar, producir movimiento (Henderson, 2005, p. 8), ya que emiten señales químicas. Se sintetizan en un determinado lugar, se transportan a través del torrente sanguíneo hacia un determinado tejido y el posterior control de las respuestas fisiológicas en dicho tejido en base a la concentración de hormona existente (Davies, 2013, p1). Se conoce que las auxinas provocan una respuesta fisiológica en distintos lugares o tejidos a la distancia de donde se sintetizan, por ende se entiende que son transportadores de señales químicas (Davies, 2013, p1).

Existe una amplia gama de hormonas de entre las cuales están: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido absísico (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.175).

La concentración y el tipo de hormona que se empleen dependerá del tipo de cultivo celular (Smith, R., 2013, p.32).

1.4.1. Auxinas

Su nombre proviene del griego “auxein” que significa alargamiento o crecimiento (Tran y Pal, 2014, p.2; George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.175).

Las auxinas se sintetizan en órganos en crecimiento y zonas meristemáticas por lo cual inducen la elongación y división celular; dan lugar a la formación de meristemas; y actúan en todas las etapas de la planta (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.176; Hopkins y Hüner, 2009, pp. 306, 311).

A pesar de que las plantas poseen ciertos niveles de hormonas endógenas, es importante suplementar el medio con hormonas exógenas, para estimular una mayor respuesta fisiológica, dependiendo de lo que se quiera obtener, generalmente estas hormonas se requieren en bajas concentraciones (0,000221-2.21 mg/L) (Bhojwani y Dantu, 2013, p.31).

Una de las auxinas habituales es la IAA o ácido índol-3-acético, la cual se usa en la inducción de callo en algunas plantas y además en el crecimiento de embriones a concentraciones bajas (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.176).

Una de las ventajas que poseen las hormonas exógenas análogas de IAA es que no se oxidan como ocurre con la hormona IAA endógena, por lo tanto, es preferible emplear la hormona sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.177).

Una de las auxinas más empleadas para inducir la formación de callos es 2,4-D (Bahadur *et al.*, 2015, p.731; Bhojwani y Dantu, 2013, p.39).

1.4.1.1. Forma de acción de las auxinas

Durante la embriogénesis somática el transporte polar de auxinas es primordial para determinar la bipolaridad del embrión globular en una fase temprana (Bahadur *et al.*, 2015, p. 318).

Las auxinas se transportan vía vascular a través de los tejidos. Se puede entender como un transporte polar a través de las células, específicamente en

el parénquima. Dicho efecto se conoce como la teoría quimiostática de difusión polar. De esta manera se regula el metabolismo de la auxina en la planta (Petrasek y Friml, 2009, p. 2677; George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.182).

En *Arabidopsis thaliana* se observó que el 2,4-D en el medio de cultivo promovió la pérdida de la capacidad morfogénica y regenerativa de los explantes en función del tiempo de exposición de la hormona (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.179). De forma interesante se observó que se podía recuperar la capacidad regenerativa si se retiraban los callos del medio de cultivo con 2,4-D (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.179).

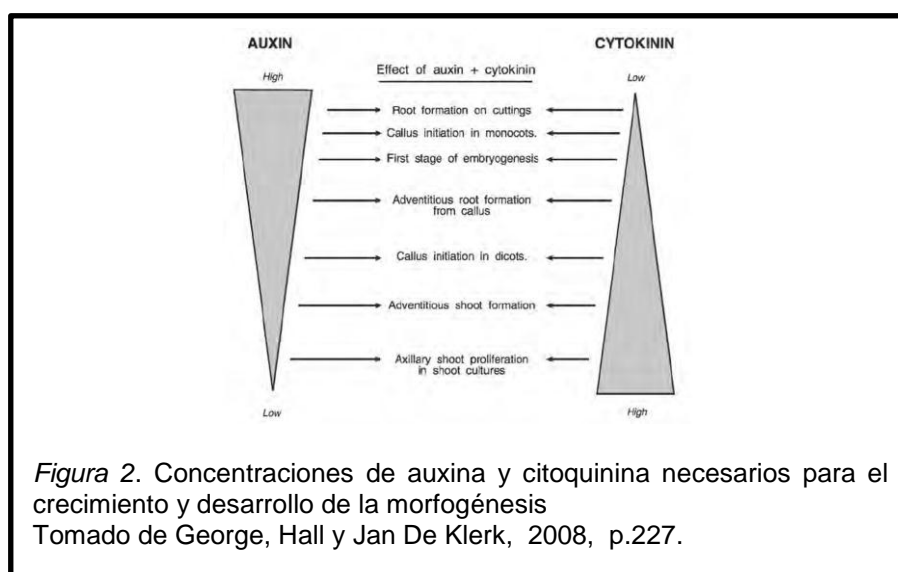
Igualmente, cuando se transfieren embriones somáticos a un medio sin regulador de crecimiento, se inhibe la embriogénesis, según ha ocurrido en *Arabidopsis* y *Daucus carota* (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.181).

Uno de los inhibidores de los efectos de las auxinas es la radiación debido a que IAA es inestable en un medio acuoso y por ende puede ser degradada por este agente, la oxidación sucede una vez que la hormona ha cumplido su propósito en el medio (Hopkins y Hüner, 2009, p. 311), mientras que cuando se trabaja con medios sólidos la degradación de IAA es mucho menor, y cuando se adhiere hormonas como 2,4-D y ANA al medio no ocurre este tipo de oxidación, puesto que son resistentes a la oxidación por dicha enzima (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.179; Hopkins y Hüner, 2009, pp. 311, 314). Esto ocurre porque IAA oxidasa es una enzima que provoca la inactivación de la hormona IAA. Dicha inactivación ocurre en presencia de oxígeno, el cual hace que la hormona sufra una reacción oxidativa y por ende la vuelve inestable (Hopkins y Hüner, 2009, pp. 311).

Según Hopkins y Hüner, (2009, p. 309) las semillas poseen una mayor cantidad de IAA que el resto de tejidos vegetales, y esto hace que se acelere el crecimiento de las plántulas cuando germinan las semillas.

Al remover la auxina exógena del medio de maduración durante la embriogénesis somática, los genes de auxina endógena se expresan (Su *et al.*, 2013, p.167).

Las auxinas pueden interactuar con otras hormonas como la citoquinina para generar reacciones como la elongación de las células vegetales o su división celular y se usan juntas para el desarrollo de callo embriogénico, células en suspensión y como un regulador en la morfogénesis vegetal (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, pp.175, 183). La relación entre citoquina-auxina es importante para evidenciar efectos fisiológicos en la planta, y es por esto que también se sabe que juntas son responsables de la iniciación de brotes (Figura 2), siendo las auxinas las que actúan sobre la replicación del ADN de las células, mientras que, las citoquininas toman control sobre la mitosis celular (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.185).



Las citoquininas y las auxinas ejercen roles antagónicos en cuanto al crecimiento de meristemas axilares, siendo las citoquininas las que provocan su elongación mientras que las auxinas ejercen un efecto contrario (Wang *et al.*, 2014, p.2056).

Según Solís, Olivera y La Rosa, (2011, p.345), se pueden formar plantas de meristemas apicales o yemas a partir de un equilibrio entre citoquininas y auxinas.

Los efectos fisiológicos de la planta están ligados a la concentración de hormona en el medio, si se emplean concentraciones de 0.0221- 2.21 mg/L, ocurre un efecto positivo en el tejido vegetal, mientras que al emplear concentración mayores a 2.21 mg/L, el efecto es una reacción inhibitoria (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.185).

A una concentración de 0.5–1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D se logró inducir la embriogénesis somática en *Daucus carota* (Bhojwani y Dantu, 2013, p. 78).

Cuando el resultado es la inducción a callos a partir de un explante determinado, las células empiezan a de-diferenciarse y se dividen, es decir, que se reprograman para dar origen a callos, ésta reprogramación ocurre cuando la hormona actúa sobre el DNA sobre metilándolo (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.186). Se ha visto un alto grado de DNA metilado en embriones somáticos en una etapa temprana en cultivos de *Cucurbita pepo* L (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.186).

La auxina generalmente empleada para inducir la formación de callos y su crecimiento es 2,4D, también se utilizan otras como ANA o IAA (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.186).

Las auxinas actúan en respuesta a la luz o a la gravedad (Zhao, 2010, p.1).

2,4-D actúa como un estimulante para la de-diferenciación de las células vegetales en el medio de inducción haciéndolas competentes para la embriogénesis, puesto que cuando la hormona se encuentra en el medio induce una división asimétrica (Bhojwani y Dantu, 2013, p.81).

La regulación de la homeostasis de la auxina en respuesta a la vía de señalización hormonal, su cantidad y localización está dada por transportadores de auxina presentes en la membrana plasmática de la célula (Tran y Pal, 2014, p.3).

Las auxinas también son conocidas por promover la iniciación del enraizamiento y brotes axilares (Hopkins y Hüner, 2009, p.311), dependiendo de la concentración de hormona con la que se trabaje en el medio de cultivo, se obtendrán diversos efectos, por lo tanto cambios en la concentración de la hormona provocará respuestas fisiológicas diferentes, teniendo en cuenta esto, dependerá de la variedad vegetal con la que se esté trabajando para observar diversos efectos y resultados (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.185).

1.4.2. Citoquininas

Las citoquininas son hormonas comúnmente empleadas en cultivo *in vitro* que cumplen funciones fisiológicas para propagación y para inducir la diferenciación de las células (Bhojwani y Dantu, 2013, p. 122; Tran y Pal, 2014, p.67) como intervenir en el enraizamiento y la aparición de brotes, el desarrollo vascular, retardo de la senescencia (Bhojwani y Dantu, 2013, p. 231; Hopkins y Hüner, 2009, p.339-340; Tran y Pal, 2014, pp.56, 66), además de la división celular también actúan en sitios específicos como en los meristemos florales, por lo tanto, promueven la floración y la ramificación (Hopkins y Hüner, 2009, p.340; Tran y Pal, 2014, p.67).

Estas hormonas se transportan por el xilema, desde las raíces donde se sintetizan hacia las hojas, cuando han cumplido su función en las hojas, se dirigen a otros órganos de la planta como los frutos (Tran y Pal, 2014, p.63; Hopkins y Hüner, 2009, pp. 341-343).

1.4.2.1. Forma de acción de las citoquininas

Las citoquininas son hormonas que se sintetizan en mayor parte en las raíces (Hopkins y Hüner, 2009, p.340), y son capaces de estimular la síntesis de proteínas y participar en el ciclo celular, no obstante, el efecto de este tipo de

hormonas es mucho más considerable cuando actúa en conjunto con auxinas para inducir la morfogénesis y la división celular (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p. 205).

Cuando las citoquininas están en presencia de auxinas estimulan la división celular en los tejidos vegetales (Hopkins y Hüner, 2009, p.343).

Las citoquininas se han empleado en conjunto con otras hormonas como las giberelinas para actuar en el crecimiento de la planta, siendo las primeras las que inducen a la división celular y aumentan su densidad, mientras que, las segundas promueven la elongación celular (Tran y Pal, 2014, p.67).

Altos niveles de la hormona citoquinina pueden provocar la muerte celular, o a su vez anomalías celulares (Bhojwani y Dantu, 2013, p.255; Tran y Pal, 2014, p.68).

Se ha visto en *Daucus carota* la inducción de la embriogénesis somática en presencia de citoquininas, al igual que en *Medicago sativa*, como también en *Podophyllum hexandrum*, la hormona BAP es necesaria para estimular la formación de embriones globulares (Bhojwani y Dantu, 2013, p. 79).

Con el empleo de 0.221 mg/L ANA y 1.105 mg/L BAP, se obtuvo una favorable diferenciación de brotes en callos de *Rubus fruticosus* (Bhojwani y Dantu, 2013, p. 122).

En especies como *Chrysanthemum* spp. y el *Arachis hypogaea* se requiere de auxinas y citoquininas para estimular la formación de brotes meristemáticos, mientras que en *Dahlia* spp. se emplean solo citoquininas (Bhojwani y Dantu, 2013, p. 231). Ambas hormonas se relacionan antagónicamente en la formación de brotes de raíz en *Nicotiana tabacum*, sin embargo, cuando la cantidad de citoquinina respecto a la de auxina es mayor, se induce la formación de brotes, y viceversa ocurre la formación de raíces (Figura 2) (Hopkins y Hüner, 2009, p. 344).

La necesidad de añadir citoquininas al medio de cultivo, se debe a que muchos tejidos y órganos vegetales que se aíslan *in vitro*, especialmente en plantas dicotiledóneas, no poseen la capacidad de sintetizar hormona suficiente para su crecimiento, por lo que de ahí surge la dependencia de algunos cultivos de callos de estas sustancias para dar lugar a la división celular (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p. 207).

Otro de los registros que se tiene con respecto a emplear citoquininas en medios de cultivos con callos de plantas dicotiledóneas es que cuando estos explantes requieren solo de auxinas para crecer, son capaces de crecer por largos periodos en presencia de una alta concentración de citoquininas en el medio sin la necesidad del uso de auxinas, debido a que este nivel de citoquininas incrementa la producción de auxina (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.214).

En cuanto al uso de citoquininas específicamente en embriogénesis, se emplean concentraciones generalmente de 0.1105-0,5525 mg/L para inducir la formación de callo embriogénico, pero a su vez existen indicios de que estas hormonas logran la inhibición de la embriogénesis cuando se trata de plantas monocotiledóneas, además altas concentraciones de citoquininas inhiben la formación de raíces (0.5-10 mg/L) (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.214).

Se pueden realizar pre tratamientos si se prefiere, es decir, que se pueden cultivar explantes en un medio con 2,4-D, y luego colocarlos un medio con ANA y BAP para de esta manera aumentar la producción de callos (George, Hall y Jan De Klerk, 2008, p.219).

1.5. Embriogénesis somática en *Caricáceas*

Muchas investigaciones han llevado a cabo la búsqueda de un protocolo eficiente para la embriogénesis somática a partir de cultivos en suspensión en *C. papaya*, estos protocolos se han utilizado en regeneración de plantas en

transformación genética (Mohamad, Vilasini, Noorsaadah, Norzulaani, 2006, p.48).

Cai *et al.*, (1999) describen un protocolo de embriogénesis somática en *C. papaya* transgénica muy detallado y efectivo. El material de partida empleado en este protocolo, fue la variedad hawaiana Sunrise (Cai *et al.*, 1999, p.62). Emplearon un medio de inducción de sales Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) al 50%, al 6% de sucrosa y la hormona ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a una concentración de 10 mg/L. El pH empleado en el medio fue de 5,8, (Cai *et al.*, 1999, pp. 62-63).

A su vez, realizaron un medio de maduración, el cual estaba compuesto de la misma forma que el medio de inducción con la excepción de que no se colocó la hormona 2,4-D, en esta etapa de la embriogénesis, los embriones se conservaron bajo luz fluorescente de color blanco en un fotoperiodo de 16 h a 25 °C, durante aproximadamente 2-4 semanas de manera que ocurra un cambio en el tamaño de los embriones, se elonguen y tomen una coloración verde (Cai *et al.*, 1999, pp. 62-63).

Por otro lado, Mohamad y otros (2006, p.48), desarrollaron un protocolo de embriogénesis somática en *C. papaya*, en donde el medio inicial estaba constituido de sales MS, y la hormona 2,4-D a una concentración de 10 mg/L, y sucrosa (6% w/v), se dio mantenimiento al cultivo en una composición similar al medio inicial pero con concentraciones de 2,4-D menores.

Mientras que, Schuabb y otros (2013, pp.117-118), describieron un medio de inducción con sales Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962), y el empleo de tres concentraciones de 2,4-D (0, 4.42, 8.84, 17.68 mg/L), con un pH de 5.8; se vio que en sus concentraciones más bajas de 2,4-D se indujo en mayor porcentaje la formación de callo, en comparación a la concentración de 17.68 mg/L.

Fitch y Manshardt (1990, pp.320-323), describieron un protocolo de embriogénesis somática en *C. papaya*, en un medio Murashige y Skoog, a una concentración de 2,4-D de 0.1-25 mg/L, donde obtuvieron cientos de embriones somáticos.

Jordan (2011, pp.481-485), evaluó la respuestas de *Vasconcellea chilensis* en presencia de tidiazurón y ácido indolacético en el medio nutritivo. Se obtuvieron brotes con apariencia de agregados compactos sobre el explante de coloración verde.

Según Nuño, Rodríguez, y Gutiérrez (2009, p. 1), se evaluó la embriogénesis somática en *Jarilla heterophylla*, con distintas concentraciones de hormona 2,4-D, obteniendo un 80% de callo embriogénico generado y un número considerable de embriones somáticos, en ausencia de 2,4-D no se indujo la embriogénesis somática.

Lo mencionado anteriormente es una recopilación de algunos estudios de micropropagación realizados en Caricaceae, sin embargo, el presente trabajo se basa en el protocolo diseñado para *C. papaya* por Cai *et al*, (1999).

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental

Se desarrolló el protocolo con dos tipos de medios: **IND** de “inducción” para estimular la de-diferenciación celular mediante ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), **MAD** de “maduración” para promover el desarrollo de embriones. Se realizaron dos ensayos cada uno conformado por los dos tipos de medios, de inducción seguido por medio de maduración.

Para el ensayo 1, el factor en estudio en medio **IND** fue la concentración de 2,4-D. Los niveles del factor concentración fueron de 4,5 mg/L; 10 mg/L; 67,5 mg/L y 112,5 mg/L mientras que para el ensayo 2 los niveles fueron de 0,5 mg/L; 2,5 mg/L; 4,5 mg/L y 10 mg/L. Se realizaron cinco repeticiones para cada nivel del factor en ambos ensayos con ocho embriones por unidad experimental en el ensayo 1 con un total de 200 embriones y con cuatro embriones por unidad experimental en el ensayo 2 con un total de 100 embriones.

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar DBCA. Las variables en estudio fueron el peso del callo embriogénico y la respuesta embriogénica, donde se consideró características como: la apertura de los cotiledones, la formación del callo, y crecimiento tanto en el ensayo 1 como en el ensayo 2, para determinar una respuesta positiva a los tratamientos.

Posteriormente, los callos obtenidos de los mejores tratamientos en el medio **IND**, se colocaron en el siguiente medio de maduración para obtención de embriones somáticos, de igual forma, se realizaron dos ensayos, en el primer ensayo el factor en estudio fue la composición de medios **MAD**, entendido como el medio de maduración 1 o 2 y considerando el medio de inducción del cuál provenía el callo original, con un total de ocho niveles para el factor composición. Para el segundo ensayo únicamente se consideró un medio de maduración por tanto el factor en estudio era la concentración del medio de inducción del cuál provenía el callo original, con un total de cuatro niveles para

el factor concentración. Las variables en estudio en ambos ensayos fueron el peso del callo embriogénico y el número de embriones somáticos obtenidos.

Para el análisis estadístico de los resultados se efectuó una prueba de Shapiro-Wilks mediante la plataforma Rcommander del sistema estadístico R-Project (Fox, 2005) para determinar la normalidad de los datos. En función de este resultado se empleó el modelo adecuado para cada tratamiento.

2.2. Obtención de las muestras de los frutos de *V. pubescens*

El material vegetal (Figura 3 y ANEXOS) se colectó en la Parroquia de Puéllaro, Provincia de Pichincha (N 0°4'6.6216" O 78°24'6.2316"), a partir de un único individuo de aproximadamente 4.10 m de alto, sus ramas tienen un diámetro de 10.18 cm, un tallo de 19.09 cm de diámetro y una base de 24.50 cm de diámetro, sus ramas tienen 2 m de largo, y sus hojas son palmeadas con un largo aproximado de 43 cm (Figura 4).

Posteriormente, a partir de la inspección morfológica de los frutos se determinó que el material vegetal empleado corresponde a *Vasconcellea pubescens* (Vásquez y Viteri, comunicación personal, 20 de enero de 2016), con un tamaño de 10-12 cm aproximadamente.

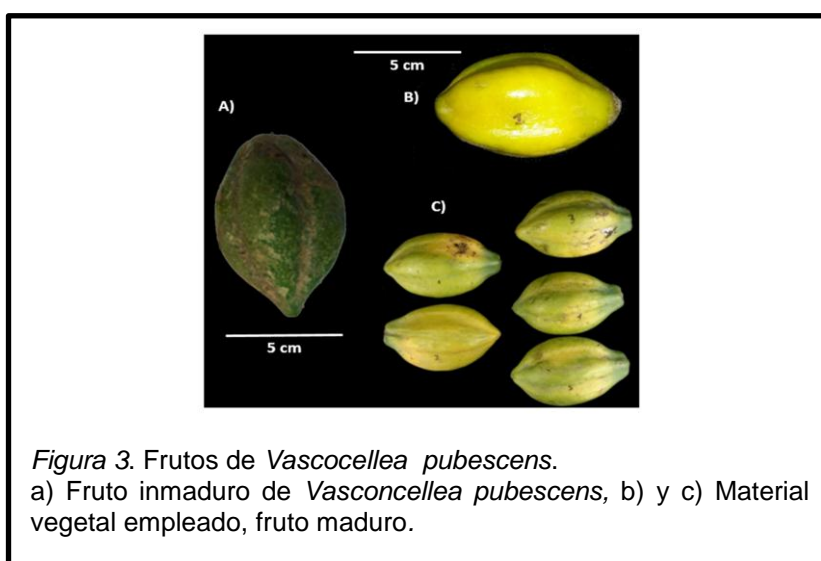


Figura 3. Frutos de *Vasconcellea pubescens*.
a) Fruto inmaduro de *Vasconcellea pubescens*, b) y c) Material vegetal empleado, fruto maduro.



Figura 4. Recolección del material vegetal.

a) Frutos inmaduros del árbol de *V. pubescens*, b) Árbol adulto de *V. pubescens* y c) Medición de la altura del árbol de *Vasconcellea*, d) Medición de la longitud de la hoja de *V. pubescens*, e) Flores de *V. pubescens*, f) Árbol joven de *V. pubescens*.

2.3. Proceso de desinfección

Luego de la recolección de los frutos del campo, los mismos se llevaron al Laboratorio CIEDI de la Universidad de las Américas, en donde se desinfectaron.

Se lavaron los frutos con un detergente líquido. Se preparó una solución de 600 mL de hipoclorito de sodio al 10%, luego se sumergieron los frutos de *V. pubescens* en la solución durante 10 minutos (Figura 5 a). La fruta se cortó por la mitad de forma vertical con un bisturí estéril dentro de la cámara de flujo laminar. Posteriormente, se retiró el mucílago de ambas partes del fruto encima de un papel toalla autoclavado (Figura 5 b). Las semillas libres de mucílago se colocaron en un matraz estéril.

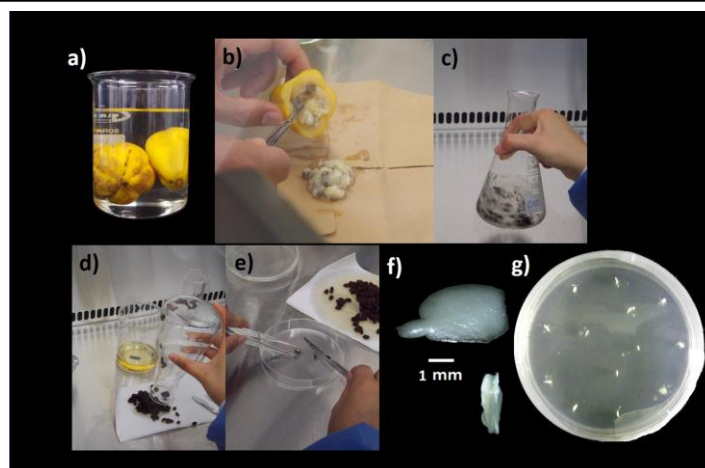


Figura 5. Proceso de desinfección, extracción y siembra del material vegetal.

a) Desinfección de frutos en hipoclorito de sodio al 10%, b) Remoción de semillas, c) Desinfección de semillas (etanol 3min, cloro al 10% 10 min), d) Secado de semillas, e) Extracción de embriones cigóticos, f) Embrión cigótico, g) Siembra en medios de cultivo.

Para la desinfección de las semillas, se preparó una solución de 50 mL de etanol al 70% y se sumergieron las semillas en la solución por 3 minutos, se desechó la solución de etanol en un vaso de precipitación sin dejar caer las semillas, luego se sumergieron las semillas en una solución de 50 mL de hipoclorito de sodio al 10% por 10 minutos (Figura 5 c). Se desechó la solución de hipoclorito de sodio, y se hicieron 3 lavados con agua destilada grado II autoclavada. Se desechó el agua, se secaron las semillas en el papel (Figura 5 d) y se almacenaron en microtubos para centrífuga de 50 mL a una temperatura de 4°C.

2.4. Etapa 1: Inducción de la embriogénesis

2.4.1. Extracción de los embriones

Los embriones se extrajeron en una Cámara de flujo vertical ESCO, sobre una caja Petri estéril, mediante el uso de un bisturí y una pinza autoclavada (Figura 5 e). Y se colocaron en el medio de cultivo.

2.4.2. Desarrollo del Experimento

2.4.2.1. Preparación de los medios de cultivo

En total se emplearon seis concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético:

Tabla 3. Ensayos 1 y 2 con sus correspondientes concentraciones empleadas

Ensayos	Concentración
Ensayo 1	4,5 mg/L; 10 mg/L; 67,5 mg/L y 112,5 mg/L
Ensayo 2	0,5 mg/L; 2,5 mg/L; 4,5 mg/L; 10 mg/L

Las cuales van a inducir la formación de callos embriogénicos. Se preparó un medio Murashige y Skoog (MS) (1962), en base a las especificaciones del fabricante (Sigma Aldrich D7299).

Primeramente se pesaron los compuestos de la solución madre descrita en la Tabla 4:

Tabla 4. Solución madre empleada en el medio de inducción

Solución madre	Concentración	Unidad
Mioinositol	0,27	mM
Ac. Nicotínico	0,0040	mM
Tiamina	0,0011	mM
Glicina	0,0266	mM
Glutamina	2,73	mM
Sacarosa	175,28	mM
Piridoxina	0,0024	mM

Se preparó la solución madre con 200 mL de agua destilada grado II en un vaso de precipitación de 500 mL, se disolvieron los compuestos en una plancha de agitación Fisher scientific con un agitador magnético, la misma se dosificó en cuatro vasos de precipitación de 50 mL, posteriormente, se midió el pH a 5.8, se colocó la hormona acorde a las concentraciones empleadas y se aforó a 125 mL cada una.

Paralelamente se preparó un medio control, se colocó 200 mL de agua destilada grado II en un vaso de precipitación, se midió el pH a 5.8, se colocó el agua en un frasco de vidrio y se pesó y disolvió 8 g/L de Bacto-agar en él. En base a experiencia previa en Caricaceae, la utilización del medio MS sin hormona provoca germinación de semillas, por tal motivo se utilizó un medio únicamente con agar.

Se autoclavaron los medios en una autoclave Tuttnauer a una temperatura de 121°C y una presión de 121 Pa por 15 minutos. Y se dispensaron en una Cámara de flujo vertical ESCO, en cajas Petri, se etiquetaron según su concentración de 2,4D, y según el medio control.

2.4.3. Siembra de los embriones

Los embriones se sembraron en los medios correspondientes (Figura 5 f, g) con la ayuda de una pinza autoclavada. Se cubrió las cajas con papel de aluminio. El ensayo se colocó en una cámara de germinación de plantas WISD Thermo stable a 23°C y una humedad de 48%.

2.5. Etapa 2: Maduración de los callos embriogénicos

2.5.1. Desarrollo del experimento

2.5.1.1. Preparación de los medios de cultivo

Primeramente se pesaron los compuestos en una balanza analítica BOECO BBI-31:

Tabla 5. Medio de maduración

Medio MS	Hormona
Medio de maduración 1 (MAD 1)	x
Medio de maduración 2 (MAD 2)	-

Ambos en base al medio Murashige y Skoog (1962), en la Tabla 4 se muestra la composición del medio MAD 1.

Tabla 6. Solución empleada en el medio de maduración 1

Solución madre	Concentración	Unidad
Mioinositol	0,0109	mM
Ac. Nicotínico	0,0044	mM
Tiamina	0,0011	mM
Glicina	0,0266	mM
Glutamina	2,73	mM
Sacarosa	175,28	mM
Piridoxina	0,0024	mM

Paralelamente se preparó el medio MAD 2 con la siguiente composición:

Tabla 7. Solución empleada en el medio de maduración 2

Compuestos	Concentración	Unidad
6-Bencilaminopurina	0,019	mM
Ácido naftalenacético	1- 0,023	mM

Se midió 200 mL de agua destilada grado II en una probeta y se colocó en un vaso de precipitación de 500 mL, se disolvieron los compuestos en una plancha de agitación térmica Fisher Scientific con un agitador magnético. Posteriormente, se midió el pH a 5,8 y se aforó el medio en una probeta a un volumen final de 300 mL.

Se autoclavaron los medios en una autoclave Tuttnauer con una temperatura de 121 ° C y a una presión de 121 Pa por 15 minutos. Y se dispensaron en una Cámara de flujo vertical ESCO, en cajas Petri, se etiquetaron según sea el medio de maduración o control.

2.5.2. Siembra de los callos embriogénicos

Los callos embriogénicos se sembraron en los medios correspondientes, se evaluó dos grupos: 12 cajas en el medio MAD y 8 cajas en un medio de agar como control, con la ayuda de una pinza autoclavada, respecto al ensayo 2 y en el ensayo 1 se consideró los dos medios de maduración: (MAD 1 y MAD 2). Ambos ensayos se colocaron en una cámara de germinación WISD Thermo stable G de plantas de 23°C a 25°C y una humedad de 48%, con un fotoperiodo 16 h de luz y 8 de oscuridad.

2.5.3. Mantenimiento de los ensayos

Se subcultivaron los callos cada dos semanas, en medio fresco correspondiente. Se pesó cada caja y se contabilizó el peso de los callos. Esto se realizó tanto en la etapa de inducción como de maduración. La respuesta morfológica se analizó en ambos ensayos en un microscopio Olympus SZ67.

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Medio de inducción

Debido a que no existen trabajos previos de embriogénesis somática en *V. pubescens*, se evaluó el ensayo 1 con un rango determinado de concentraciones de hormona, dentro del cual las concentraciones bajas dieron una mejor respuesta, por esta razón se realizó el ensayo 2 a concentraciones inferiores y se evaluó la mejor respuesta en cada uno de ellos.

3.1.1. Ensayo 1: peso de los callos

La prueba de Normalidad de Shapiro demostró la falta de normalidad de los resultados ($p= 3.878e-13$), por lo que se realizó un ajuste logarítmico $\log(y + 1)$ (Ecuación 1) de los pesos. Los datos se ajustaron a un modelo lineal. Se realizó un análisis de varianza para determinar el grado de significancia de los tratamientos (Tabla 8).

Se observó diferencia estadística significativa en el factor días, lo que determina que el peso de los callos aumenta conforme al tiempo.

También se observó diferencia estadísticamente significativa en la concentración de hormona, dentro del nivel de confianza de la prueba, lo cual indica en su medida que la concentración de hormona 2,4-D provoca un efecto que se manifiesta en el peso de los callos embriogénicos.

Tabla 8. Análisis de varianza ensayo 1 medio de inducción

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
dia	1	0.0969	0.09693	10.968	0.00242 **
conc	4	0.4689	0.11722	13.264	2.46e-06 ***
dia:conc	2	0.0474	0.02370	2.682	0.08478 .
Residuals	30	0.2651	0.00884		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

La interacción entre los factores día y concentración mostró tener una diferencia estadísticamente significativa, es decir que, el crecimiento de los callos embriogénicos ha sido influenciado en base al tiempo y a la concentración de hormona empleada en conjunto.

A partir de que se evaluaron diferentes niveles del factor concentración y factor día, se realizó la prueba de Duncan (Tabla 9). Se observó una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a los tratamientos, siendo la concentración 4,5 mg/L de hormona la más significativa (Tabla 9), con una ligera diferencia a la concentración 10 mg/L, mientras que las concentraciones de 112 mg/L y 68,5 mg/L no influyen en el peso de los callos embriogénicos, por lo tanto, no son significativos en el experimento.

Tabla 9. Prueba de Duncan ensayo 1 medio de inducción

Grupos	Concentración de 2,4-DT	Medias
a	4.5	0.25391194
a	10	0.20824213
b	112.5	0.04544190
b	67.5	0.03897776

Nota: Promedios con la misma letra, no son significativamente diferentes.

3.1.2. Ensayo 2: peso de los callos

La prueba de Normalidad de Shapiro demostró la falta de normalidad de los resultados ($p=1.75e-09$), por lo que se realizó un ajuste logarítmico $\log(y + 1)$ (Ecuación 1) de los pesos. Los datos se ajustaron a un modelo lineal.

Se realizó un análisis de varianza para determinar el grado de significancia de los tratamientos. Se observó significancia en cuanto al factor días y al factor concentración de hormona (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de varianza ensayo 2 medio de inducción

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Día	2	25.321	12.661	1854.04	<2e-16 ***
Conc	3	0.076	0.025	3.69	0.0172 *
Residuals	54	0.369	0.007		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Lo que sugiere que, la concentración de hormona influye en el desarrollo del embrión cigótico a callo embriogénico y en su posterior crecimiento en la etapa de inducción.

A partir de que se emplearon diferentes niveles del factor concentración y factor día, se realizó la prueba de Duncan. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a los tratamientos, siendo la concentración 2,5 mg/L de hormona la más significativa (Tabla 11), a diferencia del ensayo 1, en donde la concentración más favorable es la de 4,5 mg/L de hormona.

Tabla 11. Prueba de Duncan ensayo 2 medio de inducción

Grupos	Concentración de 2,4-DT	Medias
a	2.5	0.5279
ab	0.5	0.5327
ab	4.5	0.5449
b	10.0	0.6159

Nota: Promedios con la misma letra, no son significativamente diferentes.

Según Fitch y Marshadt, (1990, pp.322-323) al emplear una concentración de 5 mg/L de 2,4-D se obtiene un mayor porcentaje de desarrollo de embriones en *C. papaya*, a comparación con concentraciones más altas de 2,4-D desde 10-25 mg/L. Por lo cual, a comparación con los resultados obtenidos a partir de la prueba de Duncan, se puede observar que a bajas concentraciones de

hormona 2,4-D se logra el mejor tratamiento para inducir el desarrollo a callo embriogénico, en este caso la concentración de 2,5 mg/L ha sido la mejor concentración evaluada.

Anandan, Sudhakar, Balasubramanian y Gutieírrez-Mora, (2012, pp.45-46) han descrito que al emplear concentraciones de entre 2,0 y 4,0 mg/L de 2,4-D en embriogénesis somática de *C. papaya*, se obtiene un óptimo nivel de formación de callo embriogénico, mientras que a medida que aumentan las concentraciones de 4,0 mg/L a 12 mg/L, el número de callos embriogénicos en la inducción a callo disminuye. Asimismo, Mishra, Shukla y Chandra, (2007, pp.438-439) obtuvieron callos embriogénicos con una concentración de 10 mg/L de 2,4-D.

Igualmente, se ha reportado un 76% de embriogénesis en la variedad de papaya Sunset, a una concentración de 10 mg/L de 2,4-D, puesto que a concentraciones mayores a la descrita ocurre un declive en la respuesta embriogénica (Fitch, 1993, p. 207).

Por otro lado, Abreu, Carvalho y Clarindo, (2014, p. 479-482), obtuvieron callos pro-embriogénicos a una concentración de 2.0 mg/L de 2,4-D.

Los resultados obtenidos muestran que ha menores concentraciones de (2,5-4,5 mg/L) de auxina se obtiene una respuesta favorable en el desarrollo de callos embriogénicos en *V. pubescens*. Schuabb y otros (2013, pp.118-119), describieron que el empleo de una concentración de 4,42 mg/L de 2,4-D es efectiva en la formación de callos embriogénicos en *C. papaya*.

En un estudio realizado por Kalam y otros (2012, pp. 17068-17069) en cuanto al desarrollo de embriones somáticos a partir de híbridos entre especies de *C. papaya*, demostró que el empleo de 5 mg/L de la hormona 2,4-D fueron efectivas en la formación de callos embriogénicos con un porcentaje de 68,03% en *C. papaya* cv. Shahi x *C. goudotiana*.

Anandan y otros (2012, pp.45-46), también describieron la formación de callos embriogénicos en *C. papaya* en un 75,12 %.

3.1.3. Análisis estadístico de la respuesta ensayo 1

La prueba de Normalidad de Shapiro demostró la falta de normalidad de los resultados ($p=7.589e-08$), por lo que se realizó un ajuste $\text{arc sin} = \sqrt{a/n}$ (Ecuación 2). Los datos se ajustaron a un modelo lineal.

Se realizó un análisis de varianza para determinar el grado de significancia de los tratamientos (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de varianza ensayo 1 medio de inducción

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Conc	4	9.825	2.456	33.267	3.10e-12	***
dia	1	8.281	8.281	112.157	3.60e-13	***
Conc:dia	4	2.871	0.718	9.722	1.37e-05	***
Residuals	40	2.953	0.074			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Se observó diferencia estadísticamente significativa en los factores: días, concentración y en la interacción de ambos. Se apreció que la respuesta de los embriones en cuanto a su germinación es favorable empleando la hormona 2,4-D, además del desarrollo de los callos embriogénicos.

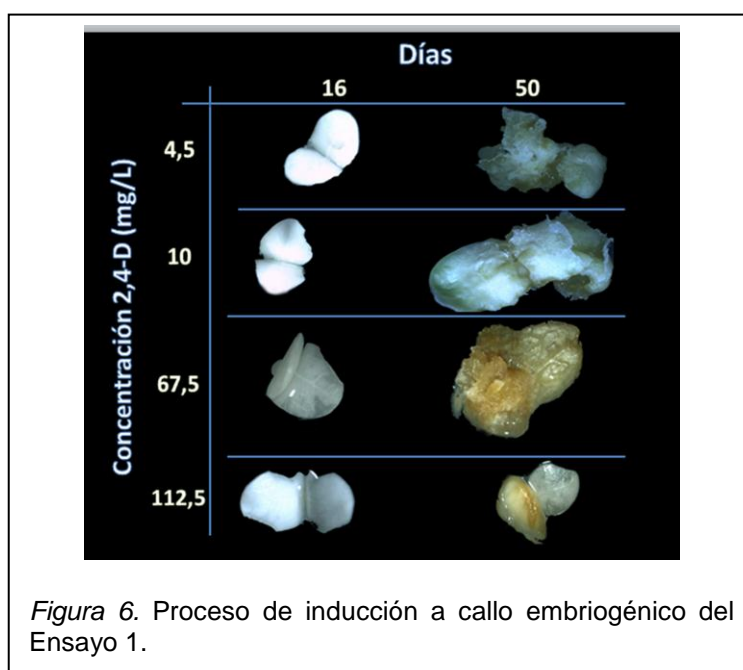
Se evaluó los tratamientos del factor concentración en base a la prueba estadística Duncan y se observó que la concentración 10 mg/L es la más significativa (Tabla 13).

Tabla 13. Prueba de Duncan ensayo 1 medio de inducción

Grupos	Concentración	
	2,4-D	Medias
a	10.0	1.221
ab	4.5	1.128
ab	67.5	1.061
b	112.5	0.8378

Nota: Promedios con la misma letra, no son significativamente diferentes.

Se observó apertura de los embriones cigóticos a los 5 días después de la siembra en el medio de inducción (Figura 6) en respuesta a la hormona, a los 38 días los embriones se engrosaron y expandieron de tamaño. Se obtuvo el 100% de callos embriogénicos a los 50 días luego de la siembra de los embriones cigóticos, en las concentraciones 4,5 mg/L y 10 mg/L, sin embargo, en la concentración 112 mg/L de hormona, se apreció un intento de callo embriogénico, lo cual no creció de tamaño con el tiempo. Lo mismo ocurrió en la concentración 67,5 mg/L, no obstante, en esta concentración sí se apreció la formación del callo.



Los callos embriogénicos obtenidos fueron de aspecto friable y de coloración café claro, el 50 % de los callos fueron de gran tamaño y correspondieron a las concentraciones de 4,5 – 10 mg/L (Figura 6).

3.1.4. Análisis estadístico de la respuesta ensayo 2

La prueba de Normalidad de Shapiro demostró la falta de normalidad de los resultados ($p < 2.2e-16$), por lo que se realizó un ajuste $\text{arc sin} = \sqrt{a/n}$ (Ecuación 2) de los pesos. Los datos se ajustaron a un modelo lineal.

Para evaluar la respuesta de los callos embriogénicos se empleó un análisis de varianza para determinar el grado de significancia en cuanto a las variables

correspondientes. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el factor días, y en el factor concentración. Lo cual indica que existe diferencia en la apariencia morfológica de los callos en cuanto al tiempo (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de varianza ensayo 2 medio de inducción

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Conc	3	0.204	0.0681	2.573	0.0557 .
dia	10	6.308	0.6308	23.821	<2e-16 ***
Conc:dia	30	0.920	0.0307	1.158	0.2751
Residuals	176	4.661	0.0265		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

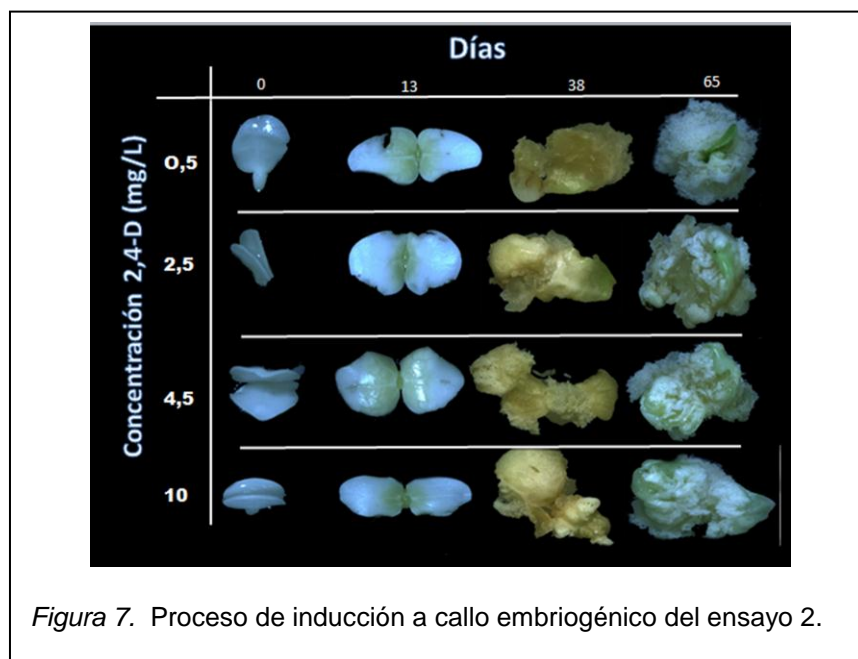
En base a la prueba de Duncan, se observó diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones 10 mg/L y 0,5 mg/L de hormona en comparación con las concentraciones 2,5 mg/L y 4,5 mg/L las cuales representan una igualdad de promedios. Lo que sugiere que la concentración 10 mg/L de hormona 2,4-D es la más significativa, siendo la misma concentración en el ensayo 1, por lo tanto, según se observó la concentración de 10 mg/L es favorable en el desarrollo de los embriones cigóticos en su formación a callo embriogénicos respecto a la respuesta (Tabla 15).

Tabla 15. Prueba de Duncan ensayo 2 medio de inducción

Grupos	Concentración	
	2,4-D	Medias
a	10	1.509
a	2.5	1.499
a	4.5	1.499
b	0.5	1.433

Nota: Promedios con la misma letra, no son significativamente diferentes.

Se puede observar el desarrollo respecto al tiempo de la respuesta embrionaria, en la etapa de inducción (Figura 7).



A partir de los 7 días en el medio de inducción se observó apertura de los embriones cigóticos como respuesta a la hormona, a los 10 días los embriones se engrosaron y expandieron de tamaño en respuesta a la división celular meristemática del eje embrionario. A los 20 días luego de la siembra los embriones cigóticos se desarrollaron en callos embriogénicos en un 56,25%, siendo a los 51 días cuando se obtuvo un 95% de los callos embriogénicos, el 40% de estos callos fueron de gran tamaño. Se observó una coloración blanca en los callos en un principio de la siembra.

Schuabb y otros (2013, p.119), observaron la inducción de la embriogénesis en *C. papaya* en el medio de cultivo a los 7 días luego de la siembra.

Fernando, Melo, Soares y Appezzato-da-Glória, (2001, p.248), observaron la elongación celular a su vez que una proliferación celular en *C. papaya* al sexto día de inducirse en el medio de cultivo, el tamaño de los explantes se duplicó de forma similar a lo ocurrido en el ensayo 1. Por otro lado, Abreu y otros (2014, p. 479), observaron la apertura de los cotiledones e inicio de crecimiento al décimo día después de la siembra en el medio MS de inducción en la variedad 'Golden' de *C. papaya*, lo cual concuerda con el ensayo 2.

Los callos embriogénicos en el medio de cultivo mostraron un aspecto de tejido friable con coloración café en el ensayo 1. Según Mohamad y otros (2006, pp.48-49), observaron que los embriones cigóticos de *C. papaya* a las 8 semanas en el medio de inducción se desarrollaron en callos embriogénicos, esto ocurrió en el 94% de los explantes, además presentaban una apariencia café, lo cual indica que los resultados obtenidos por Mohamad *et al* son congruentes con los obtenidos en el presente documento. Éstas mismas observaciones en base al aspecto morfológico fueron hechas por Fernando *et al.*, (2001, p. 248), cuando obtuvieron un callos de aspecto friable y alargado a los 14 días de estar en el medio de cultivo y Abreu y otros, (2014, p. 479), que obtuvieron callos de aspecto friable y coloración amarillenta-café en papaya 'Golden'.

No obstante, en el ensayo 2 se apreció una apariencia de color blanco, lo cual es consistente con un estudio realizado por Farzana, Palkadapala, Meddegoda, Samarajeewa y Eeswara, (2008, pp.46-47), en *C. papaya* L. cv. Rathna, en el cual se obtuvieron callos de apariencia cristalizada con una coloración blanca-crema, a su vez evaluó si existe una diferencia significativa en cuanto al número de callos originados a partir de explantes de hipocotilos y embriones cigóticos, obteniendo mejores resultados con el empleo de embriones cigóticos.

Según Abreu y otros (2014, p. 479), a los 20 días de siembra en el medio de cultivo de la papaya Golden, observaron la formación de callo en un 86% de los explantes, similar a los ocurrido en el ensayo 2, el mismo tiempo de formación de callo.

Malabadi, Kumar, Mulgund y Nataraja, (2011, p. 43-44), describen que los callos embriogénicos a partir de embriones cigóticos inmaduros de *C. papaya*, en una concentración de 1 mg/L de 2,4-D se forman completamente a las 4 semanas de estar en el medio de cultivo inorgánico con sales de Murashige y Skoog (1962), lo cual es similar a los resultados obtenidos en cuanto al tiempo

de formación del callo, siendo a los 20 días cuando se observó la formación de callo embriogénico en el ensayo 2 y a los 38 días en el ensayo 1.

Posada-Pérez, Kosky y Reyes, (2007, p.133), observaron la formación de callos embriogénicos de color pardo a una concentración de 15 mg/L de 2,4-D en *C. papaya*, sin embargo, seleccionaron la concentración de 5 mg/L de 2,4-D para la obtención de embriones somáticos. Siendo una concentración inferior a la obtenida de 10 mg/L de 2,4-D, la cual es favorable para el desarrollo y crecimiento de los callos embriogénicos.

Cai *et al*, (1999, p.64), reportó la apertura de los embriones cigóticos luego de una semana de haberse sembrado en el medio de cultivo de inducción, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo 1 y 2.

3.2. Medio de maduración

3.2.1. Ensayo 1: peso de los callos

La prueba de Normalidad de Shapiro demostró la falta de normalidad de los resultados ($p=1.581e-14$), por lo que se realizó un ajuste logarítmico $\log(y + 1)$ (Ecuación 1) de los pesos. Los datos se ajustaron a un modelo lineal.

Se realizó un análisis de varianza para determinar el grado de significancia de los tratamientos (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis de varianza ensayo 1 medio de maduración

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
comp	1	2.0212	2.0212	98.311	<2e-16 ***
dia	1	0.1103	0.1103	5.365	0.0219 *
comp:dia	1	0.0575	0.0575	2.795	0.0966 .
Residuals	151	3.1044	0.0206		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Se observó diferencia significativa en los factores: composición y días, como también en la interacción concentración por día, lo cual indica que el

crecimiento de los callos embriogénicos en el medio de maduración depende de la concentración de 2,4-D que se empleó en el anterior medio. Además, el tiempo influye en la respuesta de los callos en cuanto a su peso.

Se evaluó los tratamientos del factor concentración en base a la prueba estadística Duncan y se observó una diferencia estadística significativa entre los tratamientos, suponiendo una clara diferencia entre las concentraciones altas de hormona y las concentraciones bajas de hormona, siendo las concentraciones de 4,5 mg/L y 10 mg/L del medio MAD 1 las más significativas (Tabla 17), lo que indica que, el medio MAD 1 es el más favorable en la etapa de maduración de los embriones, puesto que influye en su desarrollo en comparación del medio de cultivo MAD 2.

Tabla 17. Prueba de Duncan ensayo 1 medio de maduración

Grupos	Medias	Composición	Conc. 2,4-D	Medio
a	0.3966	2	4.5	MAD 1
a	0.3944	3	10	MAD 1
a	0.2971	7	10	MAD 2
a	0.2766	6	4.5	MAD 2
b	0.05812	9	67.5	MAD 1
b	0.05321	4	112.5	MAD 1
b	0.03067	8	112.5	MAD 2
b	0.01102	10	67.5	MAD 2

Nota: Promedios con la misma letra, no son significativamente diferentes.

Se observó que las concentraciones de 67,5 mg /L y 112, 5 mg /L de hormona no provocan una respuesta favorable en el peso los callos embriogénicos.

3.2.2. Ensayo 2: peso de los callos

La prueba de Normalidad de Shapiro demostró la falta de normalidad de los resultados ($p=0.0004187$), por lo que se realizó un ajuste logarítmico $\log(y + 1)$ (Ecuación 1) de los pesos. Los datos se ajustaron a un modelo lineal.

Se realizó un análisis de varianza para determinar el grado de significancia de los tratamientos (Tabla 18).

Se observó una diferencia estadística significativa en el factor días y en el factor concentración, lo que indica que los días influyen en el peso de los embriones y de los callos embriogénicos.

Tabla 18. Análisis de varianza ensayo 2 medio de maduración

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)						
conc	1	0.0724	0.07236	2.923	0.09019 .						
dia	1	0.2632	0.26323	10.631	0.00148 **						
Residuals	109	2.6988	0.02476								

Signif. codes:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*'	0.05	'.'	0.1	' '	1

Se empleó una prueba de Duncan para indicar la diferencia estadística en los tratamientos empleados, determinando que la concentración de 10 mg/L es la más significativa, es decir, que a esta concentración de hormona 2,4-D, ocurre una respuesta mayormente favorable en los pesos de los callos superior a comparación de los demás tratamientos (Tabla 19).

Tabla 19. Prueba de Duncan ensayo 2 medio de maduración

Grupos	Concentración	
	2,4-D	Medias
a	10.0	0.7076
ab	0.5	0.656
b	4.5	0.6336
b	2.5	0.6103

Nota: Promedios con la misma letra, no son significativamente diferentes.

3.2.3. Ensayo 1: número de embriones

La prueba de Normalidad de Shapiro demostró la falta de normalidad de los resultados ($p=1.005e-13$), por lo que se realizó un ajuste $arc\ sin = \sqrt{a/n}$ (Ecuación 2) Los datos se ajustaron a un modelo lineal. Se realizó un análisis de varianza para determinar el grado de significancia de los tratamientos.

Se observó diferencias significativas en cuanto al número de embriones por tratamiento considerando la composición y el factor día, por lo tanto, el número de embriones varía respecto al medio IND del que proviene y el medio en el cuál se encuentra madurando (MAD1 o MAD2) adicionalmente el tiempo también influye en la respuesta observada (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de varianza ensayo 1 número de embriones del medio de maduración

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Comp	7	5.365	0.7664	20.516	< 2e-16	***
día	6	1.961	0.3269	8.750	1.43e-08	***
Comp:día	42	1.077	0.0257	0.687	0.927	
Residuals	224	8.368	0.0374			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

Se empleó la prueba estadística de Duncan para determinar la diferencia entre los tratamientos empleados. Aunque no se observó diferencia significativa en cuanto a los medios MAD 1 y MAD 2 a concentraciones de 4.5 y 10 mg/L de 2,4-D (Tabla 21), el medio MAD 1 y concentración de 4.5 mg/L dio un número mayor de embriones somáticos obtenidos, por tanto para el segundo ensayo solamente se utilizó el medio MAD 1 basado en Cai *et al*, (1999, pp. 62-63).

Tabla 21. Prueba de Duncan ensayo 1 número de embriones respecto a los medios MAD 1 y MAD 2

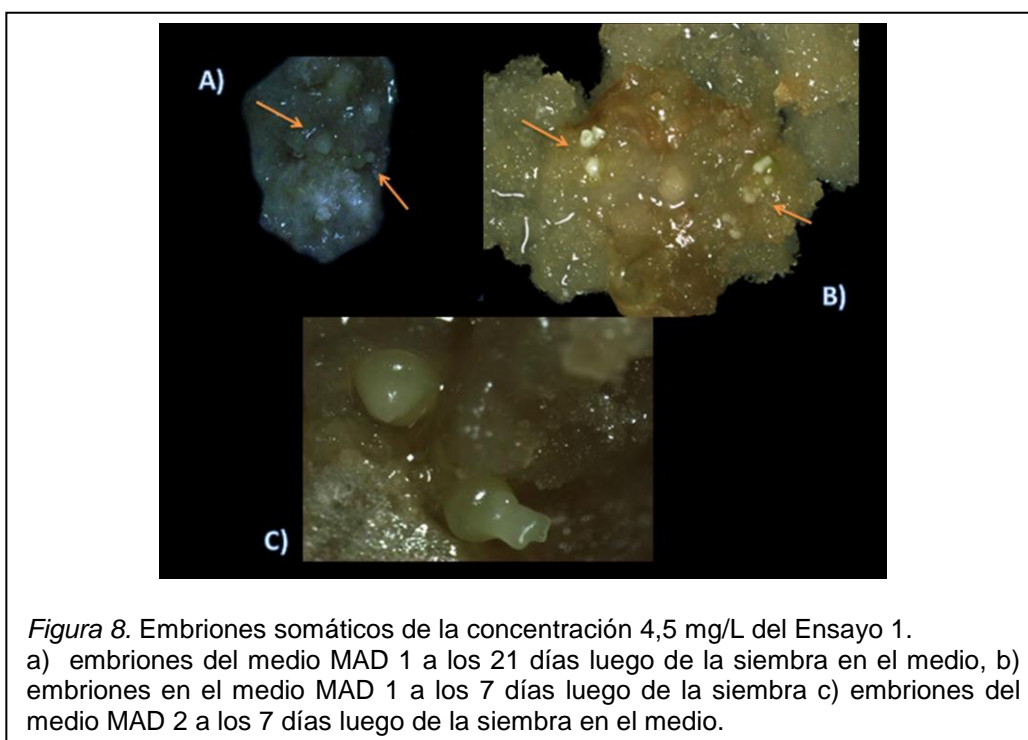
Grupos	Medias	Composición	Conc 2,4-D	Medio
a	0.3534	1	4.5	MAD 1
a	0.3234	6	10	MAD 2
a	0.3174	5	4.5	MAD 2
a	0.3166	2	10	MAD 1
b	0.1738	3	67.5	MAD 1
bc	0.1197	4	112.5	MAD 1
c	0.0	7	67.5	MAD 2
c	0.0	8	112.5	MAD 2

Nota: Promedios con la misma letra, no son significativamente diferentes.

Se observó la aparición de embriones somáticos en fase globular y torpedo una semana después de haberse sembrado en el medio de cultivo MAD en las concentraciones correspondientes a 4,5 mg/L y 10 mg/L de hormona. Lo que respecta a las concentraciones de 67,5 mg/L y 112,5 mg/L no se observó desarrollo de embriones (Figura 8 y 9).

A los 21 días luego de la siembra el número de embriones aumentó, registrándose 43 embriones correspondientes a la concentración 4,5 mg/L (Figura 8) y 38 embriones correspondientes a la concentración 10 mg/L con un total de 81 embriones somáticos (Figura 9) ambas concentraciones correspondientes al medio MAD 1. También se observó la presencia de una posible hoja en el medio MAD 1 concentración 10 mg/L.

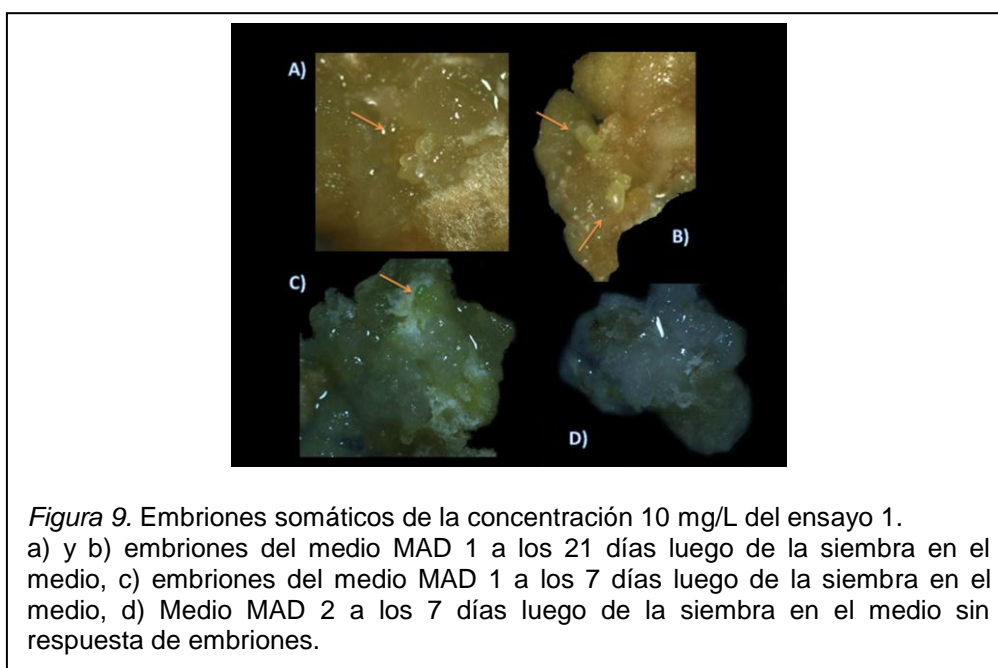
A los 91 días después de la siembra en el medio de cultivo se observó un máximo de 171 embriones somáticos en el medio MAD 1.



En el medio MAD 2 se registró un total de 35 embriones somáticos, 26 correspondientes a la concentración de 4,5 mg/L (Figura 8) y 9 correspondientes a la concentración de 10 mg/L (Figura 9). Mishra y otros

(2007, p. 440) obtuvieron embriones de *C. papaya* a las 4 semanas de haberse inoculado los explantes en el medio de maduración compuesto por 0.2 mg/L BAP and 0.1 mg/L de ANA, lo cual es congruente con el ensayo 1, puesto que sí se observó embriones somáticos tanto a los 7 días como a las 3 semanas de haber estado en el medio de cultivo MAD 2.

El 50% de los callos desarrolló embriones somáticos en cuanto a todas las concentraciones de hormona evaluadas, con una consistencia gelatinosa y de coloración café. Resultados obtenidos por Cai *et al*, (1999, p.64), demostraron que un 43% de los embriones cigóticos dieron lugar a embriones somáticos en *C. papaya*, el porcentaje concuerda con los resultados obtenidos puesto que se desarrolló un 50% de los embriones cigóticos en embriones somáticos en el ensayo 1. Además, se observó dicha formación de embriones 4-5 semanas luego de la siembra en el medio de inducción (Cai *et al.*, 1999, p.64), lo que demuestra que los embriones somáticos se desarrollaron antes en *C. papaya* que en *V. pubescens*.



Asimismo, en un estudio realizado por Kung *et al*, (2010, p. 627), se demostró la eficiencia de la embriogénesis somática en variedades de papaya ‘Sunrise’ y ‘Thailand’ a partir de explantes de raíz, obteniendo una eficiencia de 29.8%–

33.3% en la primera variedad y 43.8%–55.4% en la segunda, con el empleo de 1 mg/L de 2,4-D y 0,1 mg /L de BAP.

3.2.4. Ensayo 2: número de embriones

La prueba de Normalidad de Shapiro demostró la falta de normalidad de los resultados ($p=1.591e-10$), por lo que se realizó un ajuste $\text{arc sin} = \sqrt{a/n}$ (Ecuación 2) Los datos se ajustaron a un modelo lineal.

Se realizó un análisis de varianza para determinar el grado de significancia de los tratamientos (Tabla 22).

El análisis de varianza, determinó que el factor día es estadísticamente significativo a comparación con el factor concentración, por lo cual, en el presente ensayo la concentración no influyó en la respuesta de los callos al originar embriones somáticos, a diferencia del ensayo 1 en el cual la concentración si influyó en la correspondiente respuesta.

Tabla 22. Análisis de varianza ensayo 2 número de embriones del medio de maduración

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Conc	3	0.62	0.2055	1.885	0.132
día	19	12.44	0.6547	6.006	5.11e-13 ***
Residuals	320	34.88	0.1090		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

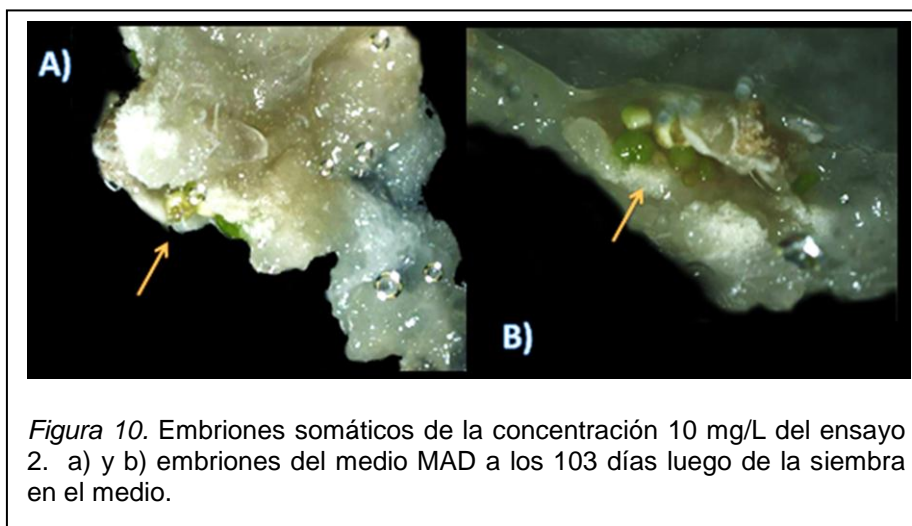
Se evaluó los tratamientos empleados bajo una prueba estadística de Duncan, donde no se observó diferencia estadísticamente significativa en la concentración de hormona, lo que corrobora los resultados obtenidos en el análisis de varianza (Tabla 23).

Tabla 23. Prueba de Duncan ensayo 2 número de embriones del medio de maduración

Grupos	Concentración 2,4-D	Medias
a	10	0.3422
a	2.5	0.3420
a	0.5	0.3412
a	4.5	0.3349

Nota: Promedios con la misma letra, no son significativamente diferentes.

Se observó la aparición de embriones somáticos en fase globular a los 103 días luego de la siembra en el medio de cultivo MAD 1 en la concentración de 10 mg/L de hormona, el número de embriones fue de 13. Por el contrario, Fernando y otros (2001, p. 251) observaron que al día 40 se formaron complejos pre-embriónicos, lo cual es congruente con el ensayo 1 pero no con el ensayo 2. Lo que respecta a las concentraciones de 0,5 mg/L, 2,5 mg/L y 4,5 mg/L no se observó desarrollo de embriones (Figura 10).



El tiempo de aparición de los embriones en el ensayo 1 comparado con el ensayo 2 difieren en gran medida, lo que puede deberse al hecho de que son dos ensayos diferentes que se realizaron en distintos tiempos, como a su vez al hecho de que las concentraciones de hormona menores a 4,5 mg/L no

indujeron una respuesta en el desarrollo de embriones somáticos, por tanto, concentraciones muy inferiores de hormona no son favorables para inducir este fenómeno en *V. pubescens*.

No obstante, Fernando y otros (2001, pp.248-251), observó que a los 49 días desde la inoculación de los explantes en el medio de cultivo, se formaron embriones en la superficie de los callos embriogénicos, a una concentración de 2 mg/L de 2,4-D en papaya Maradol roja, lo cual difiere de los resultados obtenidos en el ensayo 2 puesto que en el presente estudio se observó formación de embriones a los 103 días luego de su inoculación en el medio MAD 1.

Además, se observó una coloración blanquecina-café oscuro de los callos y con una consistencia gelatinosa en el medio de cultivo MAD 1. El 6.25 % de los callos desarrolló embriones somáticos.

Según resultados obtenidos por Carlos-Hilario y Christopher, (2015, pp. 583-585) a una concentración de 10 mg/L de 2,4-D se obtuvo embriones somáticos con una apariencia amarillenta-cremosa y de consistencia friable en la variedad de *C. papaya* 'Kapoho'.

Teixeira da Silva, (2014, p. 159) destaca la importancia de emplear semillas en protocolos de embriogénesis somática en *C. papaya*.

En esta investigación pionera en la inducción de embriogénesis somática de esta especie frutal tropical, se han obtenido resultados que podrán utilizarse a futuro en la conservación de esta especie, y contribuir a futuras investigaciones en micropropagación en otros miembros del género *Vasconcellea*. Los resultados obtenidos son congruentes con los protocolos empleados para inducir la embriogénesis somática en *C. papaya*. A bajas concentraciones de hormona 2,4-D se obtienen respuestas favorables en el desarrollo de callos embriogénicos y en la obtención de embriones somáticos.

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se estableció el protocolo de inducción de la embriogénesis somática donde se estimuló la respuesta embriogénica en embriones cigóticos de *V. pubescens* y se evaluó los resultados mediante un modelo estadístico. Se pretende continuar con la investigación hasta la etapa de germinación de las plántulas y establecer un protocolo completo de embriogénesis somática de *V. pubescens*.

Los embriones cigóticos de *V. pubescens* responden de manera similar al protocolo descrito por Cai *et al* (1999), al estímulo provocado por la hormona 2,4-D al inducir la formación de callos embriogénicos a concentraciones bajas de hormona.

En el ensayo 1 se obtuvo respuestas favorables a concentraciones de hormona 4.5 mg/L y 10 mg/L, mientras que en el ensayo 2 se obtuvo respuestas favorables de 2.5 a 10 (mg/L) de 2,4-D, por lo tanto, la respuesta más favorable para inducir la embriogénesis somática considerando los parámetros que se evaluaron son de 2.5 a 10 mg/L de 2,4-D.

El medio de maduración MAD 1 fue el que mostró mejores resultados definidos como un mayor número de embriones somáticos, a comparación con el medio de maduración MAD 2.

V. pubescens al ser una variedad ampliamente distribuida en Ecuador, requiere de más investigaciones científicas respecto a la misma, sin embargo, al no contar con protocolos de micropropagación, este trabajo ha contribuido a la conservación y desde el punto de vista biotecnológico y puede ser utilizado en futuras investigaciones de tipo molecular, transformación genética vegetal y bancos de germoplasma, debido a esto se recomienda realizar ensayos similares en otros miembros del género *Vasconcellea*.

Recomendaciones

El mantenimiento de los explantes tanto en la etapa 1 como en la 2 debería realizarse cada cuatro semanas en vez de dos, puesto que de esta manera se evita contaminación externa y por manipulación propia, además de que los explantes reaccionan de mejor manera cuando no existe manipulación constante.

Es recomendable tanto en la etapa 1 como en la etapa 2, mantener las condiciones apropiadas sin interrupción alguna para lograr una respuesta favorable en los explantes.

REFERENCIAS

- Abreu, I., Carvalho, C., y Clarindo, W. (2014). *Massal Induction of Carica papaya L. Massal Induction of Carica papaya L. 'Golden' Somatic Embryos and Somaclone Screening by Flow Cytometry and Cytogenetic*. Recuperado el 15 de Marzo del 2016 de <http://www.readcube.com/articles/10.1508/cytologia.79.475>
- Anandan, R., Sudhakar, D., Balasubramanian, P., y Gutiérrez-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. y 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
- Ashmore, S., Drew, R., Azimi, M. (2007). *Vitrification-based shoot tip cryopreservation of Carica papaya and a wild relative Vasconcellea pubescens*. Recuperado el 21 de Julio del 2015 de <http://www.publish.csiro.au/BT/pdf/BT06144>
- Badillo, V. (1967). Esquema de las Caricaceae. *Agron Trop.* 17, 245–272.
- Badillo, V. (1993). Caricaceae: segundo esquema. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela*, 43, 1-111.
- Badillo, V. M. (2001). Nota correctiva *Vasconcellea* St. Hil. y no *Vasconcella* (Caricaceae). *Ernstia*, 11, 75–76.
- Badillo, V.M. (2000). *Carica* L. vs. *Vasconcella* St.-Hil. (Caricaceae) con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, 10, 74-79.
- Bahadur, B., Rajam, M., Sahijram, L. y Krishnamurthy, K. (2015). *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology*. (1.ªed.). India: Springer.
- Banco de Desarrollo de América Latina (CAF). (1992). *Manual técnico del cultivo de chamburo*. Recuperado el 20 de Mayo del 2016 de <http://www.caf.com/es/paises/ecuador/>
- Benítez, S., Lobo, M., Delgado, O. y Medina, C. (2013). *Estudios de germinación y remoción de latencia en semillas de papayuelas*

Vasconcellea cundinamarcensis y *Vasconcellea goudotiana*. Recuperado el 30 de Octubre del 2015 de https://www.researchgate.net/publication/306023338_Estudios_de_germinacion_y_remocion_de_latencia_en_semillas_de_papayuelas_Vasconcellea_cundinamarcensis_y_Vasconcellea_goudotiana

- Bentham, G. y Hooker, J.D. (1867). *Genera plantarum: ad exemplaria imprimis in herbariis kewensibus servata definite*. (1.^aed.). London, UK: Reeve & Company.
- Bhojwani, S., y Dantu, P. (2013). *Plant tissue culture: An introductory text*. (1.^aed.). India: Springer.
- Caetano, C., Lagos, T., Sandoval, C., Posada, C., Caetano, D. (2008). *Citogenética de especies de Vasconcellea (Caricaceae)*. Recuperado el 15 de Agosto del 2015 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169914224004>
- Cai, W., Gonsalves, C., Tennant, P., Fermín, G., Souza, M., Sarindu, N., Fuh-Jyh Jan, Hai-Ying Zhu, y Gonsalves, D. (1999). A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 35(1), 61-69. doi: 10.1007/s11627-999-0011-3
- Carlos-Hilario, L., y Christopher, D. (2015). Improved Agrobacterium-mediated transformation of *Carica papaya* cultivar “Kapoho” from embryogenic cell suspension cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 51(5), 580–587. doi:10.1007/s11627-015-9719-4
- Carrasco, B., Avila, P., Perez-Diaz, J., Muñoz, P., García, R., Lavandero, B., Zurita-Silvia, A., Retamales, J., Caligari, P. (2009). *Genetic structure of highland papayas (Vasconcellea pubescens (Lenné et C. Koch) Badillo) cultivated along a geographic gradient in Chile as revealed by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2015 de [https://www.researchgate.net/profile/Peter_Caligari/publication/225237730_Genetic_structure_of_highland_papayas_\(Vasconcellea_pubescens\(Lenné_et_C._Koch\)_Badillo\)_cultivated_along_a_geographic_gradient_in_](https://www.researchgate.net/profile/Peter_Caligari/publication/225237730_Genetic_structure_of_highland_papayas_(Vasconcellea_pubescens(Lenné_et_C._Koch)_Badillo)_cultivated_along_a_geographic_gradient_in_)

Chile_as_revealed_by_Inter_Simple_Sequence_Repeats_(ISSR)/links/09e41502114c631d6e000000.pdf

- Carvalho, F., y Renner, S. (2012). *A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history*. Recuperado el 31 de Diciembre del 2015 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790312001972>
- Consejo Nacional de Investigación. (1989). *Lost Crops of the Incas*. (1.^aed.). Washington. D.C.: National Academy Press.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., Drew, R., Kyndt, T., y Scheldeman, X. (2014). Chapter 4 Vasconcellea for Papaya Improvement. En Ming, R. y Moore, P.H. (Ed.), *Genetics and Genomics of Papaya* (47-79). New York, USA: Springer.
- Davies, P. (2013). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. (1.^aed.). New York: Springer Science & Business Media.
- FAO. (1992). Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492. *Producción Y Protección Vegetal*, 26, 345. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Farzana, A., Palkadapala, P., Meddegoda, K., Samarajeewa, P., y Eeswara, J. (2008). *Somatic embryogenesis in papaya (Carica papaya L. cv . Rathna)*. Recuperado el 23 de Abril del 2016 de https://www.researchgate.net/publication/266559660_Somatic_embryogenesis_from_leaf_explants_of_hermaphrodite_Carica_papaya_A_new_approach_for_clonal_propagation
- Fernando, J., Melo, M., Soares, M., y Appezzato-da-Glória, B. (2001). *Anatomy of somatic embryogenesis in Carica papaya L.* Recuperado el 07 de Marzo del 2016 de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132001000300005
- Fitch, M. (1993). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyls callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(2), 205-212.

- Fitch, M., y Manshardt, R. (1990). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell Reports*, 9, 320-324.
- Fox, J. (2005). *The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R*. Recuperado el 12 de Julio del 2015 de https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj494S_k-DPAhXEbR4KHWKvCIUQFggcMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.jstatsoft.org%2Farticle%2Fview%2Fv014i09%2Fv14i09.pdf&usg=AFQjCNHyrVtOtri75OqnHGWNaoSlz6lcBw&sig2=t8TsfypVyj6XHu9EulUYw
- George, E.F., Hall, M., y Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. (3.^aed.). The Netherlands: Springer.
- Henderson, J. (2005). Ernest Starling and 'Hormones': an historical commentary. *Journal of Endocrinology*, 184, 5-10.
- Hopkins, W. y Hüner, N. (2009). *Introduction to Plant Physiology*. (4.^aed.). USA: WILEY.
- Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). (2008). *Informe Nacional Sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación*. Recuperado el 30 de mayo del 2016 de <http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/Ecuador.pdf>
- Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). (2003). *Diversidad de frutales nativos comestibles Caricaceae – Solanácea, fenología, usos y recolección de germoplasma en el sur del Ecuador*. Recuperado el 18 de Mayo del 2016 de http://www.iniap.gob.ec/nsite/index.php?option=com_sobipro&pid=57&sid=218:Informe-diversidad-de-frutales-nativos-comestibles-caricaceae-solanaceae-fenologia-usos-y-recoleccion-de-germoplasma-en-el-sur-del-Ecuador&Itemid=0
- IUCN Lista Roja de Especies Amenazadas. (2016). *Versión 2015.4*. Recuperado el 24 de Mayo del 2016 de www.iucnredlist.org.

- Jordan, M. (2011). Respuestas morfogenéticas *in vitro* de *Vasconcellea chilensis* Planch. ex A. DC (Caricaceae). *Agronomía Colombiana*, 29(3), 481-485.
- Kalam Azad, M., Rabbani, M., y Amin, L. (2012). *Plant regeneration and somatic embryogenesis from immature embryos derived through interspecific hybridization among different Carica species*. Recuperado el 08 de Abril del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3546739/>
- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., y Kohno, K. (2004). *Papain protects papaya trees from herbivorous insects: Role of cysteine proteases in latex*. Recuperado el 26 de Diciembre de 2015 de https://www.researchgate.net/publication/8913534_Papain_protects_papaya_trees_from_herbivorous_insects_Role_of_cysteine_proteases_in_latex
- Kung, Y., Yu, T., Huang, C., Wang, H., Wang, S., y Yeh, S. (2010). Generation of hermaphrodite transgenic papaya lines with virus resistance via transformation of somatic embryos derived from adventitious roots of *in vitro* shoots. *Transgenic Research*, 19(4), 621–635. doi:10.1007/s11248-009-9344-2
- Kyndt, T., Romein-Peeters, Van Droogenbroeck, B., Romero-Motochi, J., Gheysen, G., Goetghebeur, P. (2005). *Species relationships in the genus Vasconcellea (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence*. Recuperado el 15 de Diciembre del 2015 de <http://www.amjbot.org/content/92/6/1033.long>
- Malabadi, R., Kumar, S., Mulgund, G., y Nataraja, K. (2011). *Induction of somatic embryogenesis in Papaya (Carica papaya)*. Recuperado el 30 de Marzo del 2016 de <http://scienceflora.org/journals/index.php/rib/article/viewFile/2370/2348>
- Manshardt, R y Zee, F. (1994). Papaya germplasm and breeding in Hawaii. *Fruit Var J.* 48, 146–152.

- Mello, V., Gomes, M., Lemos, F., Delfino, J., Andrade, S., Lopes, M., y Salas, C. (2008). The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine*, 15(4), 237–244. doi:10.1016/j.phymed.2007.06.004
- Ministerio del Ambiente de Ecuador. (2010). *Cuarto Informe Nacional para el Convenio sobre la Diversidad Biológica*. Recuperado el 26 de febrero de 2016 de <https://www.cbd.int/doc/world/ec/ec-nr-04-es.pdf>
- Mishra, M., Shukla, N., y Chandra, R. (2007). Chapter 40 Micropropagation of Papaya (*Carica Papaya* L.). En Jain, S., Häggman, H. (Ed.), *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits* (437-441). Netherland: Springer.
- Mohamad, M., Vilasini, P., Noorsaadah, A. y Norzulaani, K. (2006). *Effecy of carbenicillin on somatic embryos formation of papaya (Carica papaya L. var. Eksotika I)*. Recuperado el 12 de Febrero del 2016 de https://www.researchgate.net/publication/234071575_Effect_of_Carbenicillin_on_Somatic_Embryos_formation_of_papaya_Carica_papaya_L_var_Eksotika_I
- Morales, A., Medina, D. y Yaguache, B. (2004). *Genetic diversity, phylogeny and geographic distribution of the genus Vasconcellea in Southern Ecuador*. Recuperado el 10 de Marzo del 2016 de https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjdg6HzluDPAhVHLB4KHaTPDk0QFg_gkMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.lyonia.org%2FdownloadPDF.php%3FpdfID%3D2.241.&usg=AFQjCNFOkcs07pMvIw3N4_j_MziMJU-tAQ&sig2=EyKdik2ZZhs4Xc1394gBsw
- Morales, R. y Morales, N. (2006). *Interspecific cross breeding in Vasconcellea*. Recuperado el 17 de Agosto del 2015 de http://www.lyonia.org/articles/rbusmann/article_468/pdf/articleBody.pdf
- Moya-León, M., Moya, M., y Herrera, R. (2004). *Ripening of mountain papaya (Vasconcellea pubescens) and ethylene dependence of some ripening events*. Recuperado el 05 de Abril del 2016 de https://www.researchgate.net/publication/222434209_Ripening_of_moun

tain_papaya_Vasconcellea_pubescens_and_ethylene_dependence_of_ome_ripening_events

- Murashige, T. y Skoog, E. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nuño, A., Rodríguez, B., y Gutiérrez, A. (2009). *Embriogénesis somática en Jarilla heterophylla (Caricaceae)*. Recuperado el 04 de Junio del 2016 de http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_II/CII-34.pdf
- Organización de Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas. (FAO). (2015). *Browser data by country/región Ecuador*. Recuperado el 20 de Mayo de 2016 de <http://faostat3.fao.org/browse/area/58/E>
- Organización de Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO). (2016). *Browser data by country/región Ecuador*. Recuperado el 15 de Junio del 2016 de <http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/en/c/159358/>
- Pereira, T., Neto, M., Junior, P., Rabelo, F., y Pereira, M. (2014). *Genetic Relationship between Vasconcellea and Carica Based on Their Chromosome Features*. Recuperado el 01 de Abril del 2016 de https://www.researchgate.net/publication/273308769_Genetic_Relationship_between_Vasconcellea_and_Carica_Based_on_Their_Chromosome_Features
- Petrasek, J., y Friml, J. (2009). *Auxin transport routes in plant development*. Recuperado el 18 de Enero del 2016 de <http://dev.biologists.org/content/136/16/2675.long>
- Posada-Pérez, L., Kosky, R., y Reyes, M. (2007). *Embriogénesis somática en Carica papaya L. var. Maradol rojo*. Recuperado el 16 de Abril del 2016 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/368/html>
- Rodríguez, D., Marín, C., Quecan, H. y Ortiz, R. (2005). *Áreas Potenciales para Colectas del Género Vasconcellea Badillo en Venezuela*. Recuperado el 24 de Mayo del 2016 de

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612005000100001

- Scheldeman, X., Kyndt, T., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Ming, R., Drew, R., Van Droogenbroeck, B., Van Damme, P., y Paul H. Moore. (2011). Chapter 11 *Vasconcellea*. En Kole, C. (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Tropical and Subtropical Fruits*: (213-251). New York, USA: Springer.
- Scheldeman, X., Parcemon, J., Motoche, R., Damme, V. Van, Heyens, V., y Damme, P. (2003). *Potential of highland papayas (Vasconcellea spp.) in southern Ecuador*. Recuperado el 05 de Agosto del 2015 de [http://www.lyonia.org/Archives/Lyonia%205\(1\)%202003\(1-100\)/Scheldeman,%20X.,%20%20J.P.%20Romero%20Motoche,%20V.%20Van%20Damme,%20V.%20Heyens%3B%20Lyonia%205\(1\)%202003\(73-80\).pdf](http://www.lyonia.org/Archives/Lyonia%205(1)%202003(1-100)/Scheldeman,%20X.,%20%20J.P.%20Romero%20Motoche,%20V.%20Van%20Damme,%20V.%20Heyens%3B%20Lyonia%205(1)%202003(73-80).pdf)
- Scheldeman, X., Van Damme, P. y J Romero, J. (2002). Highland papayas in Southern Ecuador: need for conservation actions. *Acta Horticulturae*, 575, 199-205.
- Scheldeman, X., Willemen, L., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Romeijn-Peeters, E., Restrepo, M.T., Romero, J., Jiménez, D., Lobo, M., Medina, C., Reyes, C., Rodríguez, D., Ocampo, A., Van Damme, P. y Goetgebeur, P. (2007). *Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papayas (Vasconcellea spp.) in tropical and subtropical America*. Recuperado el 08 de Diciembre del 2015 de https://www.researchgate.net/publication/40104874_Distribution_diversity_and_environmental_adaptation_of_highland_papayas_Vasconcellea_spp_in_tropical_and_subtropical_America
- Schuabb, A., Moura, E., Barroso, T., Santa-Catarina, C. y Silveira, V. (2013). *Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds*. Recuperado el 17 de Mayo del 2016 de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2197-00252013000200004

- Sengupta, S., Das, B., Acharyya, P., Prasad, M., y Ghose, T. (2014). *Genetic diversity analysis in a set of Caricaceae accessions using resistance gene analogues*. Recuperado el 31 de Abril del 2016 de <http://bmcbgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12863-014-0137-0>
- Smith, R. (2013). *Plant Tissue Culture Third edition*. (3.^aed.). USA: Elsevier.
- Solís, R., Olivera, J. y la Rosa, R. (2011). *Propagación in vitro de Carica papaya var. PTM-331 a partir de meristemos apicales*. Recuperado el 13 de Marzo del 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195022441012>
- Su, Y. H., Su, Y. X., Liu, Y., y Zhang, X. (2013). Abscisic acid is required for somatic embryo initiation through mediating spatial auxin response in Arabidopsis. *Plant Growth Regulation*, 69(2), 167–176. doi: 10.1007/s10725-012-9759-2
- Teixeira da Silva, J. (2014). Callus induction in papaya (*Carica papaya* L.) and synseed production for low temperature storage and cryopreservation. *Polish Society for Horticultural Science*, 26(2), 155-162. doi: 10.1515/fhort-2015-0007.
- Teixeira, R., Ribeiro, H., Gomes, M., Lopes, M. y Salas, C. (2008). The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 956-961. doi:10.1016/j.plaphy.2008.06.010
- Tran, L., y Pal, S. (Eds.). (2014). *Phytohormones: A Window to Metabolism, Signaling and Biotechnological Applications*. (1.^aed.). New York: Springer Science & Business Media.
- Trigiano, R., y Gray, D. (2005). *Plant Development and Biotechnology*. (1.^aed.). Washington, D.C: CRC Press.
- 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
- Vásquez, W y Viteri, P. (2016, Enero 20). Caracterización del fruto *Vasconcellea pubescens*, Entrevista con Vásquez y Viteri.

- Vidal, L., Finot, V., Mora, K., y Venegas, F. (2009). *Características físico-químicas del látex de papayuelo (Vasconcellea cundinamarcensis Badillo, Caricaceae)*. Recuperado el 23 de 2016 de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642009000600012
- Wang, Y., Wang, J., Shi, B., Yu, T., Qi, J., Meyerowitz, E., y Jiao, Y. (2014). *The Stem Cell Niche in Leaf Axils Is Established by Auxin and Cytokinin in Arabidopsis*. Recuperado el 14 de Abril del 2016 de <http://www.plantcell.org/content/early/2014/05/21/tpc.114.123083.full.pdf+html>
- Zhao, Y. (2010). *Auxin biosynthesis and its role in plant development*. Recuperado el 17 de Enero del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3070418/>

ANEXOS

Anexo 1.



Figura 1. Señora Rosario Cajas, dueña de la finca en Puéllaro.

Anexo 2.



Figura 2. Frutos de la planta de *Vasconcellea* en Puéllaro.

Anexo 3.



Figura 3. Medición de árbol de *Vasconcellea*.

Anexo 4.



Figura 4. Árbol y frutos de *Vasconcellea*.

Anexo 5.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BAP	6-Bencilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
IAA	Ácido índol-3-acético
IND	Medio de Inducción
MAD 1	Medio de Maduración 1
MAD 2	Medio de Maduración 2
ANA	Ácido 1-naftalenacético