

00345



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

3

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**METODOLOGIA PARA OBTENCION DE
PROTOPLASTOS DE *Carica papaya L.*
(Caricaceae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

(BIOLOGÍA VEGETAL)

PRESENTA

María de Lourdes Martínez Cárdenas

DIRECTOR DE TESIS: Dr. 3º Ciclo Antonio Carmona Alcántara

MÉXICO, D.F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco ampliamente la orientación y ayuda que me otorgaron amablemente:

El Comité Tutorial:

Director Dr. Antonio Carmona Alcántara

Dña Alicia Brechu Franco

Dra. Concepción Rodríguez Jiménez

Así como a los demás integrantes del jurado, por sus atinadas recomendaciones con las cuales se enriqueció el trabajo escrito:

Especialmente al M. En C. Gerardo Varela por el tiempo que dedicó a la asesoría en el manejo estadístico de los datos.

A la estudiante de Ing. Bioq. Industrial Ma. del Carmen Cabrera Jiménez por la ayuda aportada en el laboratorio, sin la cual el trabajo hubiera sido pesado en extremo.

Dedico este trabajo con todo mi amor y agradecimiento a mi esposo y a mis hijos, a quienes les reduje el tiempo para atenderlos, pero que me apoyaron y me tuvieron tanta paciencia.

A mis padres, mis hermanos y a mi tía Martha, porque siempre que los necesité estuvieron conmigo, sobre todo cuando hubo adversidades y parecía que este trabajo no se podría concluir.

A todas aquellas personas que me apoyaron.

¡Mil gracias!

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

METODOLOGIA PARA LA OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS DE *Carica papaya* L. (CARICACEAE)

RESUMEN

Carica papaya es un frutal de importancia económica debido a lo cotizado de su fruto y a los productos que se extraen de la planta; la principal enfermedad que presenta es el virus de la mancha anular, cuyo efecto en México es grave y solo se puede atacar por la manipulación genética introduciendo un gen que aporte resistencia a la enfermedad. Un método que puede ayudar a este propósito es la manipulación de protoplastos, por lo cual con lo que se debe contar en primer lugar es con un método fácil y confiable para la obtención de los protoplastos, que sea un modelo útil en los estudios genético-moleculares, el objetivo del presente trabajo fue establecer un método adecuado para obtener protoplastos de *C. Papaya*. El punto de partida fue el método de Litz (1984, 1986 a), del que se hicieron modificaciones. Se probaron como pretratamiento con reguladores del crecimiento 5mg/l de BAP con cada una de tres auxinas ANA, AIA y 2,4-D, cada una de ellas en 5, 3, 1, 0.1 y 0.01mg/l y un pretratamiento hipotérmico con obscuridad. Como enzimas se utilizaron Celulasa, Hemicelulasa y Pectinasa, que permitieron separar los protoplastos de forma satisfactoria; para el cultivo se utilizó un medio que consta de sales de MS modificado (MS-MC) y el medio K3 adicionados con BAP y ANA 0.2mg/l de cada uno. El pretratamiento con reguladores que mejor resultó fue BAP 5mg/l con AIA 5mg/l, aunque al reemplazarlo por el tratamiento hipotérmico con obscuridad se pudo evitar la contaminación que había sido constante. El medio de cultivo que permitió que los protoplastos se mantuvieran por lo menos tres semanas fue el MS-MC adicionado con ANA y BAP.

CONTENIDO

Importancia de los protoplastos	1
Estudios realizados con protoplastos	1
Papaya	6
- Descripción botánica	6
- Requerimientos ambientales	8
- Cultivo	9
- Origen y distribución	10
- Importancia	10
- Consumo y utilización de la papaya	11
- Producción	13
- Enfermedades	13
- Trabajos de cultivo <i>in vitro</i>	15
Antecedentes	17
Justificación	18
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
Método	20
- Primera fase	
Pretratamiento con reguladores del crecimiento vegetal	20
- Segunda fase	
Preparación de un medio de cultivo estable	24
- Tercera fase	
Pretratamiento hipotérmico y cultivo	25
Resultados y discusión	27
- Primera fase	27
- Segunda fase	31
- Tercera fase	33
- Aislamiento de los protoplastos	34
- Cultivo de los protoplastos	37
Beneficios del método	47
Conclusiones	48
Bibliografía	51

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Figura 1: planta de papayo	12
Figura 2: hoja con manchas causadas por el virus de la mancha anular	12
Figura 3: protoplastos en campo claro y con fluorescencia	36
Gráfica 1: producción de protoplastos pretratamiento BAP:ANA	29
Gráfica 2: producción de protoplastos pretratamiento BAP:AlA	29
Gráfica 3: Producción de protoplastos pretratamiento BAP:2,4-D	29
Cuadro 1: Método para cultivo de protoplastos Litz (1984, 1986 a)	21
Cuadro 2: número de células observadas después del cultivo	37
Anexo 1: Composición de los diferentes medios utilizados	49

ABREVIATURAS UTILIZADAS

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
4-pu	N-(2-cloro-4-piridil)-N'-fenilurea
ABA	Ácido absicico
AlA	Ácido indol acético
ANA	Ácido naftalén acético
BAP	Bencil amino purina
FDA	Fluoresceína diacética
MS	Murashige y Skoog
msnm	metros sobre el nivel del mar
VMAP	Virus de la mancha anular de la papaya

METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS DE *Carica papaya*

L. (Caricaceae)

IMPORTANCIA DE LOS PROTOPLASTOS

Los protoplastos son las células vegetales desprovistas de la pared celular, es decir son células desnudas, consisten de membrana plasmática, citoplasma, organelos y sistemas membranales internos. Son frágiles osmóticamente, se deben manipular con cuidado debido a que pueden plasmolizarse y se aíslan después de remover la pared celular (Thomas y Davey, 1975; Vasil y Vasil, 1980). Las técnicas de cultivo de tejidos se han extendido recientemente para incluir el cultivo de protoplastos, éstos son un material experimental valioso para el aislamiento de organelos y macromoléculas y para investigar fenómenos tales como la transferencia de plasmalema y regeneración de pared celular, pero más importante es su potencialidad en el campo de la hibridación somática celular, la producción de plantas y en el estudio de las infecciones virales y transformación genética, porque pueden aislarse en gran número y cultivarse hasta la regeneración de plantas (Butchnet e Ingram, 1976), lo cual es un ejemplo claro de la totipotencialidad de las células vegetales.

ESTUDIOS REALIZADOS CON PROTOPLASTOS

Giaja (1922, En: Bizeau y Bizeau, 1970) aisló protoplastos de levadura al degradar la pared celular con jugo digestivo de caracol; más tarde, Küster (En: Schilde-Rentschler, 1975) en Alemania, aisló protoplastos de cebolla utilizando una solución concentrada de azúcar y no es sino hasta 1960, que Bergman (En: Schilde-Rentschler, 1975) cultivó células libres; Cocking (En: Schilde-Rentschler, 1975), empleó una mezcla de enzimas de hongos llamada

METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS DE *Carica papaya*

L. (Caricaceae)

IMPORTANCIA DE LOS PROTOPLASTOS

Los protoplastos son las células vegetales desprovistas de la pared celular, es decir son células desnudas, consisten de membrana plasmática, citoplasma, organelos y sistemas membranales internos. Son frágiles osmóticamente, se deben manipular con cuidado debido a que pueden plasmolizarse y se aíslan después de remover la pared celular (Thomas y Davey, 1975; Vasil y Vasil, 1980). Las técnicas de cultivo de tejidos se han extendido recientemente para incluir el cultivo de protoplastos, éstos son un material experimental valioso para el aislamiento de organelos y macromoléculas y para investigar fenómenos tales como la transferencia de plasmalema y regeneración de pared celular, pero más importante es su potencialidad en el campo de la hibridación somática celular, la producción de plantas y en el estudio de las infecciones virales y transformación genética, porque pueden aislarse en gran número y cultivarse hasta la regeneración de plantas (Butchnet e Ingram, 1976), lo cual es un ejemplo claro de la totipotencialidad de las células vegetales.

ESTUDIOS REALIZADOS CON PROTOPLASTOS

Giaja (1922, En: Bizeau y Bizeau, 1970) aisló protoplastos de levadura al degradar la pared celular con jugo digestivo de caracol; más tarde, Küster (En: Schilde-Rentschler, 1975) en Alemania, aisló protoplastos de cebolla utilizando una solución concentrada de azúcar y no es sino hasta 1960, que Bergman (En: Schilde-Rentschler, 1975) cultivó células libres; Cocking (En: Schilde-Rentschler, 1975), empleó una mezcla de enzimas de hongos llamada

macrocima para separar las células, degradar la pared celular y así obtener protoplastos. Zaitlin y Coltrin (1964) purificaron pectinasa de una preparación comercial extraída de un filtrado del hongo *Rhizopus tritici* que hidroliza pectinas y de esta forma se conoció que la pectinasa parcialmente purificada es 10 a 15 veces más activa sobre la proteína base que la preparación comercial.

Los primeros problemas que enfrentaron los investigadores fueron la asepsia y el mantenimiento del cultivo (Schilde-Rentschler, 1975). Una vez resueltos, los trabajos con protoplastos se encaminaron a estudiar las condiciones del medio de cultivo observando la influencia de los nutrimentos minerales y orgánicos que se adicionaban al medio. Esto permitió estudiar el transporte de iones como K^+ , Cl^- , $H_2PO_4^-$, y Ca^{+2} a través de la membrana (Mettler y Leonard, 1979a; Mettler y Leonard, 1979b); también se estudió el transporte de azúcares y aminoácidos (Guy y Reinhold, 1978). Últimamente el empleo de técnicas como el “patch-clamp”, que consiste en aislar un pedazo de membrana celular con una pipeta a la cual queda sujeta y permite exponerla a diferentes solutos, siendo así posible conocer como es el paso de los solutos a través de la membrana, por lo que este método ha sido importante y ha permitido avances significativos en el conocimiento de la fisiología de la membrana de la célula vegetal (Bregante *et al* , 1996; Piñeros y Kochian, 2001).

Los protoplastos son un material privilegiado para la experimentación pues permiten estudiar la reconstrucción de la pared celular. Por ejemplo, Abdel-Basset (1998) demostró que los iones Ca^{+2} y los nutrimentos en el medio de cultivo juegan un papel importante para que las células recobren su capacidad de regeneración. Un trabajo semejante, pero en tabaco

lo realizaron Uchimiya y Murashige (1976), quienes utilizaron sales del medio MS (Murashige-Skoog, 1962), adicionadas con 15 g/l de sacarosa, 110 g/l de manitol, compuestos orgánicos de MS, 6 mg/l de ANA, 0-0.1 mg/l de Cinetina y observaron la reconstrucción de la pared celular en un 85%, además de recobrase el 35% de la capacidad de la división celular. Sugirieron también que el método para modificar genéticamente a las plantas a partir de protoplastos implica tres pasos: a) aislar los protoplastos de las células, b) preparar el material genético que se incorporará al protoplasto y c) regenerar la célula y llevarla hasta formar una planta.

Los protoplastos de girasol (*Helianthus annuus*) se han utilizado como modelo para realizar estudios sobre la regeneración de la pared celular y la organización de los microtúbulos por efecto de la agarosa (Caumont *et al.*, 1997), el efecto de la presión atmosférica en la división de los protoplastos (Barthou *et al.*, 1997), así como la influencia de tratamiento eléctrico y la densidad de siembra sobre la capacidad de la proliferación de protoplastos (Keller *et al.* 1997) En protoplastos de *Betula platyphylla* var. *japónica* se estudió el efecto de los reguladores del crecimiento vegetal, densidad de siembra, niveles de nitrógeno, fosfato inorgánico y pH sobre la división celular, la cual se incrementó con medio MS al 50%, adicionado con sacarosa 0.09M, ANA 1 μ M y 4-pu 1 μ M (Wakita *et al.*, 1996) y en haba se observó la regeneración de plantas a partir de protoplastos por efecto del thidiazuron (Tegeder *et al.*, 1995) Los protoplastos también han constituido un buen material para obtener de ellos estructuras celulares como cromosomas (Szabados *et al.*, 1981; Jouve *et al.*, 1991) o núcleos como se hizo en soya para el estudio de la síntesis de RNA e incorporación de aminoácidos (Ohyama *et al.*, 1977)

Debido a que son células separadas, se pueden inducir mutaciones y después clonar líneas celulares o bien fusionar protoplastos de diferentes especies o unidades subcelulares que pueden utilizarse para transferir parte del genoma vegetal entre especies distintas con caracteres agronómicos deseables; ello ha dado lugar al desarrollo de plantas genéticamente modificadas como se ha realizado con naranja y uva (Ohgawara *et al.*, 1989) y entre dos especies del género *Linum*, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (Ling y Binding, 1997); se han obtenido también híbridos somáticos de *Poncirus trifoliata* con *Fortunella hindsii*, especies que no se hibridan naturalmente (Miranda *et al.*, 1997) Otros dos géneros de cítricos de los que se han obtenido híbridos somáticos son *Microcitrus* con *Citrus* (Vardi *et al.*, 1989). En la mayoría de los casos, se utiliza el material vegetal que tiene potencial para brindar caracteres o mejorar características adquiridas.

Diversos factores importantes deben considerarse en la obtención de protoplastos, e incluyen los tratamientos pre-enzimáticos, la esterilización del material y la facilitación de la penetración de las enzimas que puede ser por la eliminación de la epidermis o por infiltración de la solución enzimática con el uso de vacío. El tratamiento enzimático es un paso fundamental, ya que de éste depende la liberación de los protoplastos y para ello se deben tomar en cuenta la naturaleza de las enzimas y su concentración. El pH y la temperatura son factores que se deben considerar para que las enzimas funcionen de forma óptima así como la relación enzima y la cantidad de tejido, generalmente 10 a 1 es adecuada. Debido a la fragilidad osmótica de los protoplastos se requiere de un

estabilizador osmótico en las soluciones enzimática, de lavado y medio de cultivo, por lo que se han empleado diversos tipos de azúcar y CaCl_2 .

El medio de cultivo para protoplastos contiene niveles reducidos de compuestos inorgánicos, debido a que las células desnudas son más eficientes en la toma de los nutrimentos. El rendimiento y la viabilidad de los protoplastos está estrechamente relacionada con la fuente del material, las condiciones cómo creció la planta y su edad (Loyola, 1990).

Para lograr la regeneración de plantas a partir de protoplastos, se requiere la formación de callo embriogénico; lo cual implica que se deben considerar la variación somática, que se refiere a la variación propia entre los distintos tejidos del explante, ya que es frecuente encontrar diferentes niveles de ploidía en distintos tejidos de una misma estructura vegetal (Thomas y Davey, 1975) y la variación somaclonal, que se refiere a la variación en un mismo tejido por efecto del cultivo *in vitro* que se hereda (Vázquez y Linacero, 1992). Esto se ha demostrado por estudios microscópicos en callos que presentan heterogeneidad celular, provocada por factores como el origen y la edad de los cultivos y la composición del medio (Butcher e Ingram, 1976). Aunque la variación que puede ocurrir en los cultivos puede considerarse como un impedimento para la clonación, es posible tomar provecho de ella para seleccionar características deseables que permitan el mejoramiento de las plantas cultivadas como, por ejemplo, la resistencia a enfermedades

PAPAYA

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La papaya (*Carica papaya* L.) es un miembro de la familia Caricaceae (Fig. 1), que consta de cuatro géneros: *Cylicomorpha*, *Jacaratia*, *Jarilla* y *Carica*, todos ellos, a excepción de *Cylicomorpha*, son originarios de América tropical. Dentro del género *Carica* se ubican 22 especies, de las cuales *C. papaya* es la especie más importante desde el punto de vista económico (Badillo, 1993).

La planta de papaya es una herbácea perenne, de crecimiento rápido, que puede alcanzar de 3 a 12 m de altura, con tallo generalmente único, grueso, carnoso, hueco, hasta de 20 cm de diámetro, marcado con cicatrices foliares grandes y numerosas, que remata en un grupo denso de hojas grandes. Las hojas presentan limbo amplio, casi circular, profundamente palmatinervas, palmatilobadas y los lóbulos pinatífidos. Peciolos fistulosos de 50 a 70 cm de largo (Badillo, 1993; Díaz- Luna y Lomeli-Senci3n, 1997).

Las inflorescencias de 25 a 100 cm de largo pueden encontrarse en individuos mon3icos con flores pistiladas o estaminadas o bien con flores hermafroditas, son cimoso-paniculadas con numerosas flores de color blanco cremoso; las flores masculinas son peque3as con 1 a 1.5 cm de largo del c3liz. Las femeninas son flores sentadas, se presentan en n3mero de 1 a 3, con 5 a 10 cm de largo. El ovario es m3s o menos ovoide, unilocular, hasta de 3 cm de

largo por 1.5 a 2 cm de ancho, los estigmas miden aproximadamente 1 cm, son ramificados, cortos, a manera de "cornamenta de venado" (Badillo, 1993).

El fruto es una baya ovoide-oblonga, piriforme o casi cilíndrica, desde 2 a 10 cm de largo por 1.5-6 cm de ancho, hasta muy grande en cultivo. Es carnosa, jugosa, ranurada longitudinalmente en su parte exterior, de color verde amarillento, amarillo o anaranjado, unilocular y de color amarillo, anaranjado o rojizo al interior con numerosas semillas parietales. Las semillas son de color negro, redondeadas u ovoides y encerradas en un arilo transparente (sarcotesta mucilaginoso); presenta la escleroteca con numerosas protuberancias irregularmente dentadas; los cotiledones son ovoide-oblongos, aplanados y de color blanco (Ochse *et al.*, 1976; Badillo, 1993, Díaz-Luna y Lomelí-Sención, 1997).

C. papaya no se conoce en estado silvestre, aunque hay poblaciones que se escapan de cultivo desde América Central hasta el Noreste de América del Sur; poblaciones con plantas unisexuales, estaminadas o pistiladas, con frutos pequeños y esféricos, aromáticos; que se cruzan con variedades cultivadas (León, 1987)

En México, con respecto al tamaño, forma y apariencia del fruto se determinan tipos y variedades, entendiéndose como tipos aquellos materiales que no se manejan con polinización controlada, mientras que las variedades, tienen un control de la polinización y mejoramiento genético en general; se tiene: los tipo cera, coco y mamey y las variedades maradol y hawaiana (Beltrán *et al.*, 1999)

REQUERIMIENTOS AMBIENTALES

Las regiones en donde se favorece el desarrollo de papaya son aquellas que tienen temperaturas medias altas, sin variaciones marcadas durante el año, de tal forma que a lo largo del día varíe entre los 21° y 33°C a la sombra, aunque puede soportar más temperatura, siempre que el suelo esté húmedo y el aire no sea seco. Las heladas y las temperaturas por abajo de 0°C matan a la planta inmediatamente; si las noches son frescas (menores de 16°C) y húmedas, los frutos maduran lentamente. La altitud para que se desarrolle mejor debe ser inferior a 1000 msnm, en los trópicos; sin embargo los mejores frutos se obtienen a los 400 msnm o menos.

El papayo requiere de uniformidad en la cantidad de agua en el suelo, pues bajo esta condición la planta se encontrará en constante crecimiento y producción durante todo el año. El cultivo prospera en lugares donde las precipitaciones son de 1 500 a 2 000 mm; si la precipitación es menor o la sequía se prolonga, se requerirá de riego; así una estación de lluvias de 6 a 8 meses es la condición ideal para el cultivo. Cuando se aplica el riego, deben cuidarse los excesos, pues cuando la raíz permanece inundada por más de 48 horas, sufre daños tales que pueden causar la muerte de la planta.

Los suelos para el cultivo deben ser ligeros, permeables y ricos en humus, tipo aluvión; pero puede tolerar cualquier clase de suelo siempre y cuando no esté demasiado seco ni mal drenado (Pacheco, 1972; Ochse *et al* , 1976; Santos de la Rosa, 1993).

CULTIVO

De acuerdo con Vázquez y colaboradores (1974), el cultivo productivo de papayo puede iniciarse con semillas que pueden comprarse en el mercado o bien, seleccionarlas de plantas sanas y vigorosas de sexo femenino o hermafrodita, con buena producción y porte bajo, así como uniformidad en el tamaño del fruto; los frutos seleccionados deben estar bien desarrollados, sanos y bien formados, la cáscara lisa, con color anaranjado o amarillo, con pulpa firme, gruesa y dulce. La semilla se extrae y se remueve la sarcotesta (cubierta translúcida gelatinosa que cubre a la semilla) una vez seca al sol, se trata con insecticidas y fungicidas para almacenarse en bolsas de papel en un lugar seco y fresco.

La siembra se realiza en semilleros, para los que se recomienda tierra desinfectada de textura franca. Los riegos deben ser ligeros pero manteniendo la humedad necesaria para la emergencia uniforme de las plántulas, las cuales al alcanzar de 10 a 15 cm de altura podrán trasplantarse a su lugar definitivo.

El terreno para el trasplante definitivo se prepara con anticipación y se cavan cepas con distancias según la densidad de plantación que se desee. Una vez realizado el trasplante se riega para asentar el suelo. Cuando las plantas florecen se lleva a cabo la distribución de los sexos en una proporción de una masculina por 10 a 15 femeninas (Pacheco, 1973). Para el desarrollo óptimo de las plantas se debe fertilizar según las necesidades y el tipo de riego del que se disponga. El cultivo debe mantenerse libre de plantas arvenses (malas hierbas) para evitar plagas y enfermedades (Beltrán *et al* , 1999).

ORIGEN Y DISTRIBUCION

Autores como Storey (1979) y Purseglobe (1968, En: Litz, 1984) ubican el origen de esta planta en la parte norte de América Central, Badillo (1993) indica como punto de procedencia el sur de México y Pacheco (1973) agrega Costa Rica a los anteriores. Esta información nos permite pensar que el origen pudo ser desde el sur de México hasta Costa Rica en América Central, aunque Macko (1959, En: Ludlow-Wiechers, 1981) puntualiza que el polen de papaya se ha registrado en el Mioceno (hace 25 000 000 de años) de Polonia.

Oviedo, historiador de la conquista de México, menciona que durante la Colonia se llevaron semillas a Panamá y Santo Domingo, después a Manila y que, a mediados del siglo XVI, el papayo se extendió rápidamente a Málaga, España y a la India, de tal forma que en el siglo XVIII ya era muy conocido en el mundo. Actualmente su cultivo se distribuye en todas las zonas intertropicales, en países como Cuba, Brasil, Colombia; Argentina, Nicaragua, Venezuela, Ecuador, Puerto Rico, China, Japón, India, Ceilán, Filipinas, el Archipiélago Malayo, Estados Unidos (Hawai y Florida), Jamaica y algunos países africanos (Pacheco, 1973; Litz, 1984; Badillo, 1993; Beltrán *et al.*, 1999). De todos, Brasil es el mayor productor de este frutal aportando alrededor del 36% del total mundial [ASERCA (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria), 1999].

IMPORTANCIA

El papayo presenta una distribución amplia e interés económico debido a que como cultivo se adapta fácilmente, además de que presenta rápida capacidad para producir frutos. En

Europa y Estados Unidos la demanda de papaya es alta, sin embargo en Europa, se encuentra poco en el mercado pues la calidad que se exige es alta así como su precio (Pacheco, 1973; Foltran *et al.*, 1993).

CONSUMO Y UTILIZACIÓN DE LA PAPAYA

El fruto se consume fresco, en bebidas y en conserva como: mermelada, trozos en jarabe, fruta cristalizada, encurtidos y pulpa seca dulce. Del fruto inmaduro se extrae papaína, que es una enzima proteolítica similar en su acción a la pepsina y la tripsina, la papaína se utiliza en medicina y en la industria alimentaria, por ejemplo como aclarador de cerveza. Los tallos y las hojas se utilizan para extraer carpaína (estimulante cardíaco) y también se utiliza de forma medicinal para el tratamiento de hemorroides, incordios (tumores) y enfermedades de los ojos; la raíz se utiliza para aliviar erupciones de la piel, además de que se pueden cocinar preparadas como legumbres y el jugo se puede utilizar como antihelmíntico, para la dispepsia y la úlcera (Del Amo, 1980; Beltrán *et al.*, 1999).

En México el consumo de papaya es principalmente como fruto fresco y sólo un pequeño porcentaje de la producción se utiliza en la industria para la elaboración de néctares y dulces (Santos de la Rosa, 1993). Cabe señalar que la fruta tiene un contenido de 86% de agua y 12.8% de carbohidratos, se considera que es una buena fuente de provitamina A, así como de una cantidad elevada de vitamina C (Litz, 1984); también contiene minerales como Ca, P, Fe, Mg, K, Na y Zn (Muñoz de Chávez, 1996) y aminoácidos como triptofano, lisina y metionina (Beltrán *et al.*, 1999).

Figura 1 - Planta de papayo



Figura 2.- Hoja mostrando manchas causadas por el virus de la mancha anular de la papaya



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por las ventajas que representa el consumo de papaya y la diversidad de sus usos, el consumo nacional *per cápita* por año ha crecido en gran escala durante los últimos años; para efectos de comparación, de 1990 a 1997 el consumo se incrementó de 3.012 Kg a 5.842 Kg, lo que representa casi 94%, aunque ha presentado altibajos como en 1993, año de menor consumo (Beltrán *et al* , 1999).

PRODUCCIÓN

En México, los tipos y variedades más comercializados son: cera, mamey y la variedad maradol. Sin hacer la diferencia entre tipos y variedades, en 1973, el papayo se cultivaba en 28 estados de las 5 zonas frutícolas, pero hacia 1998 la producción recayó principalmente en los estados costeros, siendo el mayor productor Veracruz con 11 906 Ha cosechadas (SAGAR, 1998; Díaz- Luna y Lomelí-Sención, 1997). Esta zona productora de Veracruz se localiza principalmente en el centro y sur del estado, comprendiendo 10 municipios en total.

ENFERMEDADES

El papayo es un cultivo que puede ser atacado por diferentes plagas como insectos o ácaros, nematodos, hongos y virus, así como presentar deficiencias por nutrimentos. Exceptuando las enfermedades virales, todas pueden ser erradicadas o controladas por medios físicos o químicos.

Los virus que atacan al papayo son: Bunchy-top (cogollo arrepollado), el mosaico, la variegación amarilla y el virus de la mancha anular (fig. 2) que es el más importante (Pacheco, 1973).

El virus de la mancha anular del papayo (VMAP) es la principal enfermedad que enfrenta el cultivo. Como su nombre lo indica se presenta como manchas en forma de anillo de color amarillo en todos los órganos de la planta (Fig. 2), causando en el fruto reducción en su calidad; las hojas se tornan amarillas, se secan y caen muriendo toda la planta (Santos de la Rosa, 1993). El daño puede ser tal que se llega a ocasionar pérdida total de la cosecha; cuando logra producir frutos son de baja calidad y poco atractivos para el consumo fresco. En la mayor parte de las regiones productoras del Sureste de México, el 90% de las plantas mueren en menos de un año por esta enfermedad (Mora-Aguilera *et al.*, 1993; 1996); ésta se transmite por diferentes especies de áfidos en forma no persistente y su dispersión depende principalmente de los factores bióticos y abióticos que influyen en la presencia de los insectos vectores

Para contrarrestar la enfermedad que causa el virus de la mancha anular, se han sugerido diferentes métodos que se pueden aplicar en el campo (Mora-Aguilera *et al.*, 1993; Santos de la Rosa, 1993) como son:

- Corte y quema de las plantas infectadas.
- Siembra de plantaciones nuevas alejadas de las enfermas
- Eliminación periódica de la maleza, tanto adentro como alrededor de la plantación.
- Siembra de surcos de otro cultivo como maíz o jamaica que sirva como barrera protectora a las plantas de papayo.
- Aplicación de aceites vegetales.
- Incremento en la densidad de población a 2 200 plantas por hectárea.

- Cruzas de protección con razas benignas de VMAP de Hawai

Además Mora-Aguilera y colaboradores (1996) después de realizar un estudio de comparación multivariada del desarrollo epidémico del virus de la mancha anular de papaya, sugiere que para reducir la incidencia del mismo, se trasplante en febrero y junio como alternativa a los trasplantes de abril y mayo que practican los agricultores en la parte central de Veracruz.

A pesar de todas las sugerencias no se ha logrado en México un control satisfactorio del VMAP y menos aún su erradicación. Para lograrlo se requiere de introducir genes que confieran resistencia de la planta a la enfermedad, con métodos transgénicos en los que se pueden utilizar protoplastos como modelo de estudio.

TRABAJOS DE CULTIVO *IN VITRO*

Se han realizado diferentes estudios de laboratorio encaminados a la solución del problema del VMAP. Entre ellos están los realizados por Litz y Conover (1978) quienes, a partir de una colección de germoplasma de papaya, se propusieron realizar la propagación clonal de plantas resistentes a la enfermedad; así se tomó al cultivo de tejidos como una buena alternativa para explotar esta posibilidad. Contaban con el antecedente de que por este método se habían regenerado plantas de callos derivados de peciolo o de callos producidos a partir de plántulas, en medios de cultivo adicionados con cinetina y AIA (De Bruijne *et al*, 1974; Mehdi y Hogan, 1976, En: Litz y Conover, 1978) por lo que propagaron papaya utilizando el brote apical de plantas maduras crecidas en campo, adicionando al medio de cultivo ANA y BAP. Después los mismos autores (1981 a), encontraron que los cultivos *in vitro* de brotes apicales de papayas crecidas en el campo, se ven afectados por la estación

del año en que se colectan, el sexo de la planta y el grado de contaminación por bacterias que presente el cultivo en el campo; las mejores condiciones ocurren cuando se colectan los brotes de plantas estaminadas y con poca contaminación (problema constante con *Pseudomonas*) durante el verano. En el mismo año, Litz y Conover (1981b) también cultivaron óvulos inmaduros de plantas de papaya fecundados con polen de *C. cauliflora* y lograron obtener embriones somáticos *in vitro* con alta efectividad. Continuando con sus investigaciones, Litz y Conover (1983) mejoraron el método de producción de embriones somáticos a partir de óvulos, empleando medio líquido para el cultivo. También, relacionaron la mayor producción de embriones con frutos piriformes de plantas hermafroditas, encontrando que en las plántulas que se desarrollan se observa variabilidad fenotípica considerable, su establecimiento es difícil, debido probablemente a anomalías inducidas durante el cultivo de tejidos. Litz (1986 b), preconiciona los cultivos en suspensión de *Carica* con altas concentraciones de manitol para incrementar la eficiencia de los cultivos en la producción de embriones somáticos.

Hacia la década de los 90, la eficiencia de producción de embriones somáticos mejoró al cultivar embriones inmaduros aislados de los tejidos ovulares y suplementar el medio MS con 2,4-D y también se obtuvieron resultados positivos empleando explantes de diferentes estructuras de plántulas (Fitch y Manshardt, 1990; Fitch, 1993; Fitch, 1995).

Una vez que se establecieron métodos de propagación mediante embriogénesis somática, se requirió de establecer métodos para el mejoramiento genético de la especie. Bhojwani y Cocking, (1972), en la búsqueda de la posibilidad de manipular genéticamente células

vegetales y la posterior regeneración de plantas, propusieron el empleo de protoplastos para encontrar nuevos genotipos de interés agronómico.

ANTECEDENTES

Con el fin de inducir mutaciones que permitieran lograr la obtención de tolerancia al VMAP, Alamgir y Rahman (1991), en Bangladesh, expusieron semillas de papaya a radiación gamma. Con 50 rads encontraron 93.1% de germinación; mientras que la exposición a 100, 500 y 5000 rads produjo plantas más altas y con la base del tallo más ancho; el número de plantas femeninas se incrementó con 10 000 rads y los frutos más grandes los obtuvieron con las que se trataron con 100 rads. Martínez-Cárdenas y colaboradores (1992), con el objetivo de inducir mutaciones para detectar mutantes tolerantes o resistentes al VMAP, irradiaron semillas de papaya tipo cera y durante la germinación detectaron la dosis letal en 3 krad; las plantas sobrevivientes de los lotes tratados fueron más altas y tuvieron mayor área foliar que las plantas testigo. No obstante que observaron quimeras en las hojas, argumentaron que el vigor de la planta podría mejorarse con este tratamiento.

El hecho de observar quimeras en las hojas, sugirió que la radiación gamma induce mutaciones distintas en los tejidos y que si alguna mutación hubiera sido favorable a la planta, no se podría fijar, ya que la hoja es una estructura de la planta que se pierde a largo plazo, por lo que se planteó que la obtención de protoplastos de tejidos irradiados permitiría la detección de líneas celulares con caracteres que pudieran mejorar a la papaya, o bien utilizar tejidos no irradiados, con los que se pudieran realizar hibridaciones somáticas con especies que tuvieran la resistencia natural al VMAP.

vegetales y la posterior regeneración de plantas, propusieron el empleo de protoplastos para encontrar nuevos genotipos de interés agronómico.

ANTECEDENTES

Con el fin de inducir mutaciones que permitieran lograr la obtención de tolerancia al VMAP, Alamgir y Rahman (1991), en Bangladesh, expusieron semillas de papaya a radiación gamma. Con 50 rads encontraron 93.1% de germinación; mientras que la exposición a 100, 500 y 5000 rads produjo plantas más altas y con la base del tallo más ancho; el número de plantas femeninas se incrementó con 10 000 rads y los frutos más grandes los obtuvieron con las que se trataron con 100 rads. Martínez-Cárdenas y colaboradores (1992), con el objetivo de inducir mutaciones para detectar mutantes tolerantes o resistentes al VMAP, irradiaron semillas de papaya tipo cera y durante la germinación detectaron la dosis letal en 3 krad; las plantas sobrevivientes de los lotes tratados fueron más altas y tuvieron mayor área foliar que las plantas testigo. No obstante que observaron quimeras en las hojas, argumentaron que el vigor de la planta podría mejorarse con este tratamiento.

El hecho de observar quimeras en las hojas, sugirió que la radiación gamma induce mutaciones distintas en los tejidos y que si alguna mutación hubiera sido favorable a la planta, no se podría fijar, ya que la hoja es una estructura de la planta que se pierde a largo plazo, por lo que se planteó que la obtención de protoplastos de tejidos irradiados permitiría la detección de líneas celulares con caracteres que pudieran mejorar a la papaya, o bien utilizar tejidos no irradiados, con los que se pudieran realizar hibridaciones somáticas con especies que tuvieran la resistencia natural al VMAP.

En el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Autónoma Metropolitana, se ha cultivado *in vitro* la papaya, para la cual se ha logrado la producción de embriones somáticos y androgénicos (datos no publicados). Con el propósito de seleccionar líneas tolerantes o resistentes a enfermedades se inició la investigación que conduzca a la obtención de protoplastos de hoja de papaya, debido a las posibilidades que estas células ofrecen.

Se han realizado escasos estudios que involucran el cultivo de protoplastos de papaya, Litz (1984 y 1986a), describió escuetamente un método realizado por Conover para cultivar protoplastos de cotiledón y aunque obtuvo protoplastos, al final indica que los cultivos no prosperaron. Este método es relativamente sencillo y susceptible de mejorarse.

Más tarde, Chen y colaboradores (1991) y Chen y Chen (1992), realizaron estudios para madurar embriones de *C papaya* x *C cauliflora* y lograron regenerar plantas de embriones somáticos cultivando embriones inmaduros de un híbrido; posteriormente de esos embriones somáticos cultivados *in vitro*, se obtuvieron protoplastos y a partir de ellos se regeneraron plantas.

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de protoplastos es una alternativa viable en la obtención de líneas celulares, con las que se puedan seleccionar aquellas que presenten resistencia a enfermedades vitales y también para realizar hibridación somática, en aquellas especies incompatibles y donde los métodos de fitomejoramiento tradicional sean limitados. Por ello es preciso realizar

En el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Autónoma Metropolitana, se ha cultivado *in vitro* la papaya, para la cual se ha logrado la producción de embriones somáticos y androgénicos (datos no publicados). Con el propósito de seleccionar líneas tolerantes o resistentes a enfermedades se inició la investigación que conduzca a la obtención de protoplastos de hoja de papaya, debido a las posibilidades que estas células ofrecen.

Se han realizado escasos estudios que involucran el cultivo de protoplastos de papaya, Litz (1984 y 1986a), describió escuetamente un método realizado por Conover para cultivar protoplastos de cotiledón y aunque obtuvo protoplastos, al final indica que los cultivos no prosperaron. Este método es relativamente sencillo y susceptible de mejorarse.

Más tarde, Chen y colaboradores (1991) y Chen y Chen (1992), realizaron estudios para madurar embriones de *C papaya* x *C cauliflora* y lograron regenerar plantas de embriones somáticos cultivando embriones inmaduros de un híbrido; posteriormente de esos embriones somáticos cultivados *in vitro*, se obtuvieron protoplastos y a partir de ellos se regeneraron plantas.

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de protoplastos es una alternativa viable en la obtención de líneas celulares, con las que se puedan seleccionar aquellas que presenten resistencia a enfermedades vitales y también para realizar hibridación somática, en aquellas especies incompatibles y donde los métodos de fitomejoramiento tradicional sean limitados. Por ello es preciso realizar

estudios en este campo, sobre todo en plantas de importancia económica que presentan enfermedades virales que sólo pueden ser contrarrestadas por la manipulación genética. Como es el caso de la papaya, planta cultivada de gran importancia económica, cuyo problema principal la enfermedad del VMAP. La aplicación del cultivo de protoplastos de papaya representa una herramienta muy valiosa para mejorar la cantidad y calidad de este frutal, es por ello, que en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el método adecuado que permita aislar protoplastos de papaya tomando como base el método descrito por Litz (1984 y 1986 a).

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el explante del cual se puedan obtener protoplastos fácilmente, ya sean cotiledones u hojas jóvenes de plantas de dos años de edad.

Establecer un pretratamiento que permita obtener protoplastos en mejor cantidad y buenas condiciones, con reguladores del crecimiento vegetal o hipotérmico con obscuridad.

Determinar el medio nutritivo en el que pueda prosperar el cultivo de los protoplastos, el Murashige-Skoog (MS) modificado o el K3

estudios en este campo, sobre todo en plantas de importancia económica que presentan enfermedades virales que sólo pueden ser contrarrestadas por la manipulación genética. Como es el caso de la papaya, planta cultivada de gran importancia económica, cuyo problema principal la enfermedad del VMAP. La aplicación del cultivo de protoplastos de papaya representa una herramienta muy valiosa para mejorar la cantidad y calidad de este frutal, es por ello, que en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el método adecuado que permita aislar protoplastos de papaya tomando como base el método descrito por Litz (1984 y 1986 a).

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el explante del cual se puedan obtener protoplastos fácilmente, ya sean cotiledones u hojas jóvenes de plantas de dos años de edad.

Establecer un pretratamiento que permita obtener protoplastos en mejor cantidad y buenas condiciones, con reguladores del crecimiento vegetal o hipotérmico con oscuridad.

Determinar el medio nutritivo en el que pueda prosperar el cultivo de los protoplastos, el Murashige-Skoog (MS) modificado o el K3

estudios en este campo, sobre todo en plantas de importancia económica que presentan enfermedades virales que sólo pueden ser contrarrestadas por la manipulación genética. Como es el caso de la papaya, planta cultivada de gran importancia económica, cuyo problema principal la enfermedad del VMAP. La aplicación del cultivo de protoplastos de papaya representa una herramienta muy valiosa para mejorar la cantidad y calidad de este frutal, es por ello, que en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el método adecuado que permita aislar protoplastos de papaya tomando como base el método descrito por Litz (1984 y 1986 a).

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el explante del cual se puedan obtener protoplastos fácilmente, ya sean cotiledones u hojas jóvenes de plantas de dos años de edad.

Establecer un pretratamiento que permita obtener protoplastos en mejor cantidad y buenas condiciones, con reguladores del crecimiento vegetal o hipotérmico con oscuridad.

Determinar el medio nutritivo en el que pueda prosperar el cultivo de los protoplastos, el Murashige-Skoog (MS) modificado o el K3

MÉTODO

Para establecer el método de producción y cultivo de protoplastos se tomó como base el procedimiento utilizado por Litz (1984, 1986a), (cuadro 1) el cual se modificó con base en los resultados que se fueron obteniendo.

Se probó cada una de las etapas con experimentos que permitieran encontrar la mejor condición, desde la obtención del explante hasta el cultivo exitoso. Así, el trabajo se dividió en tres fases:

- La primera se diseñó pensando en dar un pretratamiento al explante que indujera a la mayor producción de protoplastos con la utilización de reguladores del crecimiento vegetal.
- En la segunda fase se probó la adición al medio de cultivo de los compuestos requeridos, tales como la caseína y uno químicamente no definido como es el agua de coco.
- La tercera fase consistió en probar un pretratamiento hipotérmico y dos fórmulas de medios de cultivo, el K3 y uno que resultó de las modificaciones realizadas, al que se llamó MS-MC. A continuación se describe cada una de las fases.

PRIMERA FASE

PRETRATAMIENTO CON REGULADORES DEL CRECIMIENTO

Se diseñó un experimento que permitiera evaluar la acción de la BAP (en una concentración constante de 5mg/l) en combinación con cada una de las siguientes auxinas, ANA, AIA y 2-4,D, éstas en diferentes concentraciones: 0.01, 0.1, 1, 3 y 5 mg/l. Cada par

Cuadro 1. Método para cultivo de protoplastos de papaya. Tomado de Litz (1984, 1986a)

A) Obtención de las plántulas

Las semillas de papaya se germinan en una mezcla libre de suelo en una cámara de crecimiento con fotoperíodo de 16 h. 25°C, con riego y fertilización

b) Obtención del Explante y Pretratamiento

Los cotiledones se cosechan 4-8 días después de la germinación y se sumergen en una solución que contiene: NH_4NO_3 1mM y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1mM con BAP 22 μM (5mg/l) y ANA 5.4 μM (1mg/l), en la obscuridad, por 1.5-2.5 días.

c) Enjuague

Desinfectar los cotiledones durante 5 min en clorox 5% (v/v) con 1-2 gotas de Tween 20, quitar las venas medias y cortar la lámina en tiras de 1mm, lavarlas en una solución MS 25% con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3mM, Manitol 0.3 mM y Caseína 500 mg/l por 1 h bajo luz tenue

d) Tratamiento Enzimático

La solución de enjuague se reemplaza por una mezcla enzimática que consiste en MS 25% con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3mM, Caseína 500mg/l, Garramicina 200mg/l, Tetraciclina 22.5mM, Ampicilina 11mM, Manitol 0.3M, Macerocima 0.5% y Celulasa 1.5 % (ambas enzimas de Kinki Yakult.Mfg.Co.) El tejido del cotiledón se infiltra al vacío con la mezcla enzimática y se incuba en la obscuridad en un agitador rotatorio por 4 h a 40 rpm

e) Aislamiento de los protoplastos

Los protoplastos se aíslan pasando a través de un filtro con poro de 63 μM y se centrifugan a 70-80 g por 5 min, se remueve el sobrenadante con solución de enjuague Repetir 2-3 veces.

f) Siembra

Los protoplastos se resuspenden en medio de cultivo que contiene macrosales de MS 25%, excepto NH_4NO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3mM, caseína 500mg/l, manitol 0.3M, microsals MS, Fe-EDTA 25%, orgánicos de MS, Glutamina 2.7mM, agua de coco 10%, sacarosa 58.4mM y NH_4NO_3 5mM a densidades de $1-2 \times 10^5$ protoplastos/ml, plaqueados en capa delgada líquida en caja de Petri a densidades de $5 \times 10^4-1 \times 10^5$ protoplastos/ml.

de reguladores del crecimiento vegetal se preparó en una solución que contenía NH_4NO_3 1mM y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1mM como pretratamiento, con el fin de determinar la proporción de BAP: Auxina más adecuada. Los explantes utilizados inicialmente fueron cotiledones de plántulas de seis días de haber emergido, se pretrataron durante 48 h con las combinaciones de BAP/ANA, se enjuagaron como lo indica el método tomado como base y se llevaron al tratamiento enzimático para contar el número de protoplastos que se producían. Con este tipo de explante se realizaron tres experimentos

Posteriormente se utilizaron las láminas de hojas jóvenes extendidas totalmente, de plantas maduras (dos años de edad) de *C. papaya* tipo cera, cultivadas en invernadero (en la ciudad de México). Se eligió este tipo agromónico porque es el que se cultiva en mayor cantidad en el Estado de Veracruz, que es el que tiene la producción más alta en el país.

De las hojas, se tomaron porciones de 1g aproximadamente y se colocaron en 10 ml de la solución de pretratamiento en la que permanecieron por 48 h en obscuridad a 25°C. Se inició con la serie BAP/ANA, debido a que son los reguladores del crecimiento que se sugieren en el método tomado como base y posteriormente se probaron otras dos auxinas para determinar si se mejoraban los resultados. Para los pretratamientos con AIA y 2,4-D se realizaron seis repeticiones y para el pretratamiento con ANA se hicieron ocho repeticiones; la diferencia en el número de repeticiones se debió a la cantidad de material de que se disponía. En cada repetición se utilizó una hoja de una planta distinta

Una vez que transcurrieron las 48 h del pretratamiento, los explantes se colocaron en la solución de enjuague de Litz (1986a) durante 1h, agitando a 40 rpm y, dado que no se indicaba la temperatura, esta se fijó a 30°C; como se indica que la luz sea tenue, se colocaron bajo luz indirecta de lámparas fluorescentes

Posteriormente, los explantes para su tratamiento enzimático se colocaron en la solución con las sales de MS como Litz (1986a) describe. Las enzimas que empleó el autor eran mezclas enzimáticas, como la macerocima, así que se sustituyeron por aquellas que están involucradas específicamente en la degradación de los componentes de la lámina media y la pared celular, las enzimas que se utilizaron fueron Pectinasa (Sigma P4300) al 1.5% y Celulasa (Sigma C0901) al 2.5%. Los explantes se incubaron a 37 °C durante 4h, los tubos que los contenían se agitaron manualmente de manera suave para homogenizar y de ellos se tomó una alícuota de 0.1mm³ cada 30 min. El número de protoplastos que se producían, se determinó con ayuda del microscopio óptico y la cámara de Neubauer (Márquez-Guzmán, 1991).

Se realizó un análisis multivariado para mediciones repetidas (MANOVA), debido a que las muestras que se tomaron para contar los protoplastos, fueron para cada uno de los tiempos de un mismo tubo; esta condición hace que los datos subsecuentes tengan dependencia con el anterior. En este análisis, los factores bajo estudio fueron las 3 auxinas, sus 5 concentraciones y las mediciones repetidas representan las lecturas en los 9 diferentes tiempos. De acuerdo con el MANOVA a través del estadístico λ de Wilks se calculó la probabilidad de rechazo de la hipótesis nula (Milliken y Johnson, 1984).

SEGUNDA FASE

PREPARACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO ESTABLE

Una vez que los experimentos anteriores permitieron conocer la mejor combinación de reguladores del crecimiento vegetal, se procedió a realizar modificaciones al medio de cultivo MS modificado (Litz, 1986a) anexo 1. se desinfectaron los explantes lavándolos cuidadosamente con detergente, se enjuagaron con agua destilada esterilizada, se sumergieron en una solución de cloro comercial al 10% por 10 min, en seguida se realizó desde el pretratamiento hasta la siembra. A la solución enzimática, esta vez añadida con Hemicelulasa (Sigma H 2125) 1.5%; se esterilizó por filtración con un filtro estéril de 0.22 μ (Millipore), para no desnaturalizar a las enzimas y evitar que perdieran su actividad. Los explantes permanecieron en esta solución por 4h a 30°C bajo luz indirecta con lámparas fluorescentes.

Para lavar la solución enzimática, se filtró por una malla de 60 μ , se centrifugó por 5 min a 70 g, cambiando la solución enzimática por la de enjuague, se enjuagó en dos ocasiones y se tomó la parte superficial del sobrenadante para sembrar en una densidad de 1×10^5 protoplastos/ml en 5 ml de medio de cultivo.

Para el medio de cultivo, dado que Litz (1986 a) no especifica el tipo de caseína, las soluciones nutritivas que debían contenerla, se prepararon con caseína no hidrolizada y se realizaron diferentes ensayos modificando el pH en un intervalo de 5.8 a 6.5. En otro experimento se agregó peptona de caseína.

El agua de coco 10% v/v, que se obtuvo directamente del fruto y después se mantuvo en ebullición durante 20 min, se filtró y se guardó en congelación hasta su utilización. Al medio de cultivo se le ajustó el pH a 5.8 y se adicionó con 2% de agar para hacerlo más estable (Thomas y Davey, 1975). Todas las soluciones que no contenían enzimas se esterilizaron en autoclave.

TERCERA FASE

PRETRATAMIENTO HIPOTÉRMICO Y CULTIVO

Se utilizaron como explantes hojas jóvenes de planta tipo cera, de 2 años de edad, desarrolladas en campo, en el Rancho “La Bandera”, Actopan, Ver. de la Universidad Veracruzana y en Zanatepec, Oax. Las hojas se cortaron en el lugar al medio día, se guardaron en bolsas de plástico para su transportación y se colocaron en hielo para evitar que se desecaran; se mantuvieron en refrigeración por 4 días a 7°C en obscuridad, condiciones que sirvieron como pretratamiento hipotérmico, que se inició desde el momento del corte hasta la exposición al tratamiento enzimático.

Para combatir la contaminación se decidió ser más agresivo en el método de desinfección, por lo que los explantes se desinfectaron como lo sugieren Fisher y Hain (1995) en su trabajo con tabaco y sólo se modificaron los tiempos: los explantes se lavaron con agua destilada esterilizada, después se colocaron en una solución de etanol al 70% por 10 min, se enjuagaron y se desinfectaron con 0.6% de cloro activo (a partir de cloro comercial), se enjuagaron con agua destilada esterilizada y después se llevaron al tratamiento enzimático directamente. La solución enzimática se adicionó con penicilina 2.0 mM (sustituyendo a la

garamicina o gentamicina y a la tetraciclina sugeridas en el método de Litz, 1986 a), ampicilina 1.1mM y se procedió a los lavados con centrifugación.

Se tomó la porción superficial del sobrenadante con una pipeta Pasteur para hacer los lavados y posteriormente la siembra en el medio de cultivo; se realizaron cuatro repeticiones, para cada una de ellas se prepararon ocho tubos y de cada tubo se tomaron dos alícuotas para cuantificar los protoplastos que se habían conservado después de la centrifugación.

Se determinó el número de protoplastos viables en la suspensión utilizando la tinción con FDA (Sigma F-1397) de la siguiente manera (Langis y Steponkus, 1990):

De la solución madre de FDA ($7.2 \times 10^{-3} \text{M}$ en acetona), se tomaron 5 μl que se agregaron a 950 μl de suspensión de protoplastos. Se incubaron por 10 min a 20°C. La concentración final de acetona fue de 0.5% v/v.

Para determinar la proporción de protoplastos viables, se cuantificó en un microscopio de fluorescencia y se contó el número de éstos que presentaron color amarillo fluorescente de 100 células en total en 10 preparaciones distintas.

Para el cultivo se utilizó el medio MS (1962), al que se le agregó Hidrolizado Enzimático de Caseína (Sigma C-7290) 500 mg/l, se suprimió el agua de coco y se adicionó BAP 0.2 mg/l y ANA 0.2 mg/l por sugerencia de la Dra. Emma Morán (comunicación personal).

Dado que este medio resulta ser distinto del MS modificado por Litz (1986 a), a este medio se le llamó MS-MC.

También se probó el medio K3 (Nagy y Maliga, 1976. En: Fisher y Hain, 1995), debido a que es un medio de cultivo para protoplastos (anexo 1), el pH se ajustó a 5.8.

Se sembró en cajas de petri con una densidad de 32.7×10^4 protoplastos/ml. Para cada uno de los medios de cultivo utilizados se sembraron 5 cajas de petri selladas con papel parafilm. Se mantuvieron en una cámara de crecimiento con luz tenue a 25°C y se les dio seguimiento cuantificando la población cada semana durante 3 semanas; las cajas con cultivo se observaron al microscopio de luz invertido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRIMERA FASE

Al utilizar cotiledones como explante para la obtención de protoplastos, se observó que el tejido que forma la lámina presentaba un aspecto flácido después del pretratamiento y en ninguno de los casos se observaron protoplastos durante el tratamiento enzimático, por lo que se procedió a cambiar el cotiledón por hoja, dado que los tejidos de ésta son menos delicados.

Los resultados obtenidos con cada combinación de reguladores empleando explantes de hoja se muestran en la gráfica 1: en la combinación BAP/ANA (gráfica 1), la proporción 5:0 01mg/l fue en la que se produjo la menor cantidad de protoplastos con una diferencia no

Dado que este medio resulta ser distinto del MS modificado por Litz (1986 a), a este medio se le llamó MS-MC.

También se probó el medio K3 (Nagy y Maliga, 1976. En: Fisher y Hain, 1995), debido a que es un medio de cultivo para protoplastos (anexo 1), el pH se ajustó a 5.8.

Se sembró en cajas de petri con una densidad de 32.7×10^4 protoplastos/ml. Para cada uno de los medios de cultivo utilizados se sembraron 5 cajas de petri selladas con papel parafilm. Se mantuvieron en una cámara de crecimiento con luz tenue a 25°C y se les dio seguimiento cuantificando la población cada semana durante 3 semanas; las cajas con cultivo se observaron al microscopio de luz invertido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRIMERA FASE

Al utilizar cotiledones como explante para la obtención de protoplastos, se observó que el tejido que forma la lámina presentaba un aspecto flácido después del pretratamiento y en ninguno de los casos se observaron protoplastos durante el tratamiento enzimático, por lo que se procedió a cambiar el cotiledón por hoja, dado que los tejidos de ésta son menos delicados.

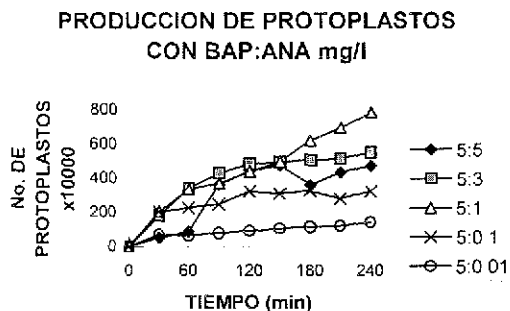
Los resultados obtenidos con cada combinación de reguladores empleando explantes de hoja se muestran en la gráfica 1: en la combinación BAP/ANA (gráfica 1), la proporción 5:0 01mg/l fue en la que se produjo la menor cantidad de protoplastos con una diferencia no

significativa ($p < 0.0001$) a partir de los 30 min y hasta el final del experimento. Se observó un comportamiento similar al anterior en la proporción 5:0.1mg/l, pero con mayor producción de protoplastos. Las concentraciones 5:1, 5:3 y 5:5 produjeron cantidades de protoplastos semejantes entre sí, de los 90 a 150 min. Sin embargo, a partir de los 180 min los explantes con pretratamiento de 5:1mg/l produjo mayor número de protoplastos hasta los 240 min, probablemente por eso es la proporción de la combinación BAP/ANA que Litz (1986 a) utilizó.

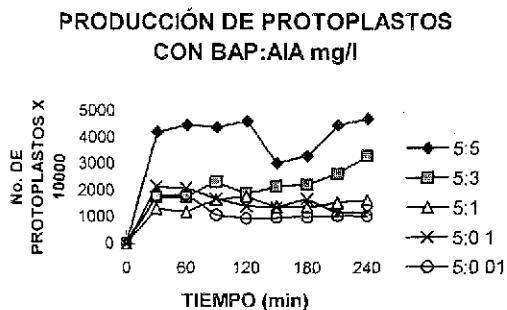
La combinación de BAP/AIA como fitoreguladores permitió la obtención de un número mucho mayor de protoplastos con una diferencia significativa con respecto a BAP/ANA ($p < 0.001$), ya que si se comparan las escalas de las gráficas 1 y 2, la escala de la segunda supera a la primera en un orden de magnitud. Todos los puntos de las curvas para las cinco concentraciones de AIA se encuentran por arriba del número de protoplastos que se produjeron a los 240 min de tratamiento enzimático, de aquellos que se pretrataron con BAP/ANA 5:1mg/l.

En la gráfica 2, se observa que la combinación BAP/AIA 5:5 mg/l, es la que produjo un número superior de protoplastos a partir de los 30 min de pretratamiento enzimático y aumentó hasta los 240 min, con una disminución a los 150 min que se recuperó posteriormente. La diferencia que presentó este lote comparado con los otros de la misma combinación resulta significativa ($p < 0.0001$), incluso la proporción 5:3, que es la más cercana.

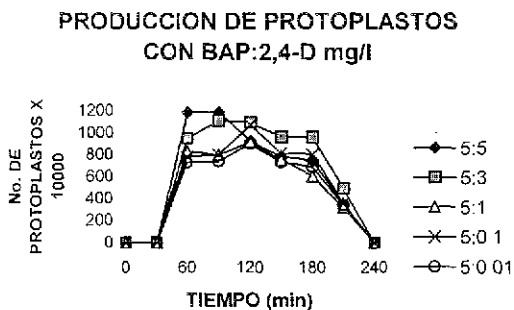
Gráfica 1: Producción de protoplastos durante el tratamiento enzimático, pretratados con BAP y ANA



Gráfica 2: Producción de protoplastos durante el tratamiento enzimático, pretratados con BAP y AIA



Gráfica 3: Producción de protoplastos durante el tratamiento enzimático, pretratados con BAP y 2,4-D



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

En la disminución que se observó a los 150 min para la proporción 5:5, la producción de protoplastos se acerca a la de la proporción 5:3 para el mismo tiempo únicamente en ese punto, las dos proporciones no presentan diferencia significativa ($p = 0.1288$).

Con respecto a la combinación BAP/2,4-D (gráfica 3), las curvas correspondientes a cada una de las diferentes concentraciones de 2,4-D aumentan de los 30 a los 60 min, las concentraciones de 5:5 y 5:3 superan significativamente ($p = 0.0067$) lo que se obtuvo a los 240 min con los mejores pretratamientos de BAP/ANA, pero el mayor número de protoplastos producido a los 60 min con la combinación BAP/2,4-D 5:5mg/l, es significativamente inferior ($p < 0.0001$) al producido por la combinación BAP/AIA 5:5.

Se puede observar que con las diferentes concentraciones de la combinación BAP/2,4-D, el número de protoplastos producido se mantuvo estable en promedio entre los 60 y 180 min y posteriormente disminuyó hasta 0 a los 240 min. Posiblemente esto haya sido como efecto del 2,4-D que en concentraciones bajas actúa como fitoregulador, pero en algunos casos es tóxico para las células vegetales y en concentraciones altas, se puede utilizar como herbicida (Salisbury y Ross, 1994); el efecto de regulador del crecimiento vegetal o el de herbicida depende de la especie (Smith, 1977). Resulta evidente que pudo ocurrir un efecto tóxico para los protoplastos de papaya, pues en todos los casos el resultado fue el mismo.

Los resultados arrojados por el MANOVA nos indican también que al comparar la producción de protoplastos es significativamente diferente ($p < 0.0001$) entre las auxinas utilizadas; lo mismo ocurrió entre las concentraciones consideradas de manera global, así

como con la interacción auxina*concentración es decir, que la producción de protoplastos debida a la concentración difiere entre auxinas.

La producción de protoplastos tomados de forma global, resulta significativamente diferente ($p < 0.0001$) tomando en cuenta la interacción que existe entre tiempo y auxinas, esto es que, la variación en la producción de protoplastos debida al tiempo difiere entre las auxinas, tanto como para las concentraciones

SEGUNDA FASE

Durante la preparación de los medios nutritivos se observó que al esterilizar en autoclave en el que contenía caseína, ésta se precipitaba.

De los cuatro experimentos que se realizaron se obtuvo lo siguiente:

1. El pH del medio se ajustó inicialmente a 5.8 y después de esterilizarse disminuyó a 5.0 y la caseína precipitó. Posiblemente debido a la acidificación del medio de cultivo, ya que la caseína es una fosfoproteína que en solución salina se precipita por ácidos y se disuelve por la acción del carbonato o el hidróxido de sodio (Adrian *et al*, 1981)
2. Con base en lo anterior se elevó el pH a 6.5 para evitar que la caseína se precipitara al esterilizarse en autoclave; no obstante, volvió a ocurrir la precipitación y el pH bajó a 5.7. Como también señalan Adrian y colaboradores (1981), es posible que la caseína también precipite por acción de la presión o que el punto isoelectrico de la

proteína varíe por las diferencias de temperatura; el punto isoeléctrico para la caseína es de 4.7 entre los 25° y los 40°C (White *et al.*,1983), más precisamente 4.6 a 20°C (Cabe hacer notar que el punto isoeléctrico de una proteína equivale al pH en el cual la proteína se encuentra eléctricamente neutra y que cuando se encuentra en solución pierde la atracción iónica que la mantiene suspendida en la solución y precipita).

3. Se preparó nuevamente medio de cultivo, esta vez sin caseína y resultó un medio con aspecto transparente. Se sembró siguiendo el método descrito; los explantes de hoja se desinfectaron con una solución de cloro comercial que tenía una concentración final de 6% de cloro activo por 10 min, se enjuagaron con agua destilada estéril después del pretratamiento y a la solución enzimática se le agregó Antifun y Antibac (Microlab) como fungicida y bactericida respectivamente, cada uno al 10%. A pesar de ello todos los explantes sembrados presentaron contaminación.

4. Se repitió la siembra, cuidando aún más la asepsia, además se adicionó Peptona de Caseína, que también precipitó. La peptona es un producto obtenido de una degradación enzimática que permite la solubilización de productos protéicos, se obtiene como resultado de la acción de la pepsina o de la pancreatina, se compone de péptidos solubles de grandes dimensiones, aunque es soluble en agua, debe estar a pH 7 (Adrian *et al.*, 1981) y el medio de cultivo debe estar en 5.8 de pH.

Aún con todos los cuidados volvió a presentarse contaminación con bacterias en todos los cultivos, después de dos días éstos se observaron con aspecto lechoso. Al microscopio óptico se observaron bacilos, que probablemente hayan sido del género *Pseudomonas* cuya presencia es constante en papaya según lo expresado por Litz (1981 a).

El precipitado obtenido durante las centrifugaciones al enjuagar la solución enzimática, se observó de color verde como lo mencionan Thomas y Davey (1975).

De este botón se tomó la muestra para la siembra pero dos días después no se encontraron los protoplastos y probablemente murieron por la contaminación que se presentó, ya que son susceptibles por la carencia de pared celular.

El agua de coco, provocó que el medio de cultivo se tornara turbio y dado que este componente es químicamente indefinido, además de que su composición puede variar dependiendo del estado fisiológico de cada fruto, el tiempo que haya transcurrido desde su cosecha y las condiciones de mantenimiento que haya tenido, se eliminó como componente del medio de cultivo.

TERCERA FASE

Con el fin de erradicar la contaminación de los cultivos y favorecer que prosperaran los protoplastos sembrados, se suprimió el pretratamiento con reguladores del crecimiento vegetal y se reemplazó por condiciones de oscuridad e hipotermia que se pensaba podían tener el mismo efecto. Al cortar la hoja de papaya durante la mañana, los estomas se encuentran abiertos por efecto de la temperatura y la luz; los estomas no se cierran porque

no hay forma de que reciban una señal hormonal que les indique que se interrumpió el suministro de agua. Esta señal en el caso de una hoja que no se ha desprendido de la planta es el ABA, que se produce en la raíz cuando se detecta deficiencia hídrica y se transporta a la hoja donde, por la pérdida de la turgencia, se cierran los estomas evitando así la transpiración.

El almacenamiento de las hojas a baja temperatura y en oscuridad favorecieron que se mantuviera la apertura estomática de la hoja desprendida y propiciaron que las células se plasmolizaran reduciendo su tamaño, con la consecuente separación de la membrana plasmática, que es lo que se persigue con un tratamiento con reguladores del crecimiento vegetal (Cocking, 1982).

Aislamiento de los Protoplastos

Como se mencionó en el método, a la solución enzimática se le adicionaron antibióticos de amplio espectro cuya acción protegió contra la contaminación, ya que es en esta solución en la que el tejido permaneció más tiempo durante el proceso de obtención de los protoplastos hasta la siembra.

Los resultados negativos obtenidos con la siembra del material de color verde obtenido en el precipitado de las centrifugaciones en la segunda fase llevó a realizar una revisión bibliográfica que reveló que este material cultivado no correspondía a los protoplastos, como se había supuesto. Schilde-Rentschlet (1975), Power (1977), Zhu y Negrutiu (1991) así como Fisher y Hain (1995), mencionan que los protoplastos flotan formando un anillo

alrededor del menisco que forma la solución en que se encuentran, por lo que en la tercera fase se tomó el líquido que se encuentra en la superficie de la solución de enjuague para sembrar posteriormente en el medio de cultivo.

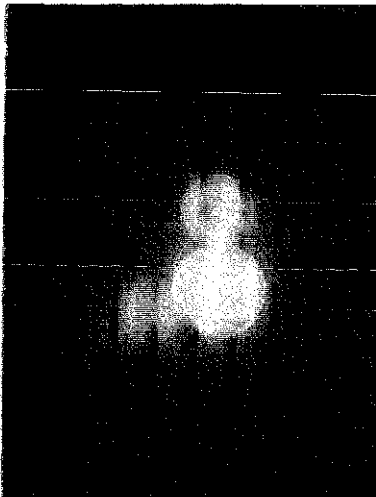
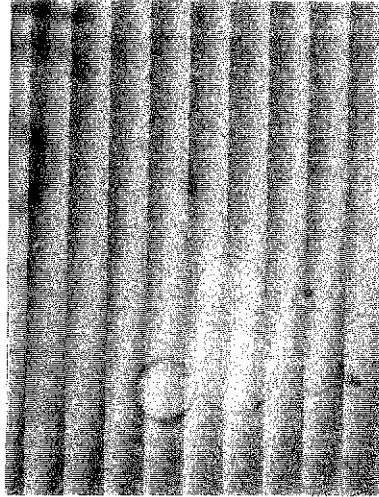
Así después de los lavados, se obtuvo $270.909 \times 10^4 \pm 86.2 \times 10^4$ (DS) protoplastos/ml en promedio. La variación que se observó, puede deberse a la diversidad inherente a los explantes y también al estado de conservación que presente el explante, ya que cuando el material biológico utilizado se encontraba deteriorado, el número de protoplastos obtenidos después de la centrifugación fue menor que con explantes en buenas condiciones.

La tinción con FDA para determinar viabilidad dio como resultado 75.3 ± 2.96 % de protoplastos viables (Fig. 3) Se pudo observar que algunas células se encontraban separadas del tejido, pero fluorescían en color rojo, indicando que aun contenían pared celular o retenían al menos una parte. Estas no se contaron como protoplastos, son células que se separaron completamente del tejido al que pertenecían pero no se digirió completamente la pared celular y por su tamaño, pudieron pasar por el filtro.

Se considera que la presencia de estas células no interfiere con los resultados y es difícil eliminarlas pues no hay forma de separarlas de los protoplastos. Más aún, si el objetivo fuera obtener líneas celulares, estas células podrían ser utilizadas y no tendrían que pasar por la fase de reconstrucción de la pared celular, y si el caso fuera fusionar protoplastos,.

Figura 3

a) protoplastos en campo claro



b) protoplastos con fluorescencia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

este tipo de células no intervendrían en ninguna fusión ya que la pared celular se los impediría

Cultivo de los protoplastos

Cuando se probó el medio K3, en dos siembras que se realizaron no pudo evitarse que el medio de cultivo se evaporara porque el parafilm con que se selló, se perforó por efecto de la temperatura. Para la tercera siembra se sellaron con doble capa de parafilm y así se pudo controlar mejor este factor. En las cajas que contuvieron el medio MS-MC (anexo 1), se evaporó la solución en tres cajas hacia la tercera semana, sin embargo con ayuda de un microscopio invertido se observaron los protoplastos en las dos cajas restantes y resultó que el medio MS-MC, es mejor que el medio K3 (cuadro 2).

Cuadro 2. Número de células observadas en cada caja de petri después de la siembra en cada uno de los medios de cultivo

SEMANA	CAJA	MS-MC	K3
1	1	204	36
	2	267	18
	3	445	8
	4		4
	5		4
2	1	223	40
	2	257	23
	3	285	3
	4		0
3	1	251	0
	2	418	

Probablemente en las cajas de cultivo en las que se observaron protoplastos éstos ya eran células individuales con pared celular reconstruida, porque la síntesis de pared se inicia nuevamente de forma inmediata una vez que se elimina la celulosa, quedando reconstruida pocas horas después. En algunas cajas se observaron también grupos celulares y esto puede

deberse a que las células se reagrupan cuando no se encuentran en agitación o bien a que se haya iniciado la proliferación celular (Thomas y Davey, 1975). Sería recomendable realizar tinciones específicas para cromosomas, para confirmar la proliferación celular y poder discernir entre si ocurrió agregación o proliferación celular en los cultivos observados.

Haciendo un análisis general, a la luz de los antecedentes de este trabajo, el cultivo de tejidos con explantes de papaya se ha utilizado históricamente como un método de propagación clonal de las plantas que pudieran presentar resistencia natural al VMAP y se lograron anteriormente avances significativos al cultivar diferentes explantes para papaya de forma exitosa, aunque al principio existían los inconvenientes de que se desconocía el sexo y otras características en las plántulas y existía la probabilidad de poliploidías, aneuploidías o aberraciones cromosómicas, debidas a la naturaleza heterogénea de los callos de papaya, lo cual podría limitar el valor hortícola de las plantas obtenidas (Litz y Conover, 1978).

Es por eso que los trabajos se encaminaron a establecer un método que permitiera separar líneas celulares para su posterior regeneración a plantas o bien, como en este caso, que la obtención de protoplastos permita realizar cruzas interespecíficas a futuro, que puedan conferir resistencia al VMAP en las plantas que se regeneren. Al respecto sólo se tiene el trabajo de Chen y Chen (1992), quienes parten de realizar primero la cruce de entre *C. papaya* x *C. cauliflora* y después producen protoplastos de los cuales regeneran plantas

Retomando estos trabajos y con el objetivo de establecer un método para la obtención de protoplastos de papaya, se decidió comenzar con el método descrito por Litz (1984, 1986a), debido a que el explante que él utiliza es fácil de obtener, los reactivos para preparar las soluciones que indica se pueden adquirir fácilmente y se contaba con el equipo indispensable para realizarlo.

El explante que se utilizó inicialmente fueron los cotiledones, pero son muy delicados y se maltrataban con la manipulación y durante el pretratamiento hormonal, pudiendo ser la causa de que se contaminaran. Por ello se decidió tomar como explante un tejido parecido pero más resistente, hojas jóvenes de plantas maduras crecidas en campo, lo que sugiere buenas condiciones de luz, riego y nutrición pero con el inconveniente de contener mayor cantidad de microorganismos. Hu y colaboradores (1999) mencionan que, cuando se utiliza hoja para la obtención de protoplastos, se puede obtener un gran número de ellos con pequeñas cantidades de material vegetal. Las muestras de hoja son un material no destructivo y permiten una investigación subsecuente de las generaciones descendientes de las plantas donadoras, en comparación con el empleo de embriones como fuente de protoplastos en la cual el donador se destruye, aparte de que los embriones son una fuente con variabilidad genética debido a que los gametos de los cuales provienen han experimentado un entrecruzamiento característico de la meiosis.

Para obtener los protoplastos se requiere en muchos casos que el tejido tenga un pretratamiento para inducir cambios en la pared celular y permitir que las células se plasmolisen. En las células plasmolisadas el protoplasto se separa de la pared celular y

disminuye su tamaño, confiriendo la ventaja de que al irse digiriendo la pared celular y abrirse huecos en la misma durante el tratamiento enzimático (Vasil y Vasil,1980), el protoplasto se desprenda del tejido; si se encuentra en el medio osmóticamente adecuado, el protoplasto no sufrirá lisis debido a la turgencia.

Así ocurre una pérdida de agua (Santos- Díaz y Ochoa-Alejo,1990) y las células se plasmolisan permitiendo que se libere el protoplasto durante la degradación enzimática de la pared celular, previa interrupción de las comunicaciones intercelulares. Los plasmodesmos son los pasadizos que conectan la pared celular entre células, proveyendo un tránsito de comunicación simplástica y están delimitados por la membrana plasmática externamente y en el interior por el retículo endoplásmico modificado. Se piensa que el espacio entre las membranas es el pasaje principal para el transporte célula-célula. Ciertas condiciones pueden reducir la conectividad tales como: la plasmólisis, el flujo de calcio, diferencias de presión o el trifosfato de inositol (Crawford y Zambryski, 2001) de los cuales los dos primeros son inductores que se utilizaron en este trabajo, durante los pretratamientos con reguladores del crecimiento vegetal.

El método que se tomó como guía, sugiere la utilización de ANA y BAP como fitoreguladores que pueden inducir la formación de los protoplastos. La relación entre auxinas y citocininas es muy importante en cultivo de tejidos ya que de ello depende que se promueva la dediferenciación y la individualización de las células para el caso de los protoplastos (Thomas y Davey, 1975; Smith, 1977). En el pretratamiento hormonal para la formación de protoplastos, las auxinas y citocininas son necesarias, ya que: a) las auxinas

actúan principalmente incrementando la permeabilidad de la membrana al agua y solutos por la activación de la bomba de H^+ que promueve la formación de enzimas relacionadas con la despolimerización de los polisacáridos de la pared celular como la celulasa, enzima del grupo de las glicosidasas que funcionan a pH bajo (Smith, 1977; Moore, 1979).

b) La presencia continua de citocininas en el medio de cultivo es necesaria durante la interfase para producir el inicio de la división celular. Las citocininas no se requieren durante la mitosis misma, sugiriendo que los eventos dependientes de citocininas suceden completamente antes de que ocurra la mitosis (Azaola, 1979).

Lo que se mencionó anteriormente es la causa de la utilización como pretratamiento, de estos reguladores del crecimiento vegetal, ya que las auxinas preparan a la pared celular para su despolimerización y las citocininas predisponen a la célula para su proliferación posterior.

Con base en ello se decidió variar la concentración de auxinas, esperando que una de las combinaciones utilizadas sería la que favoreciera la despolimerización de la trama de celulosa que forma la pared celular. Dependiendo del estadio de desarrollo, tejido y planta, la respuesta a estos dos tipos de hormonas pueden ser sinérgica, antagonista o aditiva. Un efecto sinérgico de auxinas y citocininas se puede observar en el control de la división celular de células indiferenciadas. En protoplastos de hoja de tabaco, la expresión del gen β -glucuronidasa (GUS) bajo el control de un promotor *cdc2* de *Arabidopsis* reveló que el gen correspondiente se puede inducir por auxinas y extender su expresión un poco más por

citocininas, por lo que un tratamiento con ambas hormonas deja niveles mayores de expresión que con una sola de las hormonas (Coenen y Lomas, 1997).

Como se mencionó anteriormente, la mejor combinación fue la que contuvo 5mg/l de BAP con 5mg/l de AIA, porque el número de protoplastos durante las cuatro horas de observación fue superior a los otros tratamientos, incluyendo el que sugiere Litz (1984, 1986 a).

Para evitar el exceso en la manipulación y la contaminación se eliminó el pretatamineto hormonal sustituyéndolo por un pretatamiento con hipotermia y obscuridad. Este se llevó a cabo desde el momento del corte de la hoja hasta la exposición al tratamiento enzimático.

Como se mencionó, bajo las condiciones en que se cortó la hoja se pudo haber promovido que los estomas permanecieran abiertos (al menos por un tiempo), debido a que ya no se recibe el ABA producido en la raíz cuando hay déficit hídrico, éste regulador del crecimiento vegetal actúa como señal para el cierre estomático. Sumado a lo anterior, la pérdida de comunicación entre células se puede acrecentar ya que en la hoja, los estomas presentan plasmodesmos cerrados permanentemente, mientras que las demás células los pueden tener dilatados en diferente grado. De la misma forma, el tránsito de proteínas por los plasmodesmos, se ve afectado por la edad de la planta y por su estado fisiológico, siendo mayor en hojas jóvenes y en plantas crecidas en suelo que en las cultivadas *in vitro*, al parecer esto ocurre por el control que ejercen la temperatura, el fotoperíodo y la cantidad de luz, así como el estado de nutrición (Crawford y Zambrysky, 2001)

Después de estimar el número de protoplastos por ml que se obtuvieron después de las centrifugaciones, se pudo observar que el número es variable dependiendo del estado de conservación que guarde el material, de este modo fue posible observar que una hoja que tiene coloración amarilla, produjo menos protoplastos que las hojas verdes en buen estado, y el dato obtenido de la hoja amarilla se descartó cuando se efectuó el cálculo del promedio de protoplastos producidos, porque era muy diferente de lo obtenido con las hojas verdes.

Al estimar la viabilidad de los protoplastos que se obtuvieron que fue de 75.27%, se consideró como aceptable aunque Litz (1986 a) no reporta la viabilidad.

El medio MS-MC y el K3 que utilizan Fisher y Hain (1995) para protoplastos de hoja de tabaco se componen de los mismos macro y microelementos (anexo 1), aunque en diferentes cantidades y sales que se aportan, siendo que el medio K3 lleva distintas sales, que aportan macroelementos, pero en concentración se equilibran con aquéllas que contiene el MS-MC. El medio K3 es el que requiere en menor concentración algunos de los micronutrientes como el boro, el manganeso y el zinc. Excepto la glicina que lleva el MS-MC, las demás moléculas orgánicas son iguales y sólo la cantidad del ácido nicotínico es mayor para el medio K3.

En cuanto a azúcares, el medio MS lleva 58.4 mM de sacarosa, mientras el K3 300 mM, lo que hace una diferencia en la relación osmótica con el protoplasto, pero que se compensa con el manitol que se agrega al MS. El manitol es el más estable como osmoregulador, pues es una molécula que difícilmente participa en el metabolismo para obtención de

energía, lo que no ocurre con la sacarosa que es un producto que la célula puede ingresar fácilmente a glucólisis y posteriormente a ciclo de Krebs para obtención de ATP. Así se puede pensar que la cantidad mayor que se utilizó en el medio K3 compensaría la sacarosa que las células pueden utilizar durante su metabolismo con aquella que va a osmoregular el medio de cultivo, mientras que la sacarosa que se agrega en el medio MS es la que participará en el metabolismo; el medio K3 se complementó además con Xilosa en pequeña cantidad de acuerdo con Fisher y Hain (1995).

El medio de cultivo MS-MC se adicionó con glutamina y caseína. La glutamina es un aminoácido esencial que requieren las células vegetales para llevar a cabo el proceso de transaminación y que junto con el ácido ceto-glutárico permiten la incorporación del nitrógeno en forma de radical amino para formar ácido glutámico; este hecho es importante para la transportación del nitrógeno y su almacenamiento, así como para la construcción de proteínas principalmente (Salisbury y Ross, 1994; Lehninger, 1994) y en el metabolismo de los aminoácidos. Estos hechos hacen de la glutamina un aminoácido que no puede faltar en la dieta de la célula para poder iniciar su crecimiento y la proliferación, ya que para ello se necesitan tanto proteínas como enzimas que favorezcan el metabolismo.

En cuanto a la caseína, es una fosfo-glicoproteína que contiene 94 % de proteína, 3% de calcio, 2.2% de fósforo, 0.5% de ácido cítrico y 0.1 de magnesio. La proteína consiste de 209 residuos aminoácidos, de los cuales 5 son de fosfoserina y aunque carece de cisteína, constituye una excelente fuente de aminoácidos (White *et al.*, 1983); esto la hace un compuesto importante para el medio de cultivo, ya que las células requieren de los

diferentes aminoácidos para la construcción de las proteínas necesarias para su proliferación y la forma química de agregarla es como hidrilizado enzimático para evitar problemas de precipitación.

Las fórmulas de los medios de cultivo Litz (1984, 1986 a) y K3 difieren también con respecto a los reguladores del crecimiento vegetal, en el primero no se adicionan mientras que en el K3 sí. Sin embargo, se agregaron a los dos medios de acuerdo con Fisher y Hain (1995), considerando los fitoreguladores como el ANA y el BAP indispensables para preparar a la célula para su reproducción. Litz (1984,1986 a) menciona que su cultivo de protoplastos no proliferó y lo que nosotros observamos es que con el medio de cultivo adicionado se pudieron conservar los protoplastos por lo menos hasta la tercer semana después de la siembra; también se pudo observar que había agrupaciones celulares que probablemente fueron producto de la proliferación celular. En el medio de cultivo K3, el número de protoplastos fue disminuyendo hasta terminar en cero a la tercer semana después de la siembra.

Los resultados obtenidos de la siembra en los medios de cultivo no se analizaron estadísticamente debido a que la diferencia fue muy evidente; lo anterior nos lleva a pensar que los compuestos que contiene el medio MS-MC, más los fitoreguladores ANA y BAP agregados, favorecieron el mantenimiento del cultivo y su proliferación. Probablemente el cultivo en este medio con ANA y BAP puedan producir callo o bien inducir a la embriogénesis

Con base en los resultados obtenidos se propone como método para obtener y cultivar protoplastos de papaya el siguiente:

- Tomar como explante hojas jóvenes de plantas crecidas en campo, cortarlas a durante la mañana, guardarlas en bolsas de polietileno con cierre hermético y mantenerlas a 4°C durante dos días en oscuridad.

- Desinfectar lavando con Tween 20 (SIGMA) durante 10 min, enjuagar con agua destilada esterilizada, pasar el explante a una solución de cloro activo de 0.6% durante 10 min, enjuagar con agua destilada esterilizada y pasar a etanol al 70% durante 5 min, enjuagar con agua destilada esterilizada; todo con agitación suave.

- De la hoja, cortar las venas principales para eliminarlas y la lámina cortarla en tiras de 1mm de ancho, colocar 1g de explante por cada 10 ml de solución enzimática que contenga sales de MS al 25%, con CaCl_2 3mM, adicionada con 2.5 % de celulasa, 1.5% de hemicelulasa y 1.5 % de pectinasa, así como 2 mM de penicilina y 1.1 mM de ampicilina, que se hace pasar por un filtro millipore estéril. Incubar en esta solución por 4 h a 30°C con luz tenue.

- Filtrar para desechar los residuos de hoja, pasando la solución por una malla de plástico de 60 μ de abertura de poro

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- El material se centrifuga a 70 g durante 5 min, se toma del sobrenadante la porción que forma el menisco y diluir en la solución de enjuague que contenga: sales MS al 25%, CaCl_2 3 mM, 0.3 M de manitol, caseína 500 mg/l. Volver a centrifugar de la misma forma y repetir la operación para lavar la solución enzimática.

- Estimar el número de protoplastos con ayuda de una cámara de Neubauer y sembrar con una densidad de 32.7×10^4 protoplastos en promedio, por ml en el medio de cultivo de MS-MC, que contenga: Macronutrientes MS al 25% con NH_4NO_3 5mM y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3mM, hidrolizado de caseína 500mg/l, manitol 0.3M, Micronutrientes MS al 25%, FeDETA MS, orgánicos MS, Glutamina 2.7 mM, sacarosa al 2%, BAP 0.2 mg/l y ANA 0.2 mg/l.

Se espera que este método de cultivo para protoplastos sirva como base para estudios posteriores que permitan la hibridación somática de células de *C. papaya* con células de otra especie relacionada como *C. cauliflora* que es resistente natural al virus de la mancha anular o bien que permitan el mejoramiento genético de la especie, lo cual también puede ser utilizando transgenia, es decir, introduciendo genes específicos. Además el estudio puede extenderse hasta la regeneración de plantas y combinando las técnicas, pueden llegar a obtenerse plantas mejoradas

BENEFICIOS DEL METODO:

El método establecido permite utilizar un explante más resistente que el que se plantea en estudios anteriores (Litz, 1986), no destruye a la planta y así se tiene la facilidad de poder retomar el explante del individuo de origen, lo que mantiene la homogeneidad genética.

- El material se centrifuga a 70 g durante 5 min, se toma del sobrenadante la porción que forma el menisco y diluir en la solución de enjuague que contenga: sales MS al 25%, CaCl_2 3 mM, 0.3 M de manitol, caseína 500 mg/l. Volver a centrifugar de la misma forma y repetir la operación para lavar la solución enzimática.

- Estimar el número de protoplastos con ayuda de una cámara de Neubauer y sembrar con una densidad de 32.7×10^4 protoplastos en promedio, por ml en el medio de cultivo de MS-MC, que contenga: Macronutrientes MS al 25% con NH_4NO_3 5mM y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3mM, hidrolizado de caseína 500mg/l, manitol 0.3M, Micronutrientes MS al 25%, FeDETA MS, orgánicos MS, Glutamina 2.7 mM, sacarosa al 2%, BAP 0.2 mg/l y ANA 0.2 mg/l.

Se espera que este método de cultivo para protoplastos sirva como base para estudios posteriores que permitan la hibridación somática de células de *C. papaya* con células de otra especie relacionada como *C. cauliflora* que es resistente natural al virus de la mancha anular o bien que permitan el mejoramiento genético de la especie, lo cual también puede ser utilizando transgenia, es decir, introduciendo genes específicos. Además el estudio puede extenderse hasta la regeneración de plantas y combinando las técnicas, pueden llegar a obtenerse plantas mejoradas

BENEFICIOS DEL METODO:

El método establecido permite utilizar un explante más resistente que el que se plantea en estudios anteriores (Litz, 1986), no destruye a la planta y así se tiene la facilidad de poder retomar el explante del individuo de origen, lo que mantiene la homogeneidad genética.

Se evita un pretratamiento hormonal, así como una mayor manipulación del explante.

Se disminuye el costo y tiempo en la obtención de protoplastos.

Se alcanza la desinfección suficiente del explante para evitar contaminación.

El medio de cultivo que se obtuvo permite que los protoplastos se conserven exitosamente por al menos 3 semanas.

CONCLUSIONES

Los objetivos planteados para este trabajo pudieron cumplirse satisfactoriamente, de tal forma que se estableció un método de cultivo que permitió obtener y mantener viables protoplastos de papaya.

Se determinó que las hojas jóvenes de plantas desarrolladas en campo, son un explante del cual se pueden obtener protoplastos fácilmente.

Se estableció que las condiciones de hipotermia y obscuridad pueden ser utilizadas como pretratamiento del explante, para producir protoplastos de hoja de papaya.

El medio MS-MC, resultó un medio en el que pueden prosperar los protoplastos por al menos tres semanas.

Se evita un pretratamiento hormonal, así como una mayor manipulación del explante.

Se disminuye el costo y tiempo en la obtención de protoplastos.

Se alcanza la desinfección suficiente del explante para evitar contaminación.

El medio de cultivo que se obtuvo permite que los protoplastos se conserven exitosamente por al menos 3 semanas.

CONCLUSIONES

Los objetivos planteados para este trabajo pudieron cumplirse satisfactoriamente, de tal forma que se estableció un método de cultivo que permitió obtener y mantener viables protoplastos de papaya.

Se determinó que las hojas jóvenes de plantas desarrolladas en campo, son un explante del cual se pueden obtener protoplastos fácilmente.

Se estableció que las condiciones de hipotermia y obscuridad pueden ser utilizadas como pretratamiento del explante, para producir protoplastos de hoja de papaya.

El medio MS-MC, resultó un medio en el que pueden prosperar los protoplastos por al menos tres semanas.

Anexo 1. Composición de los diferentes medios utilizados

SALES	MS modificado por Litz, 1986 a	K3	MS-MC
MACRONUTRIMENTOS	g/l	g/l	g/l
NH ₄ NO ₃	0.40	0.25	0.40
KNO ₃	0.475	2.5	0.475
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.5751	0.9	0.5751
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.0925	0.25	0.0925
KH ₂ PO ₄	0.0425	—	0.0425
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	0.134	—
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	—	0.15	—
CaHPO ₄ · 2H ₂ O	—	0.05	—

MICRONUTRIMENTOS	mg/l	mg/l	mg/l
H ₃ BO ₃	6.2	3.0	6.2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	10.0	22.3
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8.6	2.0	8.6
KI	0.83	0.75	0.83
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.025	0.025
FIERRO	mg/l	mg/l	mg/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
NaEDTA	37.3	37.2	37.3

SALES	MS modificado por Litz, 1986 a	K3	MS-MC
ORGÁNICOS	mg/l	mg/l	mg/l
Glicina	2.0	—	2.0
Mio-inositol	100	100	100
Ácido nicotínico	0.5	1.0	0.5
Piridoxina HCl	0.5	1.0	0.5
Tiamina HCl	1.0	10.0	1.0

AZÚCARES	mM	MM	mM
Sacarosa	58.4	300	58.4
Manitol	300	—	300
Xilosa	—	1.67	—
Glucosa	—	439.9	—

REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL	mg/l	mg/l	mg/l
ANA	—	1.0	0.2
BAP	—	1.0	0.2

OTROS			
Glutamina	2.7mM	—	2.7mM
Caseína	500mg/l	—	500mg/l
Agua de coco	10% v/v	—	—

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Abdel-Basset R.1998 Calcium/Calmodulin regulated cell wall regeneration in *Zea mays* mesophyll protoplasts. Z. Naturforsch 53c:33-38.
2. Adrian J; G Legrand; R Fragne 1981. Dictionnaire de Biochimie alimentaire et de nutrition Technique et documentation. Paris. 43.
- 3 Alamgir ANM; MA Rahman. 1991. Effect of gamma radiation on seed germination, growth and sex expression of *Carica papaya* L. Chittagong University Studies, Part II: Science, 15(1): 113-116.
- 4 ASERCA. 1999. Producción mundial de papaya. Claridades agropecuarias. Marzo 27-34 México.
5. Azaola, EAA.1979 Papel de los reguladores del crecimiento vegetal en el cultivo de tejidos *in vitro* Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México. 78-88
6. 0000Badillo, VM 1993. Caricaceae, segundo esquema Alcance 43. Maracay. 1-12 y 36-44
- 7 Bajaj YPS. 1974. Isolation and culture studies on pollen tetrad and pollen mother-cell protoplasts Plant Science Letters 3:93-99
- 8 Barthou H; C Biere; C Caumont; M Petitprez; J Kallerhoff; C Borin; A Souvré; G Alibert. 1997 Effect of atmospheric pressure on sunflower (*Helianthus annuus* L.) protoplast division. Plant Cell Reports 16:310-314
- 00
- 9 Beltrán BM; R Roca; BR Mandujano; MF Roca; SF Vázquez; PE García; CF Vergara; RF Ramírez; GJ Mendoza; HM Martínez; MJ Santamaría; A Gil; D Meza 1999. La papaya un mercado en expansión Claridades agropecuarias Marzo 3-24. México.

10. Bhojwani SS; EC Cocking. 1972 Isolation of protoplasts from pollen tetrads Nature New Biology 239(6):29-30
11. Bizeau C; E Bizeau. 1970. Étude de la preparation de protoplasts chez deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen Ann. Technol. Agric 19(2):131-140.
12. Bregante M; F Gambale; F LoSchiavo 1996 Ionic transport in the plasma membrane of carrot protoplasts from embryogenic cell-suspension cultures FEBS Letters 380:97-102
13. Butchner DN; DS Ingram. 1976 Plant tissue culture Studies in Biology no. 65. Edward Arnold (Publishers) Ltd. Londres. 47-53p
14. Caumont C; M Petitprez; S Woynaroski; H Barthou, C Briere; J Kallerhoff; C Botin; A Souvré; G Alibert. 1997. Agarose embedding affects cell wall regeneration and microtubule organization in sunflower hypocotyls protoplasts. Physiologia Plantarum 99:129-134.
15. Chen MH; CC Chen; DN Wang; FC Chen. 1991 Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* X *Carica cauliflora* cultured *in vitro*. Can J. Bot 69: 1913-1918
16. Chen MH; CC Chen 1992 Plant regeneration from *Carica* Protoplasts. Plant Cell Reports 11:404-407.
17. Cocking EC. 1982. Use of protoplasts for plant genetic manipulations. Proc. 5th Intl.Cong. Plant Tissue & Cell Culture. Plant Tissue Culture.
18. Coenen C, TL Lomas. 1997. Auxin-Cytocinin interactions in higher plants: old problems and new tools. Trends in Plant Science 2(9): 351-355

19. Crawford M, PC Zambryski. 2001. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiology* 125:1802-1812.

20. Del Amo S. 1980. Plantas medicinales del estado de Veracruz. INIREB. México 47

21. Díaz-Luna C; JA Lomeli-Senci6n. 1997. Faner6gamas, familia Caricaceae. *Flora de M6xico* 7(1): 7-8.

22. Fisher R; R Hain. 1995. Tobacco protoplasts transformation and use functional analysis of newly isolated genes and gene constructs. *Methods in Cell Biology* V.50, Cap 29: 401-410

23. Fitch MMM. 1993. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32:205-212.

24. Fitch MMM. 1995. Somatic embryogenesis in papaya. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 30 Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I* (ed. By Y P S. Bajaj). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 260-279.

25. Fitch MMM; RM Manshardt. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell Reports* 9:320-324

26. Foltran DE; P de Souza; JC Sabino; T Igue; RCF Vilela. 1993. Estimativas de par6metros gen6ticos e fenot6picos em mam6o. *Bragantia, Campinas* 52: 7-15

27. Guy M; L Reinhold. 1978. Membrane transport of sugar and amino acids in isolated protoplasts. *Plant Physiol* 61:593-596

28. Hu Q; SB Andersen; LN Hansen 1999 Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 189-196.
29. Jouve N; CI. Mc Intyre; JP Gustafson 1991. Chromosome preparations from protoplasts: in situ hybridization banding pattern of a dispersed DNA sequence in rye (*Secale cereale* L.) *Genome* 34: 524-527.
30. Keller A von; HGL Coster; H Schnabl 1997. Influence of electrical treatment and cell fusion on cell proliferation capacity of sunflower protoplasts in very low density culture *Plant Science* 126:79-86
31. Langis R; PL Steponkus. 1990 Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification *Plant Physiol.* 92: 666-671.
32. Lehninger AL. 1994. Bioquímica. Omega. Barcelona. 1117p
33. León J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Costa Rica 375-380.
34. Ling HQ; H Binding 1997. Transformation in protoplast cultures of *Linum usitatissimum* and *L. suffuticosum* mediated with PEG and with *Agrobacterium tumefaciens* *J of Plant Physiol.* 151:479-488
35. Litz, RE. 1984. Papaya. En: Evans DA; WR Sharp; PV Ammirato; Y Yamada Ed.. *Hand Book of Plant Cell Culture Vol.2*. Macmillan Publishing Co. New York 349-368.
36. Litz, RE 1986a Papaya. (*Carica papaya* L.). En: YSP Bajaj. *Biotechnology in agriculture and forestry. Vol I: Trees* Springer-Verlag. Berlin 220-232.

- 37 Litz RE. 1986b Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension cultures. J Amer Soc Hort Sci. 111(6):969-972.
38. Litz RE; RA Conover. 1978. In vitro propagation of papaya Hort Science 13 (3): 241-242.
39. Litz RE; RA Conover, 1981a. Effect of sex type, season, and other factors on *in vitro* establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. J Amer Soc Hort. Sci. 106(6):792-794.
- 40 Litz RE; RA Conover. 1981b. In vitro polyembryony in *Carica papaya* L. Ovules Z. Pflanzenphysiol 104:285-288.
41. Litz RE; RA Conover, 1983. High-frequency somatic embryogenesis from *Carica papaya* suspension cultures. Ann. Bot. 51, 683-686.
- 42 Oloyola VVM 1990. Cultivo y fusión de protoplastos. En: Rosell CH; AVM Villalobos. Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO.Roma 61-65.
43. Ludlow-Wiechers B. 1981. Catálogo palinológico para la flora de Veracruz No. 4 Familia Caricaceae. Biótica 6(1):33-42
- 44 Márquez-Guzmán J. 1991. Biología celular. Manual de prácticas Facultad de Ciencias, UNAM México 33-39.
- 45 Martínez-Cárdenas ML, A Carmona- Alcántara, MA Aguilar-Santamaría. 1992. Efecto de los rayos gamma en la germinación y desarrollo vegetativo de *Carica papaya* tipo cera Productos Naturales, Vol I, Perspectivas Biotecnológicas Universidad Autónoma Metropolitana, México 171-179

46. Mettler IJ; RT Leonard. 1979 a Ion transport in isolated protoplasts from tobacco suspension cells. *Plant Physiol* 63:183-190.
47. Mettler IJ; RT Leonard. 1979 b Ion transport in isolated protoplasts from tobacco suspension cells. *Plant Physiol* 63:191-194.
48. Milliken GA; DE Johnson. 1984. *Análisis of messy data Vol. 1: Designed experiments*. Van Nostrand Reinhold. New York. 424-432
49. Miranda M; T Motomura; F Ikeda; T Ohgawara; W Saito; T Endo; M Omura; I Moriguchi. 1997. Somatic hybrids obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2x) and *Fortunella hindsii* (4x) protoplasts. *Plant Cell Reports* 16:401-405.
50. Moore, I. 1979. *Biochemistry and physiology of plant hormones*. Springer-Verlag. New York. 32-85, 147-176p.
51. Mora-Aguilera G; D Nieto-Angel; D Téliz; CL Campbell. 1993. Development of a prediction model for papaya ringspot in Veracruz, Mexico. *Plant Disease* 1205-1211.
52. Mora-Aguilera G; D Nieto-Angel; CL Cambell; D Téliz; E García. 1996. Multivariate comparison of papaya ringspot epidemics. *Phytopathology* 86(1)70-78.
53. Muñoz de Chávez M. 1996. *Tablas de valor de los alimentos de mayor consumo en Latinoamérica*. Instituto Nacional de Nutrición. Salvador Zubirán. México. 136p.
54. Murashige I; F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473-497

55. Nieto AD. 1990 Epidemiología del virus mancha anular del papayo bajo diferentes fechas de siembra, densidades de plantación y localidades de Veracruz. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 68
56. Ochse JJ; MJ Soulé Jr; MJ Dijkman; C Wehburg. 1976. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales, Vol. 1. Limusa México. 652-660
57. Ohyama K; LE Pelcher; D Horn. 1977. A rapid, simple method for nuclei isolation from plant protoplasts. *Plant Physiol* 60:179-181.
58. Ohgawara T; S Kobayashi; S Ishii; K Yoshinaga; I Oiyama. 1989 Somatic Hybridation in Citrus: navel orange (*C. sinensis* Osb.) and grapefruit (*C. paradisi* Macf.) *Theor Appl Genet* 78:609-612.
59. Pacheco SP. 1972 La papaya aspectos de su cultivo y aprovechamiento. CONAFRUT. Serie de divulgación, folleto No. 5. México. 15p.
60. Pacheco SP. 1973. El papayo. CONAFRUT serie de divulgación núm. 12. México. 30pp.
61. Piñeros MA; LV Kochian. 2001. A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize: Identification and characterization of Al^{3+} - induced anion channels. *Plant Physiology* 125:292-305.
62. Power JB. 1977. The physiology of isolated protoplasts. En: Smith H. The molecular biology of plant cells. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 418-428.
63. SAGAR. 1998. Anuario Estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos Tomo I. Centro de Estadística Agropecuaria México. 564-665.

64. Salisbury FB; CW Ross. 1994. Fisiología vegetal. Interamericana. México 758p.
65. Santos-Díaz MS; N Ochoa-Alejo. 1990. Adaptación de las plantas al déficit hídrico. *Ciencia* 41: 333-344.
66. Santos de la Rosa F. 1993. En: Becerra Leor; R Mosqueda Vásquez; M Machaín Lillingston; D Riesta Díaz. Manual de producción de papayo en el estado de Veracruz. SARH. México. 30p.
67. Schilde-Rentschler L. 1975. Les protoplastes. *La Recherche* 6(56):430-436.
68. Smith, H. 1977. The molecular biology of plant cells. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 329-441p.
69. Szabados L; G Hadlaczky; D Dudits. 1981. Uptake of isolated plant chromosomes by plant protoplasts. *Planta* 151:141-145.
70. Tegeder M; D Gebhardt; O Schieder; I Pickardt. 1995. Thidiazuron-induced plant regeneration from protoplasts of *Vicia faba* cv. Mythos. *Plant Cell Reports* 15: 164-169.
71. Thomas E; MR Davey. 1975. From single cells to plant. The Wykeham Science Series. Wykeham Publications. London. 27, 111-112.
72. Uchimiya H; I Murashige. 1976. Influence of the nutrient medium on the recovery of dividing cells from tobacco protoplasts. *Plant Physiol* 57: 424-429.
73. Vardi A; P Arzee-Gonen; A Frydman-Shani; S Bleichman; E Galun. 1989. Protoplast-fusion-mediated transfer organelles from *Microcitrus* into *Citrus* and regeneration of novel alloplasmic trees. *Theor Appl Genet* 78: 741-747.

74. Vasil IK; V Vasil 1980. Isolation and culture of protoplasts. En: Vasil IK. Perspectives in plant cell and tissue culture International Review of Cytology Supplement 11B. 1-19.
75. Vázquez AM y R Linacero. 1992. Variación somaclonal. V Congreso Iberoamericano de Biología Celular (memorias) Málaga, España. 72.
76. Vázquez JI; P Vizcaíno; D Parra. 1974. Introducción al cultivo del papayo (*Carica papaya*) CONAFRUT. Serie de divulgación, folleto No. 16. México, 15pp
77. Wakita Y; H Sasamoto; N Yoshizawa. 1996. Protoplasts culture conditions for increasing cell division in *Betula platyphylla* var. japonica. Plant Tissue Culture Letters, 13 (1): 35-41
78. White A; P Handler; EL Smith; RL Hill; IR Lehman 1983. Principios de bioquímica. Mc Graw-Hill. Madrid. 1116-1120
79. Zaitlin M, D Coltrin 1964. Use of pectic enzymes in a study of the nature intercellular cement of tabaco leaf cells. Plant Physiology 39(1):91-95.
80. Zhu XY; I Negrutiu. 1991. Isolation and culture of protoplasts. En: I. Negrutiu; GB Gharthi-Chetri A laboratory guide for cellular and molecular plant biology. Bio Methods Vol. 4 Birkhauser Verlag. Basel. 19-26.