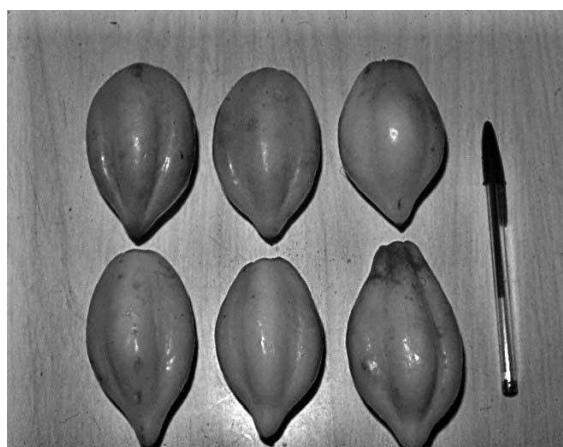


Biotechnologías aplicables al desarrollo de algunas especies de Caricáceas cultivadas en la región Andina: avances y problemas

Biotechnologies applicable to the development of some Caricaceae species cultivated in the Andean Region: advances and problems



MIGUEL JORDÁN^{1, 3}
DIEGO VÉLEZ²
ROSA ARMIJOS²

Frutos maduros de *Vasconcellea cundinarcensis*.

Foto: M. Jordan

RESUMEN

Diferentes especies de la Familia Caricaceae corresponden a cultivos importantes de la región Andina, teniendo usos como frutales, producción de compuestos enzimáticos con acción proteolítica, como fuentes de germoplasma y potencial génico de interés posible de usar en programas de mejoramiento. Entre ellas se destacan *Carica papaya* y otro grupo de cultivos clasificados dentro del género *Vasconcellea*; entre ellos *V. cundinarcensis* [sin. *C. pubescens*] (papayo de montaña); y *V. stipulata*; ambas portadoras de genes que confieren resistencia a “papaya ringspot virus”, así como para tolerancia de frío, con características organolépticas y como patrones de injerto de otro cultivo como es *V. x heilbornii* nm. *pentagona* (babaco). Según cada cultivo, se evidencian diferentes potenciales regenerativos, ya sea a nivel sexual y asexual, pero también grandes limitaciones que afectan su desarrollo y su regeneración. Algunas de las varias limitaciones específicas a mencionar, según especie, corresponden a problemas de germinación por causa de dormancia influenciada por la testa, variabilidad en el grado de viabilidad según proveniencia y lento desarrollo de postemergencia (*V. stipulata*). En otras situaciones, la reproducción asexual es obligatoria, tratándose de híbridos interespecíficos estériles, como es el caso de *V. x heilbornii*, respuesta que se ve parcialmente limitada. Fundamentalmente la presencia de virosis es el mayor problema que afecta los cultivos comerciales de *C. papaya*; conjuntamente la existencia de las diferentes formas sexuales limita la productividad de *V. cundinarcensis*. El objeto del presente trabajo es señalar algunos resultados de estudios conducidos en nuestros laboratorios, así como enfocar algunas estrategias biotecnológicas que han sido exploradas y en desarrollo, útiles en la superación de algunas de dichas problemáticas.

¹ Instituto de Biotecnología, Universidad Mayor, Santiago de Chile.

² Instituto de Ecología, Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.

³ Autor para correspondencia. miguel.jordan@umayor.cl

Palabras clave adicionales: *Vasconcellea*, *Carica papaya*, papaya de montaña, organogénesis, embriogénesis somática, regeneración *in vivo* & *in vitro*, germoplasma.

ABSTRACT

Different species of Caricaceae family are intensively cultivated in the Andean Region consumed as fruit, used as sources of proteolytic enzymatic compounds and as germplasm sources, and have genetic potential of possible interest for improvement programs. Among these species stay *Carica papaya* and another group of species classified within the *Vasconcellea* genus, such as *V. cundinamarcensis* [syn. *C. pubescens*] (mountain papaya) and *V. stipulata*. Both species carry genes conferring resistance to "papaya ringspot virus" as well as cold tolerance and also have specific organoleptic characteristics. They can be used as graft stocks for other cultures such as *V. x heilbornii* nm. *pentagona* (babaco). Different regenerative potentials are evidenced, according to each species at the sexual or asexual level as well as important limitations affecting their development and regeneration. Some of the specific limitations to be mentioned are: germination problems due to dormancy influenced by the testa, variability in the degree of viability according to provenance, slow post-emergence development and associated aspects, with significant losses to fungal attack (*V. stipulata*). Asexual reproduction is otherwise mandatory, for sterile interspecific hybrids such as *V. x heilbornii*, whose response is partially limited. The presence of virosis is the main problem affecting commercial cultures of *C. papaya*; the existence of different sexual forms affects the productivity of *V. cundinamarcensis*. The objective of this work is to mention several results of studies carried out in our laboratories, focusing on various biotechnological strategies already explored or being developed, which can be used to overcome some regeneration problems.

Additional key words: *Vasconcellea*, *Carica papaya*, mountain papaya, organogenesis, somatic embryogenesis, *in vivo* & *in vitro* regeneration, germplasm.

Fecha de recepción: 28-04-2009

Aprobado para publicación: 01-06-2009

Lista de abreviaciones: AIA: ácido indolacético; AIB: ácido indol-3-butírico; AG₃: ácido giberélico; ANA: ácido α -naftalenacético; BAP: 6-bencilaminopurina; TDZ- 1-fenil-3-(1,2,3,-tidiazol-5-il)urea (tidiazuron).

INTRODUCCIÓN

La Región Andina, centro de origen de las numerosas especies e híbridos pertenecientes a la Familia Caricaceae, y que evidencian considerable variabilidad genética, constituyen una fuente importante de recursos genéticos para mejoramiento vegetal y productos tanto agrícolas, medicinales o industriales. Diferentes especies que proveen de características de resistencia a virosis pueden participar en cruzamientos interespecífi-

cos generando híbridos, aportar genes de tolerancia para el frío favoreciendo la extensión de cultivos a zonas por hoy limitantes o para otorgar características organolépticas. La recombinación genética, los aspectos de selección y generación de genotipos y la multiplicación, en sus formas, agámica y sexual, vía *in vivo* o *in vitro* son en su conjunto todas relevantes. Diferentes potencialidades biotecnológicas han sido exploradas en las

diferentes especies de Caricáceas y han conducido al conocimiento del potencial morfogénico y regenerativo existente. En el presente trabajo se intenta recopilar algunos antecedentes sobre el potencial de respuestas inductivas y regenerativas inducidas, expresables en células, tejidos y órganos de algunas Caricáceas, biotecnologías de posible utilidad en estudios atingentes a estas especies.

MATERIAL Y MÉTODOS

A fin de evaluar el potencial morfogénico y regenerativo *in vivo* e *in vitro* según la especie, se evaluaron respuestas bajo diferentes condiciones a partir de células y protoplastos derivados, de varios tipos de tejidos y órganos. Se ensayaron anteras a fin de conocer el potencial androgénico existente en microsporas. A partir de suspensiones celulares se evaluó la capacidad de iniciar embriogénesis somática; embriogénesis somática adventicia y producción de semillas sintéticas mediante encapsulación, y en protoplastos la posibilidad de fusiones interespecíficas. A partir de hojas se evaluó la inducción de nuevos brotes o embriogénesis somática, así como desde hipocótilos, ápices caulinares, yemas axilares–secciones nodales y secciones de tallo. Respuestas fisiológicas y adaptativas fueron referidas a aspectos de viabilidad, germinación y control de la hiperhidricidad y caracterización parcial de germoplasma. La metodología empleada se encuentra resumida en Jordan *et al.* (1986); Jordan (1992); Jordan y Velozo (1996); Jordan y Piwanski (1999) y Vélez *et al.* (2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuestas morfogénicas y regenerativas del material estudiado, parcial caracterización del germoplasma (*V. cundinamarcensis*), condiciones de cultivo y de requerimientos hormonales se resumen en las tablas 1 y 2. De los resultados se desprende que una gran parte de los diferentes

tipos de explantes ensayados expresan respuestas morfogénicas dependientes de las potencialidades inherentes a la especie y del órgano–tejido examinado, aun en presencia de niveles de reguladores de crecimiento y condiciones de cultivo muy semejantes. Así, por ejemplo, la inducción de embriones somáticos en callo de diferente origen *V. cundinamarcensis* es fácilmente inducible (Jordan, 1992), mientras que en *V. heilbornii* *nm. pentagona* este tejido prospera difícilmente, aun en presencia de addenda orgánica, evidenciando pardeamiento sin generar embriones; respuesta en parte semejante a nuestros resultados con *C. papaya*. Por el contrario, explantes de lámina foliar de *V. cundinamarcensis* no son inducibles a expresar la formación de brotes de–novo, mientras sí se inician en hojas adultas de babaco (Jordan y Piwanski, 1997, 1999).

V. cundinamarcensis expresa amplia respuesta morfogénica en sus tejidos. Diferentes tipos y niveles hormonales (combinaciones de ANA con BA; ANA con Z; ANA con K; AIA con BA y AIA con Z) inician todos la formación de embriones en callo derivados de temas axilares de plantas adultas o de hipocótilos (Jordan, 1986). Dichos embriones son inducibles, además de generar embriones adventicios, con lo cual se facilita su multiplicación masiva (Jordan y Velozo, 1996). Un encapsulamiento de estos embriones (para uso como semilla sintética) también parece factible (Jordan, 2005).

Dadas las variadas formas sexuales (por ejemplo en *V. cundinamarcensis* poco reconocibles en material juvenil), estrategias como la inducción homocigosis de doble haploides mediante el proceso de androgénesis en plantas altamente productivas aparece como una estrategia de selección y producción de germoplasma en programas de mejoramiento genético. Si bien las respuestas androgénicas en Caricáceas han sido poco descritas, en estudios preliminares el potencial en *V. cundinamarcensis*, alcanza a aprox. > 5% de inducción de embrioides derivados de polen y hasta un 91% de callo embriogénico, probablemente también de carácter haploide (Jordan, 1996).

El potencial de cruzamientos interespecíficos entre especies de la familia Caricaceae está ampliamente establecido, y con ello su potencial de recombinación (con resultados tan notables como en babaco). Al respecto, Kyndt *et al.* (2005 a, b) indica que la hibridación es común entre especies del género *Vasconcellea*, encontrándose signos de introgresión de *V. cundinamarcensis* en *V. stipulata* en condiciones naturales como controladas (De Zerpa, 1980); dicha variabilidad es notable en *V. stipulata* en material colectado de diferentes procedencias (Horovitz y Jiménez, 1967). Al respecto, cabe notar que en las poblaciones de cultivo de *V. cundinamarcensis*, originarias de las regiones de altura de la Región Andina, distribuida desde Panamá a Bolivia en zonas templadas entre 1.500-3.000 m (Badillo, 1971; Muñoz, 1965), adaptadas a la zona costera en Chile central (28° y 36° S.), éstas parecen ser más bien homogéneas; estudios isoenzimáticos denotan extrema similitud en muestras en más de 1.000 km de extensión.

Así, considerando el potencial de cruzamiento interespecies existente, trabajos experimentales de fusión a nivel de protoplastos han sido sin embargo bastante limitados. Al respecto, algunos experimentos de fusiones de protoplastos entre *V. cundinamarcensis* y *C. papaya* con perspectivas de lograr híbridos o recombinantes con características de interés posibles de usar en programas genéticos (inserción de resistencia a PRV, características de tolerancia al frío, generación de recombinantes como patrones de injerto),

sólo inician las primeras fases de desarrollo embriogénico *in vitro* y no desarrollan estructuras viables (Jordan *et al.*, 1986). La incompatibilidad génica al recombinar el genoma de ambas procedencias es probablemente la causa de los escasos resultados disponibles. Sin embargo, establecidos los mecanismos morfogénicos y de regeneración celular y tisular y con el advenimiento de metodologías que permiten la inserción de genes foráneos entre una especie y otra permite la fijación y expresión de características particulares deseables. Entre éstas, ayudan marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a PRV presentes en *V. cundinamarcensis* (Dillon *et al.*, 2006). Finalmente, mediante ingeniería genética, insertando el gene codificante de la proteína viral del PRV, ha sido posible obtener existosamente plantas transgénicas de *C. papaya* resistentes en variedades comerciales, intensidad de respuesta que depende de la dosificación presente de dicho gen en las nuevas plantas transformadas (Fitch *et al.*, 1992; Tennant *et al.*, 1994, 2001.; Gonzalves y Ferreira, 2003). Otros muchos mecanismos de regulación son necesarios en la estabilización de respuestas ante la modificación genética y consecución final de un producto transgénico comercial. Entre las Caricaceas, las respuestas regenerativas *in vitro*, según el caso, parecen ser más satisfactorias que en muchas especies vegetales de carácter recalcitrante, característica de no menor relevancia cuando a nivel del material celular transformado los procesos morfogénicos deben encaminarse hacia la obtención *in vitro* de una planta viable completa.

Tabla 1. Resumen de respuestas regenerativas, potencial regenerativo y parcial caracterización del germoplasma en algunas Caricáceas*.

Especie-explante	<i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	<i>V. heilbornii</i> nm. <i>pentagona</i>	<i>V. stipulata</i>	<i>Carica papaya</i>
Microsporas uninucleadas	Androgénesis, embriones somáticos derivados de polen-callos	(No aplica)		
Cultivos celulares	Embriones somáticos, plántulas, embriogénesis; embriog. adventicia, encapsulación	Formación de callo	Formación de callo	Formación de callo

Tabla 1. Continuación

Especie-explante	<i>Vasconcellea cundimarcensis</i>	<i>V. heilbornii</i> nm. <i>pentagona</i>	<i>V. stipulata</i>	<i>Carica papaya</i>
Fusión de protoplastos	Con <i>Carica papaya</i> ; primeros estados de embriogénesis de células fusionadas			Con <i>Vasconcellea cundimarcensis</i> ; primeros estados de embriogénesis de células fusionadas
Lámina foliar	Sin respuesta morfológica	Formación de callo, brotes de novo o embriones somáticos, hoja adulta	Iniciación de brotes de hojas derivadas de ejes embrionarios	
Elemento bulboso en porción basal de lámina foliar		Inducción de nuevos brotes; plántulas	(Estructura visible poco desarrollada según ontogenia foliar)	
Hipocótilo	Embriogénesis somática	(No aplica)	Regeneración de plántulas, control de la hiperhidricidad	Formación de callo
Ápices caulinares		A partir de subcultivo de los nuevos brotes generados del elemento bulboso que evidencian inducción de raíces, regeneración de plántulas		Formación de callo de ápices de plántulas en desarrollo
Yemas axilares–secciones nodales	Brotación de las yemas axilares preexistentes; formación nuevos brotes múltiples, callo y embriogénesis indirecta	Formación de raíces y plantas escasa	Brotación de las yemas axilares preexistentes; nuevos brotes, callo	
Estacas de tallo	Raíces; plantas	Raíces; plantas		
Semillas		(No aplica)	Escarificación promueve porcentaje y reduce tiempo de germinación	
Embriones	Incremento en el porcentaje de germinación <i>in vitro</i> en presencia de ANA y Kin, medio MS	(No aplica)	Reducción tiempo de latencia	
Caracterización de germoplasma				
Formas sexuales en plantas masculinas y productoras femeninas	1. Determinación de extractos de fenoles HPLC de hojas y flores plantas ambos sexos 2. Electroforesis SDS poliacrilamida hojas, flores, pecíolos en plantas de ambos sexos			
Ecotipos–variación somaclonal	Electroforesis en gel de isoenzimas (AAT) y otras enzimas indicadoras			

* Resultados experimentales realizados por autores exclusivamente.

Tabla 2. Resumen de mejores condiciones inductoras de respuestas morfológicas y regenerativas en varias Caricáceas

Respuesta morfológica	Inducción – tratamiento	Medio nutritivo – reguladores	Addenda – otros	Resultado
<i>Androgenesis</i> (V. <i>cundinamarcensis</i>)	Cultivo de anteras y microsporas uninucleadas de plantas femeninas	Sales NN; microelementos de MS, sacarosa 60 g L ⁻¹ . AIA 1,0 mg L ⁻¹ BAP 1,0 mg L ⁻¹ (papel Whatman N° 1 reemplaza agar)	De preferencia cultivo bajo luz fluorescente tenue, ciclos de 18 horas; aprox. 48 μmol m ⁻² s ⁻¹	Generación de embrioides de polen 6,5%
Embriogenesis somática [hipocótilo] (V. <i>cundinamarcensis</i> ; <i>C. papaya</i>)	Formación de callo inicial, posteriormente subcultivo, estático o agitación cte.	Varios embriones somáticos, plántulas, embriogénesis; embriog. adventicia, encapsulación	Para el caso de <i>C. papaya</i> se requiere oscuridad. Medios: MS y NN	En V. <i>cundinamarcensis</i> formación de callo y embriones somáticos, tb. embriones adventicios, abundantes y plántulas usando pretratamientos con 2,4-D
Fusión de protoplastos (V. <i>cundinamarcensis</i> x <i>C. papaya</i>)	Células de <i>C. cundinamarcensis</i> derivadas de hoja juvenil; de <i>C. papaya</i> obtenidas de callo formado de hipocótilo	Preplasmólisis con manitol 13%, 60 min; digestión por 39 h en celulasa (2%) , Macerozima R-10 (0,5%) y manitol 13%, en oscuridad, 30°C, sales MS	Desinfección hoja en etanol 70%, 2 min	Protoplastos viables de ambos tejidos, densidad aprox. 44 x 104 en <i>C. cundinamarcensis</i> . Primeros estados de división y embriogénesis de productos de fusión aunque sin posterior desarrollo
Formación de embriones somáticos–brotes en lámina foliar (V. <i>heilbornii</i> nm. <i>pentagona</i>)	Inducción de brotes y embriones somáticos en secciones de lamina foliar; respuestas de acuerdo a uso y niveles de reguladores	Fases de cultivo de hoja y subcultivo de callo al inicio con TDZ y AIA, luego con AG ₃ . Callo en placa, estático desarrolla embriones somáticos. En babaco formación de brotes solo con alta concentración de TDZ	Inducción de embriones somáticos (indirecto) sólo en presencia glutamina, hidrolizado de caseína y cisteína	Varias fases de subcultivo; con respuesta embriogénica menor que observada en V. <i>cundinamarcensis</i> , en la cual no se generan por contrario brotes a partir de explantes foliares
Formación de brotes [elemento bulboso] en lámina foliar (V. <i>heilbornii</i> nm. <i>pentagona</i>)	Inducción de brotes sólo del elemento bulboso, ligado vascularmente y cultivado con sección de hoja	Medio MS con TDZ solo o combinado incluyendo hidrolizado de caseína y sulfato de adenina. Para rizogénesis de brotes en subcultivo AIB 2,0 mg L ⁻¹	Presencia de maltosa (2%) y TDZ 3,0 mg L ⁻¹ imprescindibles para la inducción de respuesta y síntesis de clorofila en los nuevos brotes	Obtenidos los brotes el enraizamiento en subcultivo ocurre en un 50% aprox.

Tabla 2. Continuación.

Respuesta morfológica	Inducción – tratamiento	Medio nutritivo – reguladores	Addenda – otros	Resultado
Ápices caulinares [regenerados <i>in vitro</i>]. (<i>V. heilbornii</i> nm. <i>pentagona</i>)	Formación de callo			A partir de nuevos brotes <i>in vitro</i> , formación de callo, inducción de raíces, plántulas
Yemas axilares (<i>V. heilbornii</i> nm. <i>pentagona</i> ; <i>V. cundinamarcensis</i> ; <i>C. papaya</i> ; <i>V. stipulata</i>)	Inducción de callo morfológico en porción proximal del ápice en varias especies conducente a embriones somáticos en subcultivo	En babaco, inducción raíces en presencia de ANA 0,01 mg L ⁻¹ y BAP 0,8 mg L ⁻¹ . Nutrientes NN. Para <i>C. papaya</i> , <i>V. cundinamarcensis</i> y <i>V. stipulata</i> (secciones nodales), brotación de yemas axilares; con formación de nuevos brotes, brotes múltiples, callo y embriogénesis indirecta	Babaco requiere incluir junto a reguladores carbón activado 0,6 g L ⁻¹ ; tb. AdS, hidrolizado caseína y cisteína a fin de evitar pardeamiento. Medios WPM y MS	En babaco, inducción de raíces en la base con producción de plantas en forma errática
Estacas de tallo (<i>V. heilbornii</i> nm. <i>pentagona</i>)	Tratamiento directo de inmersión y posterior mantención de estacas en agua conteniendo AIB	Formación de raíces en presencia de AIB, 50 mg L ⁻¹ , 7 min	Addenda no requiere; solo condiciones de invernadero. Respuesta a luz	Todas las estacas con 3-4 raíces en la porción proximal
Semillas (<i>V. stipulata</i>)	Escarificación de la escleroteca	Peróxido de hidrógeno	(no aplica)	Incremento de porcentaje de germinación de 0,5% a aprox. 53% en 40 días
Embriones (<i>V. stipulata</i>)	Ruptura de la dormancia, desarrollo rápido eje embrionario	Ajuste concentración de sales MS y NN más AG ₃	(no aplica)	Germinación más temprana, control de hiperhidricidad de ejes embrionarios en desarrollo; reducción al 0-13%

MS: Murashige y Skoog, 1962; NN: Nitsch y Nitsch, 1969; WPM: Lloyd y McCown, 1981.

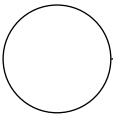
CONCLUSIONES

Con base en la vasta literatura existente, varias especies adscritas a la familia de la literatura existente, sometidas a condiciones inductivas específicas *in vivo* e *in vitro*, parecen expresar un po-

tencial embriogénico y regenerativo satisfactorio a nivel celular, tisular o de órganos. Lo anterior es ventajoso en programas de mejoramiento o de propagación masiva para fines productivos. Particularmente relevante, considerando estrategias como las de transgenia, es la posibilidad de poder ser regeneradas plantas viables llevando íntegra-

mente el gen-carácter de interés a partir de células o tejidos virtualmente transformados. En segundo lugar, la posibilidad de poder seleccionar material de interés y la regeneración de plantas a partir del nivel celular hace posible y facilita también la selección temprana de características particulares, naturales o inducidas detectables a ese nivel y, en tercer lugar, la expresión de la androgénesis, derivando en la regeneración de plantas di-haploides (doble haploides o de carácter homocigoto) derivadas del polen, respuesta inducible y obtenible a corto plazo, en una sola generación, permite igualmente la selección de

material con características no posibles de ser obtenidas en programas de mejoramiento convencionales. La obtención de plantas en forma directa a partir del polen descarta la fase de generación de heterocigotos predominantes en las primeras fases de cruzamientos convencionales. La resultante del empleo conjunto de las biotecnologías mencionadas implica poder incrementar en el ámbito de las Caricaceas la variabilidad de germoplasma por hoy disponible y hacer uso de éste en futuros programas de selección, recombinación o de mejoramiento genético en las especies adscritas a esta familia de plantas.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badillo, V.M. 1971. Monografía de la familia Caricaceae. Fac. Agr. Maracay, Venezuela.
- De Zerpa, D.M. 1980. Comportamiento meiótico de la descendencia híbrida producida al transferir el carácter bisexual de *Carica pubescens* a *Carica stipulata*. Rev. Fac. Agron. (Maracay) 11, 5-47.
- Dillon, S.; C. Ramage; S. Ashmore y R.A. Drew. 2006. Development of a codominant CAPS marker linked to PRSV-P resistance in highland papaya. Theor. Appl. Genet. 113, 1159-1169.
- Fitch, M.; R. Manshardt; D. Gonsalves; J. Slightom y J. Sanford. 1992. Virus resistant papaya derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. BioTechnol. 10, 1466-1472.
- Gonsalves, D. y S. Ferreira. 2003. Transgenic papaya: A case for managing risks of papaya ringspot virus in Hawaii. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2003-1113-03-RV.
- Horovitz S. y H. Jiménez. 1967. Cruzamientos interespecíficos e intergenéricos en Caricáceas y sus implicaciones fitotécnicas. Agronomía Tropical (Maracay) 17, 323-343.
- Jordan, M.; G. Ciudad; M.L. Rojas y F. Valverde. 1986. Isolation, culture and fusion of *Carica candamarcensis* and *C. papaya* protoplasts. Gartenbauwissenschaft 51, 175-178.
- Jordan, M. 1992. Capítulo II 12: Micropropagation of Papaya (*Carica* sp). pp. 418-459. En: Bajaj, Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 18, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Jordan, M. 1996. *In vitro* regeneration of some little known Andean fruit crops. p. 34. Proc. 1st. Conference on Fruit Production in the Tropics and Subtropics. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Jordan, M. y J. Velozo. 1996. Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. Plant Cell Tissue Organ Cult. 44, 189-194.
- Jordan, M. y D. Piwanski. 1997. Regeneration of babaco [*Carica pentagona* (Heilborn) Badillo] using leaf explants and shoot-tip culture. Rev. Intl. Bot. Exp. 61, 109-115.
- Jordan, M. y D. Piwanski. 1999. Regeneration of babaco (*Carica pentagona*) through somatic embryogenesis. Phytan 64, 101-105.
- Jordan, M. 2005. Capítulo 4: Aplicaciones de la técnica de cultivo de tejidos. pp.73-98. En: Prieto, H., M. Jordan; L.P. Barreto; M.C. Rocha y D. Durzan. Biotecnología vegetal. Colección Libros INIA, N° 15.

- Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, Prograf Impresores, Santiago.
- Kyndt, T.; E. Romeijn-Peeters; B. Van Droogenbroeck; J. Romero-Motochi; G. Gheysen y P. Goetghebeur. 2005a. Species relationships in the genus *Vasconcellea* (Caricaceae) based on molecular and morphological evidence. *Amer. J. Bot.* 92, 1033–1044.
- Kyndt, T.; B. Van Droogenbroeck; E. Romeijn-Peeters; J. Romero-Motochi; X. Scheldeman; P. Goetghebeur; P. van Damme y G. Gheysen. 2005b. Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 442-459.
- Lloyd, G. y B.H. McCown. 1981. Woody Plant Medium-A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience* 16, 453.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth at bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Nitsch J.P. y C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163, 85-87.
- Muñoz, M. 1965. Síntomas de deficiencias nutricionales en plantas de papayo (*Carica candamarcensis* Hook). Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad de Chile, Santiago.
- Tennant, P., C. Gonsalves; K. Ling; M. Fitch; R. Manshardt; J. Slightom y D. Gonsalves. 1994. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathol.* 84, 1359-1366.
- Tennant, P.; G. Fermin; M. Fitch; R. Manshardt; J. Slightom y D. Gonsalves. 2001. Papaya ringspot virus resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 645-653.
- Vélez D.; R. Armijos y M. Jordan. 2009. Germinación y desarrollo *in vitro* de embriones de *Vasconcellea stipulata* Badillo: tratamientos pre-germinativos y control de hiperhidricidad (en preparación).