

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**HIBRIDACIÓN SOMÁTICA DE *CARICA PAPAYA* VAR. POCOCÍ Y
VASCONCELLEA SP. (BRASSICALES: CARICACEAE) MEDIANTE
ELECTROFUSIÓN DE PROTOPLASTOS**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar por el grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología

PAULA CARVAJAL CAMPOS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

Agradecimientos

A mi mamá y mi hermana Priscilla por su compañía y apoyo incondicional.

A Víctor Guzmán, por siempre estar para mí y ayudarme en todo lo que le fue posible.

Al Dr. Víctor Jiménez por abrirme las puertas del CIGRAS y por todas sus recomendaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Eric Guevara, M.Sc. Rodolfo Umaña y Dra. María Viñas por sus sugerencias para poder finalizar este trabajo.

A Ester Vargas, Gabriel Rojas y Marcelo Murillo por ayudarme y hacerme compañía durante los aislamientos de protoplastos.

A Andrea Holst y Ester Vargas por ayudarme durante la cuarentena para poder finalizar la tesis.

A todo el personal del Laboratorio de Biotecnología del CIGRAS, los que están y los que se han ido al extranjero, por haberme ayudado en algún punto del desarrollo del trabajo y por haberme brindado su amistad.

Al Sistema de Estudios de Posgrado (SEP) por la “Beca de un millón” otorgada para el desarrollo de este trabajo.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología”

Dr. Andrés Gatica Arias
**Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado**

Dr. Víctor Jiménez García
Director de Tesis

Dr. Eric Guevara Berger
Asesor

M.Sc. Rodolfo Umaña Castro
Asesor

Dra. María Viñas Meneses
**Representante del Director del Programa de Posgrado
en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales**

Paula Carvajal Campos
Candidata

Índice

Agradecimientos	ii
Hoja de aprobación	iii
Índice	iv
Resumen.....	vi
Índice de cuadros.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Índice de anexos	xi
Autorización para digitalización y comunicación.....	xii
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1. General.....	3
2.2. Específicos	3
3. Revisión de literatura	4
3.1. Generalidades de la papaya	4
3.1.1. <i>Carica papaya</i> híbrido Pococí	4
3.1.2. <i>Vasconcellea</i>	5
3.2. Protoplastos	6
3.2.1. Fusión de protoplastos	8
3.2.2. Cultivo y regeneración de protoplastos.....	10
4. Metodología	12
4.1. Germinación de semillas de <i>C. papaya</i> in vitro	12
4.2. Aislamiento de protoplastos de <i>C. papaya</i>	14
4.2.1. Aislamiento de protoplastos a partir de hoja.....	14
4.2.2. Aislamiento de protoplastos a partir de callo	18
4.3. Aislamiento de protoplastos de <i>Vasconcellea</i> sp.	19
4.3.1. Material vegetal	19
4.3.2. Preplasmólisis.....	20
4.3.3. Digestión enzimática	21
4.3.4. Purificación	21
4.3.5. Evaluación de los protoplastos aislados	21
4.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico	22
4.4. Electrofusión de protoplastos y detección de posibles fusionantes entre <i>C. papaya</i> y <i>Vasconcellea</i> sp.	22

4.4.1. Electrofusión de protoplastos	22
4.4.2 Detección molecular de posibles fusionantes mediante PCR-RFLP	27
4.5. Cultivo y regeneración de protoplastos	31
4.5.1. Regeneración de la pared celular de los protoplastos	31
4.5.2. Reducción del contenido de manitol en el cultivo de protoplastos	32
5. Resultados	34
5.1. Germinación de semillas de <i>C. papaya</i> in vitro	34
5.2. Aislamiento de protoplastos de <i>C. papaya</i>	39
5.2.1. Aislamiento de protoplastos a partir de hojas	39
5.2.2. Aislamiento de protoplastos a partir de callo	40
5.3. Aislamiento de protoplastos a partir de callos de <i>Vasconcellea</i> sp.	42
5.4. Electrofusión de protoplastos y detección de posibles fusionantes mediante polimorfismos entre <i>C. papaya</i> y <i>Vasconcellea</i> sp.....	46
5.4.1. Electrofusión de protoplastos	46
5.4.2. Detección molecular de posibles fusionantes mediante PCR-RFLP	54
5.5. Cultivo y regeneración de protoplastos	58
5.5.1. Regeneración de la pared celular de los protoplastos	58
5.5.2. Reducción del contenido de manitol en el cultivo de protoplastos	60
6. Discusión.....	63
6.1. Germinación de semillas de <i>C. papaya</i> in vitro	63
6.2. Aislamiento de protoplastos de <i>C. papaya</i>	64
6.2.1. Aislamiento de protoplastos a partir de hojas	64
6.2.2. Aislamiento de protoplastos a partir de callo	65
6.3. Aislamiento de protoplastos a partir de callos de <i>Vasconcellea</i> sp.	66
6.4. Electrofusión de protoplastos y detección de posibles fusionantes mediante polimorfismos entre <i>C. papaya</i> y <i>Vasconcellea</i> sp.....	69
6.4.1. Electrofusión de protoplastos	69
6.4.2. Detección molecular de posibles fusionantes mediante PCR-RFLP	72
6.5. Cultivo y regeneración de protoplastos	74
6.5.1. Regeneración de la pared celular de los protoplastos	74
6.5.2. Reducción del contenido de manitol en el cultivo de protoplastos	76
7. Referencias bibliográficas.....	78
8. Anexos	95

Resumen

La papaya (*Carica papaya*) es un cultivo de importancia económica y alimenticia. Por su relevancia, ha existido interés en mejorar genéticamente esta especie usando el género *Vasconcellea* como recurso génico. Algunas especies de este género poseen características de interés agronómico como resistencia al virus de la mancha anular de la papaya, tolerancia al frío, mayor contenido de enzimas proteolíticas y propiedades organolépticas agradables. Una alternativa para transferir estas características de *Vasconcellea* a *C. papaya* es la fusión de protoplastos.

En este trabajo se aisló protoplastos de hojas de *C. papaya* y se determinó que el uso de una solución enzimática con 1,0% m/v de celulasa y 0,5% m/v de macerozima permite obtener un rendimiento adecuado para continuar con pasos posteriores de cultivo y fusión. Con respecto al aislamiento a partir de callos embriogénicos de *C. papaya*, se recomienda utilizar la misma solución enzimática, pero adicionándole 0,5% m/v de hemicelulasa. En cuanto a los protoplastos de callos de *Vasconcellea* sp, la variación en el contenido de celulasa no modificó el rendimiento del proceso. Sin embargo, se determinó que la adición de hemicelulasa redujo el porcentaje de protoplastos fluorescentes luego de ser teñidos con blanco de calcoflúor, que es indicativo de una mayor remoción de la pared celular, y que se debe utilizar callos friables para incrementar el rendimiento del proceso.

Para realizar la fusión de los protoplastos, primeramente, se determinó si las soluciones de fusión reducen la viabilidad de los protoplastos. De las seis soluciones probadas se definió que tres de ellas no modifican este parámetro. Posteriormente se realizaron pruebas de fusión de los protoplastos; sin embargo, el éxito de las pruebas realizadas fue bajo. Un factor que pudo influenciar el proceso es la diferencia de tamaño de los protoplastos de ambas especies. Para identificar a futuro posibles híbridos se evaluó la reacción en cadena de la polimerasa combinada con la detección de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y se encontró que las regiones *ITS1-ITS4* y *trnK1-trnK2* permiten diferenciar ambas especies luego de realizar la digestión con endonucleasas.

Con respecto al cultivo de los protoplastos, se observó que, para ambas especies por separado, el medio de cultivo KM8P-S permitió la formación de la pared celular más rápidamente que con respecto a los otros tres medios de cultivo probados. Por último, la reducción en 50% del contenido de manitol en el medio KM8P-S permitió obtener microcolonias de protoplastos de *C. papaya* más grandes con respecto al testigo. Sin embargo, no se llegó a obtener la formación de callos.

Índice de cuadros

Cuadro 1. Concentración enzimática y rendimiento de protoplastos aislados a partir de diferentes tejidos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp.

Cuadro 2. Composición de las diferentes soluciones enzimáticas utilizadas en los experimentos para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de *C. papaya*.

Cuadro 3. Composición de las diferentes soluciones enzimáticas utilizadas en los experimentos para el aislamiento de protoplastos a partir de callo de *C. papaya*.

Cuadro 4. Composición de las diferentes soluciones enzimáticas utilizadas en los experimentos para el aislamiento de protoplastos a partir de callo de *Vasconcellea* sp.

Cuadro 5. Secuencias de los imprimadores utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. mediante PCR de tiempo final.

Cuadro 6. Ciclos térmicos para las reacciones de PCR con los imprimadores *ITS1-ITS4*, *1406F-ITS2*, *ITS1-ITS2*, *ITS3-ITS4*, *trnL-trnF* y *trnK1-K2*.

Cuadro 7. Plantas obtenidas (%) al germinar semillas con arilo (CA) y sin arilo (SA) de *C. papaya* en agar-agua (AA), papel de germinación (P), turba:perlita (S) o medio MS (MS), tratadas con AG₃ (AG) y/o un choque térmico de 35°C (35) luego de treinta días de iniciado el cultivo.

Cuadro 8. Rendimiento en protoplastos·g⁻¹, viabilidad y protoplastos no fluorescentes al ser teñidos con CFW aislados a partir de hojas in vitro de *C. papaya*.

Cuadro 9. Viabilidad y rendimiento en protoplastos·g⁻¹ de protoplastos aislados a partir de callos de *Vasconcellea* sp.

Cuadro 10. Diámetro de los protoplastos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. inicial y luego de estar expuestos a dos soluciones de fusión.

Cuadro 11. Comportamiento de los protoplastos durante y después de la electrofusión de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. en dos soluciones de fusión bajo tres condiciones distintas y tres voltajes por solución.

Índice de figuras

Figura 1. Callo embriogénico de *C. papaya* utilizado para el aislamiento de protoplastos.

Figura 2. Callos de *Vasconcellea* sp. con apariencia a) friable y b) embriogénica, utilizados para el aislamiento de protoplastos.

Figura 3. Protoplastos unidos luego de realizar el proceso de electrofusión de tamaño a) similar, b) diferente tamaño, y c) fusionados.

Figura 4. Germinación de semillas de *C. papaya* en a) diferentes sustratos, b) al aplicarles un choque térmico de 35°C luego de cinco días de haber iniciado el experimento, c) al aplicarles 500 ppm de AG₃ por dos horas y d) al removerle o no el arilo, luego de 30 días de haber iniciado el experimento.

Figura 5. Plántulas de *C. papaya* obtenidas de semillas con arilo cultivadas en agar-agua, papel de germinación, medio MS y turba:perlita a) sin tratar (testigo), b) tratadas con AG₃, c) tratadas con un choque térmico de 35°C y d) tratadas con choque térmico y ácido giberélico (AG₃), luego de 30 días de haber sido sembradas.

Figura 6. Plántulas de *C. papaya* obtenidas de semillas sin arilo cultivadas en agar-agua, papel de germinación, medio MS y turba:perlita a) sin tratar (testigo), b) tratadas con AG₃, c) tratadas con un choque térmico de 35°C y d) tratadas con choque térmico y AG₃, luego de 30 días de haber sido sembradas.

Figura 7. Protoplastos aislados a partir de callos de *C. papaya* con las soluciones enzimáticas a) C, b) J y c) F.

Figura 8. Rendimiento de los protoplastos aislados a partir de callo de *C. papaya* al probar tres soluciones enzimáticas diferentes.

Figura 9. Protoplastos aislados a partir de callos de *Vasconcellea* sp. utilizando una solución enzimática a) sin y b) con 0,5% de hemicelulasa, además de 1% de celulasa RS y 0,5% de macerozima R10.

Figura 10. Rendimiento de los protoplastos aislados a partir de callo de *Vasconcellea* sp. en el experimento tres utilizando diferentes concentraciones de hemicelulasa (Cuadro 4). a) número de protoplastos·g⁻¹ aislados, b) viabilidad de los protoplastos (%) y c) protoplastos sin fluorescer al ser teñidos con CFW (%).

Figura 11. Rendimiento de los protoplastos·g⁻¹ obtenidos en el experimento cinco al utilizar callo de *Vasconcellea* sp. con apariencia embriogénica (A) o friable (F) al ser digeridos con 1% de celulasa RS, 0,5% de macerozima R10 y 1 ó 1,5% de hemicelulasa.

Figura 12. Viabilidad de los protoplastos aislados de a) *C. papaya* y b) *Vasconcellea* sp. luego de ser expuestos por 15 min solución de fusión para células eucariotas de Eppendorf en tres osmolalidades diferentes.

Figura 13. Viabilidad de los protoplastos aislados de a) *C. papaya* y b) *Vasconcellea* sp. luego de ser expuestos a la solución de fusión de Bates et al. (1983), Yu et al. (2013), Duquenne et al. (2007), y la solución de fusión de Eppendorf de 90 mOsmol/kg.

Figura 14. Protoplastos de *C. papaya* (verdes) y *Vasconcellea* sp. (translúcidos) luego de intentar ser electrofusionados.

Figura 15. Prueba de electrofusión de protoplastos aislados a partir de *Vasconcellea* sp. con una densidad de $3,6 \times 10^5$ protoplastos·mL⁻¹, a los que se les aplicó dos choques eléctricos por 15 μ s con 30 V utilizando la solución de fusión propuesta por a) Yu et al. (2013) o b) Bates et al. (1983).

Figura 16. Electrofusión de protoplastos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. en las soluciones de fusión de Yu et al. (2013) (a y b) y Bates et al. (1983) (c y d) durante la formación de cadenas (a y c) y después del evento de fusión

Figura 17. Protoplastos fusionados al aplicar a) dos pulsos de 25 V por 25 μ s, b) tres pulsos de 26 V por 25 μ s, c) dos pulsos de 26 V por 30 μ s, d) tres pulsos de 34 V por 30 μ s, utilizando la solución de fusión de Yu et al. (2013) (a) y Bates et al. (1983) (b, c, d).

Figura 18. Protoplastos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. unidos luego de realizar la electrofusión utilizando la solución de fusión de Yu et al. (2013) al aplicar a) dos pulsos de 21 V por 30 μ s, b) tres pulsos de 25 V por 30 μ s, y la solución de Bates et al. (1983) al aplicar c) tres y d) dos pulsos de 18 V por 30 μ s.

Figura 19. Digestión con cuatro enzimas de restricción y sus posibles combinaciones de los productos de PCR obtenidos al amplificar a) la región ribosomal *ITS1-ITS4* y b) la cloroplástica *trnK1-trnK2* en *C. papaya* (P) y *Vasconcellea* sp (V).

Figura 20. Árbol del posicionamiento taxonómico de *Vasconcellea* sp. para el gen a) *trnL-trnF* e b) *ITS3-307R*, mediante un análisis de máxima verosimilitud (ML).

Figura 21. Comparación de la a) planta utilizada para la obtención de frutos de donde se extrajeron las semillas usadas en los diferentes experimentos (fotografía propia) y b) ilustraciones que describen la morfología de *C. pubescens* (ahora *V. cundinamaricensis*).

Figura 22. Fluorescencia a través del tiempo de protoplastos aislado de callos de a) *C. papaya* y b) *Vasconcellea* sp. teñidos con blanco de calcoflúor cultivados en medio MSBSOH con 2,4-D, MSBSOH con ANA, BAP y 2,4-D, MSBSOH con ANA y BAP y KM8P-S.

Figura 23. Conglomerado celular de *Vasconcellea* sp. cultivado en medio KM8P-S durante 144 h.

Figura 24. Área ocupada por las microcolonias de a) *C. papaya* y b) *Vasconcellea* sp. luego de un mes de cultivo en medio KM8P-S, al cual se le redujo el contenido de manitol luego de 72 h de haber iniciado el cultivo

Figura 25. Formación de microcolonias de *C. papaya* luego de un mes de cultivo en medio KM8P-S al cual se le redujo el contenido de manitol en a) 0, b) 25 y c) 50% luego de 72 h de haber iniciado el cultivo.

Índice de anexos

Anexo 1. Composición del medio de cultivo MS líquido para el aislamiento de protoplastos según Boyes y Sink (1989), modificado luego por Oh et al. (1994) (MSBSOH).

Anexo 2. Preparación de 10 mL de la solución de fusión Eppendorf a tres osmolalidades diferentes a partir de las soluciones hipoosmolar e isoosmolar.

Anexo 3. Composición de las soluciones de fusión propuestas por otros autores.

Anexo 4. Resultados del BLAST para la región *trnL-trnF* de *Vasconcellea* sp.

Anexo 5. Comparación en BLAST de la secuencia *trnL-trnF* de *Vasconcellea* sp. obtenida contra la secuencia AYA461550.1

Anexo 6. Resultados del BLAST para la región *ITS3-307R* de *Vasconcellea* sp.

Anexo 7. Comparación en BLAST de la secuencia *ITS3-307R* de *Vasconcellea* sp. obtenida contra la secuencia AY461550.1.

Autorización para digitalización y comunicación



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Paula Carvajal Campos, con cédula de identidad 402200463, en mi condición de autor del TFG titulado Hibridación somática de Carica papaya var. Pococi y Vasconcellea sp. (Brassicales: Caricaceae) mediante electrofusión de protoplastos

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

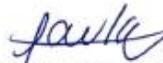
Nombre Completo: Paula Carvajal Campos

Número de Carné: B11494 Número de cédula: 402200463

Correo Electrónico: paula.carvajalcampos@ucr.ac.cr

Fecha: 13.11.20 Número de teléfono: 8769-0393

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Víctor Jiménez García


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1. Introducción

La papaya (*C. papaya* L) es uno de los principales cultivos frutales en muchas zonas tropicales y subtropicales (Teixeira-da Silva et al., 2007). En el 2018, la producción mundial de este fruto llegó a ser de 13,29 millones de toneladas (MT), siendo el 58,1% producido en Asia, seguido de América con el 30,8%. Durante los últimos 10 años la India ha sido el mayor productor de papaya a nivel mundial. En el año 2018, la India produjo 5,96 MT, seguido por Brasil con 1,06 MT. En el caso de Costa Rica, la producción alcanzó las 69 750 toneladas durante ese mismo año (FAO, 2018).

En Costa Rica, el cultivo de la papaya se da principalmente para satisfacer el mercado nacional. En el 2014, el 71,4% de la producción fue vendida en la propia finca productora o en mercados locales y el 5,2% de los frutos fue exportado, el 23,4% restante se destinó al autoconsumo (12,6%), agroindustrias (5,2%), no se cosechó (4,7%) o no se vendió (1%) (INEC, 2015; CEPAL, 2017). Esta fruta se está convirtiendo en un cultivo importante para la exportación, tanto fresca como de productos terminados, en los países en desarrollo. Para el año 2000 solamente 2,4% de la producción era exportada, lo cual implica que en los últimos 14 años la exportación se ha duplicado (Teixeira-da Silva et al., 2007, CEPAL, 2017).

La papaya es afectada por una extensa variedad de organismos patógenos, siendo el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-P, por sus siglas en inglés) la enfermedad más destructiva que afecta los frutos y que está presente en la mayoría de las principales áreas de plantación de papaya del mundo (Teixeira-da Silva et al., 2007; Zhang et al., 2011). Debido a la relevancia económica de la papaya, se han buscado alternativas para mejorar genéticamente esta especie. Una opción es el uso de la técnica de hibridación somática a partir de protoplastos, siendo el género *Vasconcellea* el candidato más promisorio para poder lograr este fin (Jordan et al., 1986; Kyndt y Gheysen, 2007). Algunos miembros de este género poseen resistencia al virus PRSV-P, además, presentan mejor sabor, y mayor tolerancia al frío, comparado con *C. papaya* (National Research Council, 1989).

Por otra parte, se ha reportado que diferentes especies de *Vasconcellea* sp. presentan una mayor actividad proteolítica en el látex, atribuida al contenido de cisteína proteinasas, con respecto a *C. papaya*. Adicionalmente, *Vasconcellea* posee mayor

concentración de enzimas y presenta isoformas que *C. papaya* no posee (Kyndt et al 2007). El látex de *Vasconcellea* ha sido estudiado y se han obtenido resultados promisorios que podrían ser útiles para diferentes industrias. Por ejemplo, en el campo farmacéutico se ha estudiado la fracción P1G10 de *V. cundinamarcensis* y se ha visto que en ratones acelera el proceso de sanación de heridas abiertas (Freitas et al., 2017), quemaduras en la piel por radiación UVB (Freitas et al., 2019), reduce el daño en el colon y reduce los síntomas de colitis (Albuquerque et al., 2020), y en conejos contribuye a la recuperación del epitelio de la córnea (Silva et al., 2020). En cuanto a la industria alimenticia, las cisteínas endopeptidasas que posee *V. quercifolia* son capaces de coagular leche, por lo que se pueden utilizar para producir queso (Torres et al., 2010). Además, la fracción P1G10 de *V. cundinamarcensis* posee actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, causante de daños pre y post cosecha de frutas y verduras (Torres-Ossandón et al., 2019). Por último, en la industria textil podría ser utilizada en tenerías para eliminar el pelo del cuero (Errasti et al., 2020).

La generación de híbridos de somáticos de *C. papaya* L. var. Pococí + *Vasconcellea* sp. puede ser favorable ya que, al conferir resistencia al PRSV-P, se disminuirían las pérdidas durante su producción en países en donde esta enfermedad sea un problema. Además, existe la posibilidad de ampliar las zonas de cultivo si se logra una combinación genética que favorezca una tolerancia al frío. También, la hibridación de estas dos especies podría modificar el olor, sabor y actividad proteolítica, lo cual puede traer beneficios a nivel de consumo y productivo. Por las características del látex de *Vasconcellea* sp. no se debe pensar únicamente en el consumo de la fruta fresca, sino se debe tener en cuenta que la generación de híbrido podría ser útil para realizar investigaciones y desarrollos para obtener productos biotecnológicos.

2. Objetivos

2.1. General

- Establecer protocolos para el aislamiento, electrofusión y regeneración de protoplastos de papaya (*Carica papaya* L. var. Pococí y *Vasconcellea* sp.).

2.2. Específicos

- Establecer parámetros para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas *in vitro* de *Carica papaya* L. var. Pococí y de callos de *Vasconcellea* sp. con una densidad óptima, para realizar electrofusión y regeneración de éstos en plantas.
- Determinar las condiciones de electrofusión para obtener fusiones de *Carica papaya* L. var. Pococí y *Vasconcellea* sp.
- Evaluar la regeneración de los protoplastos de *Carica papaya* L. var. Pococí, de *Vasconcellea* sp. y de fusionantes de estas especies.

3. Revisión de literatura

3.1. Generalidades de la papaya

El ancestro común más reciente de la familia Caricaceae es originario de África y pertenece al género *Cylicomorpha*; sin embargo, este género se dispersó y diversificó en México, Centroamérica y Suramérica, en donde actualmente se encuentran la mayoría de especies. La familia presenta plantas arborescentes y herbáceas con sistemas laticíferos bien desarrollados. Está conformada por 35 especies distribuidas en seis géneros con pocas especies: *Cylicomorpha*, *Horovitzia*, *Jarilla*, *Jacaratia*, *Vasconcellea* y *Carica*. Estos dos últimos géneros son los más relevantes para el consumo humano y para el mejoramiento genético; sin embargo, tres especies del género *Jarilla* y una de *Horovitzia*, parientes cercanos de *C. papaya*, también podrían ser utilizadas con fines de mejora genética no convencional (Badillo, 1971; 1993; 2000; Carvalho y Renner, 2015).

3.1.1. *Carica papaya* híbrido Pococí

Carica papaya L. es el único representante del género *Carica*. Se cree que es originario del área tropical de América, entre el sur de México y Centroamérica; pero se desconoce la zona específica de su origen (de Candolle, 1885; Morton, 1987; Badillo, 2000). Sus frutos son ricos en diversos carotenoides (Chandrika et al., 2003), y son utilizados principalmente para consumo fresco (Poulter y Caygill, 1985). Además, puede ser utilizada con fines medicinales para diferentes malestares (Krishna et al., 2008).

Esta planta presenta el tallo de color verde o morado oscuro, sus hojas crecen en la zona apical del tallo y se dividen en secciones de cinco a nueve segmentos. Las flores, de color blanco marfil, pueden ser femeninas, masculinas o hermafroditas; sin embargo, se ha visto que puede cambiar de sexo por altas temperaturas o posterior a su poda. El fruto es ovalado con piel cerosa y delgada; al madurar su color es entre amarillo y anaranjado (Morton, 1987). En Costa Rica, mediante mejoramiento convencional se desarrolló el híbrido "Pococí". Por su alto rendimiento y buen sabor de la fruta, a partir del año 2004 su cultivo ha tomado relevancia en el país (Bogantes y Mora, 2006).

3.1.2. *Vasconcellea*

El género *Vasconcellea* es el más grande de la familia Caricaceae. Está conformado por 21 de las 35 especies que componen esta familia (Badillo, 2000). Comúnmente las especies del género son conocidas como papayas de tierras altas o montañas (National Research Council, 1989). Sus frutos son utilizados frescos o en preparados como jaleas, salsas, mermeladas, helados, o jugos, y son consumidos principalmente en el mercado local del Altiplano andino (National Research Council, 1989). Por el aprovechamiento que se le ha dado, las dos especies más importantes del género son *V. cundinamarcensis* y *V. x heilbornii* (Scheldeman et al., 2011).

La mayor diversidad de especies se encuentra en Ecuador, en donde habitan 16 de las 21 especies de *Vasconcellea*, seguido por Colombia y Perú con nueve especies cada uno. En Costa Rica existen reportes de la presencia de *V. cauliflora*, *V. microcarpa* y *V. cundinamarcensis*, siendo esta última la especie con la distribución geográfica más amplia, ya que se encuentra desde Costa Rica hasta Chile (Scheldeman et al., 2007). Estas plantas, con forma de arbusto o árbol, pueden ser silvestres, domesticadas o semidomesticadas. Los tallos son poco ramificados o simples. Sus flores muestran colores variables entre blanco, verde, amarillo, anaranjado y rosado. El color del fruto varía entre especies (Badillo, 1993).

Este género es candidato para la mejora genética de *C. papaya* debido a que algunas de las especies poseen resistencia al PRSV-P. Por ejemplo, en *V. cundinamarcensis* la resistencia es atribuida al gen *prsv-1* (National Research Council, 1989; Dillon et al., 2005; Dillon et al., 2006). Además, estas papayas de montaña presentan características organolépticas interesantes de olor y sabor, y son una fuente potencial para el aislamiento de papaína (Scheldeman et al., 2011). Se ha demostrado que el látex aislado de *V. cundinamarcensis* puede tener entre cinco y ocho veces más actividad proteolítica con respecto al de *C. papaya* (Baeza et al., 1990). Por otra parte, algunos miembros de este género pueden encontrarse hasta a 3000 msnm, debido a que poseen genes que les confieren una mayor tolerancia al frío (National Research Council, 1989).

Por las características mencionadas anteriormente, se desarrolló mediante mejoramiento no convencional el híbrido *C. papaya* x *V. quercifolia*. Para esto se polinizó flores femeninas de *C. papaya* con polen de *V. quercifolia*, y 90 días después de la polinización se realizó el rescate de embriones. Los autores lograron obtener 75% de

híbridos resistentes al PRSV-P, mientras que el 25% presentó síntomas de esta afección (Drew et al., 2006). Además de *V. quercifolia*, las especies *V. cauliflora*, *V. pubescens* y *V. stipulata* son resistentes a este virus (Conover, 1964).

3.2. Protoplastos

Los protoplastos han sido definidos por Brenner et al. (1958) como la "parte de la célula que está dentro de la pared celular, y en algunas especies puede ser plasmolizada fuera de ella". Su aislamiento puede realizarse mediante métodos mecánicos, enzimáticos o combinaciones de ambos (Gutiérrez et al., 2003). El método mecánico consiste en plasmolizar las células aplicando un choque osmótico con cloruro de calcio, nitrato de calcio o sacarosa, y luego liberar los protoplastos por medio de cortes o abrasiones. Esta técnica es utilizada en menor medida, debido a que se obtienen concentraciones muy bajas de protoplastos (Cocking, 1972).

En contraposición, el aislamiento enzimático permite obtener mayores concentraciones de protoplastos. Para este fin se han empleado celulasas, pectinasas (Power y Cocking, 1970, Davey et al., 2005), hemicelulasas o combinaciones de estas enzimas (Meng et al., 1996; Power y Cocking, 1969). Además, se ha determinado que la concentración de las enzimas celulasa y macerozima (un tipo de pectinasa), la dosis de manitol y el tiempo de incubación enzimático, son factores que, en *C. papaya*, han determinado el rendimiento y viabilidad de estos protoplastos durante su aislamiento (Zhang et al., 2011).

El aislamiento de protoplastos de plantas ha sido empleado en diversas aplicaciones. Por ejemplo, se han utilizado para realizar la clonación de plantas y de estudios morfológicos de cultivo de tejidos (Carlson, 1973; Cocking, 1981). En cuanto a la mejora genética, los protoplastos han sido usados para realizar hibridación somática, aislamiento de mutantes, transferencia de organelas y genes. Pueden ser empleados para estudiar los mecanismos de infección, replicación y ensamblaje de virus en plantas (Carlson, 1973; Cocking, 1981). En los últimos años la investigación en el área ha tomado fuerza debido a que los protoplastos pueden ser editados genéticamente mediante CRISPR/Cas9, lo que abre una nueva línea de investigación (Lin et al. 2018).

En el caso específico de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp., ha sido posible obtener protoplastos a partir de hojas jóvenes y adultas, cotiledones, suspensiones celulares de

embriones somáticos y callos provenientes de hojas e hipocótilos (Cuadro 1). Adicionalmente, de *C. papaya* variedad Pococí, Lipka (2010) logró obtener protoplastos a partir de hojas, tanto de plantas *in vitro* como *ex vitro* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentración enzimática y rendimiento de protoplastos aislados a partir de diferentes tejidos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp.

Especie	Tejido	Solución enzimática	Rendimiento	Referencia
<i>C. papaya</i>	Hojas de plántulas	2,0% de celulasa R-10 + 0,5% de macerozima	No especificado	Litz y Conover (1979)
<i>C. papaya</i>	Hojas de plantas en invernadero	1,0% de celulasa R-10 + 0,5% de macerozima	9,03x10 ⁵ protoplastos·g ⁻¹	Lipka (2010)
<i>C. papaya</i>	Hojas de plántulas <i>in vitro</i>	2,0% de celulasa R-10 + 0,5% de pectoliasa Y-23	2,48x10 ⁶ protoplastos·g ⁻¹	Tang et al. (2011)
<i>C. papaya</i>	Hojas de plántulas	1,2% de celulasa R-10 + 0,3% de macerozima R-10	1,5X10 ⁷ protoplastos·g ⁻¹	Zhang et al. (2011)
<i>C. papaya</i>	Cotiledones de plántulas de invernadero	1,5% de celulasa R-10 + 0,5% de macerozima	No especificado	Litz (1984)
<i>C. papaya</i>	Callos derivados de hojas	2,0% de celulasa R-10 + 0,5% de macerozima	2,0x10 ⁵ protoplastos·g ⁻¹	Liu et al. (1984)
<i>C. papaya</i>	Callos derivados de hipocótilos	2,0% de celulasa R-10 + 0,5% de macerozima	No especificado	Litz (1986)
<i>C. papaya</i>	Callos derivados de hipocótilos	2,0% de celulasa R-10 + 0,5% de macerozima	3,0x10 ⁴ protoplastos·ml ⁻¹	Jordan et al. (1986)
<i>C. papaya</i> x <i>V. cauliflora</i>	Suspensiones de embriones somáticos	2,0% de celulasa R-10 + 0,6% de macerozima + 0,2% de driselasa	1,5x10 ⁶ protoplastos·g ⁻¹	Chen y Chen (1992)
<i>V. pubescens</i> x <i>V. stipulate</i>	Callos derivados de hojas	3,0% de celulasa + 3,0% de macerozima + 0,4% pectoliasa	1,0x10 ⁸ protoplastos·g ⁻¹	Ulloa y Jadán (2010)

Continuación cuadro 1. Concentración enzimática y rendimiento de protoplastos aislados a partir de diferentes tejidos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp.

Especie	Tejido	Solución enzimática	Rendimiento	Referencia
<i>V. cundinamarcensis</i>	Hojas jóvenes y adultas	2,0% de celulasa R-10 + 0,5% de macerozima	4,5x10 ⁵ protoplastos·ml ⁻¹	Jordan et al. (1986)
<i>V. stipulata</i>	Hojas in vitro	3,0% de celulasa + 3,0% de macerozima + 0,4% pectoliasa	1,8x10 ⁶ protoplastos·ml ⁻¹	Ulloa y Jadán (2010)

Para evaluar la eficiencia del proceso del aislamiento de protoplastos es común utilizar diferentes tinciones. Para determinar la viabilidad de los protoplastos es posible utilizar la tinción de azul de Evans. Con dicho tinte se pueden diferenciar los protoplastos no viables de los viables, ya que en el caso de que se encuentre no viable el tinte va a permear la membrana celular. Por otra parte, desde el año 1970 se ha utilizado la tinción con blanco de calcoflúor (CFW, por sus siglas en inglés) para dar seguimiento a la regeneración de la pared celular de protoplastos de plantas superiores (Nagata y Takebe, 1970). Se ha demostrado que existe un alto grado de correlación entre la fluorescencia del CFW y el contenido total de celulosa en la pared celular durante su síntesis (Galbraith, 1981).

3.2.1. Fusión de protoplastos

La fusión de protoplastos es una técnica que permite realizar la recombinación génica a nivel nuclear y así formar híbridos somáticos, o bien movilización de organelas, que lleva a la formación de cíbridos. Esto permite obtener nuevos genotipos que no pueden ser generados en la naturaleza en forma espontánea (Kumar y Cocking, 1987). Las especies vegetales empleadas para la fusión pueden ser compatibles o incompatibles sexualmente (Kumar y Cocking, 1987). Por esto, la técnica puede aplicarse cuando los cruces intergenéricos o interespecíficos son difíciles de realizar por la incompatibilidad genómica, como es el caso de *C. papaya* L. y *Vasconcellea* sp. (van Droogenbroeck et al., 2004).

La fusión de protoplastos puede ser inducida mediante métodos mecánicos, con el uso de un micromanipulador, químicos o eléctricos, aunque en algunos casos puede ocurrir de manera espontánea en el laboratorio durante la etapa de aislamiento (Verma et al.,

2008). Debe darse un contacto cercano e interacción entre las membranas. Para realizar la fusión química se puede utilizar polietilenglicol (PEG) y calcio (Ca^{2+}) a pH alto; estos actúan neutralizando la carga negativa de la membrana celular. Sin embargo, el control de la fusión es limitada y los químicos pueden ser tóxicos para las células, ya que para mejorar la eficiencia de la fusión se debe aumentar la concentración o prolongar el tiempo de incubación con el químico (Kao y Michayluk, 1974; Lynch et al., 1993).

La fusión mediante choques eléctricos o electrofusión es una alternativa a la fusión química. Esta técnica no utiliza sustancias tóxicas para los fusionantes y la perturbación de la membrana celular se restringe únicamente a las zonas de contacto. En este método, los protoplastos son alineados en un campo eléctrico entre dos electrodos, generando el contacto cercano de las membranas por dielectroforesis e interacciones entre células que presentan dipolos. La principal desventaja de la técnica radica en que, dado el tamaño de la cámara de fusión, sólo se pueden fusionar volúmenes pequeños de protoplastos a la vez (Zimmermann y Vienken, 1982; Tempelaar y Jones, 1985; Lynch et al., 1993).

Para poder realizar la electrofusión es necesario colocar los protoplastos en un medio osmóticamente balanceado con baja conductividad eléctrica, adicionando poco o nada de sales. Se busca que la solución de fusión utilizada posea una baja conductividad eléctrica y fuerza iónica para favorecer que ocurra la dielectroforesis entre los protoplastos. Ambos parámetros pueden ser modificados por la presencia de calcio (Ca^{+2}) en la solución de fusión; sin embargo, el uso de soluciones con este catión genera una disyuntiva entre diferentes investigaciones. En algunos casos se asegura que este catión favorece el proceso de electrofusión; sin embargo, en otras investigaciones indican que este catión no es necesario y es suficiente con utilizar manitol. Cabe destacar que, en caso de agregar el calcio, este se debe mantener en baja concentración, preferiblemente entre 0,1-0,5 mM CaCl_2 (Watts y King, 1984; Bates et al., 1987b; Jones, 1991).

La electrofusión de los protoplastos ocurre en tres pasos en donde se debe alternar corrientes eléctricas alternas (AC) y directas (DC). Primeramente, a una corriente AC baja, ocurre el fenómeno de dielectroforesis que permite que los protoplastos se alineen y formen cadenas, también conocidos como collares de perlas. Se denomina dielectroforesis al fenómeno que ocurre en las membranas de los protoplastos al aplicar

un campo eléctrico, las cargas de la membrana se polarizan y ocasionan la reorientación de los dipolos hacia los electrodos de la cámara de fusión. El segundo paso consiste en la aplicación de pulsos de corriente DC que provoquen la formación reversible de poros para que ocurra la fusión. Por último, nuevamente se aplica un pulso de AC para cerrar los poros que fueron abiertos en las membranas (Bates et al., 1987b; Jones, 1988).

Ha sido posible realizar la electrofusión entre protoplastos de *Solanum tuberosum* y *S. brevidens* (Fish et al., 1988), *Coptis japonica* y *Euphorbia millii* (Morikawa et al., 1988), *Minneola tangelo* × *clementine* y *Murraya paniculata* (L.) Jack (Guo y Deng, 1998), *Helianthus annuus* L. y *Helianthus maximiliani* (Schrader) (Taski-Ajdukovic et al., 2006), *Pisum sativum* L. y *Lathyrus sativus* L. (Durieu y Ochatt, 2000), entre otros. También ha sido posible fusionar plantas con filamentos de hongos, como es el caso de *Apium graveolens* L. con *Aspergillus nidulans* (Lynch et al., 1989). Hasta el momento no se han encontrado reportes de electrofusión de protoplastos entre *C. papaya* y *Vasconcellea* sp.

3.2.2. Cultivo y regeneración de protoplastos

Para lograr obtener una planta a partir de protoplastos, lo primero que hay que lograr es que los protoplastos sobrevivan al proceso de aislamiento y puedan regenerar la pared celular (Xu y Xue, 1999). Normalmente, esta regeneración ocurre en un corto período de tiempo luego de haber iniciado el cultivo. Un punto clave durante la regeneración de esta estructura es la presión osmótica. Es recomendable reducir gradualmente el potencial osmótico del medio de cultivo una vez que se haya regenerado la pared celular, para estimular la división mitótica y que se dé la formación de microcallos para así obtener un tejido más desarrollado (Davey et al., 2005). El manitol es comúnmente utilizado como regulador osmótico durante el cultivo, así como también, durante el aislamiento y purificación de protoplastos (Bhojwani y Razdan, 1986).

La densidad del cultivo resulta ser clave durante la regeneración de los protoplastos, por lo que se recomienda utilizar entre 5×10^4 - 1×10^6 protoplastos $\cdot \text{mL}^{-1}$ (Jain et al., 1995). Una vez considerado este punto, se debe elegir entre diferentes sistemas que puedan ser utilizados para el cultivo de protoplastos. Estos pueden ser cultivados en gotas sobre superficies plásticas (Kao et al., 1971), u optar por medios de cultivo gelificados con agarosa, ya que se ha determinado que es más efectivo que el uso de agar (Shillito et al., 1983). O bien, es posible embeber los protoplastos en líquido o gel, para aumentar

la proliferación celular. Una división celular activa permite obtener congregados celulares y callos, para así inducir posteriormente la formación de la planta (Xu y Xue, 1999).

Al menos 24 especies y cuatro híbridos frutales han logrado ser regeneradas exitosamente a partir de protoplastos provenientes de callos, suspensiones celulares, hojas y tallos (Xu y Xue, 1999; Ara et al., 2000; Yu et al., 2000; Assani et al., 2001; Niedz et al., 2003; Umate et al., 2005; Xiao et al., 2007). En el caso específico de la familia Caricaceae, se han hecho diferentes esfuerzos para regenerar protoplastos de *C. papaya* y una especie de *Vasconcellea* sp. que involucran el uso de medios de cultivo como el MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado, combinación de modificaciones del medio KM8 (KM8P/KM8 [1:1]) (Kao y Michayluk, 1975), y el medio basal B5 (Gamborg et al., 1968) con reducción de nitrógeno (B5/N); sin embargo, ninguno de estos ha sido exitoso (Litz, 1984; Liu et al., 1984; Litz, 1986; Jordan et al., 1986). Chen y Chen (1992) lograron regenerar protoplastos de *C. papaya* + *C. cauliflora* (ahora clasificado como *V. cauliflora*), obtenidos a partir de suspensiones celulares de embriones somáticos, utilizando el medio de cultivo KM8P-S. Para la obtención de este híbrido interespecífico se utilizó el polen de *V. cauliflora* para polinizar las flores de *C. papaya*, y posteriormente se aplicó la técnica de rescate de embriones (Chen et al., 1991).

4. Metodología

4.1. Germinación de semillas de *C. papaya* in vitro

Se realizaron dos introducciones de semillas de *C. papaya* var. Pococí F1 provenientes de la Estación Experimental Los Diamantes del Ministerio de Agricultura y Ganadería, Guápiles, Pococí, Limón. Para el primer experimento, se flameó el fruto de papaya dentro de la cámara de flujo laminar, se cortó a la mitad y se extrajeron las semillas, que posteriormente fueron secadas sobre una rejilla cubierta con servilleta durante cinco días dentro de la cámara de flujo laminar. Una vez secas se iniciaron los tratamientos de germinación. Se sumergieron 70 semillas en 100 mL de ácido giberélico (AG₃) (N-Large 3.2 SL, Stoller Enterprises, Inc., Houston, Estados Unidos) a 55 mg/L y se dejaron incubando por 16 h en oscuridad a 100 rpm. Transcurrido el período de incubación, se lavaron las semillas tres veces con agua destilada estéril y se sembraron en agar-agua al 0,9% m/v (Lipka, 2010). La germinación se evaluó luego de 30 días de haber iniciado el experimento. Se consideraron como germinadas las semillas en las que al menos había emergido la radícula.

En cuanto al segundo experimento, se prepararon las semillas de la misma forma que en el primer experimento. Seguidamente, el arilo de la mitad de las semillas extraídas fue removido con una pinza. Una vez eliminado el arilo se enjuagaron las semillas tres veces más con agua destilada estéril y se escurrió en un papel filtro autoclavado. Luego, se dejaron secando durante cinco días dentro de la cámara de flujo laminar. Para germinar las semillas con y sin arilo se probaron cuatro sustratos y tres métodos para acelerar la germinación. Se incluyó un testigo por cada sustrato y tipo de semilla (con o sin arilo) a los que no se les aplicó ningún método para acelerar la germinación. En total se probaron 32 tratamientos diferentes.

Para germinar las semillas, con y sin arilo, con los tres métodos para acelerar la germinación se utilizaron los siguientes sustratos:

1. Agar-agua al 0,9% m/v.
2. Papel de germinación (Anchor Steel Blue Seed Germination Blotter, Anchor Paper Co., Estados Unidos) humedecido con 5 mL de agua.
3. 80 mL de medio MS suplementado con tiamina (0,1 mgL⁻¹), ácido nicotínico (0,5 mgL⁻¹), piridoxina (0,5 mgL⁻¹), glicina (2 mgL⁻¹), inositol (100 mgL⁻¹), sacarosa (30

gL⁻¹) y Phytigel™ (2 gL⁻¹) (P8169, Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), con un pH de 5,8 ajustado con KOH.

4. 200 g de una mezcla de turba (Jiffy, Moerdijk, Países Bajos) y perlita (Coarse, Florida, Estados Unidos) en proporción 1:1 humedecida a capacidad de campo.

Los diferentes sustratos para la germinación de las semillas se colocaron en frascos de vidrio transparente de 8,6 x 9,2 cm o 7,9 x 10,6 cm y se autoclavaron. Para tratar de acelerar la germinación se imbibieron las semillas con AG₃ (N-Large 3.2 SL) a 500 mg/L por dos horas a 100 rpm en oscuridad, previo a sembrarlas; o bien se aplicó un choque térmico de 35°C por cuatro horas luego de cinco días de haber sido sembradas (Webster et al., 2016). Además, se hizo la combinación de ambos tratamientos. En cada frasco se colocaron seis semillas y se tapó con dos capas de plástico adhesivo, sujetas con una banda elástica. Se evaluó la germinación luego de 30 días de haber iniciado el experimento. Se contó el número de plántulas obtenidas por frasco para calcular el porcentaje de germinación.

Una vez realizada la evaluación de la germinación, las plántulas obtenidas en los cuatro sustratos se transfirieron a frascos de vidrio transparente de 9 x 5,5 cm con 20 mL de medio MS autoclavado. Por cada frasco se colocó una plántula. Con una tijera se cortaron las raíces que impedían introducir las plántulas al frasco. En algunos casos, se redujo la altura de las plántulas haciendo un corte transversal en el tallo. Los frascos fueron cerrados con tapas de plástico y se colocó una capa de plástico adhesivo alrededor de la misma.

En ambos experimentos las semillas se cultivaron a 25°C con un fotoperíodo de 12 h luz y oscuridad, con una intensidad lumínica de 55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las semillas que se cultivaron en turba y perlita se cubrieron con el sustrato para tratar de emular las condiciones de siembra en el campo.

4.1.1. Análisis estadístico

Los datos obtenidos no cumplían con los supuestos de normalidad. Se usó un análisis de desviación para ajustes de modelo lineal generalizado (GLM) con Chi cuadrado para una distribución binomial, tomando en cuenta la interacción entre el sustrato y la aplicación del choque térmico, sustrato e imbibición en AG₃, y sustrato y remoción del arilo. Además, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, con un alfa de 0,05, para determinar

si había significancia estadística entre los sustratos utilizados y para encontrar cuáles fueron los mejores tratamientos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa R versión 1.1.447 (Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>).

4.2. Aislamiento de protoplastos de *C. papaya*

4.2.1. Aislamiento de protoplastos a partir de hoja

4.2.1.1. Material vegetal

Se utilizaron plantas in vitro provenientes de semilla de *C. papaya* híbrido Pococí con dos o tres meses de haber germinado y con tres a cinco hojas desarrolladas, obtenidas según lo descrito en la sección 4.1. Las plantas se mantuvieron en medio MS suplementado con tiamina ($0,1 \text{ mgL}^{-1}$), ácido nicotínico ($0,5 \text{ mgL}^{-1}$), piridoxina ($0,5 \text{ mgL}^{-1}$), glicina (2 mgL^{-1}), inositol (100 mgL^{-1}), sacarosa (30 gL^{-1}) y Phytigel™ (2 gL^{-1}) (Sigma-Aldrich) con un pH de 5,8 ajustado con KOH y se transfirieron a medio de cultivo fresco cada 30 días. Se mantuvo las plantas a 25°C con un fotoperiodo de 12 horas luz y oscuridad, con una intensidad lumínica de $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Para los aislamientos de protoplastos se utilizaron hojas verdes jóvenes, sin secciones amarillentas.

4.2.1.2. Preplasmólisis

En frascos tipo Erlenmeyer estériles de 50 mL se agregó 0,2 g de hojas, a las cuales se les había removido con un bisturí la epidermis del envés, y 10 mL de solución para preplasmólisis. La solución de preplasmólisis estuvo compuesta por las sales CPW (Power y Chapman, 1985) y 0,71 M de manitol a pH 5,8 ajustado con KOH, previamente esterilizada con un filtro de $0,2 \mu\text{m}$ (Minisart Syringe Filter, Sartorius, Goettingen, Alemania). Las muestras se mantuvieron en la solución por una hora a 25°C , con una intensidad lumínica de $13 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Transcurrido este período se eliminó la solución con una pipeta Pasteur. En el primer experimento se probó el efecto que produce en el aislamiento de protoplastos el cortar las hojas “en peine”. Para esto, además de eliminar la epidermis de envés, se hicieron cortes desde la vena central hasta el borde de la lámina en secciones de aproximadamente 3 mm.

4.2.1.3. Digestión enzimática

Se utilizó el protocolo propuesto por Lipka (2010) para la preparación de las soluciones enzimáticas, condiciones de agitación y tiempo de digestión. En los tres experimentos realizados se modificó las concentraciones de las enzimas celulasa RS (Origen: *Trichoderma viridae*, Karlan, Estados Unidos), macerozima R10 (Origen: *Rhizopus arrhizus*, Karlan, Estados Unidos) y driselasa (Origen: Basidiomycetes, Karlan, Estados Unidos) (Cuadro 2). Las combinaciones de enzimas probadas fueron propuestas por Litz y Conover (1979), Chen y Chen (1992) y Lipka (2010), que fueron previamente utilizadas para aislar protoplastos de *C. papaya*. Además, se probó un tratamiento adicional, que consistió en agregar a la solución enzimática de Lipka (2010) la concentración de driselasa propuesta por Litz y Conover (1979).

Las soluciones A y E (Cuadro 2) contenían manitol 5 M, ácido 2-morfolinoetanesulfónico (MES) 6,15 mM, CaCl₂ 6,53 mM y NaH₂PO₄ 1,23 mM (Grosser y Gmitter, 1990), más las enzimas correspondientes. En el caso de las soluciones propuestas por Litz y Conover (1979) y Chen y Chen (1992), se prepararon según lo descrito en los artículos. El pH se ajustó a pH 5,8 con KOH y cada solución se esterilizó con filtros de 0,2 µm. A las muestras preplasmolizadas se les adicionó 5 mL de la solución de digestión y se incubaron en agitación a 50 rpm por 16 h en oscuridad a 25°C.

Cuadro 2. Composición de las diferentes soluciones enzimáticas utilizadas en los experimentos para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de *C. papaya*.

Experimento	Solución enzimática	Concentraciones enzimáticas (% m/v)		
		Celulasa	Macerozima	Driselasa
1. Corte en las hojas	A*	1,0	0,50	0,0
	A*	1,0	0,50	0,0
2. Soluciones enzimáticas usadas para <i>C. papaya</i>	C ^y	2,0	0,60	0,2
	D [‡]	2,0	0,50	0,0
3. Adición de driselasa a la solución enzimática A	A*	1,0	0,50	0,0
	E	1,0	0,50	0,2

* Tomado de Lipka (2010). ^y Tomado de Chen y Chen (1992). [‡] Tomado de Litz y Conover (1979).

4.2.1.4. Purificación

Al finalizar la digestión enzimática, se filtró las muestras a través de una malla de 45 µm. Luego, se transfirieron a tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 800 rpm por 6 min a temperatura ambiente. Se

descartó el sobrenadante y se adicionó lentamente al precipitado 3 mL de la solución de CPW con sacarosa ultra pura al 25% m/v a pH 5,8 ajustado con KOH, previamente esterilizada con un filtro de 0,2 μm . Seguidamente, se resuspendió los protoplastos en la solución con una pipeta Pasteur evitando formar burbujas. A continuación, se agregó 3 mL de medio de cultivo MS líquido modificado (MSBSOH) (Anexo 1), suplementado con 0,5 M de manitol a pH 5,8 ajustado con KOH y esterilizado con un filtro de 0,2 μm , con el fin de que se formaran dos fases, y se centrifugó 6 min a 800 rpm. El anillo formado se extrajo con una pipeta Pasteur y se colocó en un nuevo tubo cónico. Al anillo se le adicionó 14 mL de medio MSBSOH, con el fin de eliminar impurezas, se resuspendió los protoplastos y se centrifugó 6 min a 800 rpm. Finalmente, luego de la centrifugación, se dejó la muestra en un volumen final de 0,5 mL.

4.2.1.5. Viabilidad de los protoplastos

Para determinar el número total de protoplastos aislados y su viabilidad, se mezcló en proporción 1:1 los protoplastos aislados (previamente resuspendidos) con la solución de azul de Evans al 0,15% (p/v) (Gaff y Okong'O-Ogola, 1971) en medio CPW con 0,71 M de manitol y se incubó por 5 min. La muestra se colocó en el hemocitómetro (Bright-line Boeco, Hamburgo, Alemania) y se observó bajo el microscopio (CX22LED, Olympus Corp., Tokio, Japón). Los protoplastos teñidos de color azul son considerados no viables, mientras que los protoplastos que no están teñidos son viables. Con los datos obtenidos se procedió a calcular el porcentaje de viabilidad de cada una de las muestras:

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{protoplastos viables}}{\text{total de protoplastos}} \times 100$$

La viabilidad fue calculada a partir del promedio de protoplastos viables y total de protoplastos obtenido de los cuatro cuadros del hemocitómetro. Para el cálculo de protoplastos por mililitro se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{protoplastos/mL} = \text{promedio de protoplastos totales} \times 10\,000 \times 2$$

El promedio de protoplastos totales corresponde al conteo promediado de los protoplastos vivos y muertos de los cuatro cuadros del hemocitómetro. El número 2 es el factor de dilución, ya que la muestra fue diluida por el azul de Evans. Una vez obtenido

el dato de los protoplastos por mililitro se calculó el número de protoplastos por gramo de tejido adicionado:

$$\text{protoplastos/g} = \text{protoplastos/mL} \times \frac{\text{volumen final de la muestra}}{\text{masa de la muestra (g)}}$$

4.2.1.6. Tinción con blanco de calcoflúor

Se evaluó si aún existía la presencia de pared celular, luego del aislamiento, con el tinte CFW. Para esto se utilizó el protocolo descrito por Xu et al. (2013). Los protoplastos fueron resuspendidos, se tomó una muestra de 50 μL y se mezcló con 1 μL de blanco de calcoflúor (6,93 mg/mL), se incubó por 5 min en oscuridad y se colocó en el hemocitómetro. El conteo se realizó en el microscopio invertido con filtro de luz ultravioleta (Axio Vert.A1, Zeiss, Göttingen, Alemania). Los protoplastos que fluorecían total o parcialmente se contabilizaban como células con remanentes de pared celular, mientras que si estos no fluorecían se contemplaban como protoplastos verdaderos. Una vez realizado el conteo se determinó el porcentaje de protoplastos que no brillaban:

$$\% \text{ protoplastos sin brillar} = \frac{\text{protoplastos que no brillan con CFW}}{\text{total de protoplastos}} \times 100$$

En donde, los protoplastos que no brillan con CFW corresponden al promedio de protoplastos que no brillan de los cuatro cuadros del hemocitómetro. El total de protoplastos es el promedio de protoplastos que brillan (fluorescen) y no brillan en los cuadros del hemocitómetro.

4.2.1.7. Diseño experimental y análisis estadístico

Para los experimentos uno y tres se realizaron tres repeticiones por tratamiento, mientras que para el experimento dos se hicieron cuatro repeticiones (Cuadro 2). Debido a que los datos no cumplían con una distribución normal se emplearon análisis no paramétricos. Para los experimentos uno y tres se realizó el análisis no paramétrico de la U de Mann-Whitney, con un alfa de 0,05. Además, para encontrar las diferencias estadísticas se utilizó la prueba de Comparación Múltiple después de Kruskal-Wallis. Para el experimento dos se hizo la prueba de Kruskal-Wallis con un alfa de 0,05. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa R versión 1.1.447 (Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>).

4.2.2. Aislamiento de protoplastos a partir de callo

4.2.2.1. Material vegetal

Se utilizaron callos de *C. papaya* obtenidos a partir de semilla siguiendo la metodología propuesta por Solórzano-Cascante et al. (2018). Las semillas fueron secadas dentro de la cámara de flujo laminar por cinco días y posteriormente se cortaron longitudinalmente. Se sembró las semillas con el corte en contacto con el medio de multiplicación. Dicho medio está compuesto por las sales minerales MS a la mitad de concentración, tiamina ($0,1 \text{ mgL}^{-1}$), ácido nicotínico ($0,5 \text{ mgL}^{-1}$), piridoxina ($0,5 \text{ mgL}^{-1}$), glicina (2 mgL^{-1}), inositol (100 mgL^{-1}), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (2 mgL^{-1}), sacarosa (30 gL^{-1}) y Phytigel (2 gL^{-1}) (Sigma-Aldrich), con un pH de 5,8 ajustado con KOH (Solórzano-Cascante et al., 2018). Las placas de Petri con las semillas se mantuvieron en oscuridad a 25°C por dos meses. Los callos obtenidos se transfirieron cada mes a medio de cultivo fresco. En todos los casos se utilizaron callos con embriones para los aislamientos (Fig.1).



Figura 1. Callo embriogénico de *C. papaya* utilizado para el aislamiento de protoplastos. La barra indica 0,5 cm.

4.2.2.2. Preplasmólisis

Se utilizó el mismo procedimiento descrito en la sección 4.2.1.2 para las hojas; sin embargo, se modificó la cantidad de tejido inicial a 1 g de callo. Se tomaron secciones de callo, hasta alcanzar 1 g de tejido, con una pinza y se agregaron cuidadosamente en el Erlenmeyer, evitando hacer presión para no dañar el tejido.

4.2.2.3. Digestión enzimática

Se empleó el mismo procedimiento descrito en la sección 4.2.1.3. Se probaron las soluciones enzimáticas propuestas por Chen y Chen (1992), Zhang et al. (2011) y la

solución enzimática F (Cuadro 3) utilizada para el aislamiento de protoplastos de *Vasconcellea*. Para esta última solución se modificó la concentración de celulasa RS (Origen: *Trichoderma viridae*, Karlan, Estados Unidos), macerozima R10 (Origen: *Rhizopus arrhizus*, Karlan, Estados Unidos), hemicelulasa (Origen: *Aspergillus niger*, Sigma, Estados Unidos) y driselasa (Origen: *Basidiomycetes*, Karlan, Estados Unidos) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Composición de las diferentes soluciones enzimáticas utilizadas en los experimentos para el aislamiento de protoplastos a partir de callo de *C. papaya*.

Solución enzimática	Concentraciones enzimáticas (% m/v)			
	Celulasa	Macerozima	Hemicelulasa	Driselasa
C ^y	2,0	0,6	0,0	0,2
F	1,0	0,5	1,0	0,0
J ^ϕ	1,2	0,3	0,0	0,0

^y Tomado de Chen y Chen (1992). ^ϕ Tomado de Zhang et al. (2011).

4.2.2.4. Purificación

Se realizó según lo explicado en la sección 4.2.1.4. para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de *C. papaya*.

4.2.2.5. Evaluación de los protoplastos aislados

Se realizó según lo explicado en las secciones 4.2.1.5 y 4.2.1.6 para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de *C. papaya*.

4.2.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Debido a que los datos no cumplían con una distribución normal, se empleó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis con un alfa de 0,05. Las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa R versión 1.1.447 (Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>).

4.3. Aislamiento de protoplastos de *Vasconcellea* sp.

4.3.1. Material vegetal

Se utilizaron callos de *Vasconcellea* sp. provenientes de semilla con cinco años de ser mantenidos en el Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) en medio de cultivo de multiplicación, descrito en la sección

4.2.2.1 (Solórzano-Cascante et al., 2018). Adicionalmente, se introdujo semillas provenientes del Microbeneficio *Passiflora* (Santa Cruz, León Cortés, San José) según lo descrito en la sección 4.1, para tener más material disponible. Se mantuvo los callos en oscuridad a 25°C. Para cada aislamiento de protoplastos se utilizó callos con 14 días de haber sido transferidos a medio de cultivo fresco.

En los primeros cuatro experimentos se utilizaron callos con apariencia friable (Fig. 2a). En el experimento cinco se probaron dos tipos de callos, friables (Fig. 2a) y con apariencia embriogénica (Fig. 2b), para determinar si esto tiene una influencia en el rendimiento de protoplastos.

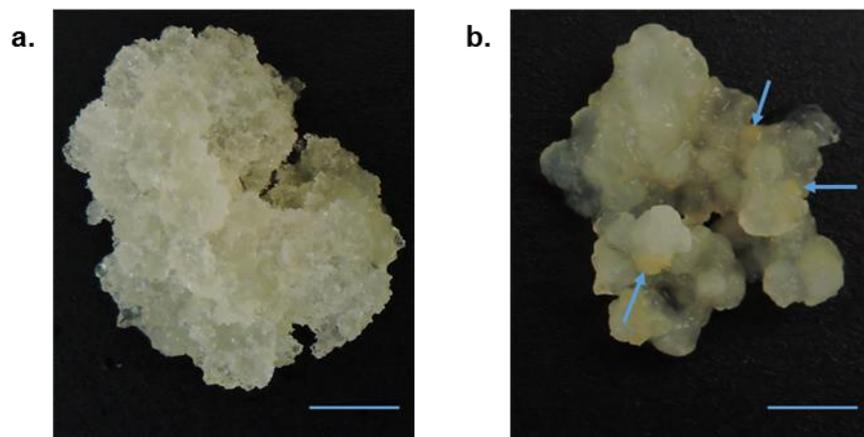


Figura 2. Callos de *Vasconcellea* sp. con apariencia friable y **b)** embriogénica, utilizados para el aislamiento de protoplastos. La barra indica 0,5 cm y las flechas posibles estructuras embriogénicas.

4.3.2. Preplasmólisis

Se utilizó el mismo procedimiento descrito en la sección 4.2.2.2. En total, se realizaron cinco aislamientos de protoplastos. Las muestras de callo se tomaron al azar, seleccionando únicamente el tipo de callo a probar (Fig. 2). Con una pinza, se tomaron secciones de callo, hasta alcanzar 1 g de tejido, y se agregaron cuidadosamente en el Erlenmeyer, evitando cortar el tejido con la pinza o hacer presión; esto debido a que los callos se pueden oxidar fácilmente al ser manipulados, lo cual es contraproducente para el aislamiento de los protoplastos.

4.3.3. Digestión enzimática

Se empleó el mismo procedimiento descrito en la sección 4.2.1.3. En el primer experimento se probaron tres concentraciones de celulasa RS para determinar cuál de estas favoreció en mayor medida el aislamiento de protoplastos. Con respecto al segundo ensayo, se hizo la prueba de agregar 0,5% m/v de hemicelulasa (Origen: *Aspergillus niger*, Sigma, Estados Unidos) a la solución enzimática. En los experimentos restantes se realizaron pruebas de diferentes concentraciones de hemicelulasa, además de 1% m/v de celulasa y 0,5% m/v de macerozima, ya que se observó que esta enzima mejora el rendimiento del aislamiento (Cuadro 4).

Cuadro 4. Composición de las diferentes soluciones enzimáticas utilizadas en los experimentos para el aislamiento de protoplastos a partir de callo de *Vasconcellea* sp.

Experimento	Solución enzimática	Concentraciones enzimáticas (% m/v)		
		Celulasa	Macerozima	Hemicelulasa
1. Concentración de celulasa	A*	1,0	0,5	0,00
	B	1,5	0,5	0,00
	C	2,0	0,5	0,00
2. Concentración de hemicelulasa 0-0,5% m/v	A	1,0	0,5	0,00
	D	1,0	0,5	0,50
3. Concentración hemicelulasa 0,25-1% m/v	E	1,0	0,5	0,25
	D	1,0	0,5	0,50
	F	1,0	0,5	1,00
4. Concentración hemicelulasa 1-1,5% m/v	F	1,0	0,5	1,00
	G	1,0	0,5	1,25
	H	1,0	0,5	1,50
5. Prueba tipo de callo y hemicelulasa	F	1,0	0,5	1,00
	H	1,0	0,5	1,50

* Tomado de Lipka (2010).

4.3.4. Purificación

Se realizó según lo explicado en la sección 4.2.1.4 para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de *C. papaya*.

4.3.5. Evaluación de los protoplastos aislados

Se realizó según lo explicado en las secciones 4.2.1.5 y 4.2.1.6 para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de *C. papaya*.

4.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico

En cada experimento (Cuadro 4) se realizaron tres repeticiones por tratamiento, excepto en los experimentos dos y tres, en donde se hicieron seis repeticiones. Como los datos obtenidos no cumplían con los supuestos de normalidad, se empleó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, con un alfa de 0,05, en los experimentos uno, tres y cuatro, mientras que en los experimentos dos y cinco se realizó el análisis no paramétrico de la U de Mann-Whitney, con un alfa de 0,05. Para determinar las diferencias estadísticas se utilizó la prueba de Comparación Múltiple después de Kruskal-Wallis. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa R versión 1.1.447 (Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>).

4.4. Electrofusión de protoplastos y detección de posibles fusionantes entre *C. papaya* y *Vasconcellea* sp.

4.4.1. Electrofusión de protoplastos

4.4.1.1. Viabilidad de los protoplastos en soluciones de fusión

Se realizaron dos experimentos con el fin de determinar si las soluciones de fusión afectan la viabilidad de los protoplastos. Para ambos experimentos se aislaron protoplastos de callo con apariencia embriogénica de *C. papaya* y friables de *Vasconcellea* sp. utilizando la solución enzimática F (Cuadro 4), siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2. Una vez finalizado el aislamiento se tomó 100 μ L de protoplastos y se centrifugó por 2 min a 800 rpm (MiniSpin Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Finalizada la centrifugación se eliminó el medio de cultivo y se reemplazó por 100 μ L de la solución de fusión correspondiente. Transcurridos 10 o 15 min, según corresponda en el experimento, se evaluó la viabilidad con azul de Evans (según la sección 4.2.1.5). Como testigo se utilizaron los protoplastos aislados, mantenidos en el medio MSBSOH.

En el primer experimento se probó el efecto en la viabilidad de los protoplastos al exponerlos a 90, 150 o 200 mOsmol/kg de la solución de fusión Eppendorf para células eucariotas compuesta por una mezcla de las soluciones hipoosmolar (N° producto: 940002001) e isoosmolar (N° producto: 940002109) (Anexo 2) por 15 min. La solución de fusión Eppendorf para células eucariotas es la recomendada para realizar la

electrofusión con el electroporador disponible (Multiporator, Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Con respecto al segundo experimento, se probó el efecto en la viabilidad de los protoplastos al exponerlos a soluciones de fusión que han demostrado ser efectivas para la electrofusión de otras especies. Se expusieron los protoplastos a las soluciones propuestas por Yu et al. (2013), Duquenne et al. (2007), Bates et al. (1983) (Anexo 3); además, se incluyó la solución Eppendorf de 90 mOsmol/kg. En este caso, se expuso los protoplastos por 10 min a la solución correspondiente. Adicionalmente, se midió la conductividad eléctrica de las soluciones (Waterproof Tester, Hanna Instruments, Rhode Island, EE. UU), excepto a la solución Eppendorf de 90 mOsmol/kg por el poco volumen con el que se contaba.

Diseño experimental y análisis estadístico

En ambos experimentos se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Debido a que los datos no cumplen con una distribución normal, se empleó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis con un alfa de 0,05. Las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa R versión 1.1.447 (Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>).

4.4.1.2. Fusión de protoplastos sin tomar en cuenta el diámetro celular como factor

Se realizaron dos pruebas para observar el comportamiento de los protoplastos en las soluciones de fusión propuestas por Yu et al. (2013), Duquenne et al. (2007) y Bates et al. (1983) (Anexo 3). Para ambos experimentos se aislaron protoplastos siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2. En el primer experimento se aislaron protoplastos de hojas de *C. papaya* y callos de *Vasconcellea* sp. Con respecto al segundo experimento, se aislaron protoplastos de callos de *C. papaya* con apariencia embriogénica y para *Vasconcellea* sp. friables. Para aislar los protoplastos de hojas se utilizó la solución enzimática propuesta por Lipka (2010) y para los callos la solución F (Cuadro 3). En ambos experimentos se tomó 100 μ L de protoplastos, con la concentración ajustada según cada experimento. Para ajustar la concentración de los protoplastos se mezcló en un único tubo los protoplastos obtenidos en las tres repeticiones realizadas, se centrifugó por 6 min a 800 rpm y luego se diluyó con medio

MSBSOH con el volumen requerido para obtener la misma concentración en ambas especies.

Una vez ajustada la concentración de protoplastos, se centrifugó (Minispin, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) por 6 min a 800 rpm para eliminar el medio de cultivo de la muestra. Una vez finalizada la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se agregó 100 μL de la solución de fusión indicada más adelante. La muestra se resuspendió sin formar burbujas y se cargó 25 μL en la microcámara de fusión de 200 μm de ancho (Helix fusion chamber, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Seguidamente se aplicó el voltaje correspondiente. Según el manual básico para la aplicación de la electrofusión (Eppendorf, 2007) no se recomienda exponer los protoplastos por más de 15 min a la solución de fusión, por lo que no se sobrepasó este período de tiempo.

En la primera prueba realizada se utilizó únicamente la solución de fusión de Bates et al. (1983). Se ajustó la concentración de los protoplastos aislados de hojas de *C. papaya* y callos de *Vasconcellea* sp. a $1,78 \times 10^6$ protoplastos/mL. Una vez ajustada la concentración, en un tubo de 0,2 mL se mezcló 100 μL de protoplastos de cada especie, se centrifugó por 6 min a 800 rpm y se eliminó 100 μL del sobrenadante, para mantener la concentración inicial de protoplastos de cada especie. La muestra se resuspendió y se cargó en la microcámara de fusión, según lo explicado anteriormente. Para alinear los protoplastos se aplicó 7 V por 20 s, seguido por cinco choques de 30 V por 30 μs y un post-alineamiento de 5 V por 25 s. Se realizó tres repeticiones.

En la segunda prueba de fusión se utilizaron protoplastos aislados de callos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. Además, se probaron las soluciones de fusión propuestas por Yu et al. (2013), Duquenne et al. (2007) y Bates et al. (1983). A diferencia de la prueba anterior, luego de centrifugar y eliminar el medio de cultivo se realizó un lavado con la solución de fusión correspondiente. Para esto se resuspendieron los protoplastos en la solución de fusión, se centrifugó por 6 min a 800 rpm, se eliminó el sobrenadante y se agregó nuevamente la solución de fusión. Posteriormente se cargó 25 μL de muestra en la microcámara de fusión. Primeramente, se intentó fusionar protoplastos de *Vasconcellea* sp. entre sí a una concentración de $3,6 \times 10^5$ protoplastos/mL, la cual se ajustó igual que en el primer experimento. Se aplicó un alineamiento de 5 V por 30 s, seguido de dos choques eléctricos por 15 μs con 30 V, y por último 5 V por 30 s, según los parámetros recomendados por el fabricante del electrofusionador. Por otra parte, se

probó fusionar protoplastos de *C. papaya* con *Vasconcellea* sp., mezclados según lo descrito anteriormente. Para esto se usó una concentración de $2,6 \times 10^5$ protoplastos/mL. Se mantuvieron las mismas condiciones eléctricas de fusión. El experimento se realizó por triplicado.

4.4.1.3. Fusión de protoplastos tomando en cuenta el diámetro celular

Cálculo del diámetro de los protoplastos y voltaje requerido para la electrofusión

Para el cálculo del diámetro de los protoplastos y el voltaje requerido para realizar la electrofusión se siguió el protocolo publicado en el manual básico para la aplicación de la electrofusión (Eppendorf, 2007) del electroporador que se utilizó para realizar las pruebas. Se utilizaron protoplastos aislados de callo de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. utilizando la solución enzimática F (Cuadro 4), siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2.

Para calcular el diámetro, se expuso los protoplastos por 10 min a las soluciones de fusión de Yu et al. (2013) y Bates et al. (1983) (Anexo 3). Además, se midió el diámetro celular de los protoplastos en medio MSBSOH como medida inicial. Transcurrido este período de tiempo se midió el diámetro celular con el software cellSens Standard (versión 2.3) de la cámara fotográfica DP74 (Olympus, Tokio, Japón) acoplada al microscopio invertido Axio Vert.A1 (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Por cada tratamiento se midió 20 protoplastos.

Para calcular el voltaje requerido para la fusión se determinó primeramente la intensidad crítica de campo eléctrico (E_c) con la siguiente fórmula:

$$E_c = \left(\frac{V_c}{0,75 \times d} \right) \cdot 2$$

En donde E_c es la intensidad de campo crítica (V/cm), V_c es el voltaje de permeación (1 V a 22°C) y d es el diámetro del protoplasto (cm), el cual ya fue previamente calculado para cada especie. El resultado obtenido se multiplicó por dos para garantizar que dos o tres células se fusionen. Seguidamente, con el valor calculado de E_c , se determinó el voltaje requerido para la fusión, para esto se usó la relación indicada en el manual, en donde se indica que se deben utilizar 27 V para 1334 V/cm si se utiliza una cámara de fusión de 200 μm .

Experimento de electrofusión de protoplastos

Para realizar las pruebas de fusión se aislaron protoplastos de callos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. con la solución enzimática F (Cuadro 4), siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2. Primeramente, se mezclaron partes iguales de protoplastos de *C. papaya* a una concentración de $8,05 \times 10^5 \pm 1,56 \times 10^5$ protoplastos·mL⁻¹ con *Vasconcellea* sp. a una concentración de $8,60 \times 10^5 \pm 1,86 \times 10^5$ protoplastos·mL⁻¹. La concentración fue ajustada según lo descrito al inicio de esta sección.

De la mezcla de protoplastos se tomó 25 µL y se centrifugó (Minispin, Eppendorf, Alemania) por 3 min a 800 rpm. El sobrenadante fue eliminado y se reemplazó con 25 µL de la solución de fusión de Yu et al. (2013) o Bates et al. (1983). La muestra de 25 µL se colocó en la microcámara de fusión de 200 µm de ancho (Helix fusion chamber) y se procedió a realizar las pruebas de fusión. Para esto se probó el voltaje de fusión calculado para cada especie y un voltaje promedio.

Por cada uno de los voltajes calculados se modificó la duración y número de pulsos de fusión. En total se hicieron tres pruebas de fusión por cada uno de los voltajes. En la primera prueba se aplicaron tres pulsos por 30 µs, en la segunda prueba dos pulsos por 30 µs y en la tercera prueba tres pulsos por 25 µs. Para el alineamiento y post-alineamiento de los protoplastos se aplicó 5 V por 30 s, según lo recomendado en el manual básico para la aplicación de la electrofusión (Eppendorf, 2007). Cabe destacar que la muestra se mantuvo menos de 10 min en la solución de fusión para evitar que ocurriera una pérdida de viabilidad de los protoplastos. El proceso de la fusión fue grabado y posteriormente fotografiado con el software cellSens de la cámara fotográfica DP74 (Olympus) acoplada al microscopio invertido Axio Vert.A1 (Zeiss). Adicionalmente, se determinó visualmente si en la muestra se formaron cadenas con protoplastos de tamaño similar o con protoplastos de mayor y menor tamaño intercalados. Por último, se visualizó si, luego del proceso de electrofusión, los protoplastos se mantenían unidos entre sí con protoplastos de tamaño similar (Fig. 3a), diferente tamaño (Fig. 3b) o estaban fusionados (Fig. 3c). Se contabilizó como protoplastos fusionados a aquellos en los que se vio una invaginación entre sus membranas.

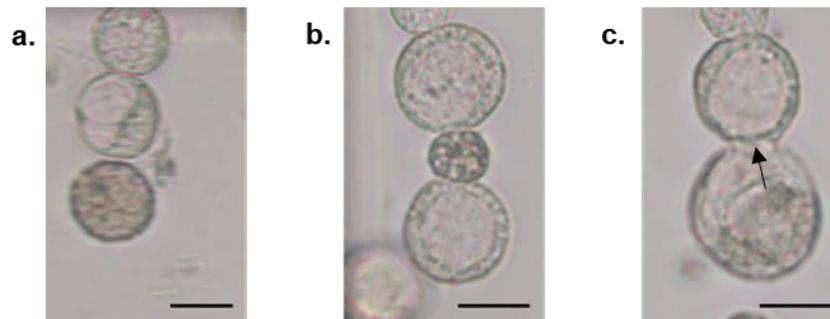


Figura 3. Protoplastos unidos luego de realizar el proceso de electrofusión de tamaño **a)** similar, **b)** diferente tamaño, y **c)** fusionados. La flecha indica punto de invaginación entre los protoplastos

Diseño del experimento y análisis estadístico

Se midió el diámetro (μm) de 20 protoplastos por especie para cada una de las soluciones de fusión y testigo. Posteriormente se realizó el análisis estadístico no paramétrico de la U de Mann-Whitney, con un alfa de 0,05 para determinar si había diferencias significativas en el tamaño de los protoplastos de cada especie en las distintas soluciones. Adicionalmente, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, con un alfa de 0,05 y la prueba de Tukey, con un alfa de 0,05, para determinar si el tamaño de los protoplastos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp., se modificó de acuerdo con la solución en la que se encontraban. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa R versión 1.1.447 (Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>).

4.4.2 Detección molecular de posibles fusionantes mediante PCR-RFLP

4.4.2.1. Aislamiento de ADN

Para extraer el ADN se utilizó el protocolo publicado por Araya-Valverde et al. (2019), al que se le modificó la cantidad de tejido inicial y el método de maceración del tejido. Esta metodología está basada en el protocolo de bromuro de etil trimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés) (Doyle y Doyle, 1990). El ADN fue extraído por triplicado de callos de *C. papaya* híbrido Pococí y *Vasconcellea* sp. Previo a la extracción de ADN los callos fueron congelados por 1 h a -20°C y luego liofilizados (Christ Alpha 1-2/LD, Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, Alemania).

En un tubo de 2 mL se agregó 100 mg de tejido liofilizado y un balín de acero inoxidable de 5 mm de diámetro para macerarlo en el molino mecánico (MM 400, Retsch, Haan,

Alemania) durante un minuto a 26 Hz. Seguidamente, se agregó a cada muestra 750 μ L del buffer de extracción compuesto por 20 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (pH 8,0); 100 mM de Tris (pH 8,0); 2% de polivinilpirrolidona (PVP), 2% m/v de CTAB; 1,4 M de NaCl y 0,2% v/v de β -mercaptoetanol. A continuación, se incubaron las muestras por 20 min a 65°C. Finalizada la incubación, se agregó 750 μ L de la solución cloroformo:octanol (24:1) y se mezcló invirtiendo los tubos 100 veces. Seguidamente se centrifugó las muestras por 5 min a 13 000 rpm (Centrífuga 5415 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). En un nuevo tubo de 1,5 mL se agregó 300 μ L del sobrenadante y 300 μ L de isopropanol frío, y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó las muestras por 5 min a 13 000 rpm y se descartó el isopropanol. El ADN precipitado se lavó con 500 μ L de etanol al 70% v/v frío y se centrifugó por 2 min a 13 000 rpm. El precipitado de ADN obtenido se mantuvo a 37°C hasta que se secó. Finalmente, se rehidrataron las muestras con 50 μ L de agua ultra pura y se determinó la concentración y pureza del ADN con el nanofotómetro (NanoPhotometer Pearl, Implent GmbH, Múnich, Alemania).

4.4.2.2. Amplificación mediante PCR de regiones ribosomales y citoplasmáticas.

Debido a que el proceso de electrofusión es aleatorio, se amplificaron marcadores moleculares ribosomales y citoplasmáticos, para determinar si estos permiten identificar posibles fusionantes interespecíficos. Algunos de estos marcadores han sido utilizados previamente en estudios filogenéticos y evolutivos de la familia Caricaceae (van Droogenbroeck et al, 2004; Kyndt et al., 2005). Se probaron las combinaciones de imprimadores de secuencias del ADN ribosomal nuclear *ITS1-ITS4*, *1406F-ITS2*, *ITS1-ITS2*, *ITS3-ITS4*, además de los imprimadores citoplasmáticos del cloroplasto *trnL-trnF* y *trnK1-trnK2* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Secuencias de los imprimadores utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. mediante PCR de tiempo final.

Gen	Secuencia (5'-3')	Referencia
<i>ITS1</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCCG	White et al. (1990)
<i>ITS2</i>	GCTGCGTTCTTCATCGATAC	Soltis y Kuzoff (1995)
<i>ITS3</i>	GCATCGATGAAGAACGCAGC	Soltis y Kuzoff (1995)
<i>ITS4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
<i>trnL</i>	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	Taberlet et al. (1991)
<i>trnF</i>	ATTTGAACTGGTGACACGAG	Taberlet et al. (1991)
<i>trnK1</i>	GGGTTGCCCGGACTCGAAC	van Droogenbroeck et al. (2004)
<i>trnK2</i>	CAACGGTAGAGTACTCGGCTTTTA	van Droogenbroeck et al. (2004)

Cada reacción de PCR se llevó a cabo con un volumen de 25 µL conteniendo una concentración final de 1X de Dream Taq Buffer 10X (Thermo Fisher Scientific Inc.), 0,15 mM de dinucleótidos (dNTP's), 0,19 µM del cebador directo y reverso, 0,02 U/µL de la polimerasa Dream Taq (Thermo Fisher Scientific Inc.), 50-100 ng aproximadamente de ADN genómico y agua ultrapura libre de nucleasas. La amplificación se llevó en el termociclador de tiempo final Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con ciclos térmicos específicos para cada par de cebadores (Cuadro 6).

Cuadro 6. Ciclos térmicos para las reacciones de PCR con los imprimadores ribosomales (*ITS1-ITS4*, *1406F-ITS2*, *ITS1-ITS2* y *ITS3-ITS4*) y citoplasmáticos (*trnL-trnF* y *trnK1-K2*).

Fases PCR	Ribosomales			Citoplasmáticos		
	T	Temp (°C)	Ciclos	T	Temp (°C)	Ciclos
Desnaturalización inicial	90 s	95	1	5 min	94	1
Desnaturalización	50 s	95		1 min	94	34
Alineamiento	70 s	55	30	1 min	60	34
Elongación	90 s	72		2 min	72	34
Elongación final	10 min	72	1	10 min	72	1

T: tiempo, Temp: temperatura

4.4.2.3. Electroforesis de los productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa (TopVision Agarose, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) al 1,5% m/v preparado con buffer TBE 0,5 M, pH 8. En el gel se cargó 5 µL del producto de PCR y 2 µL de buffer de carga. El buffer de carga estuvo compuesto por 98,5 µL de Loading Dye 6X (Thermo Fisher Scientific Inc.) y 1,5 µL de GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, Ca). Se empleó el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.). La electroforesis se corrió en un campo eléctrico de 90 V por 1,5 h. Finalizado este

periodo de tiempo, se visualizó el resultado en el fotodocumentador de luz UV (Gel Solo, Analytik Jena, Florida, Estados Unidos).

4.4.2.4. Búsqueda de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción mediante PCR-RFLP

Los productos de PCR obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* (H), *DraI* (D), *EcoRI* (E), *RsaI* (R), *HindIII* combinada con *DraI* (HD), *HindIII* combinada con *RsaI* (HR), y *HindIII* combinada con *DraI* y *RsaI* (HDR). La enzima *RsaI* fue seleccionada debido a que es isoesquizómero de la enzima *AfaI*, con la cual se encontró polimorfismos entre *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. (van Droogenbroeck et al., 2004). Las enzimas restantes fueron utilizadas debido a que estaban disponibles en el laboratorio. La digestión fue realizada según las instrucciones provistas por el fabricante, Thermo Scientific, para cada una de enzimas. Finalizado el proceso de digestión se visualizaron los resultados mediante electroforesis, siguiendo la metodología descrita en la sección 4.4.2.3.

4.4.2.5. Identificación molecular de la especie de *Vasconcellea* sp.

Se envió a secuenciar, mediante secuenciación de Sanger, los productos de PCR obtenidos al amplificar la región cloroplástica *trnL-trnF* y la región ribosomal *ITS3-307R* a MacroGen Inc. en Corea. Dichos productos fueron previamente purificados con el kit GeneJet Gel Extracción (Thermo Fisher Scientific Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenidas las secuencias, se editó y alineó las secuencias directas y reversas para cada par de cebadores con el programa bioinformático BioEdit Sequence Alignment Editor (versión 7.6.2). Para reconocer la identidad taxonómica preliminar, las secuencias fueron sometidas en el algoritmo en línea BLASTn (Altschul et al. 1990), mediante parámetros por defecto (NCBI, Bethesda, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa MAFFT v7.308 (Kato y Standley, 2013) aplicando el método iterativo de refinamiento G-INS-i (1PAM/k= 2), seguido de una selección de bloques conservados mediante parámetros menos estrictos empleando el programa Gblocks (Castresana, 2000). Las matrices de bloques obtenidos de las secuencias *ITS3-307R* (354 posiciones informativas) y *trnL-trnF* (427 posiciones informativas) se evaluaron para obtener el modelo de mejor ajuste de acuerdo a un modelo bayesiano (BIC) mediante el programa ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) arrojando que el mejor modelo para *ITS3-*

307R fue el K3Pu+F+G4 y para *trnL-trnF* fue TPM2+F. Seguidamente, se utilizó la plataforma en línea IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>) (Nguyen et al., 2015, Trifinopoulos et al., 2016) para inferir topologías de posicionamiento filogenético por máxima verosimilitud empleando un algoritmo estocástico. Los parámetros empleados para la inferencia filogenética fueron el uso de heterogeneidad de tasa libre, cálculo de soporte de los nodos derivado del método bootstrap UFboot de 5000 permutaciones (Minh et al., 2013), con un máximo de 5000 iteraciones y un test de rama única (SH-aLRT) con 5000 réplicas. Finalmente, los árboles obtenidos se visualizaron y editaron con el programa FigTree v1.4.

Adicionalmente, se complementó la identificación molecular con una identificación morfológica, en donde se compararon fotografías de la planta y frutos utilizados para extraer las semillas que se usaron para inducir los callos con las características morfológicas de las hojas y frutos descritas por Badillo (1971).

4.5. Cultivo y regeneración de protoplastos

4.5.1. Regeneración de la pared celular de los protoplastos

Para darle seguimiento al proceso de regeneración de la pared celular se aislaron protoplastos de callos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2. Para el aislamiento se utilizó la solución enzimática F (Cuadro 4) y el medio de cultivo MSBSOH (Anexo 1). Para ambas especies se cultivaron los protoplastos con una concentración no menor a $1,0 \times 10^5$ protoplastos·mL⁻¹. Una vez ajustada la concentración, se transfirió las muestras a tubos de 1,5 mL estériles y se centrifugó (Minispin, Eppendorf) por 6 min a 800 rpm. Seguidamente, se removió el medio de cultivo utilizado en el aislamiento y se reemplazó con el mismo volumen del medio de cultivo correspondiente a cada tratamiento.

La curva de regeneración de la pared celular se realizó utilizando los siguientes medios de cultivo como tratamientos: MSBSOH suplementado con 10,7 μ M de ácido naftalenacético (ANA) y 2 μ M de 6-bencilaminopurina (BAP) (MSBS+ANA+BAP) (Lipka, 2010), MSBSOH suplementado con 2,3 μ M de 2,4-D (MSBS+ANA+BAP+2,4-D) (Fitch, 1993), MSBSOH solo con 2,3 μ M de 2,4-D (MSBS+2,4-D) y medio KM8P-S (Kao y Michayluk, 1975) modificado por Chen y Chen (1992). Para realizar el cultivo se colocó 100 μ L de protoplastos con el medio de cultivo respectivo en una placa de Petri plástica

de 60 x 15 mm estéril. Las muestras se colocaron sobre placas de Petri de vidrio dentro de una caja plástica con servilletas húmedas. Las placas de Petri de vidrio se colocaron para que las muestras no estuvieran en contacto directo con la servilleta húmeda. La caja se mantuvo en la oscuridad. Para evaluar la regeneración de la pared celular se realizó la prueba de blanco de calcoflúor descrita en la sección 4.2.1.6. a todas las muestras al finalizar el aislamiento de los protoplastos y luego cada 24 h.

4.5.1.1. Diseño experimental y análisis estadístico

Por cada tratamiento se realizaron 12 repeticiones. Cada 24 h se tomaron dos repeticiones por tratamiento para realizar la prueba de blanco de calcoflúor hasta alcanzar las 144 h transcurridas después de haber realizado la primera evaluación. En total se realizaron seis evaluaciones a través del tiempo, más la evaluación inicial. Con los datos obtenidos a las 144 h se realizó un análisis estadístico para determinar si existían diferencias entre los medios de cultivo probados. Debido a que los datos no cumplían con la distribución normal se aplicó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis con un alfa de 0,05. Las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa R versión 1.1.447 (Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>).

4.5.2. Reducción del contenido de manitol en el cultivo de protoplastos

Para determinar el efecto que genera la reducción del contenido de manitol en el cultivo de los protoplastos, se aislaron protoplastos de callos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2. Para el aislamiento se utilizó la solución enzimática F (Cuadro 3) y el medio de cultivo MSBSOH (Anexo 1). Seguidamente, se reemplazó el medio MSBSOH por KM8P-S (Chen y Chen, 1992) y se cultivó las muestras en placas Petri según lo descrito en la sección 4.5.1.

Luego de 72 h de cultivo se redujo el contenido de manitol en 50 (0,686 mM), 25 (1,029 mM) o 0% (1,372 mM). Para esto se agregó medio KM8P-S sin manitol en los tratamientos con reducción de 50 y 25%, mientras que en el tratamiento con reducción de 0% se agregó medio KM8P-S con manitol. El volumen final de cada tratamiento pasó a ser de 200 μ L. Luego de un mes y medio se fotografiaron los cultivos, en la zona con mayor densidad celular, con la cámara fotográfica DP74 (Olympus) acoplada al

microscopio invertido Axio Vert.A1 (Zeiss). Se analizaron las fotografías obtenidas con el programa ImageJ (1.48 V) para determinar el área ocupada por las microcolonias.

4.5.2.1. Diseño experimental y análisis estadístico

Por cada tratamiento se realizaron cinco repeticiones por especie. Debido a que los datos del área no eran normales se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis con un alfa de 0,05. La prueba fue realizada con el programa R versión 1.1.447 (Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>).

5. Resultados

5.1. Germinación de semillas de *C. papaya* in vitro

En relación con la primera introducción de semillas para la obtención de plantas in vitro de *C. papaya* var. Pococí, solamente en seis de las 70 semillas se obtuvieron plantas luego de 45 días de haber iniciado el experimento.

Por otra parte, con la segunda introducción de semillas se encontró que, de los sustratos evaluados, la mezcla turba:perlita (T:P), el papel de germinación (P) y el agar-agua (AA) presentaron porcentajes de germinación significativamente mayores al medio de cultivo MS (MS) ($p=0.0006$), que presentó el menor porcentaje de germinación (Fig. 4a). Cabe destacar que las plantas cultivadas sobre papel de germinación (P), al carecer de un soporte sólido, presentaron crecimiento desordenado, por lo que es preferible optar por la mezcla turba:perlita (T:P) o el agar-agua (AA) (Fig. 5 y Fig. 6).

Adicionalmente, se encontró que la aplicación del choque térmico de 35°C en las semillas germinadas en la mezclaturba:perlita (T:P) y agar-agua (AA) permitió obtener los porcentajes de germinación más altos, siendo estos de 96 y 89% ($p=0,7733$), respectivamente. En ausencia del choque térmico, el porcentaje de germinación fue significativamente menor con 4,81% en agar-agua, 4,81% en MS y 21,86% en la mezcla de turba:perlita (Fig. 4b).

La aplicación de 500 ppm de AG_3 por dos horas en las semillas no generó un incremento ni reducción en la germinación al utilizar agar-agua (AA) ($p=0,9738$), MS ($p=0,2343$), papel de germinación (P) ($p=0,9255$) o turba:perlita (T:P) ($p=1,0000$) (Fig. 4c). Al igual que con el AG_3 , el arilo no fue un factor determinante para la germinación de las semillas cultivadas en agar-agua (AA) ($p=0,9999$), MS ($p=0,0986$) y turba:perlita (T:P) ($p=0,6958$). Sin embargo, al utilizar en papel de germinación (P) se encontró que las semillas sin arilo presentaron una germinación de 77,78% que fue significativamente mayor con respecto a las semillas en las que no se removió esta estructura, ya que su germinación fue de 51,39% ($p=0,0247$) (Fig. 4d).

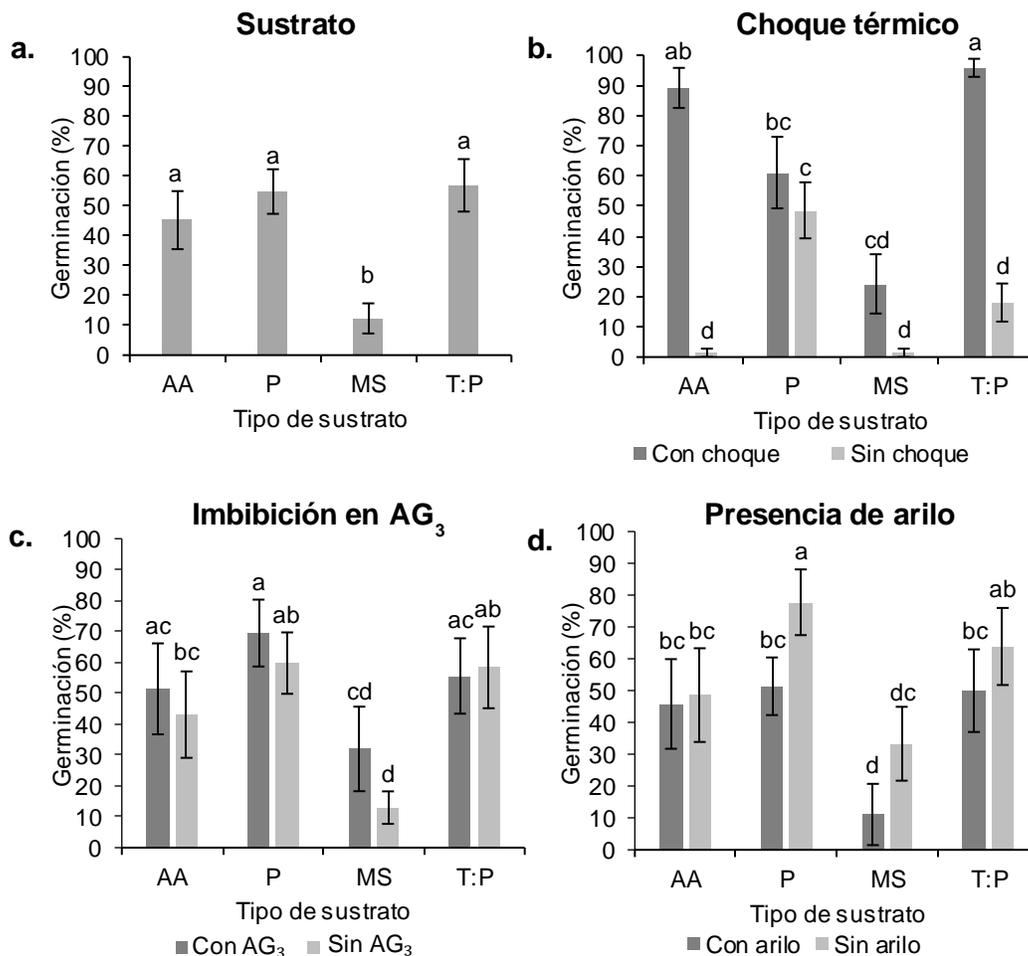


Figura 4. Germinación de semillas de *C. papaya* en **a)** diferentes sustratos, **b)** al aplicarles un choque térmico de 35°C luego de cinco días de haber iniciado el experimento, **c)** al aplicarles 500 ppm de AG₃ por dos horas y **d)** al removerle o no el arilo, luego de 30 días de haber iniciado el experimento.

AA: agar-agua, **P:** papel, **MS:** medio de cultivo MS, **T:P:** turba:perlita (1:1). Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos, la prueba de Chi-cuadrado con un 95% de confianza, n = 24. Las barras indican el error estándar.

Globalmente, los mejores tratamientos resultaron ser las semillas sin arilo tratadas con AG₃ y las tratadas con choque térmico cultivadas en agar-agua, papel de germinación y sustrato; además de las semillas con arilo y sin arilo a las que se les aplicó choque térmico y se cultivaron en sustrato. El menor porcentaje de plantas se obtuvo en los tratamientos de agar-agua y medio MS sin haber aplicado el choque térmico, en ninguno de los seis casos (Cuadro 7, Fig. 5 y Fig. 6).

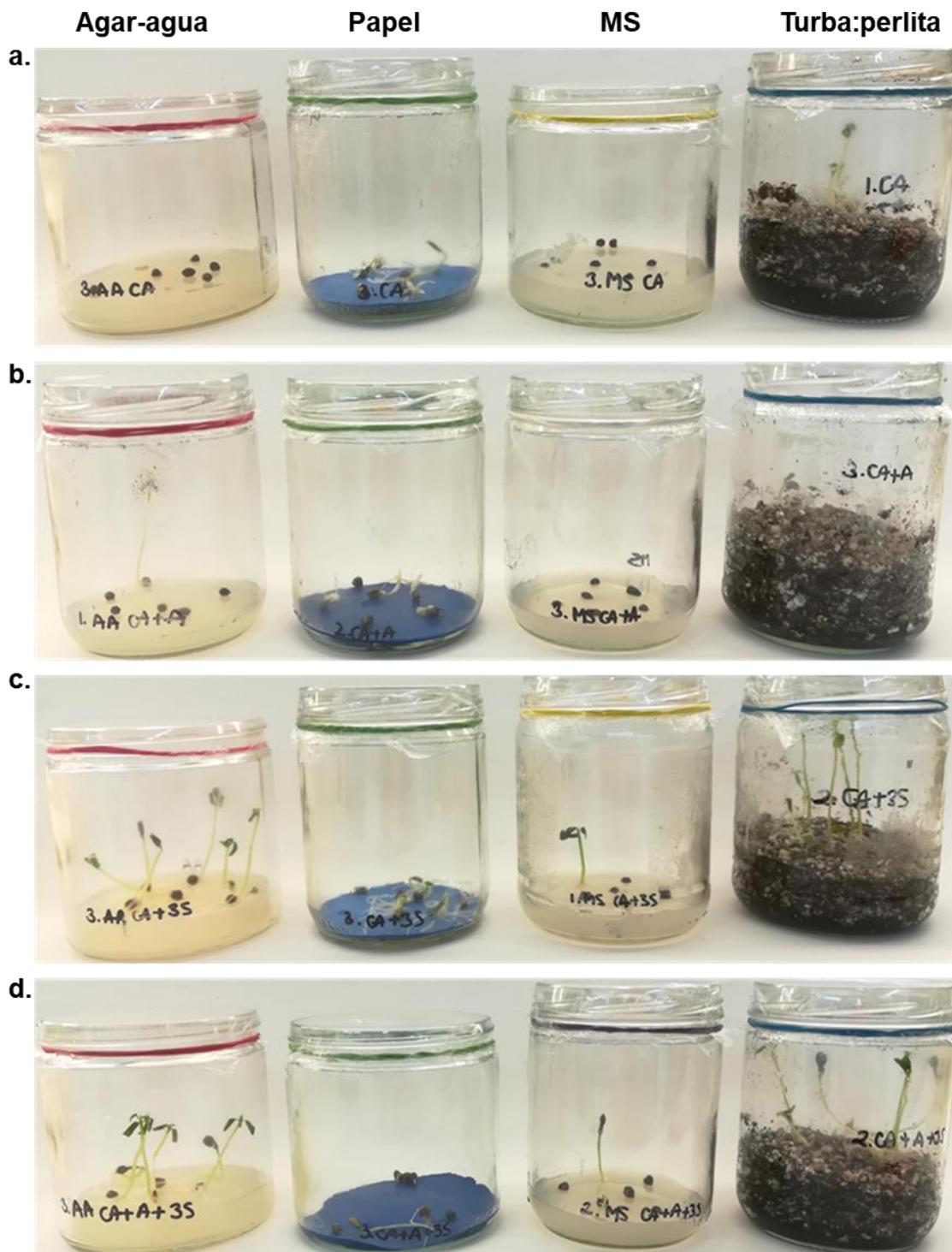


Figura 5. Plántulas de *C. papaya* obtenidas de semillas con arilo cultivadas en agar-agua, papel de germinación, medio MS y turba:perlita **a)** sin tratar (testigo), **b)** tratadas con AG_3 , **c)** tratadas con un choque térmico de 35°C y **d)** tratadas con choque térmico y AG_3 , luego de 30 días de haber sido sembradas.

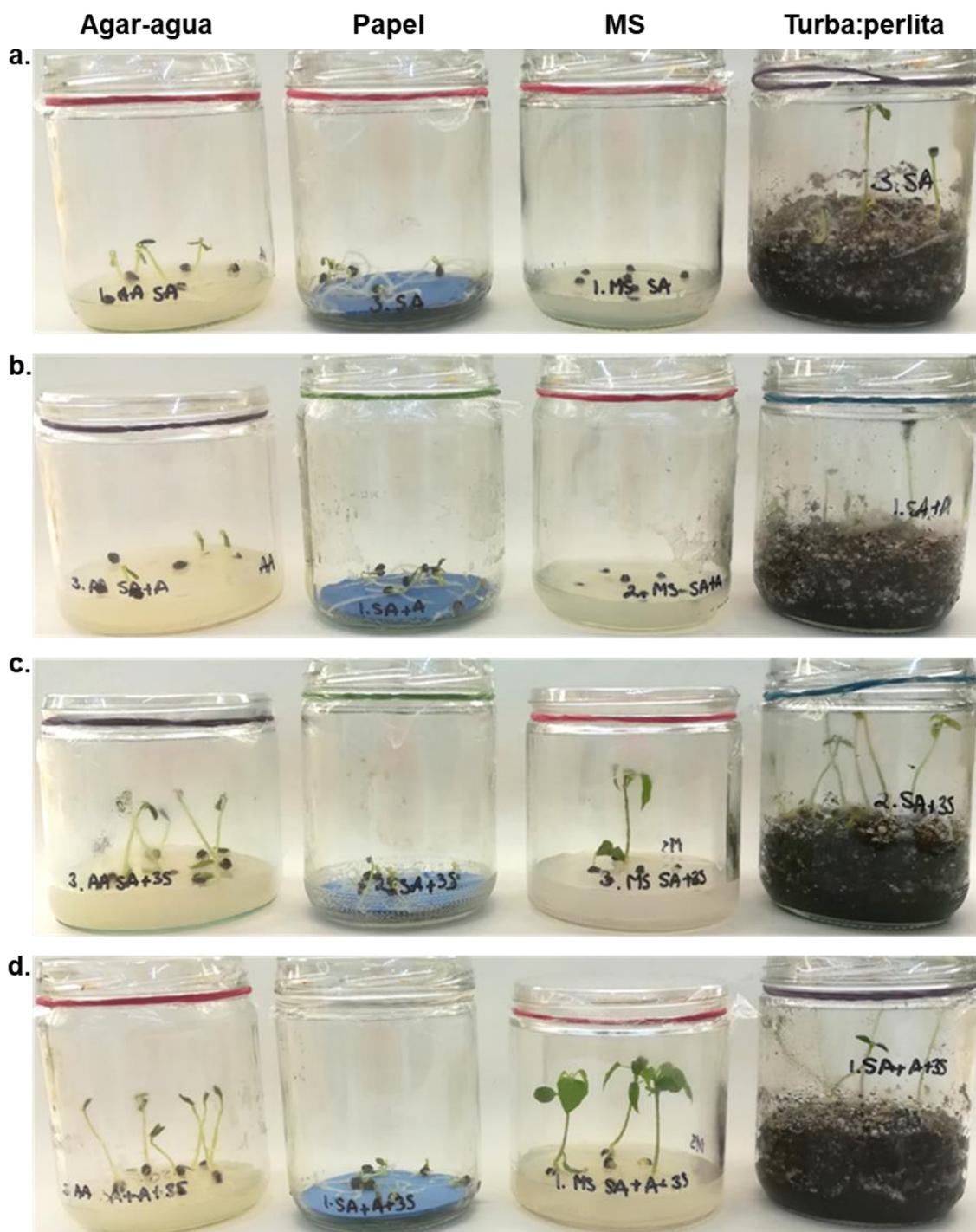


Figura 6. Plántulas de *C. papaya* obtenidas de semillas sin arilo cultivadas en agar-agua, papel de germinación, medio MS y turba:perlita **a)** sin tratar (testigo), **b)** tratadas con AG₃, **c)** tratadas con un choque térmico de 35°C y **d)** tratadas con choque térmico y AG₃, luego de 30 días de haber sido sembradas.

Cuadro 7. Plantas obtenidas (%) al germinar semillas con arilo (CA) y sin arilo (SA) de *C. papaya* en agar-agua (AA), papel de germinación (P), turba:perlita (T:P) o medio MS (MS), tratadas con AG₃ (AG₃) y/o un choque térmico de 35°C (35) luego de treinta días haber iniciado el cultivo.

Tratamiento	Arilo	Plantas (%)	Error estándar	Significancia
AA	CA	0	0	h
AA	SA	0	0	h
AA + 35	CA	73,33	26,67	abc
AA + 35	SA	88,89	5,56	abc
AA + AG ₃	CA	5,56	5,56	gh
AA + AG ₃	SA	0	0	h
AA + AG ₃ + 35	CA	94,44	5,56	ab
AA + AG ₃ + 35	SA	100	0	a
MS	CA	0	0	h
MS	SA	5,56	5,56	gh
MS + 35	CA	8,33	8,33	fgh
MS + 35	SA	16,67	9,62	efgh
MS + AG ₃	CA	0	0	h
MS + AG ₃	SA	0	0	h
MS + AG ₃ + 35	CA	5,56	5,56	gh
MS + AG ₃ + 35	SA	61,11	22,22	abcdef
P	CA	38,89	11,11	bcdefg
P	SA	50,00	25,46	abcdef
P + 35	CA	33,33	9,62	cdefg
P + 35	SA	66,67	33,33	abcde
P + AG ₃	CA	27,78	14,70	defgh
P + AG ₃	SA	77,78	14,70	abcd
P + AG ₃ + 35	CA	44,44	24,22	cdefg
P + AG ₃ + 35	SA	100	0	a
S	CA	5,56	5,56	gh
S	SA	27,78	14,70	defgh
S + 35	CA	100	0	a
S + 35	SA	100	0	a
S + AG ₃	CA	11,11	5,56	fgh
S + AG ₃	SA	27,78	20,03	efgh
S + AG ₃ + 35	CA	83,33	9,62	abc
S + AG ₃ + 35	SA	100	0	a

5.2. Aislamiento de protoplastos de *C. papaya*

5.2.1. Aislamiento de protoplastos a partir de hojas

En el primer experimento realizado se probó si el corte de las hojas in vitro de *C. papaya* en forma de peine provoca algún efecto en el aislamiento de protoplastos. Sin embargo, realizar los cortes en las hojas no generó un cambio en el número de protoplastos·g⁻¹ aislados ($p=0,5127$), ni en su viabilidad ($p=0,1266$) (Cuadro 8), si se compara con respecto a las hojas a las que únicamente se les removió la epidermis del envés. La prueba de CFW permitió determinar que el tratamiento con hojas sin cortar, en las que se había removido la epidermis del envés, presentó un mayor número de protoplastos sin fluorescer, que indica la ausencia de restos de pared celular, con respecto al tratamiento con hojas cortadas en peine ($p=0,0463$) (Cuadro 8). Por lo tanto, se continuó trabajando con hojas con la lámina entera a las que únicamente se les removió la epidermis del envés.

Cuadro 8. Rendimiento en protoplastos·g⁻¹, viabilidad y protoplastos no fluorescentes al ser teñidos con CFW aislados a partir de hojas in vitro de *C. papaya*.

Experimento	Tratamiento	Protoplastos·g ⁻¹ *	Viabilidad (%) *	Protoplastos no fluorescentes (%) *
1. Corte en las hojas en peine [‡]	Sin corte	3,40x10 ⁵ ± 7,11x10 ⁴ a	75,76 ± 6,86 a	46,65 ± 8,56 a
	Con corte	2,75x10 ⁵ ± 4,21x10 ⁴ a	64,69 ± 4,91 a	9,52 ± 9,53 b
2. Soluciones enzimáticas usadas para <i>C. papaya</i> [‡]	Solución A	2,44x10 ⁶ ± 8,41x10 ⁵ a	76,87 ± 14,06 a	84,40 ± 3,99 a
	Solución C	3,46x10 ⁶ ± 1,66x10 ⁶ a	80,70 ± 4,98 a	78,25 ± 5,89 a
	Solución D	2,36x10 ⁶ ± 9,65x10 ⁵ a	65,26 ± 11,16 a	80,07 ± 3,60 a
3. Adición de driselasa a la solución A [‡]	Solución A	4,73x10 ⁶ ± 1,34x10 ⁶ a	80,17 ± 14,06 a	86,22 ± 1,19 a
	Solución E	2,92x10 ⁶ ± 1,66x10 ⁶ a	90,30 ± 4,98 a	71,12 ± 7,16 a

*valor promedio ± error estándar. No se encontró diferencias significativas entre las variables evaluadas en cada tratamiento, excepto para la tinción con CFW en el experimento 1. [‡] n = 3. [‡] n = 4. Tratamientos con letras iguales para una misma columna indican que no hubo diferencias significativas.

En el experimento dos se probaron tres soluciones enzimáticas utilizadas por diferentes autores para el aislamiento de protoplastos de *Carica*, con el fin de determinar si estas incrementan la viabilidad con respecto a los resultados obtenidos en el experimento uno. Sin embargo, no se logró determinar diferencias significativas entre soluciones en cuanto al número de protoplastos·g⁻¹ aislados ($p=0,9565$), la viabilidad ($p=0,3932$), ni con la

prueba de CFW ($p=0,5866$) (Cuadro 8). De igual manera, en el experimento tres, la adición de driselasa a la solución enzimática A no generó un cambio significativo en el número de protoplastos·g⁻¹ aislados ($p=0,4857$), en la viabilidad ($p=0,0571$), ni en la prueba de CFW ($p=0,3429$) (Cuadro 8).

Al no haber encontrado diferencias significativas en los experimentos realizados se decidió utilizar la solución enzimática A, propuesta por Lipka (2010), para experimentos posteriores. Lo anterior se debe a que esta solución es la que contiene la menor concentración y número de enzimas, por lo que el costo de elaboración es menor.

No se continuó realizando aislamientos de protoplastos a partir de hojas debido a las dificultades presentadas con el mantenimiento de las plantas. Luego de cortar las hojas necesarias para realizar el aislamiento, las plantas no lograban formar nuevas hojas. Por lo tanto, cada aislamiento requería realizar una nueva introducción de semillas, que tardaban cerca de 40 días para obtener plántulas de un tamaño adecuado para cortar las hojas. Por esta razón, se decidió cambiar de tejido inicial, de hojas a callos.

5.2.2. Aislamiento de protoplastos a partir de callo

Se probó aislar los protoplastos de callo de *C. papaya* con las soluciones enzimáticas C (Chen y Chen, 1992), J (Zhang et al., 2011) y F (Cuadro 3). Las diferentes combinaciones y concentraciones de enzimas probadas no generaron una variación significativa en la viabilidad ($p=0,1931$) ni en el número de protoplastos que no fluorescen al ser teñidos con CFW ($p=0,8771$). La viabilidad se mantuvo entre $64,36 \pm 7,33\%$ (solución C) y $84,57 \pm 2,71\%$ (solución F). En cuanto a los protoplastos que no fluorescen, el porcentaje se mantuvo entre $76,01 \pm 1,26\%$ (solución F) y $79,99 \pm 4,45\%$ (solución C). La solución enzimática F, propuesta para aislar protoplastos de *Vasconcellea*, permitió obtener un rendimiento significativamente mayor con respecto a las otras dos soluciones probadas ($p=0,0509$). Con esta solución se obtuvo una cantidad de $5,22 \times 10^6 \pm 1,28 \times 10^6$ protoplastos·g⁻¹ (Fig. 7c), seguida por las soluciones J y C con $1,39 \times 10^6 \pm 4,10 \times 10^5$ y $7,66 \times 10^5 \pm 1,28 \times 10^6$ protoplastos·g⁻¹, respectivamente (Fig. 7 y Fig. 8).

Globalmente, si se comparan los resultados obtenidos al aislar protoplastos de hojas (Cuadro 8) y callos (Fig. 8) los valores fueron similares tanto para la viabilidad como los protoplastos·g⁻¹.

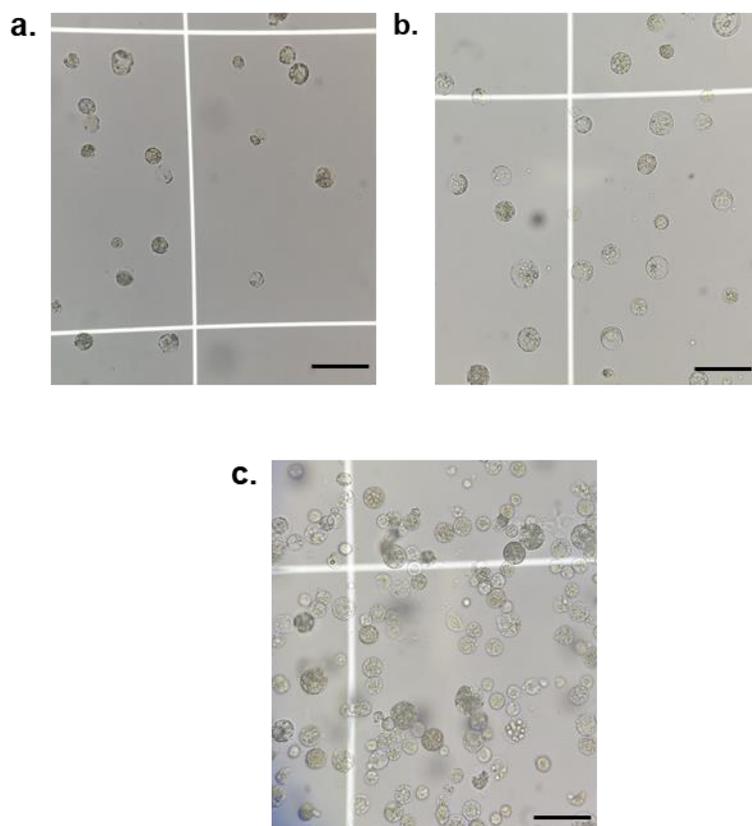


Figura 7. Protoplastos aislados a partir de callos de *C. papaya* con las soluciones enzimáticas **a)** C (Chen y Chen, 1992) **b)** J (Zhang et al., 2011) y **c)** F (Cuadro 3). La barra indica una medida de 50 μm .

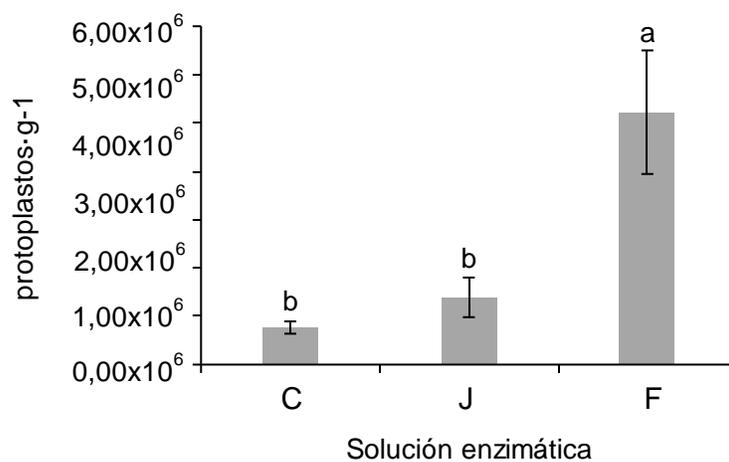


Figura 8. Rendimiento de los protoplastos aislados a partir de callo de *C. papaya* al probar tres soluciones enzimáticas diferentes (Cuadro 3). Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Kruskal-Wallis con un 95% de confianza, $n = 3$.

5.3. Aislamiento de protoplastos a partir de callos de *Vasconcellea* sp.

En el primer experimento realizado se probaron tres concentraciones de celulasa RS en las soluciones enzimáticas para el aislamiento de protoplastos. Sin embargo, no modificaron la viabilidad ($p=0,7839$) ni el rendimiento en protoplastos·g⁻¹ aislados ($p=0,5164$) (Cuadro 9). Por esta razón, se continuó utilizando 1,0% de celulasa RS en los siguientes experimentos, al igual que en *C. papaya*.

Cuadro 9. Viabilidad y rendimiento en protoplastos·g⁻¹ de protoplastos aislados a partir de callos de *Vasconcellea* sp.

Experimento	Tratamiento	Protoplastos·g ⁻¹ *	Viabilidad (%) *
1. Concentración de celulasa [‡]	Celulasa 1,0%	8,42x10 ⁴ ± 1,86x10 ⁴ a	61,26 ± 53,06 a
	Celulasa 1,5%	2,06x10 ⁴ ± 5,10x10 ³ a	41,67 ± 38,19 a
	Celulasa 2,0%	1,37x10 ⁴ ± 5,98x10 ³ a	50,00 ± 50,00 a
2. Concentración hemicelulasa de 0-0,5% m/v [‡]	Hemicelulasa 0,0%	1,06x10 ⁴ ± 5,71x10 ³ a	58,65 ± 21,16 a
	Hemicelulasa 0,5%	5,09x10 ³ ± 3,22x10 ³ a	50,00 ± 45,95 a
4. Concentración hemicelulasa 1-1,5% m/v [‡]	Hemicelulasa 1,0%	9,18x10 ⁵ ± 6,78x10 ⁵ a	84,94 ± 19,81 a
	Hemicelulasa 1,25%	8,58x10 ⁵ ± 1,34x10 ⁶ a	78,09 ± 24,77 a
	Hemicelulasa 1,5%	3,66x10 ⁶ ± 2,03x10 ⁶ a	92,62 ± 5,01 a

* valor promedio ± error estándar. No se encontró diferencias significativas entre las variables evaluadas en cada experimento. ‡ n = 3. † n = 6. Letras iguales para los tratamientos de una misma columna no difieren estadísticamente entre sí

Con el fin de tratar de incrementar el rendimiento de protoplastos, en el experimento dos se hizo una prueba adicionando 0,5% m/v de hemicelulasa. Sin embargo, la adición de esta enzima no generó un cambio significativo en la viabilidad ($p=0,7449$) ni en el rendimiento de los protoplastos·g⁻¹ ($p=0,2273$) aislados (Cuadro 9). Al teñir con CFW fue posible observar que los protoplastos aislados sin hemicelulasa presentaron una mayor fluorescencia (Fig. 9a) en comparación con los protoplastos aislados con esta enzima (Fig. 9b), en donde la fluorescencia fue menor o inexistente. Lo anterior indica que la hemicelulasa permite que se dé una remoción más efectiva de la pared celular.

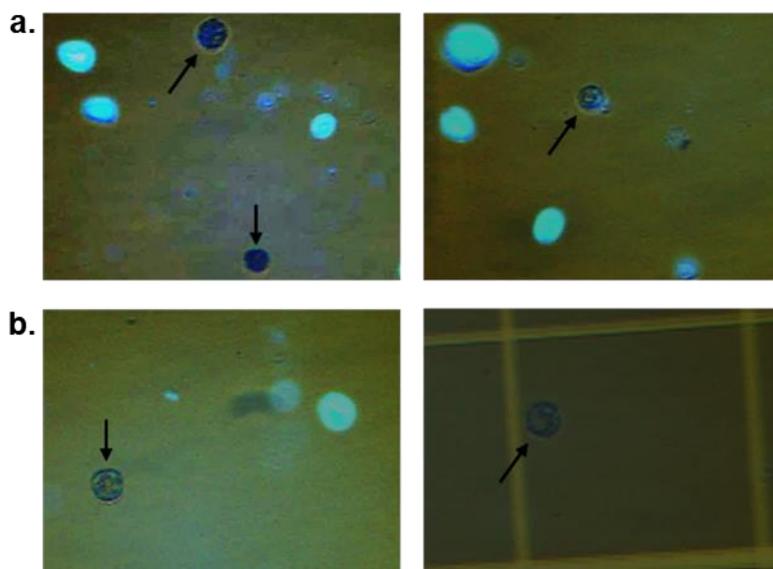


Figura 9. Protoplastos aislados a partir de callos friables de *Vasconcellea* sp. utilizando una solución enzimática **a)** sin y **b)** con 0,5% de hemicelulasa, además de 1% de celulasa RS y 0,5% de macerozima R10. Las flechas indican los protoplastos con la pared celular digerida total y parcialmente.

Por el indicio dado por la prueba del blanco de calcoflúor se decidió continuar probando diferentes concentraciones de hemicelulasa en los experimentos del tres al cinco. En cuanto al experimento tres, se probó adicionar 0,25; 0,50 y 1,00% m/v de hemicelulasa. La adición de 1,00% m/v de hemicelulasa permitió obtener $1,59 \times 10^7 \pm 8,72 \times 10^6$ protoplastos·g⁻¹, siendo este rendimiento significativamente mayor ($p=0,0060$) con respecto a los dos tratamientos restantes (Fig. 10a). En cuanto a la viabilidad, esta fue significativamente mayor al agregar 1,00% m/v de hemicelulasa, con respecto al tratamiento con 0,25% m/v. Sin embargo, la viabilidad de los protoplastos tratados con estos dos tratamientos difirió en comparación con el tratamiento de 0,5% m/v de hemicelulasa ($p=0,0176$) (Fig. 10b). La prueba de CFW reflejó el mismo comportamiento que la viabilidad, en donde la adición de 1,00% m/v de hemicelulasa permitió obtener un porcentaje significativamente mayor de protoplastos sin fluorescer con respecto al tratamiento de 0,25% m/v de hemicelulasa, pero no del tratamiento de 0,5% m/v de esta enzima ($p=0,0145$) (Fig. 10c).

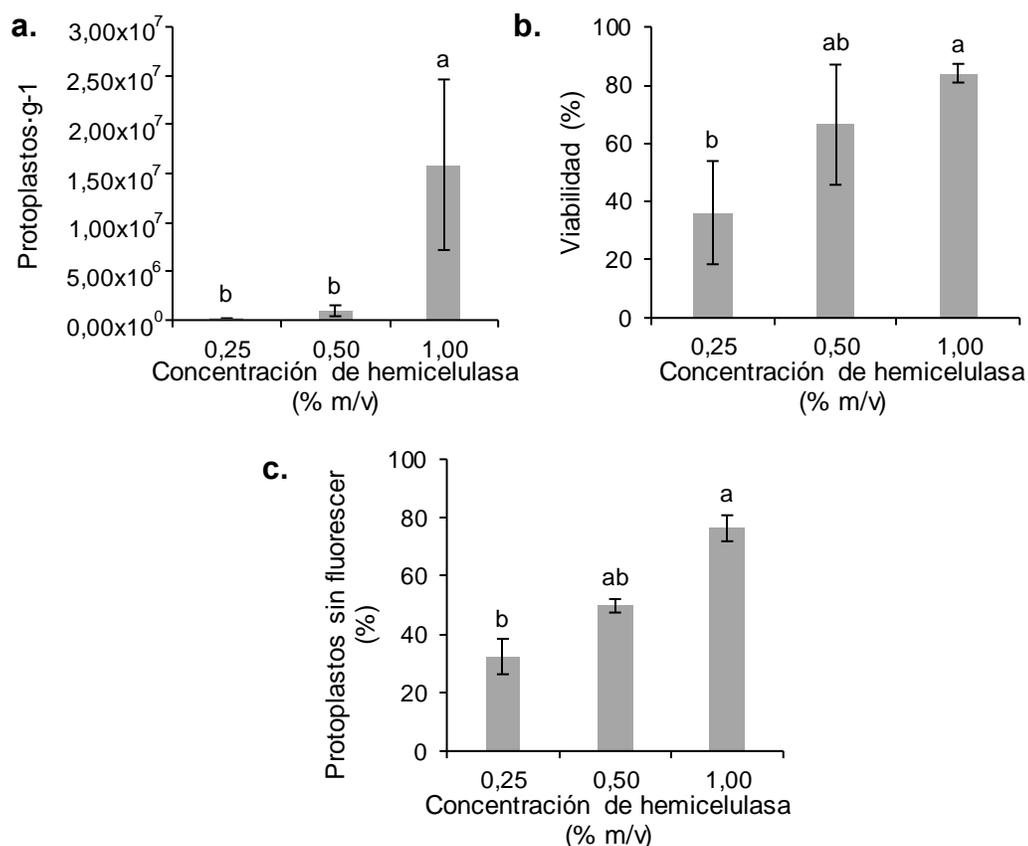


Figura 10. Rendimiento de los protoplastos aislados a partir de callos friables de *Vasconcellea* sp. en el experimento tres utilizando diferentes concentraciones de hemicelulasa (Cuadro 4). **a)** número de protoplastos $\cdot \text{g}^{-1}$ aislados, **b)** viabilidad de los protoplastos (%) y **c)** protoplastos sin fluorescer al ser teñidos con CFW (%). Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos, según la prueba de Kruskal-Wallis con un 95% de confianza. $n = 6$.

Debido a que la adición de 1,00% de hemicelulasa favoreció el aislamiento de protoplastos, en el cuarto experimento se decidió probar dos concentraciones más altas de esta enzima. Sin embargo, no se logró cuantificar un cambio significativo en el rendimiento de protoplastos $\cdot \text{g}^{-1}$ aislados ($p=0,0822$), en la viabilidad ($p=0,7326$) (Cuadro 9), ni con la tinción de blanco de calcoflúor ($p=0,3199$), ya que esta se mantuvo entre $73,99 \pm 1,90$ y $76,99 \pm 3,01$. Por lo tanto, se decidió seguir trabajando con 1,00% de hemicelulasa en la solución enzimática.

Se contaba en ese momento con dos tipos de callos de *Vasconcellea* sp., friable y con apariencia embriogénica (Fig. 2), por lo que en el experimento cinco se probó cuál de estos era más adecuado para realizar el aislamiento de protoplastos, bajo dos

condiciones enzimáticas diferentes. Al aislar los protoplastos de callos friables digeridos con la solución enzimática F, con 1% de hemicelulasa, se logró obtener un rendimiento de $1,71 \times 10^5 \pm 9,49 \times 10^4$ protoplastos·g⁻¹, que fue significativamente mayor con respecto al tratamiento de callos con 1,50% m/v de hemicelulasa y callos con apariencia embriogénica ($p=0,0599$) (Fig. 11). En cuanto a la viabilidad, no se determinó un cambio significativo entre los tratamientos. Por último, para la prueba de CFW solamente se evaluó las muestras aisladas con callos friables, en donde la concentración de hemicelulasa tampoco afectó el porcentaje de protoplastos que no fluorescían al estar en presencia de esta tinción ($p=0,1063$).

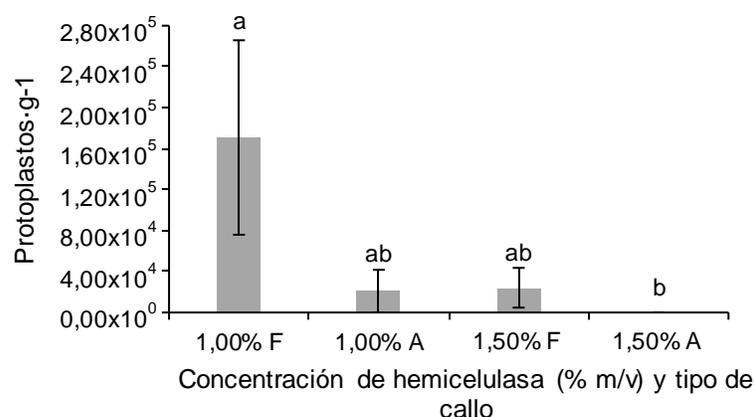


Figura 11. Rendimiento de los protoplastos·g⁻¹ obtenidos en el experimento cinco al utilizar callo de *Vasconcellea* sp. con apariencia embriogénica (A) o friable (F) al ser digeridos con 1% de celulasa RS, 0,5% de macerozima R10 y 1 ó 1,5% de hemicelulasa. Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos, según la prueba de Kruskal-Wallis con un 95% de confianza. $n = 3$.

De acuerdo con los resultados obtenidos, para el aislamiento de protoplastos de *Vasconcellea* sp. a partir de callo se decidió continuar utilizando callos friables y la solución enzimática compuesta por 1% de celulasa RS, 0,5% de macerozima R10 y 1% de hemicelulasa (solución enzimática F). Lo anterior se debe a que utilizando estas condiciones se logró obtener entre $9,18 \times 10^5 \pm 6,78 \times 10^5$ y $1,59 \times 10^7 \pm 8,72 \times 10^6$ protoplastos·g⁻¹ con una viabilidad superior al 84% y con al menos un 76% de protoplastos sin brillar al ser teñidos con CFW.

5.4. Electrofusión de protoplastos y detección de posibles fusionantes mediante polimorfismos entre *C. papaya* y *Vasconcellea* sp.

5.4.1. Electrofusión de protoplastos

5.4.1.1. Viabilidad de los protoplastos en soluciones de fusión

Al exponer por 15 min los protoplastos a diferentes osmolalidades de la solución de fusión para células eucariotas de Eppendorf se encontró que estas modificaron significativamente la viabilidad de los protoplastos de *C. papaya* ($p=0,0070$) y *Vasconcellea* sp. ($p=0,0106$) con respecto al testigo (medio MSBSOH). En caso de *C. papaya*, la solución de 200 mOsmol/kg no redujo la viabilidad con respecto al testigo, a diferencia de las dos osmolalidades restantes que sí la redujeron (Fig. 12a). En relación con *Vasconcellea* sp., todas las soluciones probadas redujeron la viabilidad en comparación al testigo (Fig. 12b). Debido a que el comportamiento no fue igual en ambas especies, estas soluciones no se recomiendan para la fusión, ya que, en un evento de fusión, los protoplastos de ambas especies deben estar en buenas condiciones.

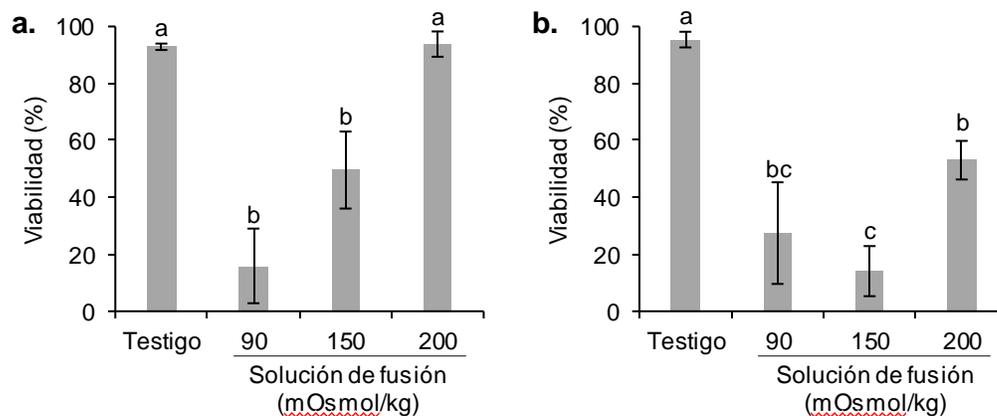


Figura 12. Viabilidad de los protoplastos aislados de **a)** *C. papaya* y **b)** *Vasconcellea* sp. luego de ser expuestos por 15 min a la solución de fusión para células eucariotas de Eppendorf en tres osmolalidades diferentes. Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Kruskal-Wallis con un 95% de confianza. $n = 3$.

Con respecto al segundo experimento, se probó si exponer los protoplastos por 10 min a las soluciones de fusión propuestas por Yu et al. (2013), Duquenne et al. (2007), Bates et al. (1983), y la solución de fusión de Eppendorf de 90 mOsmol/kg reducen la viabilidad de los protoplastos. Tanto para *C. papaya* ($p=0,0138$) (Fig. 13a) como para *Vasconcellea* sp. ($p=0,0353$) (Fig. 13b) se determinó que hubo una reducción significativa en la

viabilidad de los protoplastos en esta última solución con respecto al testigo. Sin embargo, las tres soluciones restantes no difirieron de este (Fig. 13). Por lo anterior, se estima que es posible utilizar las soluciones de fusión propuestas por Yu et al. (2013), Duquenne et al. (2007) y Bates et al. (1983) para la fusión de protoplastos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. debido a que estas no afectan la viabilidad.

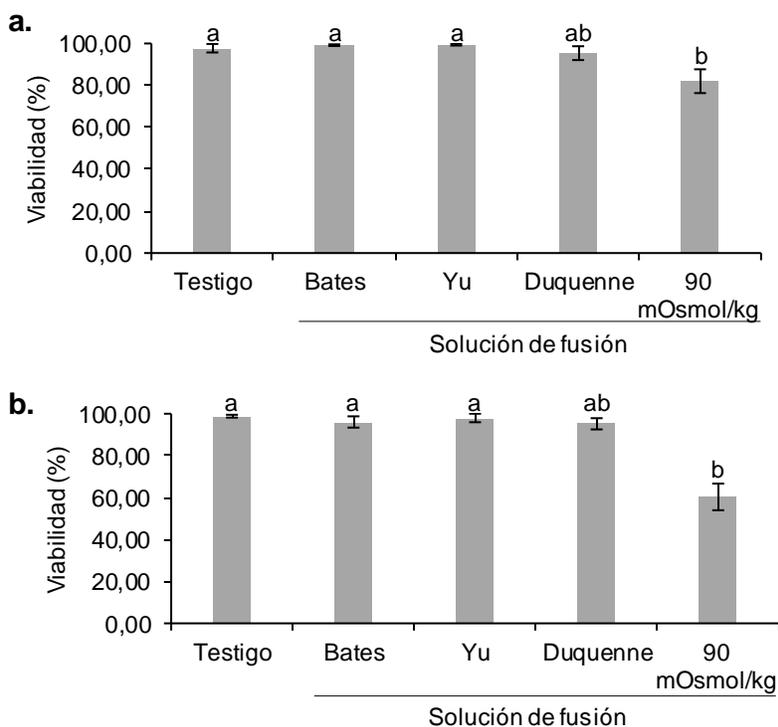


Figura 13. Viabilidad de los protoplastos aislados de **a) *C. papaya*** y **b) *Vasconcellea* sp.** luego de ser expuestos a la solución de fusión de Bates et al. (1983), Yu et al. (2013), Duquenne et al. (2007), y la solución de fusión de Eppendorf de 90 mOsm/kg. Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Kruskal-Wallis con un 95% de confianza. n = 3.

Al medir la conductividad eléctrica de las soluciones de fusión se determinó que la solución que presenta la conductividad más baja es la de Bates et al. (1983) con 0,01 mS, seguido de la de Yu et al. (2013) con 0,11 mS, mientras que la solución propuesta por Duquenne et al. (2007) tiene la conductividad más alta, siendo esta de 1,12 mS.

5.4.1.2. Fusión de protoplastos sin tomar en cuenta el diámetro celular como factor

En el primer ensayo de electrofusión se intentó fusionar protoplastos aislados de callos de *Vasconcellea* sp. y de hojas in vitro de *C. papaya* con la solución de fusión de Bates et al. (1983). Los protoplastos de ambas especies se llevaron a una concentración de

$1,78 \times 10^6$ protoplastos $\cdot \text{mL}^{-1}$. Con las condiciones de electrofusión probadas no fue posible observar que los protoplastos de ambas especies se alinearan y formaran cadenas para fusionarse; sin embargo, los protoplastos de *Vasconcellea* sp. tuvieron contactos cercanos entre sí. Cabe destacar que visualmente se observó un menor tamaño de los protoplastos de hojas in vitro de *C. papaya* con respecto a los de callos de *Vasconcellea* sp., lo cual podría estar influyendo en la fusión (Fig. 14).



Figura 14. Protoplastos de *C. papaya* (verdes) y *Vasconcellea* sp. (translúcidos) luego de intentar ser electrofusionados.

Con respecto al segundo ensayo, se fusionaron entre sí protoplastos de *Vasconcellea* sp. para determinar si las diferentes soluciones de fusión a probar son efectivas al utilizar protoplastos con un tamaño similar. Se utilizó una concentración de $3,60 \times 10^5$ protoplastos $\cdot \text{mL}^{-1}$ y se logró observar la formación de cadenas de protoplastos con las tres soluciones de fusión probadas (Fig. 15). Cabe destacar que al utilizar la solución de fusión propuesta por Duquenne et al. (2007) los protoplastos migraban lentamente al aplicarse los choques eléctricos, mientras que al utilizar la solución de Bates et al. (1983) estos se movilizaban a mayor velocidad. Esta diferencia en la velocidad de migración podría estar afectando la capacidad de obtener fusionantes, por lo que no se recomienda el uso de la solución de Duquenne et al. (2007). Adicionalmente, luego de aplicar los choques eléctricos al utilizar las soluciones de fusión de Yu et al. (2013) y Bates et al. (1983) se notaron posibles eventos de fusión, ya que se observaba una única célula alargada o bien se formaban puntos de contacto entre las células. Sin embargo, no fue posible determinar si tenían un punto de contacto o los protoplastos estaban traslapados (Fig. 15b).

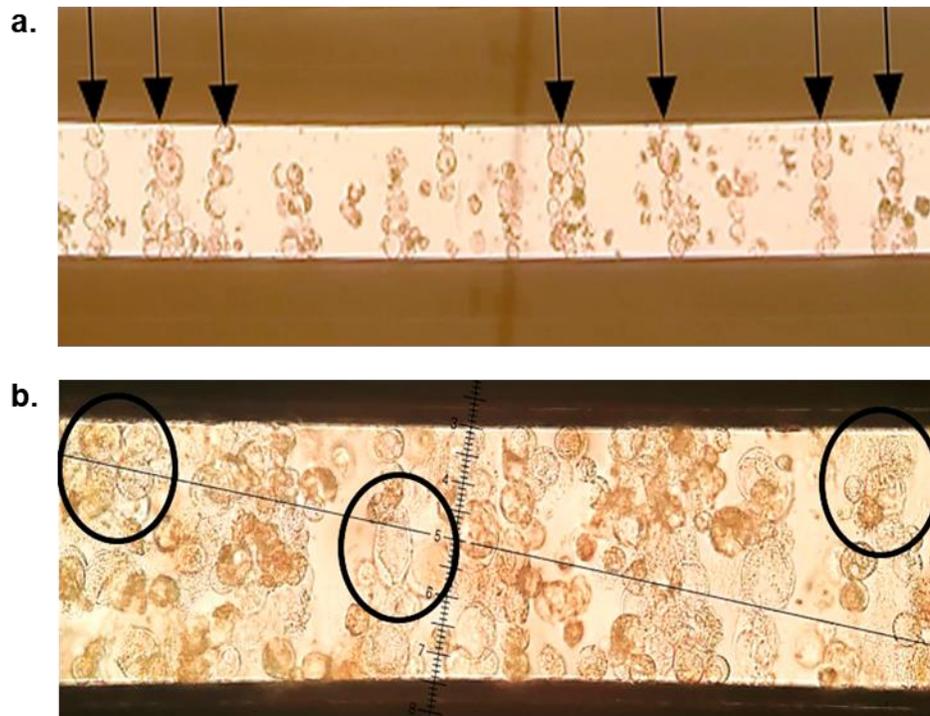


Figura 15. Prueba de electrofusión de protoplastos aislados a partir de *Vasconcellea* sp. con una densidad de $3,6 \times 10^5$ protoplastos·mL⁻¹ a los que se les aplicó dos choques eléctricos por 15 μ s con 30 V utilizando la solución de fusión propuesta por **a)** Yu et al. (2013) o **b)** Bates et al. (1983). Las flechas indican la formación de cadenas completas de protoplastos y los círculos posibles fusionantes.

Se intentó fusionar los protoplastos aislados a partir de callos de *C. papaya* con los de *Vasconcellea* sp. utilizando la solución de Bates et al. (1983). La concentración de protoplastos de ambas especies fue ajustada a $2,6 \times 10^5$ protoplastos·mL⁻¹. Con esta concentración de protoplastos fue posible observar la formación de cadenas y se sospecha de la presencia de fusionantes. Por lo observado anteriormente, se recomienda utilizar la solución de Bates et al. (1983) o la de Yu et al. (2013), para la fusión de protoplastos de estas dos especies.

5.4.1.3. Fusión de protoplastos tomando en cuenta el diámetro celular

Diámetro de los protoplastos y voltaje requerido para la electrofusión

Al medir el diámetro de los protoplastos se determinó que aquellos aislados de callos de *Vasconcellea* sp. fueron significativamente más grandes con respecto a los de callos de *C. papaya*, tanto en la solución inicial (MSBSOH) como en las soluciones de fusión (Cuadro 10). Además, se determinó que, en el caso de *Vasconcellea* sp., las soluciones utilizadas no modificaron el tamaño de los protoplastos ($p=0,1308$), con respecto al

diámetro inicial. En el caso de *C. papaya*, las soluciones de fusión provocaron un incremento significativo en el tamaño de los protoplastos ($p=5,82 \times 10^{-6}$), siendo los protoplastos en la solución de Yu et al. (2013) los de mayor tamaño (Cuadro 10).

Cuadro 10. Diámetro de los protoplastos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. inicial y luego de estar expuestos a dos soluciones de fusión.

	Diámetro (μm)*		Valor p
	<i>C. papaya</i>	<i>Vasconcellea</i> sp.	
Diámetro inicial	12,96 \pm 0,78	29,65 \pm 1,37	1,06 $\times 10^{-7}$
Solución de fusión			
Yu et al. (2013)	18,70 \pm 0,62	26,28 \pm 1,49	2,49 $\times 10^{-5}$
Bates et al. (1983)	16,05 \pm 1,07	30,25 \pm 1,55	1,17 $\times 10^{-6}$

* valor promedio \pm error estándar. n = 20.

Para realizar la electrofusión de los protoplastos se calculó el voltaje requerido a partir del voltaje crítico necesario para abrir poros en las membranas celulares. Con la solución de Yu et al. (2013) se requieren 29 V (1426,33 V/cm) para fusionar los protoplastos de *C. papaya* y 21 V (1014,58 V/cm) para *Vasconcellea* sp. En cuanto a la solución de Bates et al. (1983) los voltajes requeridos son de 34 V (1661,11 V/cm) y 18 V (899,32 V/cm) para *C. papaya* y *Vasconcellea* sp., respectivamente. Adicionalmente, se determinó que el voltaje promedio para ambas especies fue de 25 V para la solución de Yu et al. (2013) y de 26 V para la solución de Bates et al. (1983).

Electrofusión de protoplastos

Al realizar las pruebas de electrofusión con las soluciones propuestas por Yu et al. (2013) y Bates et al. (1983) se logró observar la formación de cadenas o collares de perlas de protoplastos durante la fase de fusión en todas las condiciones probadas (Fig. 16a y c). Además, se observó que, al utilizar la solución de fusión de Yu et al. (2013), hubo un mayor daño celular, con respecto a la solución de Bates et al. (1983) (Fig. 16 b y d), ya que al finalizar la electrofusión los protoplastos explotaban o se rasgaba la membrana celular. Al realizar el proceso con los tres voltajes y las tres condiciones de fusión hubo lisis de los protoplastos (Fig. 16b), llegando a casi desaparecer. En el caso de la solución de Yu et al. (2013), el daño celular ocurrió en menor medida ya que en tres de las nueve condiciones probadas no se observó protoplastos lisados (Fig. 16d). Conforme se incrementó el voltaje fue más evidente el daño en protoplastos de mayor tamaño.

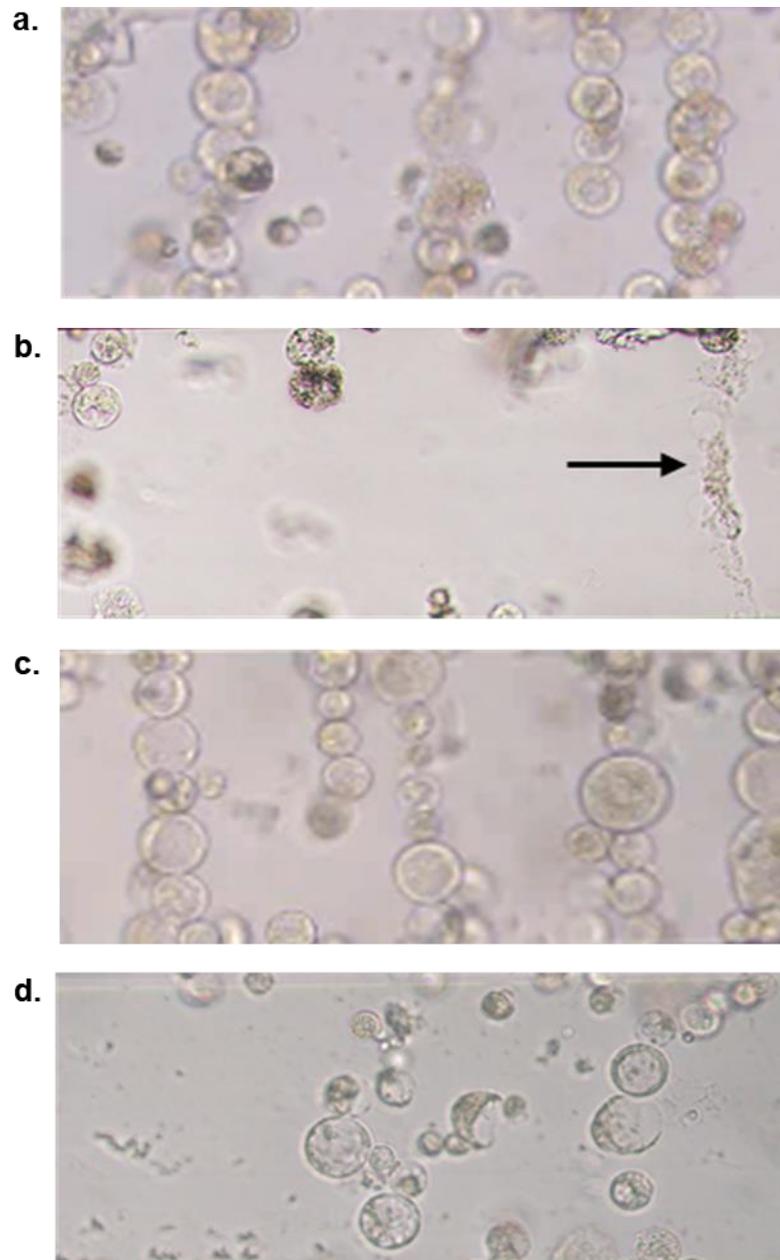


Figura 16. Electrofusión de protoplastos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. en las soluciones de fusión de Yu et al. (2013) (**a** y **b**) y Bates et al. (1983) (**c** y **d**) durante la formación de cadenas (**a** y **c**) y después del evento de fusión (**b** y **d**). Para la fusión se aplicaron 3 pulsos de 29 V para Yu et al. (2013) y 18 V para Bates et al. (1983) durante 25 μ s. La flecha indica protoplastos dañados.

Luego del proceso de electrofusión fue posible observar la presencia de fusionantes en una y cuatro de las condiciones probadas con la solución de fusión de Yu et al. (2013) y Bates et al. (1983), respectivamente (Cuadro 11). Con las dos soluciones de fusión probadas se observó la presencia de fusionantes al utilizar el voltaje intermedio calculado

de tres pulsos por 25 μ s (Fig. 17a y b). Para ambas soluciones, los protoplastos fusionados fueron de tamaño similar. Adicionalmente, con la solución de Bates et al. (1983) se obtuvieron fusionantes al aplicar dos pulsos de 26 V por 30 μ s y 34 V con tres pulsos por 30 μ s. Con los 26 V se fusionó protoplastos de tamaño diferente, por lo que podría tratarse de un fusionante interespecífico (Fig. 17c) y con 34 V el fusionante es de tamaño similar (Fig. 17d).

Cuadro 11. Comportamiento de los protoplastos durante y después de la electrofusión de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. en dos soluciones de fusión bajo tres condiciones distintas y tres voltajes por solución.

Solución de fusión	Voltaje (V)	Fase de fusión		Características de la electrofusión		
		Pulsos (n)	Duración (μ s)	Tamaño de protoplastos en las cadenas	Daño celular	Observaciones
Yu et al. (2013)	21	3	30	GP	sí	US y UD
		2	30	GP y S	sí	US y UD
		3	25	S	sí	US y UD
	25	3	30	S	sí	US y UD
		2	30	GP y S	sí	US y UD
		3	25	S	sí	F, US y UD
	29	3	30	S	sí	US y UD
		2	30	GP y S	sí	US y UD
		3	25	S	sí	US y UD
Bates et al. (1983)	18	3	30	S	no	US y UD
		2	30	GP y S	no	US y UD
		3	25	GP y S	sí	US y UD
	26	3	30	GP	no	US
		2	30	GP y S	sí	F, US y UD
		3	25	S	sí	F, US y UD
	34	3	30	GP y S	sí	F, US y UD
		2	30	S	sí	US
		3	25	S	sí	F y US

S: cadenas con protoplastos de tamaño similar; **GP:** cadenas con protoplastos grandes y pequeños intercalados; **US:** protoplastos unidos de tamaño similar; **UD:** Protoplastos unidos de tamaño grande y pequeño; **F:** fusionantes.

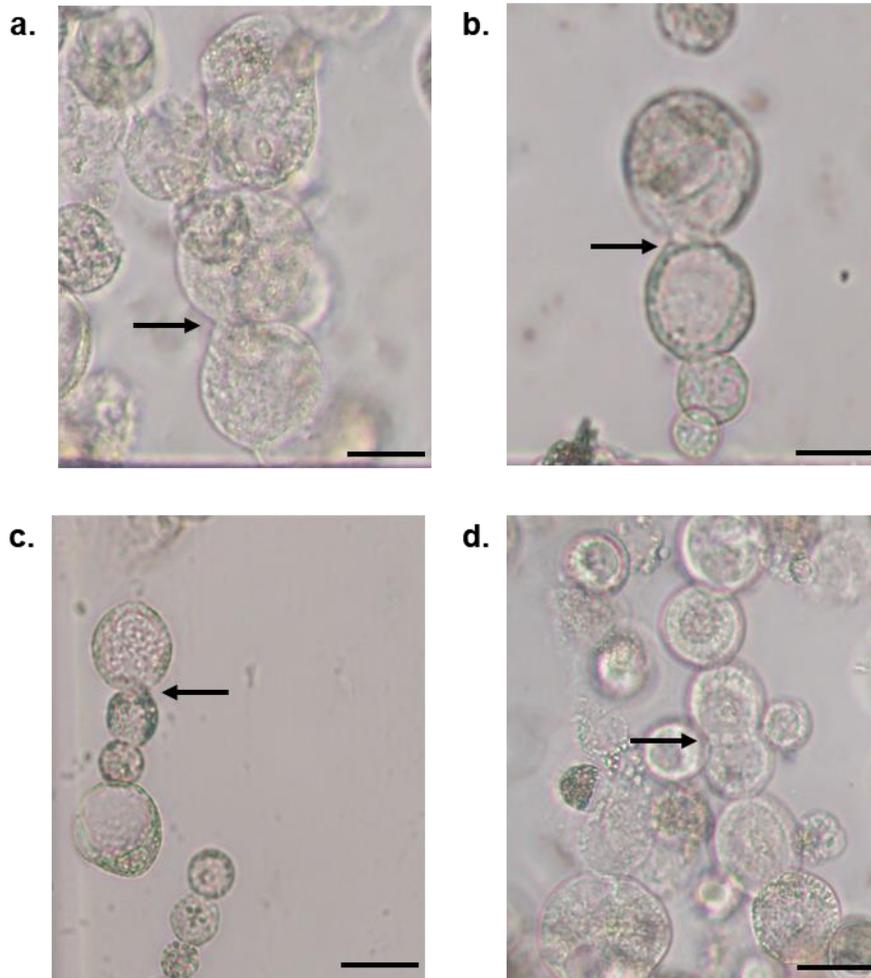


Figura 17. Protoplastos fusionados al aplicar **a)** dos pulsos de 25 V por 25 μ s, **b)** tres pulsos de 26 V por 25 μ s, **c)** dos pulsos de 26 V por 30 μ s, **d)** tres pulsos de 34 V por 30 μ s, utilizando la solución de fusión de Yu et al. (2013) (a) y Bates et al. (1983) (b, c, d). La flecha indica el punto de fusión de los protoplastos. La barra indica 25 μ m.

Cabe destacar que, en todas las condiciones probadas con ambas soluciones de fusión, fue posible observar protoplastos unidos luego del evento de fusión (Cuadro 11); sin embargo, estos no llegaron a fusionarse. En algunos casos, estos llegaron a unirse en pares de protoplastos con tamaño similar (Fig. 18), de tamaños diferentes (Fig. 18c y d), en tríos (Fig. 18d) o en grupos (Fig. 18).

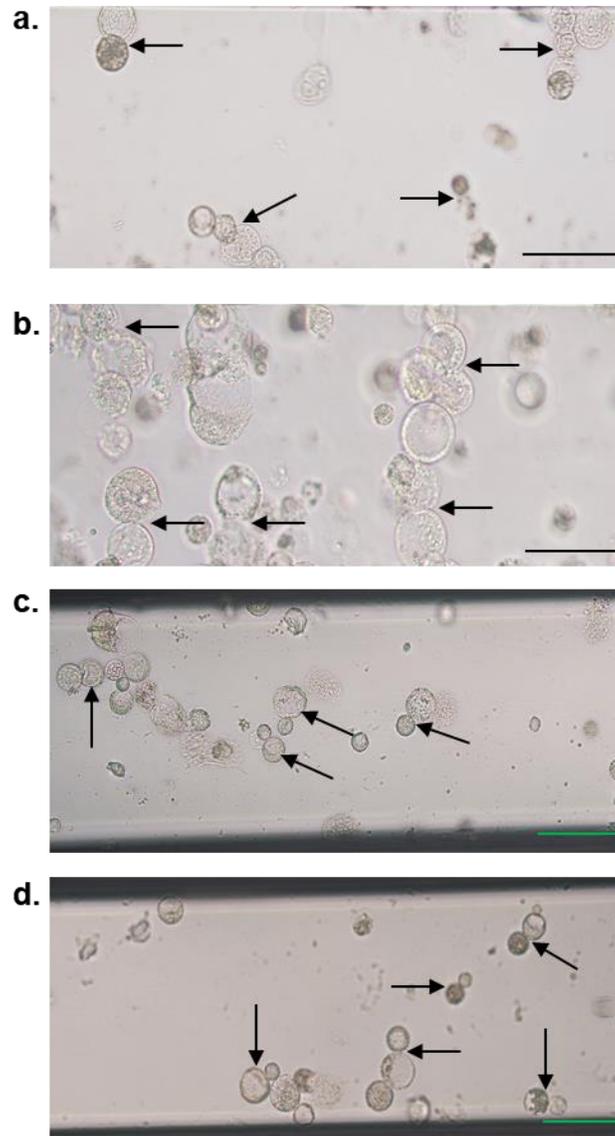


Figura 18. Protoplastos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. unidos luego de realizar la electrofusión con la solución de fusión de Yu et al. (2013) al aplicar **a)** dos pulsos de 21 V por 30 μ s, **b)** tres pulsos de 25 V por 30 μ s, y con la solución de Bates et al. (1983) al aplicar **c)** tres y **d)** dos pulsos de 18 V por 30 μ s. La barra negra indica 50 μ m y la verde 100 μ m.

5.4.2. Detección molecular de posibles fusionantes mediante PCR-RFLP

Se logró amplificar con éxito las regiones del ADN ribosomal *ITS1-ITS4*, *1406F-ITS2*, *ITS1-ITS2* e *ITS3-ITS4*, y las regiones del ADN cloroplástico *trnL-trnF* y *trnK1-K2*. Luego de digerir los productos de PCR con las ocho posibles combinaciones de enzimas de restricción disponibles se determinó que solamente las regiones *ITS1-ITS4* y *trnK1-trnK2* permitirían identificar los posibles fusionantes de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. En

cuanto a la región *ITS1-ITS4* (Fig. 19a), la enzima *Rsal* generó un corte diferencial entre ambas especies. En el caso de *Vasconcellea*, fue posible observar dos bandas de ADN, mientras que para *C. papaya* solamente se observa una ligera disminución en el tamaño del fragmento de ADN con respecto al fragmento sin digerir. Esto se debió a que el sitio de corte era cercano a alguno de los extremos del fragmento de ADN, por lo que la resolución de la electroforesis no permitió visualizarlo. Al combinar la enzima *Rsal* con la enzima de restricción *DraI* o bien con las enzimas *HindIII* y *DraI* se observó el mismo patrón de corte, lo que indica que estas combinaciones de enzimas no revelan los posibles polimorfismos entre *C. papaya* y *Vasconcellea* sp.

En cuanto al fragmento *trnK1-K2*, este permitió una diferenciación más clara de ambas especies, ya que hubo presencia de bandas específicas para una especie y la otra (Fig. 19b). En el caso de la enzima de restricción *Rsal*, esta generó una banda diferencial para cada una de las especies; en el caso de *Vasconcellea* sp., esta banda fue cercana a los 250 pb, mientras que para *C. papaya* fue de aproximadamente 500 pb. Por otra parte, la combinación de las enzimas *DraI* y *Rsal* generó tres bandas diferenciales, dos de estas en *Vasconcellea* sp. y una en *C. papaya*, todas con tamaños moleculares diferentes. Por último, la enzima *EcoRI* produjo una ligera variación de tamaño en una de las bandas generadas en ambas especies, por lo que también podría ser utilizada para diferenciarlas.

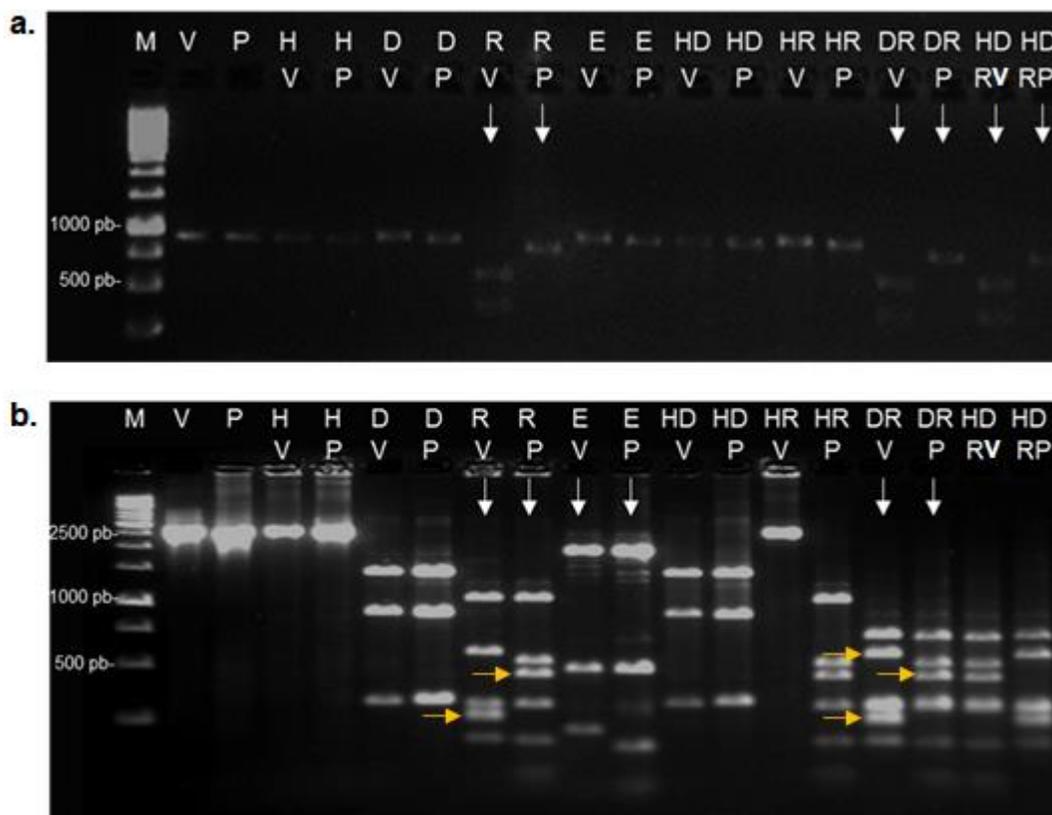


Figura 19. Digestión con cuatro enzimas de restricción y sus posibles combinaciones de los productos de PCR obtenidos al amplificar **a)** la región ribosomal *ITS1-ITS4* y **b)** la cloroplástica *trnK1-trnK2* en *C. papaya* (P) y *Vasconcellea* sp (V). M: marcador de peso molecular de 1 kb. V: *Vasconcellea* sp., P: *C. papaya*, H: *HindIII*, D: *DraI*, R: *RsaI*, E: *EcoRI*, HD: *HindIII* + *DraI*, HR: *HindIII* + *RsaI*, DR: *DraI* + *RsaI*, HDR: *HindIII* + *DraI* + *RsaI*. Las flechas blancas indican los carriles en los que se encontraron bandas diferenciales entre las dos especies y las flechas amarillas indican las bandas diferenciales obtenidas.

Para identificar la especie de *Vasconcellea* sp. con la que se está trabajando se envió a secuenciar a Macrogen Inc. dos regiones de ADN, una cloroplástica y otra ribosomal. Con la región *trnL-trnF* se identificó la especie como *V. cundinamarcensis*, con un porcentaje de identidad y cobertura del 100%, y un valor E de 0, siendo este el primer resultado de la lista (Anexo 4 y 5). En cuanto a la secuencia obtenida con la región *ITS3-307R*, para esta misma especie se obtuvo 86,26% de identidad y 63% de cobertura, con valor E de 5×10^{-103} . Este fue el resultado 62 en la lista generada. Sin embargo, previo a este especie se encontraban otros miembros de la familia Caricaceae como *Carica*, *Jacaratia* y otras especies de *Vasconcellea* (Anexo 6 y 7). Al realizar un árbol filogenético con el gen *trnL-trnF*, la secuencia obtenida agrupa con *V. cundinamarcensis* (Fig. 20a), mientras que con la región *ITS3-307R* agrupa en el mismo nodo con otras especies de

Vasconcellea (Fig. 20b). Por lo tanto, se puede indicar que definitivamente se está trabajando con una especie de *Vasconcellea* sp. y según el ADN cloroplástico es *V. cundinamarcensis*.

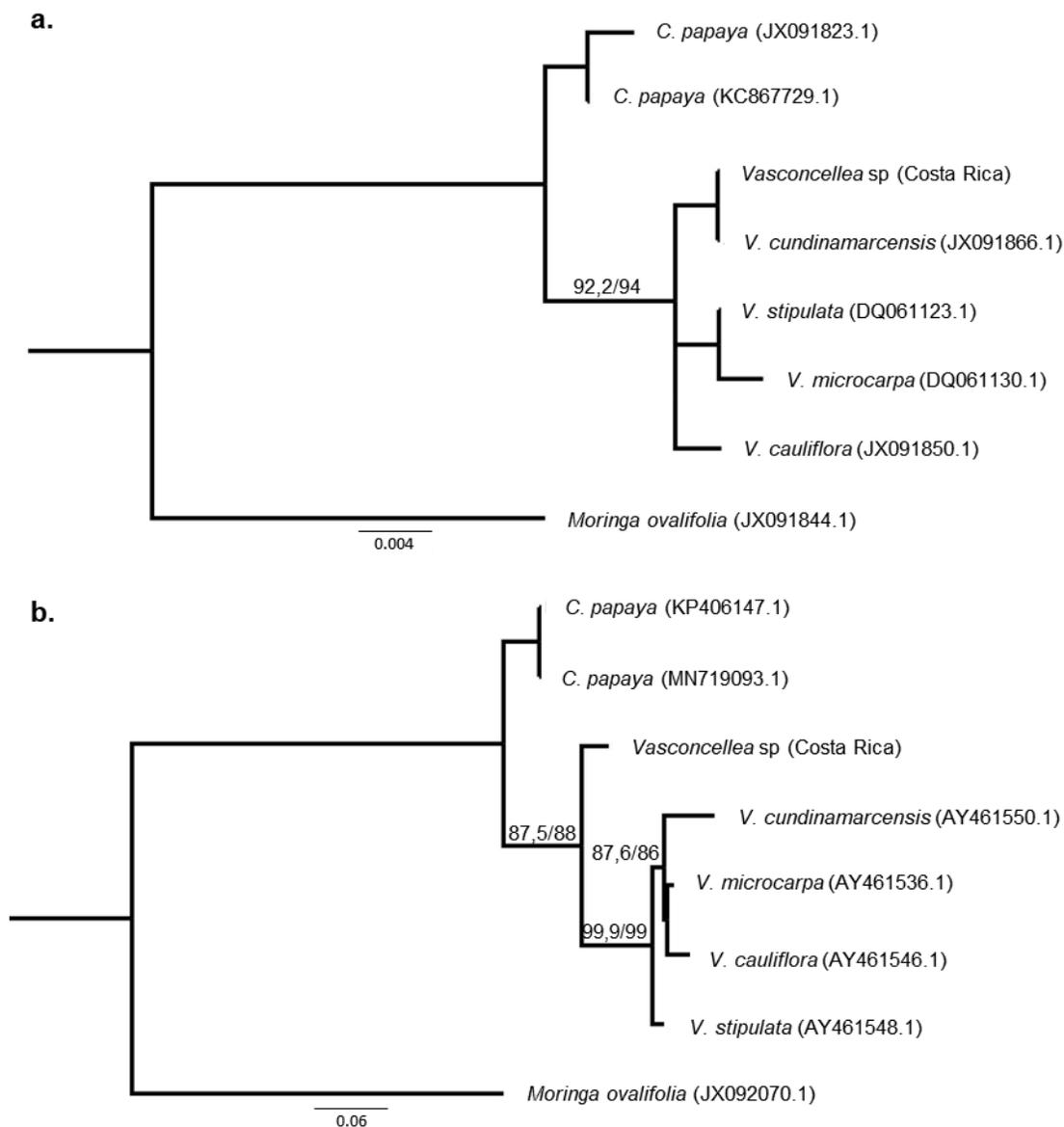


Figura 20. Árbol del posicionamiento taxonómico de *Vasconcellea* sp. para el gen **a)** *trnL-trnF* e **b)** *ITS3-307R*, mediante un análisis de máxima verosimilitud (ML). Los valores de soporte de cada rama se muestran como SHaLRT (Test de rama única) / UFBoot (bootstrap ultra rápido), en el cual la confianza en un clado se interpreta como >80 y >90, respectivamente. Al final de las ramas se muestra el número de accesión GenBank empleado para el análisis. Solamente se muestran los valores de rama mayores a 80. Las secuencias obtenidas en esta investigación se identifican como *Vasconcellea* sp. (Costa Rica). Se utilizó como grupo externo *Moringa ovalifolia*.

Al comparar la forma de los frutos y hojas de la planta utilizada para generar los callos (Fig. 21a) con lo descrito por Badillo (1971) (Fig. 21b), la especie corresponde a *C. pubescens* (ahora denominada *V. cundinamarcensis*), lo cual respalda lo encontrado molecularmente.

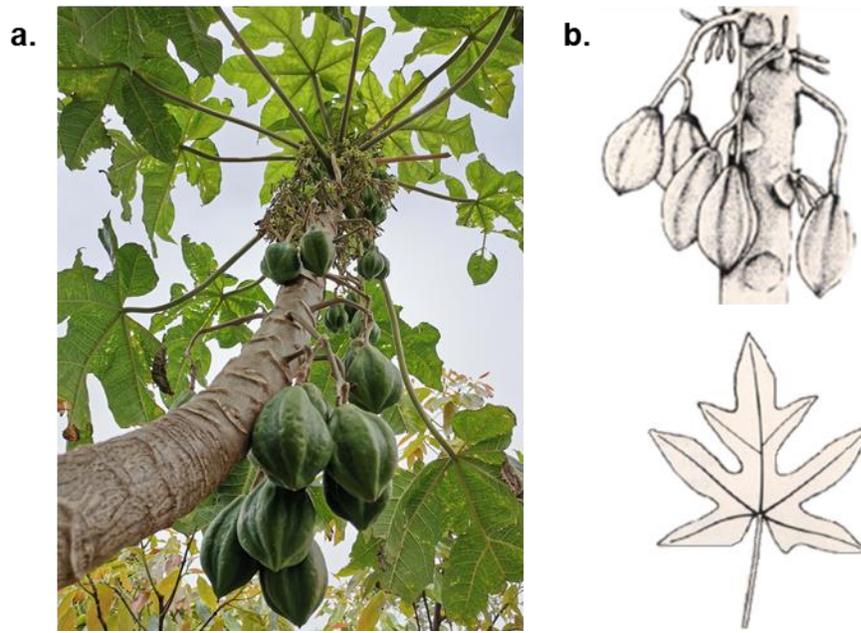


Figura 21. Comparación de **a)** la planta utilizada para la obtención de frutos de donde se extrajeron las semillas usadas en los diferentes experimentos (fotografía propia) y **b)** ilustraciones que describen la morfología de *C. pubescens* (ahora *V. cundinamarcensis*). Tomado y modificado de Badillo (1971).

5.5. Cultivo y regeneración de protoplastos

5.5.1. Regeneración de la pared celular de los protoplastos

Para dar seguimiento a la regeneración de la pared celular se cultivaron los protoplastos aislados de callos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. en cuatro medios de cultivo diferentes. Para *C. papaya* se utilizó una densidad de cultivo de $5,03 \times 10^6 \pm 3,82 \times 10^5$ protoplastos·g⁻¹, mientras que para *Vasconcellea* sp. fue de $1,16 \times 10^5 \pm 1,53 \times 10^4$ protoplastos·g⁻¹.

En el caso de *C. papaya*, luego de 24 h de cultivo y de realizar el análisis con CFW, se detectó un incremento exponencial en la fluorescencia de los protoplastos mantenidos en medio KM8P-S, que fue significativamente mayor respecto a los tratamientos restantes ($p=0,01789$). En medio KM8P-S la fluorescencia incrementó hasta 33,22%,

mientras que en los tratamientos restantes no superó el 20,12%. Este comportamiento se mantuvo hasta el final del experimento, ya que transcurridas 144 h los protoplastos cultivados en KM8P-S alcanzaron el 100% de fluorescencia, mientras que los protoplastos en los tratamientos restantes no superaron el 25% de fluorescencia ($p=0,0060$) (Fig. 22a).

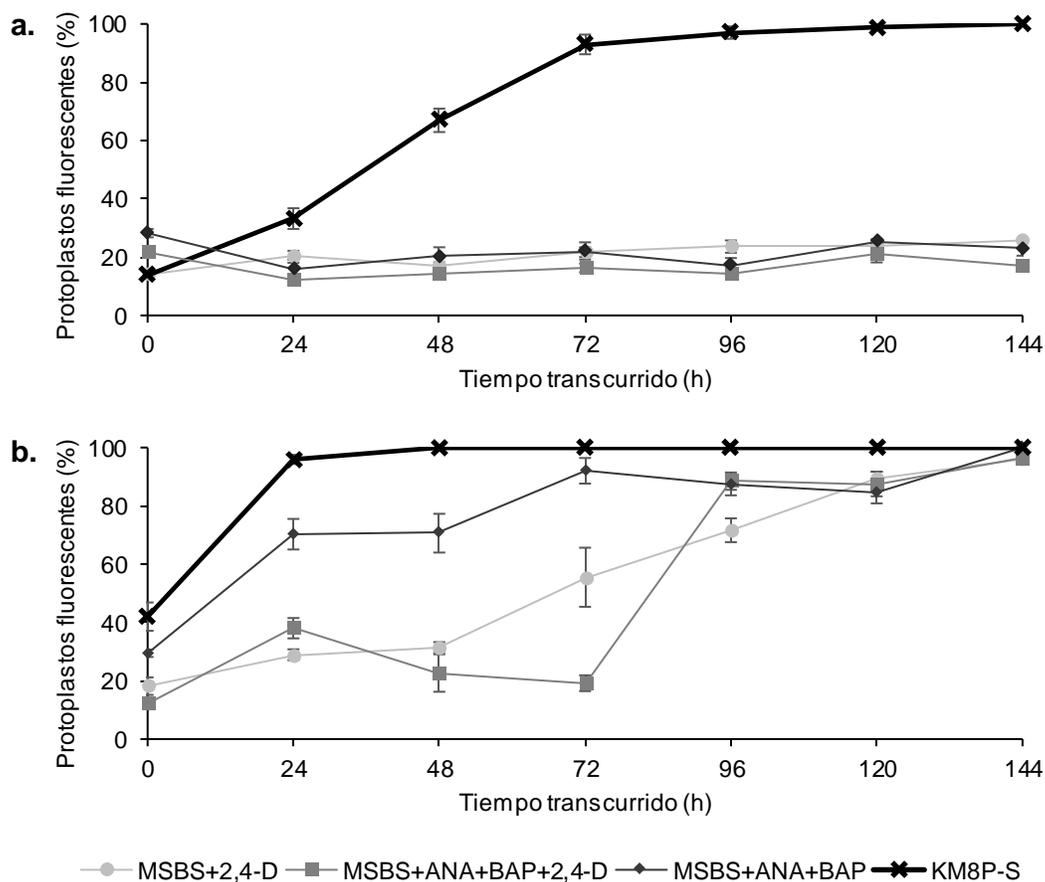


Figura 22. Fluorescencia a través del tiempo de protoplastos aislado de callos de **a)** *C. papaya* y **b)** *Vasconcellea* sp. teñidos con blanco de calcoflúor cultivados en medio MSBS con 2,4-D, MSBS con ANA, BAP y 2,4-D, MSBS con ANA y BAP y KM8P-S. Las barras indican el error estándar.

Con respecto a *Vasconcellea* sp., el medio KM8P-S incrementó más rápidamente la regeneración de la pared, medida indirectamente por la fluorescencia, con respecto a los tres tratamientos restantes ($p=1,04 \times 10^{-5}$). Luego de 24 h de cultivo en KM8P-S se obtuvo 95,93% de fluorescencia, seguido de MSBS+ANA+BAP con 70,28%, MSBS+ANA+BAP+2,4-D con 38,03% y por último MSBS+2,4-D con 28,93% de fluorescencia. Sin embargo, luego de 144 h de cultivo, esta diferencia se redujo, ya que la fluorescencia de los protoplastos cultivados en KM8P-S no difirió con respecto a los

mantenidos en MSBS + ANA + BAP, pero sí de los tratamientos restantes ($p=0,0014$) (Fig. 22b).

Cabe destacar que con el medio KM8P-S los protoplastos de *Vasconcellea* sp. tardaron 24 h para alcanzar una fluorescencia cercana al 100% (Fig. 22a), mientras que para *C. papaya* se tardó 72 h para alcanzar este valor (Fig. 22b). Adicionalmente, para *C. papaya* solamente el medio de cultivo KM8P-S fue efectivo, mientras que los protoplastos de *Vasconcellea* sp. respondieron en los cuatro medios de cultivo probados.

Con ambas especies fue posible observar la formación de conglomerados celulares que indican el inicio de la formación de microcolonias. Al cultivar los protoplastos de *C. papaya* fue posible visualizar la división celular luego de 36 y 48 h de cultivo en los medios KM8P-S y MSBS + ANA + BAP, respectivamente. Además, en el medio KM8P-S fue posible observar la formación de conglomerados luego de 48 h de haber iniciado el cultivo. En cuanto a *Vasconcellea* sp., a partir de las 72 h de cultivo se observó la formación de conglomerados celulares solamente en el medio MSBS + ANA + BAP + 2,4-D; sin embargo, luego de 144 h la formación de estos conglomerados fue evidente en los cuatro medios de cultivo probados (Fig. 23).

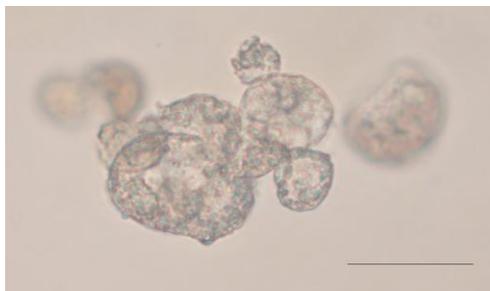


Figura 23. Conglomerado celular de *Vasconcellea* sp. cultivado en medio KM8P-S durante 144 h. La barra indica una distancia de 50 μm .

5.5.2. Reducción del contenido de manitol en el cultivo de protoplastos

Para determinar si el manitol presente en el medio de cultivo influyó en la formación de microcolonias, luego de 72 h se redujo el contenido de esta sustancia en 0, 25 y 50%. Al cultivar en el medio KM8P-S protoplastos de aislados de callos de *C. papaya* ($3,29 \times 10^6 \pm 9,28 \times 10^4$ protoplastos $\cdot \text{g}^{-1}$) se determinó que el contenido de manitol afectó significativamente la formación de microcolonias ($p=0,0556$) (Fig. 24a). La reducción en 50% del contenido de manitol favoreció la formación de microcolonias de mayor tamaño ya que permitió la inducción de microcolonias 3,79 veces más grandes con respecto al

tratamiento con 0% de reducción. Sin embargo, el tamaño de las microcolonias obtenidas al reducir el manitol en 50% no difiere estadísticamente con respecto a la reducción del 25% de este compuesto (Fig. 25).

En cuanto al cultivo de *Vasconcellea* sp. ($1,43 \times 10^5$ protoplastos- g^{-1}), se observó un comportamiento opuesto al observado con *C. papaya*. En este caso la disminución de 50% del contenido de manitol generó microcolonias de un tamaño significativamente menor con respecto a los dos tratamientos restantes ($p=0,0088$) (Fig. 24b).

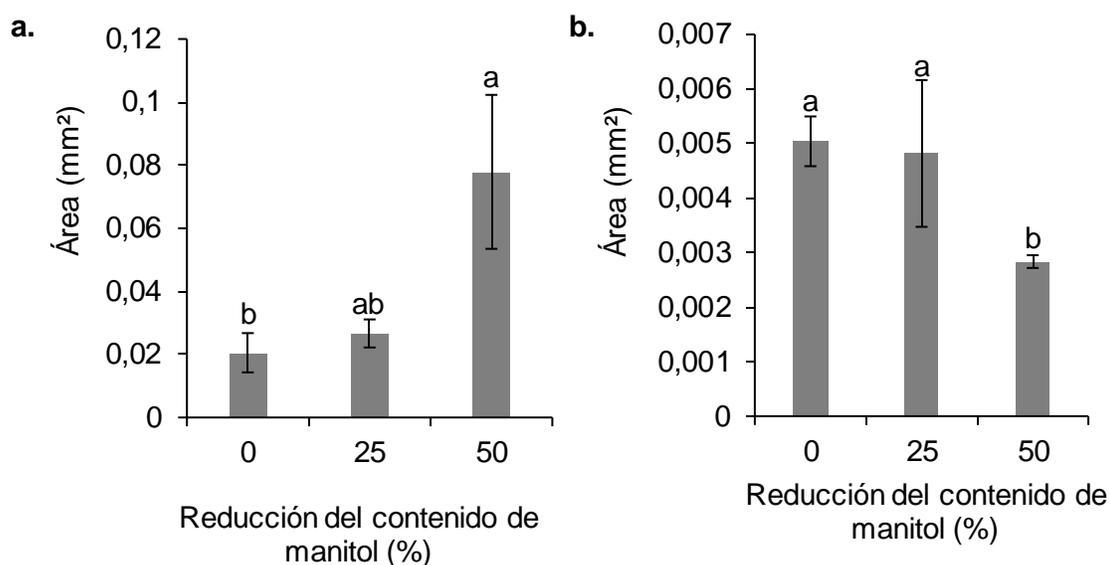


Figura 24. Área ocupada por las microcolonias de **a)** *C. papaya* y **b)** *Vasconcellea* sp. luego de un mes de cultivo en medio KM8P-S, al cual se le redujo el contenido de manitol luego de 72 h de haber iniciado el cultivo. Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Kruskal-Wallis con un 95% de confianza. $n = 5$.

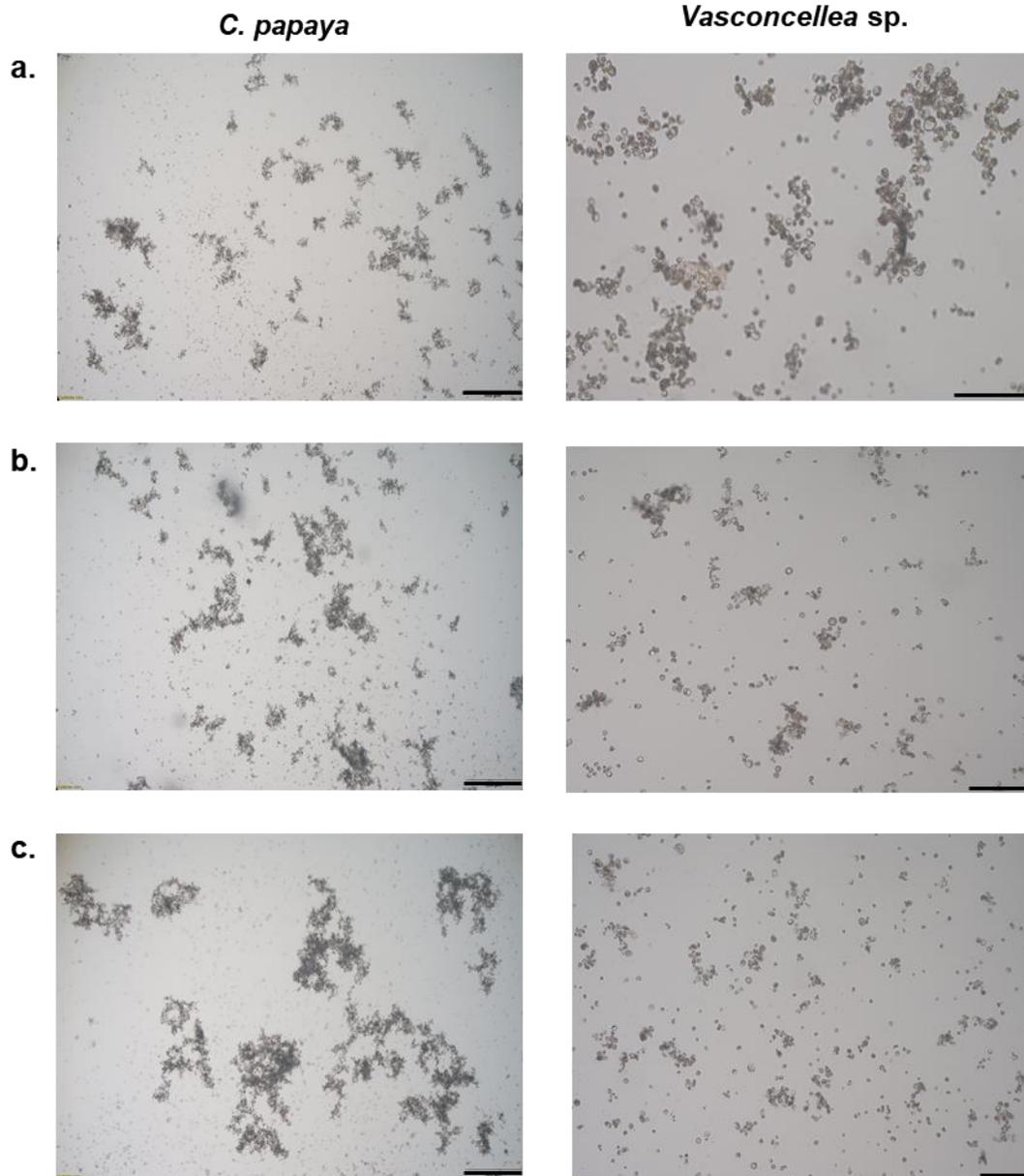


Figura 25. Formación de microcolonias de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. luego de 45 días de cultivo en medio KM8P-S al cual se le redujo el contenido de manitol en **a)** 0, **b)** 25 y **c)** 50% luego de 72 h de haber iniciado el cultivo. La barra indica una distancia de 500 μm para *C. papaya* y 200 μm para *Vasconcellea* sp.

6. Discusión

6.1. Germinación de semillas de *C. papaya* in vitro

En una primera aproximación para germinar semillas de *C. papaya* in vitro, se siguió la metodología mencionada por Lipka (2010); sin embargo, en ese trabajo no se indica el porcentaje de germinación de las semillas, que impide realizar una comparación de resultados. Las semillas utilizadas, que mostraron una germinación menor al 10%, habían sido previamente secadas por cinco días en un flujo constante de aire. Según Webster et al. (2016), el secado de las semillas de *C. papaya* es una limitante para su germinación. Dicha conclusión fue obtenida al utilizar semillas que fueron secadas por un mes. Si bien las condiciones de secado no fueron las mismas, en ambos casos hubo una reducción en el contenido de agua de las semillas. Adicionalmente, Webster et al. (2016) indican que secar las semillas podría reducir la capacidad del embrión para desarrollarse, incluso después de la imbibición, como en este caso con AG₃ y agua. Lo anterior se puede deber a que el embrión no tiene la fuerza necesaria para romper las estructuras que lo rodean e imponen resistencia mecánica para su crecimiento (Webster et al. (2016).

Por otra parte, la segunda introducción de semillas resultó ser más exitosa. La mezcla perlita:turba, el papel de germinación y el agar-agua resultaron ser mejores sustratos para germinar las semillas de *C. papaya* (Fig. 4a). Sin embargo, para la fase de germinación se recomienda utilizar la mezcla perlita:turba porque reproduce de una mejor manera el crecimiento que tendría la planta en condiciones naturales, ya que las semillas no están expuestas a la luz. El papel no permite que las plántulas se mantengan erguidas; además, puede llegar a secarse, por lo que se debe estar revisando y de ser requerido rehidratarlo, lo que puede aumentar el riesgo de contaminación del cultivo, ya que se debe abrir constantemente la tapa del frasco que contiene el cultivo aséptico. Ninguno de estos sustratos contenía nutrientes que le permitiera a las plántulas continuar con su desarrollo, posterior a la germinación. Se recomienda transferir las plántulas a medio MS, si bien, este medio no es adecuado para la germinación, su uso ha sido reportado para el desarrollo de un protocolo de propagación in vitro de *C. papaya* (Reuveni et al.,1990); además, se observó que las plántulas que lograron germinar en este medio se mantuvieron verdes y desarrollaron hojas verdaderas con mayor rapidez (Fig. 6).

Se demostró que aplicar un choque térmico a las semillas favoreció la germinación, principalmente al utilizar como sustrato agar-agua y turba: perlita (Fig. 4b). Webster et al. (2016) indican que en *C. papaya* esto puede deberse a que el choque térmico emula la exposición a altas temperaturas que las semillas tienen naturalmente en los sitios en donde crecen. Además, esta germinación, inducida por el choque térmico, también puede estar relacionada con la síntesis proteica *de novo*, asociada al endospermo y embrión.

Previamente se ha reportado que la presencia del arilo en las semillas de papaya reduce el porcentaje de germinación debido a que contiene sustancias que inhiben este proceso. Una vez removida esta estructura, las semillas deben de ser lavadas con agua por 24 h o ser tratadas con carbón para eliminar remanentes de los compuestos inhibidores (Lange, 1961; Gherardi y Valio, 1976). En esta investigación no fue posible encontrar un efecto significativo en la germinación por la remoción del arilo en tres de los cuatro sustratos probados. Únicamente al utilizar papel como sustrato se logró obtener una germinación significativamente mayor en las semillas sin arilo. Las semillas utilizadas para el experimento provenían del mismo fruto y todas fueron lavadas simultáneamente, por lo que no hay una explicación clara de por qué el efecto solamente se vio en uno de los tratamientos. Para pruebas posteriores se puede considerar modificar el método de lavado de las semillas y aumentar el número de repeticiones, para determinar si de esta manera se puede ver un efecto.

6.2. Aislamiento de protoplastos de *C. papaya*

6.2.1. Aislamiento de protoplastos a partir de hojas

Las hojas han sido utilizadas exitosamente como un tejido para el aislamiento de protoplastos de *C. papaya*. En algunos casos se ha recurrido a realizar cortes en las láminas de las hojas como parte del protocolo para el aislamiento de protoplastos (Litz y Conover, 1979; Lipka, 2010; Tang et al., 2011; Zhang et al., 2011; Gao et al., 2015). Sin embargo, en la presente investigación se determinó que estos cortes no influyeron en el rendimiento ni en la viabilidad de los protoplastos aislados, con respecto al testigo con la lámina sin cortar, pero a la que se le eliminó la epidermis abaxial (Cuadro 8). Estos resultados concuerdan con Lipka (2010), quien determinó que cortar en tiras las hojas de plantas de *C. papaya* provenientes del invernadero tuvo un efecto negativo en el aislamiento ya que disminuye el rendimiento y viabilidad de los protoplastos. El hecho

de que no sea indispensable realizar estos cortes en las hojas permite que se agilice el proceso de establecer un experimento. Además, minimizar la manipulación de las hojas reduce el riesgo de contaminación y evita que se marchite el tejido.

Para poder realizar el aislamiento de los protoplastos es necesario mezclar diferentes enzimas que permitan digerir la pared celular (Cocking, 1972). En este trabajo, las variaciones realizadas en la concentración de celulasa RS, macerozima R10 y driselasa en la solución enzimática no generaron ningún efecto en el rendimiento, viabilidad o fluorescencia al teñir con CFW los protoplastos en ninguno de los experimentos (Cuadro 8). Tres de las cuatro soluciones fueron probadas previamente para el aislamiento de protoplastos de *C. papaya* a partir de hojas de plántulas *ex vitro* (Litz y Conover, 1979) e *in vitro* (Lipka, 2010), y embriones somáticos (Chen y Chen, 1992). Estas soluciones resultaron ser efectivas para el aislamiento de protoplastos en las tres investigaciones previas, al igual que como sucedió en los experimentos realizados en este trabajo. Al utilizar la solución enzimática A, se logró obtener mayor rendimiento y viabilidad con respecto a los resultados obtenidos por Lipka (2010). En cuanto a la solución C, el rendimiento fue mayor, pero la viabilidad disminuyó en 10% con respecto a lo obtenido por Chen y Chen (1992). Esta variación en la viabilidad puede deberse a que la metodología utilizada para la purificación de los protoplastos fue diferente, al igual que el tejido inicial. Los datos obtenidos no pueden compararse con los de Litz y Conover (1979), debido a que no aportan datos numéricos sobre su experimento.

6.2.2. Aislamiento de protoplastos a partir de callo

Al igual que con las hojas, se probaron diferentes soluciones enzimáticas para determinar si estas permiten el aislamiento de protoplastos a partir callos embriogénicos de *C. papaya*. La solución enzimática F resultó ser la más efectiva ya que permitió obtener un rendimiento significativamente mayor de protoplastos·g⁻¹, en comparación con las otras dos soluciones probadas (Fig. 7 y Fig. 8). Dicha solución se caracteriza por contener hemicelulasa, por lo que se están cubriendo los tres tipos posibles de enzimas de digestión para polisacáridos: celulasas, hemicelulasas y pectinasas (macerozima R10) (Ishii, 1989). La degradación de las hemicelulosas podría estar favoreciendo una mayor liberación de los protoplastos de la pared celular. Lo anterior, debido a que estos compuestos sirven como puente de unión entre las microfibrillas de celulosa y los polisacáridos de pectinas (Bauer et al., 1973).

6.3. Aislamiento de protoplastos a partir de callos de *Vasconcellea* sp.

Al probar tres concentraciones de celulasa (1, 1,5 y 2% m/v) para aislar protoplastos de callos de *Vasconcellea* sp. no se encontró un cambio significativo en el rendimiento del aislamiento (Cuadro 9). Esto podría deberse a que las concentraciones probadas de esta enzima son altas en comparación con el contenido de celulosa en la pared celular, por lo que agregar más celulasa a la solución enzimática no provocó ningún efecto. A futuro, valdría la pena estudiar la composición de la pared celular de *Vasconcellea* sp. para optimizar la cantidad de celulasa que se debe agregar a la solución de digestión. La concentración de celulasa a utilizar es proporcional al contenido de celulosa, principal componente de la pared celular, y el contenido de este polisacárido en la pared celular varía entre especies (Ruesink, 1971; Doi y Kosugi, 2004). Para incrementar el rendimiento del aislamiento, puede que sea necesario adicionar hemicelulasa a la solución, al igual que con los protoplastos de callos de *C. papaya*.

Anteriormente se han realizado aislamientos de protoplastos de diversos tejidos de *C. papaya* y tres especies de *Vasconcellea*, en los cuales se ha utilizado entre 1 y 3% m/v de celulasa R-10, acompañados en su mayoría por 0,5% m/v de macerozima R-10 (referencias citadas en el Cuadro 1). Si bien es cierto no se utilizó el mismo tipo de celulasa, la combinación enzimática es similar y en todos los casos se logró el aislamiento de protoplastos, con un rendimiento superior al obtenido en esta investigación. Al no existir una variación en el rendimiento o viabilidad de los protoplastos es recomendable continuar utilizando 1% m/v de celulasa RS por ser la concentración más baja, que reduce el costo del aislamiento.

Tanto el rendimiento como la viabilidad de los protoplastos obtenidos en el experimento uno, en donde se varió la concentración de celulasa, fueron bajos y no permitieron continuar con procesos posteriores de cultivo, regeneración y fusión de protoplastos ya que se recomienda utilizar al menos 5×10^4 protoplastos·mL⁻¹ para la regeneración (Jain et al., 1995) y $5,0 \times 10^5$ protoplastos·mL⁻¹ para la fusión (Bates, 1985), que en este caso no se cumplió. Debido a la necesidad de incrementar estos parámetros para el aislamiento de los protoplastos, en el segundo experimento se adicionó hemicelulasa a la solución enzimática. Anteriormente no se había reportado el uso de esta enzima para aislar protoplastos de *C. papaya* o alguna especie de *Vasconcellea*. La adición de 0,5% de hemicelulasa no incrementó el rendimiento de los protoplastos (Cuadro 9); sin embargo, con la tinción de blanco de calcoflúor se pudo observar una disminución en la

fluorescencia de los protoplastos a los que se les agregó esta enzima (Fig. 9), evidencia de una mayor remoción de la pared, debido a que este compuesto se une a las paredes celulares por la presencia de celulosa, polisacáridos carboxilados y quitina, entre otros polímeros unidos por enlaces tipo β (Berglund et al., 1987) y permite darle seguimiento a la regeneración de la pared celular en protoplastos de diferentes especies (Nagata y Takebe, 1970; Williamson et al., 1977; Kinnersley et al., 1978; Galbraith, 1981; Yamada y Sakaguchi, 1982). El uso de este tinte es efectivo, pero se debe tener en cuenta que no permite detectar microfibrillas de celulosa cuando estas se encuentran en baja densidad (Williamson et al., 1977). En este caso fue utilizado a la inversa, ya que se usó este tinte para determinar si la pared celular fue removida.

En el tercer experimento se probó el efecto de agregar a la solución enzimática 0,25, 0,5 o 1% m/v de hemicelulasa. Al utilizar 1% m/v de esta enzima se logró incrementar significativamente el rendimiento y viabilidad de los protoplastos, obteniéndose, $1,59 \times 10^7 \pm 1,51 \times 10^7$ protoplastos $\cdot g^{-1}$ y $84,07 \pm 5,57$ %, respectivamente (Fig. 10). Por lo tanto, el problema del bajo rendimiento para procesos posteriores (Bates, 1985; Jain et al., 1995) fue solucionado con esta enzima. Como se mencionó anteriormente, la inclusión de la hemicelulasa podría facilitar el proceso del aislamiento de los protoplastos, ya que se cubrirían los tres tipos de polisacáridos que se pueden encontrar en la pared celular (Bauer et al., 1973).

En el cuarto y quinto experimento se probó si el incremento entre 1 y 1,5% m/v de hemicelulasa favoreció el aumento en el rendimiento de los protoplastos; sin embargo, esto no sucedió, por lo que puede mantenerse el uso de 1% de esta enzima para el aislamiento de protoplastos de callo de *Vasconcellea* sp. Al igual que en esta investigación, la adición de hemicelulasa a la solución enzimática resultó ser crucial en el rendimiento de los protoplastos para Xu y Jia (1996). La solución que utilizaron para aislar protoplastos de callos de *Artemisia sphaerocephala* estaba compuesta por 1% m/v de celulasa R-10 y 0,5% m/v de macerozima R-10, y a esta le adicionaron 0,5% m/v de hemicelulasa. Al agregar esta enzima fue posible incrementar seis veces el rendimiento de los protoplastos, siendo este de $1,12 \times 10^6 \pm 0,21 \times 10^6$ protoplastos $\cdot g^{-1}$ con una viabilidad del 81,5%.

En reportes previos, la hemicelulasa ha sido utilizada a una concentración de 0,5% m/v para aislar protoplastos a partir de callos de legumbres (Fabaceae), canola (Brassicaceae), *Echinacea augustifolia* (Asteraceae), *Gentiana crassicaulis*

(Gentianaceae) y *Artemisia sphaerocephala* (Asteraceae). Además de esta enzima, las soluciones de digestión incluyeron celulasa, macerozima y en algunos casos pectoliasa o driselasa (Karthä et al., 1974; Gill et al., 1987; Meng et al., 1996; Xu y Jia, 1996; Hou y Jia, 2004; Zhu et al., 2005). Por otra parte, se ha empleado 1% m/v de hemicelulasa para aislar protoplastos de mesófilo de diferentes cereales y rosa. Al igual que en el caso anterior, las soluciones de digestión se suplementaron con celulasa, macerozima y, en el caso de la rosa, con pectoliasa (Chin y Scott, 1979; Marchant et al., 1997).

En esta investigación, la solución enzimática que resultó ser más efectiva para aislar protoplastos de callos de *Vasconcellea* sp. fue la F, compuesta por 1% m/v de celulasa RS, 0,5% m/v de macerozima R-10 y 1% m/v de hemicelulasa. Chin y Scott (1979) utilizaron una solución enzimática similar para aislar protoplastos de hojas de diferentes cereales. Sin embargo, en lugar de usar celulasa RS utilizaron celulisina, un tipo de celulasa. Al igual que en esta investigación, lograron obtener al menos 10^6 protoplastos·g⁻¹. El período de incubación utilizado por Chin y Scott (1979) varió entre 3 y 5 h, por lo que se podría considerar realizar experimentos para tratar de reducir el tiempo de incubación de los callos con la enzima.

De *Vasconcellea* sp. se obtuvieron dos tipos de callo (Fig. 2), siendo el callo friable el más eficiente para el aislamiento de protoplastos. Este tipo de callo posee un menor contenido de agua, por lo que la masa agregada inicialmente como muestra resultó ser en su mayoría tejido, en comparación con los callos de apariencia embriogénica, donde parte de la masa fue aportada por el contenido líquido que poseen. Este rendimiento variable en el aislamiento de los protoplastos dependiendo del tipo de callo que se utilice como material inicial (Fig. 11) también fue reportado por Imbrie-Milligan y Hodges (1986). En esa investigación identificaron dos tipos de callo de maíz, uno heterogéneo y otro friable de rápido crecimiento. Con el callo heterogéneo se logró obtener un mayor rendimiento y se necesitó una menor cantidad de tejido para obtener el rendimiento máximo de protoplastos, en comparación con el callo friable. En esta investigación se obtuvo resultados inversos a los obtenidos por Imbrie-Milligan y Hodges (1986); sin embargo, los resultados no son comparables debido a que los tipos de callo no son iguales y se trabajó con dos especies diferentes.

Por último, al aislar protoplastos de callos friables con la solución enzimática F se obtuvo una variación entre $9,18 \times 10^5 \pm 6,78 \times 10^5$ y $1,59 \times 10^7 \pm 8,72 \times 10^6$ protoplastos·g⁻¹. Esta variación ocurrió entre repeticiones, a pesar de que se utilizaron callos cultivados en las

mismas condiciones y el método de aislamiento. Esta variación entre repeticiones también ha sido reportada al aislar protoplastos de pitahaya (Acuña, 2018).

6.4. Electrofusión de protoplastos y detección de posibles fusionantes mediante polimorfismos entre *C. papaya* y *Vasconcellea* sp.

6.4.1. Electrofusión de protoplastos

En el primer experimento de viabilidad en soluciones de fusión se determinó que la exposición por 15 min a la solución de fusión para células eucariotas de Eppendorf a diferentes osmolalidades (90, 150 y 200 mOsmol/kg) disminuyó la viabilidad de los protoplastos, excepto para los protoplastos de *C. papaya* expuestos a 200 mOsmol/kg (Fig. 12). Montero-Carmona y Jiménez (2015) utilizaron la solución a 90 mOsmol/kg para fusionar protoplastos de *Vanilla planifolia* y *V. pompona* y lograron obtener un máximo de 8,9% eventos de fusión. En su investigación no reportaron el efecto de la solución de fusión en la viabilidad de los protoplastos; sin embargo, el bajo rendimiento de fusión puede estar asociado a este factor. En la presente investigación, en *C. papaya* y *Vasconcellea* sp., se determinó que la solución de 90 mOsmol/kg disminuyó cerca de cuatro veces la viabilidad de los protoplastos, con respecto al testigo. Lo anterior indica que el efecto de la solución de fusión sí es un factor relevante a tomar en cuenta, ya que puede reducir la viabilidad y por tanto afectar el éxito del desarrollo de un protocolo para la hibridación somática de protoplastos.

En el segundo experimento de viabilidad se determinó que las soluciones de fusión propuestas por Bates et al. (1983), Yu et al. (2013) y Duquenne et al. (2007) no provocaron cambios en la viabilidad de los protoplastos con respecto al testigo (Fig. 13). Si bien en las investigaciones realizadas por estos autores no se evaluó este factor, en los tres estudios se logró obtener la formación de cadenas y fusionantes, aunque no cuantificaron el porcentaje de fusionantes obtenidos (Bates et al., 1983; Yu et al., 2013; Duquenne et al., 2007). Cabe destacar que Yu et al. (2013) lograron regenerar los protoplastos y obtener plantas híbridas, por lo que se puede afirmar que esta solución fue un medio efectivo para realizar la electrofusión de papa y berenjena. En este segundo experimento, nuevamente se evidenció que la solución de fusión para células eucariotas de Eppendorf (90 mOsmol/kg) generó una disminución significativa de la viabilidad en ambas especies. Dicha reducción en la viabilidad podría deberse a que esta solución es hipoosmolar, por lo tanto, puede que no esté osmóticamente balanceada, lo que genera

daños en las membranas celulares, incluso si el tiempo de exposición a la solución de fusión es corto (Bates et al., 1987b). En este segundo experimento el efecto de la solución sobre la disminución de la viabilidad no fue tan importante como en el primer experimento; sin embargo, esto puede deberse a que se redujo en 10 min el tiempo de exposición a la solución.

Al realizar diferentes experimentos para la electrofusión de protoplastos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp., se encontró que el proceso es complicado de realizar, y esto podría deberse a la diferencia de tamaño que existe entre los protoplastos de ambas especies (Fig. 14 y Cuadro 10). Previamente se ha reportado que este es uno de los factores que afectan la electrofusión (Davey et al., 2005).

Se intentó electrofundar protoplastos de hojas in vitro de *C. papaya* y callos de *Vasconcellea* sp, pero no se logró obtener la formación de cadenas. Al usar protoplastos de callos de ambas especies se observaron eventos de fusión, principalmente entre protoplastos de tamaño similar (Fig. 17), pero no se pudo determinar si los eventos fueron inter o intraespecíficos. Al fusionar protoplastos de *Vasconcellea* entre sí, con tres soluciones de fusión diferentes, se observó la formación de cadenas y eventos de fusión con las soluciones de Bates et al. (1983) y Yu et al. (2013). Lo anterior sugiere que la electrofusión no es un proceso aleatorio cuando hay protoplastos de diferente tamaño o diámetro (Bates et al., 1987b). Se ha visto que la eficiencia del proceso de electrofusión incrementa si los protoplastos son de tamaño similar, debido a que el potencial de membrana inducido por el campo eléctrico es directamente proporcional al radio celular, (Bates et al., 1987b).

La teoría indica que entre mayor sea el tamaño del protoplasto, menor será la intensidad de campo requerida para alcanzar el voltaje crítico (Bates et al., 1987b). Esto concuerda con los voltajes calculados para ambas especies en estudio. Tanto en la solución de Yu et al. (2013) como en la de Bates et al. (1983), el voltaje necesario para fusionar los protoplastos de *Vasconcellea* sp. fue menor en comparación con los protoplastos de *C. papaya*. Lo anterior fue comprobado por Mehrle et al. (1990) al realizar experimentos con protoplastos de *Avena sativa* donde, para poder realizar un evento de fusión, la intensidad de campo que se debió aplicar fue inversamente proporcional al tamaño del protoplasto.

Si bien se ha mencionado que la electrofusión entre protoplastos de diferente tamaño es difícil de realizar, no significa que sea imposible. Por ejemplo, Tempelaar y Jones (1985) fusionaron protoplastos de diferentes cultivos y determinaron que los protoplastos pequeños tienden a fusionarse más fácilmente con los protoplastos grandes. También, Salhani et al. (1985) lograron fusionar protoplastos de células eritroleucémicas de ratón con un radio de 8 μm con protoplastos de *Petunia* con un radio de 28 μm .

Para tratar de superar esta barrera física que se presenta entre los protoplastos de estas dos especies de Caricaceae, se podrían agregar diferentes sustancias que promuevan la eficiencia del proceso. Por ejemplo, en el caso del tabaco, la adición de proteasa y pronasa a la solución de fusión permitió incrementar el rendimiento de la electrofusión 2,9 veces con respecto al testigo al fusionar protoplastos de mesófilo (Ruzin y McCarthy, 1986). De igual manera, Hoffmann-Tsay et al. (1994) determinaron para esta misma especie, que el uso de cloruro de di-[polioxietileno] etanol]-estearilamonio incrementó 2,15 veces el rendimiento de la fusión, mientras que el polivinilalcohol aumentó el rendimiento en 2,21 veces.

Por otra parte, la formación de cadenas de protoplastos al electrofundar protoplastos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. (Fig 15a y c) indica que la corriente AC aplicada fue suficiente para que ocurriera la dielectroforesis (Bates et al., 1987b). Sin embargo, luego de realizar la fusión se observó un mayor daño en los protoplastos expuestos a la solución de Bates et al. (1983), con respecto a los sometidos a la solución de Yu et al. (2013) (Fig. 16b y d). Esta diferencia en el daño celular puede deberse a que la solución de Yu et al. (2013) contiene 0,2 mM de CaCl_2 . Se ha demostrado que utilizar soluciones con una concentración de CaCl_2 entre 0,1-0,5 mM, puede reducir la lisis celular (Watts y King, 1984).

En cuanto a la solución propuesta por Duquenne et al. (2007), se vio un lento desplazamiento de los protoplastos, además de ausencia de fusionantes. Este resultado puede estar asociado a su alto contenido de CaCl_2 (1 mM), que afecta la conductividad eléctrica de la solución. Chapel et al. (1984) determinaron que, al agregar 2 mM de CaCl_2 , la eficiencia de la fusión se reducía en 50%, mientras que con 5 mM de CaCl_2 el proceso se inhibía por completo. En este caso, puede que el uso de 1 mM en la solución de Duquenne et al. (2007) inhiba parcialmente el proceso de fusión y, por esta razón, no haya sido posible observar un comportamiento similar al de las otras dos soluciones probadas que no contienen del todo CaCl_2 (Bates et al., 1983) o una baja concentración

(0,2 mM) (Yu et al.,2013). A futuro valdría la pena probar otras concentraciones de CaCl₂, por ejemplo 0,5 y 2 mM, para comprobar si este compuesto realmente está modificando la eficiencia de la fusión. Se esperaría que conforme incrementa la concentración de CaCl₂ disminuya el movimiento de los protoplastos.

Un punto importante a recalcar es que, luego del proceso de electrofusión, fue posible observar protoplastos unidos, pero no fusionados, ya que no se observaba una invaginación en sus membranas (Fig. 18). Estos protoplastos unidos son fusionantes potenciales, pero puede que el tiempo en el que se evaluó el proceso no haya sido suficiente para observar la fusión, ya que se observaron inmediatamente después de finalizar los choques eléctricos. Por ejemplo, fue posible fusionar protoplastos de *Brassica napus* con protoplastos pequeños de *Solanum brevidens*, el proceso tardó alrededor de 15 min en ocurrir y en un inicio se veían solamente unidos (Jones, 1988), tal como en el caso de las especies estudiadas en la presente investigación. A futuro, se podría probar mantener por un tiempo más prolongado los protoplastos en la solución de fusión, aunque esto podría a reducir el porcentaje de viabilidad, para determinar si la fusión llega a ocurrir después de 15 min de estar en contacto, o el tiempo que sea necesario.

Por último, al fusionar protoplastos resulta ser ventajoso poder identificar los fusionantes a simple vista. Por esta razón, es muy conveniente hacer fusionantes a partir de mesófilo de hojas y callos, en donde la presencia de zonas verdes e incoloras evidenciaría la fusión (Bates et al., 1987a). En esta investigación los resultados más promisorios fueron obtenidos con protoplastos aislados de callos de ambas especies, pero no se pudo determinar si los fusionantes fueron inter o intraespecíficos. A futuro, para poder determinar visualmente si ocurren eventos específicos se podría recurrir a teñir los protoplastos de una de las dos especies. Por ejemplo, para diferenciar durante la electrofusión los protoplastos aislados de mesófilo de maíz y avena, se tiñó con rojo neutro los protoplastos de avena (Bates et al., 1983).

6.4.2. Detección molecular de posibles fusionantes mediante PCR-RFLP

De las seis regiones de ADN probadas, se determinó que únicamente las regiones *ITS1-ITS4* y *trnK1-K2* permitieron identificar polimorfismos entre *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. con las enzimas de digestión probadas (Fig. 19). La región *ITS* ha sido utilizada previamente para realizar análisis filogenéticos de hongos (White et al., 1990; Nagy et

al., 2012) y diferentes especies de plantas, incluida la familia Caricaceae (Baldwin et al., 1995; Olson, 2002; Kyndt et al., 2005). Por ejemplo, Kyndt et al. (2005) utilizaron la región *ITS1-ITS4* para estudiar la evolución intragenérica de *Vasconcellea*. En este caso, al digerir el producto de PCR generado al amplificar la región *ITS1-ITS4* con la endonucleasa *RsaI* fue posible observar diferencias entre ambas especies. Si bien es cierto que la diferencia es sutil en el caso de *C. papaya*, esta región puede utilizarse en conjunto con otros marcadores para identificar los posibles fusionantes.

Previamente, van Droogenbroeck et al. (2004) utilizaron la región *trnK1-trnK2* para estudiar la filogenia de diferentes géneros de la familia Caricaceae. La digestión de los productos de PCR la realizaron con la endonucleasa de restricción *AfaI*, que realiza cortes idénticos a la *RsaI* utilizada en esta investigación. Sin embargo, en el caso *Vasconcellea* sp., van Droogenbroeck et al. (2004) obtuvieron tres bandas entre las 200-300 pb, mientras que en esta investigación solamente se divisaron dos. Respecto a *C. papaya*, este mismo autor identificó dos bandas de menos de 100 pb, pero en esta investigación solamente fue posible observar una única banda difusa.

Esto se puede deber a que la electroforesis no permitió separar las bandas, ya que las bandas no detectadas tienen un peso casi idéntico al de la banda más cercana. A pesar de esta diferencia, aún sería posible identificar cruces entre ambas especies por la presencia de una banda diferencial en cada especie. En el caso de *Vasconcellea* sp., la banda diferencial es cercana a los 250 pb, que debería corresponder a dos bandas según van Droogenbroeck et al. (2004), y para *C. papaya* cercana a los 500 pb. A futuro, se podría utilizar un gel de agarosa de mayor porcentaje, o bien, geles de poliacrilamida o electroforesis capilar, para aumentar la resolución de los resultados.

Al tratar de identificar molecularmente con las regiones *trnL-trnF* e *ITS3-307R* la especie de *Vasconcellea* sp. con la que se está trabajando, los datos obtenidos sugieren que corresponde a *V. cundinamarcensis*, anteriormente conocida como *C. pubescens* (Fig. 21) (Badillo, 1971) antes de su reclasificación (Badillo, 2000). Por lo anterior, lo observado corresponde con la información molecular generada. Esta especie de *Vasconcellea* es una de las tres que han sido reportadas previamente en Costa Rica (Scheldeman et al., 2007). *V. cundinamarcensis* se caracteriza por poseer resistencia completa al PRSV-P atribuida al gen dominante *prsv-1*. Dicha cualidad la convierte en una especie candidata para la mejora genética de otras Caricaceae que no son

resistentes, siempre y cuando se puedan superar las barreras que impiden el cruce intergenérico entre estas (Drew et al., 1998; Dillon et al., 2005; Dillon et al., 2006).

Con las dos regiones secuenciadas se obtuvo, se obtuvo solo un fragmento corto de bases nitrogenadas informativas, que pudo ocasionar que con la región *ITS3-307R* no se lograra identificar a nivel de especie la *Vasconcellea*. A futuro, se pueden fabricar cebadores que amplifiquen secciones de 500 pb de esta región, que permitirían obtener una secuencia consenso con un mayor número de bases informativas para realizar una identificación más certera.

6.5. Cultivo y regeneración de protoplastos

6.5.1. Regeneración de la pared celular de los protoplastos

Si bien hubo un comportamiento diferencial en cuanto a la regeneración de la pared celular entre *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. con el medio de cultivo KM8P-S (Fig. 22) en ambas especies a partir de las 24 h se logró ver un incremento en el número de protoplastos fluorescentes teñidos con CFW, y se logró alcanzar rápidamente un máximo de fluorescencia, por lo que no hubo un retardo en la regeneración de la pared con respecto a los estudios realizados previamente. El éxito de este medio de cultivo en la regeneración de la pared celular puede deberse a que, además de contener macro y micronutrientes, es rico en azúcares, vitaminas, ácidos orgánicos y aminoácidos, los cuales pueden contribuir al proceso de síntesis de la pared celular. Al utilizar el medio KM8P, con algunas modificaciones, ha sido posible observar la regeneración de la pared celular con CFW luego de 12 h en *Solarium viarum* (Chand y Chand, 1996), 24 h en *Stevia rebaudiana*, berenjena y *Anubias nana* (Lopez-Arellano et al., 2015; Sihachakr y Ducreux, 1987; Pongchawee et al., 2006) y 48 h en *Picea glauca*, *Lotus corniculatus* y coliflor (Bekkaoui et al., 1987; Rasheed et al., 1990; Vatsya y Bhaskaran, 1982), después de haber realizado el aislamiento. Esto sugiere que la regeneración de la pared en las especies estudiadas en esta investigación podría iniciar más temprano, lo que se evidenciaría con evaluaciones frecuentes durante las primeras 24 h de haber realizado el aislamiento.

Con el uso del medio KM8P, se ha logrado obtener la formación de colonias celulares (Chand y Chand, 1996; Pongchawee et al., 2006), tal y como fue observado en esta investigación. Además de la formación de estas colonias, también ha sido posible obtener microcallos y callos, que fueron transferidos a otros medios de cultivo y se logró

obtener plántulas regeneradas a partir de protoplastos (Lopez-Arellano et al., 2015; Tao et al., 1991; Rasheed et al., 1990; Sihachakr y Ducreux, 1987, Vatsya y Bhaskaran, 1982). Este medio en específico ha sido utilizado únicamente para regenerar protoplastos de *C. papaya* hasta llegar a la obtención plantas (Chen y Chen, 1992), y es una modificación del medio KM8P (Kao y Michayluk, 1975).

En esta investigación se observó un efecto diferenciado entre los cultivos de protoplastos de *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. utilizando el medio de Lipka (2010) suplementado con los tres reguladores (ANA, BAP y 2,4-D). En el caso de *C. papaya*, no se logró detectar un incremento en la fluorescencia de los protoplastos (Fig. 22a). Por el contrario, con *Vasconcellea* sp. sí se logró observar la regeneración de la pared celular, medida indirectamente con CFW (Fig. 22b). Por lo tanto, hubo un efecto diferenciado entre especies con respecto a la regeneración de la pared celular en estos medios de cultivo. Este efecto podría deberse al estado fisiológico de cada especie. Por ejemplo, podrían existir diferencias en los niveles endógenos de hormonas vegetales que ocasionen que no haya respuesta o que la suplementación con reguladores de crecimiento no sea suficiente, o bien, que no todos los callos usados de *C. papaya* se encontraban en crecimiento activo y esto afectó la respuesta. También, al tratarse de diferentes especies, es de esperar que haya un comportamiento diferente por el efecto que puede generar el genotipo.

Al cultivar los protoplastos en medio MSBSOH, Lipka (2010) determinó que luego de mantener por siete días los protoplastos de *C. papaya* en el medio suplementado con ANA y BAP los protoplastos se oxidaban, pero esto no ocurría al suplementar el medio únicamente con 2,4-D. Sin embargo, en la presente investigación no se observó oxidación de los protoplastos en ninguno de los tratamientos probados, por lo que no se puede indicar que el uso de una u otra combinación de reguladores de crecimiento promueva este efecto negativo en el cultivo.

Al cultivar los protoplastos en los medios estudiados fue posible observar la formación de conglomerados celulares en todos los tratamientos probados; sin embargo, Lipka (2010) no se refiere en su investigación a este tema, por lo que no es posible realizar una comparación. Cabe destacar que con ambas especies la formación de conglomerados celulares se observó primeramente al cultivar los protoplastos en MSBS + ANA + BAP + 2,4-D. Esto podría deberse a la presencia de auxinas, que junto con los

otros reguladores estimulan la división celular, como ha sido observado en el cultivo de protoplastos de alfalfa (Pasternak et al., 2000).

6.5.2. Reducción del contenido de manitol en el cultivo de protoplastos

Los resultados obtenidos para *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. al reducir el contenido de manitol luego del cultivo de protoplastos produjeron resultados inversos (Fig. 25): para el caso de *C. papaya*, una mayor reducción del contenido de manitol (50%) permitió obtener microcolonias de mayor tamaño, mientras que en el caso de *Vasconcellea* sp., el testigo, sin reducción de manitol, mostró los resultados más favorables en términos del área ocupada por las microcolonias. No obstante, para las especies estudiadas no se logró obtener más allá de microcolonias o agrupaciones de células sin llegar a formar un microcallo o callo luego de un mes y medio de cultivo. Se ha observado que la reducción gradual de manitol posterior al cultivo de protoplastos promueve la formación de colonias (Zhang et al., 2008).

La ausencia de resultados positivos en la formación de callos podría deberse a diferentes factores, entre ellos que la reducción del contenido de manitol realizada, de hasta 50% de la concentración inicial, no fue suficiente para que pudiera continuar la proliferación celular. Sin embargo, una reducción del 50% del contenido de manitol sí fue efectiva para Melchers y Labib (1974) al utilizar dos mutantes de *Nicotiana tabacum*, en donde, luego de la reducción del potencial con manitol, los callos pequeños pasaron a formar brotes. Otro posible panorama que podría estar ocurriendo con *C. papaya* y *Vasconcellea* sp. es que la reducción de manitol se haya dado muy pronto, antes de que ocurrieran suficientes divisiones celulares que permitieran posteriormente la formación de microcallos. Al respecto, Nishio et al. (1987) determinaron que, a concentraciones de manitol de 0,4 y 0,5 M ocurre la división celular con mayor frecuencia, mientras que el crecimiento de las colonias de protoplastos es favorecido con la reducción del manitol a 0,3 M.

Para solucionar el problema del desarrollo de los microcallos se podría optar por realizar una reducción gradual en la concentración del manitol. Tjahjono et al. (1993) lograron regenerar protoplastos de *Haematococcus pluvialis* reduciendo la concentración de manitol de 0,2 M a 0,05 M, incubando una hora entre cada reducción. La teoría de que la reducción gradual favorece la regeneración de protoplastos la respaldaron estos autores mediante la reducción de la concentración de manitol de 0,2 M a 0,05 M

directamente, en donde solamente lograron obtener unas pocas colonias de protoplastos. Además de la reducción del contenido de manitol se podría contemplar reducir la concentración de macroelementos, tal como lo realizó Mühlbach (1980). En su investigación trabajó con dos cultivares de tomate y logró obtener una mayor tasa de división celular para ambos genotipos cuando se redujo el contenido de los macroelementos, y en lugar de reducir el manitol, lo reemplazó con glucosa para mantener la estabilidad osmótica. Sin embargo, previamente también se ha reportado que el manitol puede actuar como un inhibidor del crecimiento en cultivos de protoplastos (Bharal y Rashid, 1980).

El medio KM8P-S utilizado para cultivar los protoplastos es un medio complejo, ya que contiene 13 vitaminas, nueve fuentes de carbohidratos, cuatro ácidos orgánicos, un hidrolizado proteico, seis macronutrientes y nueve micronutrientes (Chen y Chen, 1992). Se podría considerar reducir el contenido de estos macroelementos para ver si se obtiene una respuesta positiva en el desarrollo de los protoplastos, tal como lo realizó Mühlbach (1980). La concentración de macronutrientes utilizada en el medio KM8P-S es similar a la utilizada en el medio MS, la diferencia radica en que el KM8P-S contiene adicionalmente KCl. Originalmente, los callos de ambas especies son cultivados en medio de cultivo MS con la mitad de la concentración de macronutrientes, por lo que se podría probar reducir la concentración de estas sales en el medio KM8P-S para determinar si esto genera un efecto positivo en el desarrollo de las microcallos obtenidos de protoplastos.

7. Referencias bibliográficas

- ACUÑA, C. 2018. Hibridación somática de pitahaya *Hylocereus costaricensis* y *Selenicereus megalanthus* (Cactaceae) mediante fusión de protoplastos. Tesis. M.Sc. San Pedro, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 112 p.
- ALBUQUERQUE, RM; PIZZITOLA, MP; E SILVA, ACA., DITZ, D; FREITAS, KM; FERREIRA, Ê; ... LOPES, MTP. 2020. The proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* latex displays anti-inflammatory effect in a mouse model of acute TNBS-induced colitis. *Scientific Reports* 10(1): 1-11.
- ALTSCHUL, SF; GISH, W; MILLER, W; MYERS, EW; LIPMAN, DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 21: 403-410.
- ARA, H; JAISWAL, U; JAISWAL, VS. 2000. Plant regeneration from protoplasts of mango (*Mangifera indica* L.) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 19(6): 622-627.
- ARAYA-VALVERDE, E; BOGANTES, A; HOLST, A; VARGAS-MORA, C; GÓMEZ-ALPÍZAR, L; BRENES, A; SÁNCHEZ-BARRANTES, E; BARBOZA-BARQUERO, L. 2019. Field performance of hermaphrodite papaya plants obtained through molecular selection and micropropagation. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 19(4): 420-427.
- ASSANI, A; HAICOUR, R; WENZEL, G; COTE, F; BAKRY, F; FOROUGHI-WEHR, B; DUCREUX, G; AGUILLAR, ME; GRAPIN, A. 2001. Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 20(6): 482-488.
- BADILLO, VM. 1971. Monografía de la familia Caricaceae. Maracay, Venezuela, Universidad Central de Venezuela. 140 p.
- BADILLO, VM. 1993. Caricaceae: segundo esquema. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Venezuela* 43: 1-111.
- BADILLO, VM. 2000. *Carica* L. vs. *Vasconcellea* St.-Hil. (Caricaceae) con la rehabilitación de este último. *Ernstia* 10(2):74-79.

- BAEZA, G; CORREA, D; SALAS, C. 1990. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 51(1): 1-9.
- BALDWIN, BG; CAMPBELL, CS; PORTER, JM; SANDERSON, MJ; WOJCIECHOWSKI, MF; DONOGHUE, MJ. 1995. Utility of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences in phylogenetic analysis of angiosperms. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- BATES, GW; GAYNOR, JJ; SHEKHAWAT, NS. 1983. Fusion of plant protoplasts by electric fields. *Plant Physiology* 72(4): 1110-1113.
- BATES, G. 1985. Electrical fusion for optimal formation of protoplast heterokaryons in *Nicotiana*. *Planta* 165: 217-224.
- BATES, GW; NEA, LJ; HASENKAMPF, CA. 1987a. Electrofusion and plant somatic hybridization. *In: Sowers, AE (ed.). Cell Fusion. Massachusetts, Estados Unidos, Springer. p. 479-496.*
- BATES, GW; SAUNDERS, JA; SOWERS, AE. 1987b. Electrofusion: principles and applications. *In: Sowers, AE (ed.). Cell fusion. Boston, Estados Unidos, Springer. p. 367-395.*
- BAUER, WD; TALMADGE, K.W; KEEGSTRA, K; ALBERSHEIM, P. 1973. The structure of plant cell walls: II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology* 51(1): 174-187.
- BEKKAOUI, F; SAXENA, PK; ATTREE, SM; FOWKE, LC; DUNSTAN, DI. 1987. The isolation and culture of protoplasts from an embryogenic cell suspension culture of *Picea glauca* (Moench) Voss. *Plant Cell Reports* 6(6): 476-479.
- BERGLUND, DL; TAFFS, RE; ROBERTSON, NP. 1987. A rapid analytical technique for flow cytometric analysis of cell viability using calcofluor white M2R. *Cytometry Part A* 8(4): 421-426.
- BHARAL, S; RASHID, A. 1980. Isolation of protoplasts from stem and hypocotyl of the legume *Vigna sinensis* and some factors affecting their regeneration. *Protoplasma* 102(3-4): 307-313.

- BHOJWANI, SS; RAZDAN, MK. 1986. Protoplast Isolation and Culture. *In: Plant tissue culture: theory and practice*. Ámsterdan, Países Bajos, Elsevier. p. 343-344.
- BOGANTES, A; MORA, E. 2006. Validación del rendimiento del híbrido de papaya "Pococi" (*Carica papaya*) en el Caribe de Costa Rica. *Revista Alcances Tecnológicos* 4(1): 53-58.
- BOYES, CJ; SINK, KC. 1989. Regeneration of plants from protoplasts of *Salpiglossis*. *In: Plant Protoplasts and Genetic Engineering I*. Berlin, Alemania, Springer. p. 254-261
- BRENNER, S; DARK, FA; GERHARDT, P; JEYNES, MH; KANDLER, O; KELLENBERGER, E; KLIENENBERGER-NOBEL, E; MCQUILLEN, K; RUBIO-HUERTOS, M; SALTON, MBJ; STRANGE, BE; TOMOSIK, J; WEIBULL, C. 1958. Bacterial protoplasts. *Nature* 181: 1713-1715.
- CARLSON, PS. 1973. The use of protoplasts for genetic research. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(2): 598-602.
- CARVALHO, FA; RENNER, SS. 2015. A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. *In: Molecular phylogeny, biogeography and an e-monograph of the papaya family (Caricaceae) as an example of taxonomy in the electronic age*. Wiesbaden, Alemania, Springer Spektrum. p. 49-81.
- CASTRESANA, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17(4): 540-552.
- CEPAL (Comisión Económica para América Latina y el Caribe). 2017. Incorporación de valor agregado en la cadena de valor de papaya en el Pacífico Central, Costa Rica. México, México. 100 p.
- CHAND, PK; CHAND, S. 1996. High frequency plant regeneration from *Solarium viarum* protoplasts. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 3(4): 21-34.

- CHANDRIKA, UG; JANSZ, ER; WICKRAMASINGHEM, SMD; WAMASURIYA, ND. 2003. Carotenoids in yellow-and red-fleshed papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83(12):1279-1282.
- CHAPEL, M; TEISSIE, J; ALIBERT, G. 1984. Electrofusion of spermine-treated plant protoplasts. *FEBS Letters* 173(2): 331-336.
- CHEN, MH; CHEN, CC; WANG, DN; CHEN, FC. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* × *Carica cauliflora* cultured in vitro. *Canadian Journal of Botany* 69(9): 1913-1918.
- CHEN, MH; CHEN, CC. 1992. Plant regeneration from *Carica* protoplasts. *Plant Cell Reports* 11: 404-407.
- CHIN, JC; SCOTT, KJ. 1979. A large-scale isolation procedure for cereal mesophyll protoplasts. *Annals of Botany*, 43(1), 23-32.
- COCKING, EC. 1972. Plant cell protoplasts-isolation and development. *Annual Review of Plant Physiology* 23(1): 29-50.
- COCKING, ECD. 1981. Opportunities from the use of protoplasts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B* 292(1062): 557-568.
- CONOVER, RA. 1964. Distortion ringspot, a severe virus disease of papaya in Florida. *Florida State Horticultural Society* 77:447-448.
- DAVEY, MR; ANTHONY, P; POWER, JB; LOWE, KC. 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* 23(2): 131-171.
- DE CANDOLLE, A. 1885. *Origin of cultivated plants*. New York, Estados Unidos, D. Appleton and Company. p. 293-295.
- DILLON, S; RAMAGE, C; DREW, R; ASHMORE, S. 2005. Genetic mapping of a PRSV-P resistance gene in 'highland papaya' based on inheritance of RAF markers. *Euphytica* 145:11-23.

- DILLON, S; RAMAGE, C; ASHMORE, S; DREW, R. 2006. Development of a codominant CAPS marker linked to PRSV-P resistance in highland papaya. *Theoretical and Applied Genetics* 113:1159–1169.
- DOI, RH; KOSUGI, A. 2004. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nature Reviews Microbiology* 2(7): 541-551.
- DOYLE JJ; DOYLE JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- DREW, RA; O'BRIEN, CM; MAGDALITA, PM. 1998. Development of interspecific *Carica* hybrids. *Acta Horticulturae* 461:285–292.
- DREW, RA; SIAR, SV; O'BRIEN, CM; MAGDALITA, PM; SAJISE, AGC. 2006. Breeding for papaya ringspot virus resistance in *Carica papaya* via hybridization with *Vasconcellea quercifolia*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 46(3): 413-418.
- DUQUENNE, B; EECKHAUT, T; WERBROUCK, S; VAN HUYLENBROECK, J. 2007. Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91(2): 165-173.
- DURIEU, P; OCHATT, SJ. 2000. Efficient intergeneric fusion of pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protoplasts. *Journal of Experimental Botany* 51(348): 1237-1242.
- EPPENDORF. 2007. Multiporador®: Manual básico para la aplicación de la electrofusión. Hamburgo, Alemania, Eppendorf Publications. p. 5-22.
- ERRASTI, ME; TORRES, MJ; MERCERAT, JR; CAFFINI, NO; LÓPEZ, LMI. 2020. Plant proteases from *Carica papaya* and *Vasconcellea quercifolia* with potential application for a cleaner processing in tanneries. *Biocatalysis and Biotransformation* 1-10.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2018. Estadísticas de cultivos [Internet]. FAOSTAT Database (en línea). Consultado 26 may. 2020. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/en>

- FISH, N; KARP, A; JONES, MGK. 1988. Production of somatic hybrids by electrofusion in *Solanum*. *Theoretical and Applied Genetics* 76(2): 260-266.
- FITCH, MM. 1993. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32(2): 205-212.
- FREITAS, KM; BARCELOS, LS; CALIARI, MV; SALAS, CE; LOPES, MTP. 2017. Healing activity of proteolytic fraction (P1G10) from *Vasconcellea cundinamarcensis* in a cutaneous wound excision model. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96: 269-278.
- FREITAS, KM; SILVA, AC; VELOSO, ES; FERREIRA, Ê; BARCELOS, LS; CALIARI, M. V; ... LOPES, MT. 2019. P1G10, the proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis*, stimulates tissue repair after acute exposure to ultraviolet B radiation. *International Journal of Molecular Sciences* 20(18): 4373.
- GAFF, DF; OKONG'O-OGOLA, O. 1971. The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *Journal of Experimental Botany* 22: 756-758.
- GALBRAITH, DW. 1981. Microfluorimetric quantitation of cellulose biosynthesis by plant protoplasts using Calcofluor White. *Physiologia Plantarum* 53(2): 111-116.
- GAMBORG, OL; MILLER, RA; OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soyabean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- GAO, L; TUO, D; SHEN, W; YAN, P; LI, X; ZHOU, P. 2015. NIa-Pro of *Papaya ringspot virus* interacts with *Carica papaya* eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G (Cpelf3G). *Virus Genes* 50(1): 97-103.
- GHERARDI, E; VALIO, IFM. 1976. Occurrence of promoting and inhibitory substances in the seed arils of *Carica papaya* L. *Journal of Horticultural Science* 51(1): 1-14.
- GILL, R; EAPEN, S; RAO, PS. 1987. Callus induction from protoplasts of *V. unguiculata*, *V. sublobata* and *V. mungo*. *Theoretical and Applied Genetics* 74(1): 100-103.
- GROSSER, JW; GMITTER, FG. 1990. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Reviews* 8: 339-374.

- GUO, WW; DENG, XX. 1998. Somatic hybrid plantlets regeneration between *Citrus* and its wild relative, *Murraya paniculata* via protoplast electrofusion. *Plant Cell Reports* 18(3-4): 297-300
- GUTIÉRREZ, A; SANTACRUZ, F; CABRERA, JL; RODRÍGUEZ, B. 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. *E-Gnosis* 1:1-19.
- HOFFMANN-TSAY, SS; ERNST, R; HOFFMANN, F. 1994. Design, synthesis and application of surface-active chemicals for the promotion of electrofusion of plant protoplasts. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 34(2): 115-122.
- HOU, SW; JIA, JF. 2004. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic calli of the forage legume *Astragalus melilotoides* Pall. *Plant Cell Reports* 22(10): 741-746.
- IMBRIE-MILLIGAN, CW; HODGES, TK. 1986. Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. *Planta* 168(3): 395-401.
- INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos). 2015. "VI Censo Nacional Agropecuario 2014", San José, Costa Rica. 110 p.
- ISHII, S. 1989. Enzymes for the isolation of protoplasts. *In: Bajaj, YPS (ed.). Plant protoplast and genetic engineering I*. Berlín, Alemania, Springer-Verlag, p. 23-33.
- JAIN, RK; KHEHRA, GS; LEE, SH; BLACKHALL, NW; MARCHANT, R; DAVEY, MR, POWER, JB; COCKING, EC; GOSAL, SS. 1995. An improved procedure for plant regeneration from indica and japonica rice protoplasts. *Plant Cell Reports* 14:515-519.
- JONES, M. 1988. Fusing plant protoplasts. *Trends in Biotechnology* 6(7): 153-158.
- JONES, MG. 1991. Electrical fusion of protoplasts. *In: Lindsey, K. Plant Tissue Culture Manual* (pp. 645-655). Dordrecht, Países Bajos, Springer. p. 645-655.
- JORDAN, M; CIUDAD, G; ROJAS, ML; VALVERDE, F. 1986. Isolation, culture and fusion of *Carica candamarcensis* and *Carica papaya* protoplasts. *Gartenbauwissenschaftl* 51(4): 175-178.

- KALYAANAMOORTHY, S; MINH, BQ; WONG, TK; VON HAESELER, A; JERMIIN, LS. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14(6): 587-589.
- KAO, KN; GAMBORG, OL; MILLER, RA; KELLER, WA. 1971. Cell divisions in cells regenerated from protoplasts of soybean and *Haplopappus gracilis*. *Nature New Biology* 232(30):124.
- KAO, KN; MICHAYLUK, MR. 1974. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115:355-367.
- KAO, K; MICHAYLUK MR. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126(2): 105–110.
- KARTHA, KK; MICHAYLUK, MR; KAO, KN; GAMBORG, OL; CONSTABEL, F. 1974. Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants (*Brassica napus* L. cv. Zephyr). *Plant Science Letters* 3(4): 265-271.
- KATOH, K; STANDLEY, DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30(4): 772-780.
- KINNERSLEY, AM; RACUSEN, RH; GALSTON, AW. 1978. A comparison of regenerated cell walls in tobacco and cereal protoplasts. *Planta* 139(2): 155-158.
- KRISHNA, KL; PARIDHAVI, M; PATEL, JA. 2008. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of papaya (*Carica papaya* Linn.). *Natural Product Radiance* 7(4): 364-373.
- KUMAR, A; COCKING, EC. 1987. Protoplast fusion: a novel approach to organelle genetics in higher plants. *American Journal of Botany* 74(8): 1289-1303.
- KYNDT, T; VAN DROOGENBROECK, B; ROMEIJN-PEETERS, E; ROMEROMOTOCHI, JP; SCHELDEMAN, X; GOETGHEBEUR, P; VAN DAMME, P; GHEYSEN, G. 2005. Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on

- rDNA internal transcribed spacers and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37(2): 442-459.
- KYNDT, T; GHEYSEN, G. 2007. Evolutionary relationships between and within the highland papayas (Genus *Vasconcellea*) and the common papaya (*Carica papaya*). *Acta Horticulturae* 740: 61-72.
- KYNDT, T; VAN DAMME, EJ; VAN BEEUMEN, J; GHEYSEN, G. 2007. Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea* spp. *The FEBS Journal* 274(2): 451-462.
- LANGE, AH. 1961. Effect of the sarcotesta on germination of *Carica papaya*. *Botanical Gazette* 122(4): 305-311.
- LIN, CS; HSU, CT; YANG, LH; LEE, LY; FU, JY; CHENG, QW; WU, FH; HSIAO, HCW; ZHANG, Y; ZHANG, R; CHANG, WJ; YU, CT; WANG, W; LIAO, LJ; GELVIN, SB; SHIH, MC. 2018. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnology Journal* 16(7):1295-1310.
- LIPKA, E. 2010. Isolation und Gewebekultur von Papaya-Protoplasten (*Carica papaya* L.). Tesis M.Sc. Stuttgart, Alemania, Universität Hohenheim. 102 p.
- LITZ, R; CONOVER, R. 1979. Development of systems for obtaining parasexual *Carica* hybrids. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 92: 281-283.
- LITZ, RE. 1984. Papaya. *In*: Evans, DA; Sharp, WR; Ammirato, PV; Yamada, Y (eds.) *Handbook of plant cell culture*, vol 2. New York, United States, Maemillan. p. 349-368.
- LITZ, RE. 1986. Papaya (*Carica papaya* L.) *In*: Bajaj, YPS (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, volt. Trees I. Berlin, Germany, Springer Berlin Heidelberg. p.220-232.
- LIU, CS, CHOW, HT, CHEN, CY. 1984. Isolation and culture of papaya protoplasts - studies on cultural environments and media supplements. *J Sei Eng (Chung Hsing University, Taichung, Taiwan)* 21: 89-98.

- LOPEZ-ARELLANO, M; DHIR, S; ALBINO, NC; SANTIAGO, A; MORRIS, T; DHIR, SK. 2015. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from protoplast culture of *Stevia rebaudiana*. *Biotechnology Journal International* 5(1):1-12.
- LYNCH, PT; DAVEY MR; POWER, JB. 1993. Plant protoplast fusion and somatic hybridization. *In: Dünzgünes, N (ed.). Membrane fusion techniques Part B. San Diego, Estados Unidos, Academic Press Inc. p. 379-392.*
- LYNCH, PT; ISAAC, S; COLLIN, HA. 1989. Electrofusion of protoplasts from celery (*Apium graveolens* L.) with protoplasts from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Planta* 178(2): 207-214.
- MARCHANT, R., DAVEY, MR; POWER, JB. 1997. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from *Rosa hybrida*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50(2): 131-134.
- MEHRLE, W; NATON, B; HAMPP, R. 1990. Determination of physical membrane properties of plant cell protoplasts via the electrofusion technique: prediction of optimal fusion yields and protoplast viability. *Plant Cell Reports* 8(11): 687-691.
- MELCHERS, G; LABIB, G. 1974. Somatic hybridisation of plants by fusion of protoplasts. *Molecular and General Genetics* 135(4): 277-294.
- MENG, YL; GAO, YP; JIA, JF. 1996. Plant regeneration from protoplasts isolated from callus of *Gentiana crassicaulis*. *Plant Cell Reports* 16(1-2): 88-91.
- MINH BQ; NGUYEN MAT; VON HAESELER A. 2013. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution* 30:1188-1195.
- MONTERO-CARMONA, W; JIMÉNEZ, VM. 2015. Vanilla protoplasts: isolation and electrofusion. *In: RAKSHIT, A (ed.) Emerging innovations in agriculture: from theory to practice. Atenas, Grecia, ATINER. p. 15-29.*
- MORIKAWA, H; ASADA, M; YAMADA, Y. 1988. Effects of physical parameters upon protoplast electrofusion. *Plant and Cell Physiology* 29(4): 659-664.
- MORTON, JF. 1987. Papaya. *In: Morton, JF (ed.). Fruits of warm climates. Miami, Estados Unidos, Echo Point Books Media LLC. p.336-346.*

- MÜHLBACH, HP. 1980. Different regeneration potential of mesophyll protoplasts from cultivated and a wild species of tomato. *Planta* 148(1): 89-96.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- NAGATA, T; TAKEBE, I. 1970. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 92(4): 301-308.
- NAGY, LG; KOCSUBÉ, S; CSANÁDI, Z; KOVÁCS, GM; PETKOVITS, T; VÁGVÖLGYI, C; PAPP, T. 2012. Re-Mind the gap! insertion – deletion data reveal neglected phylogenetic potential of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) of fungi. *PLoS ONE* 7(11): e49794.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1989. Lost crops of the Incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. Washington, Estados Unidos, National Academy Press, p. 253-263.
- NGUYEN LT; SCHMIDT HA; VON HAESELER A; MINH BQ. 2015 IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32:268-274.
- NIEDZ, RP; MCKENDREE, WL; SHATTERS, RC. 2003. Electroporation of embryogenic protoplasts of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and regeneration of transformed plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 39(6): 586-594.
- NISHIO, T; SATO, T; TAKAYANAGI, K. 1987. Efficient plant regeneration from hypocotyl protoplasts in eggplant (*Solanum melongena* L. and *Solanum insanum* L.). *Japanese Journal of Breeding* 37(4) 389-396.
- OH, MO; CHEONG, K; SANGU-GU, K. 1994. Changes of protein patterns during induction of the first cell divisions in petunia (*Petunia hybrida*) protoplast cultures. *Journal of Plant Physiology* 144(4-5):555-561.

- OLSON, ME. 2002. Intergeneric relationships within the Caricaceae–Moringaceae clade (Brassicales) and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. *International Journal of Plant Sciences* 163: 51–65.
- PASTERNAK, T; MISKOLCZI, P; AYAYDIN, F; MÉSZÁROS, T; DUDITS, D; FEHÉR, A. 2000. Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regulation* 32(2-3): 129-141.
- PONGCHAWEE, K; NA-NAKORN, U; LAMSEEJAN, S; POOMPUANG, S; PHANSIRI, S. 2006. Factors affecting the protoplast isolation and culture of *Anubias nana* Engler. *International Journal of Botany* 2(2): 193-200.
- POULTER, NH; CAYGILL, JC. 1985. Production and utilization of papain: a proteolytic enzyme from *Carica papaya* L. *Tropical Science* 25: 123-137.
- POWER, JB; COCKING, EC. 1969. A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase. *Biochemical Journal* 111(5): 33.
- POWER, JB; COCKING, EC. 1970. Isolation of leaf protoplasts: macromolecule uptake and growth substance response. *Journal of Experimental Botany* 21(1): 64-70.
- POWER, J; CHAPMAN, J. 1985. Isolation, culture and genetic manipulation of plant protoplasts. *In*: Dixon, RA (ed.). *Plant Cell Culture: a practical approach*. Oxford, Reino Unido, IRL Press. p. 37-66.
- RASHEED, JH; AL-MALLAH, MK; COCKING, EC; DAVEY, MR. 1990. Root hair protoplasts of *Lotus corniculatus* L. (birdsfoot trefoil) express their totipotency. *Plant Cell Reports* 8(9): 565-569.
- REUVENI, O; SHLESINGER, DR; LAVI, U. 1990. In vitro clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20(1): 41-46.
- RUESINK, AW. 1971. Protoplasts of plant cells. *In*: San Pietro, A (ed.). *Methods in Enzymology*, Vol. 13(A). New York, Estados Unidos, Academic Press. p. 197-209.

- RUZIN, SE; MCCARTHY, SC. 1986. The effect of chemical facilitators on the frequency of electrofusion of tobacco mesophyll protoplast. *Plant Cell Reports*, 5(5): 342-345.
- SALHANI, N; VIENKEN, J; ZIMMERMANN, U; WARD, M; DAVEY, MR; CLOTHIER, RH; BALLS, M; COCKING, EC; LUCY, JA. 1985. Haemoglobin synthesis and cell wall regeneration by electric field-induced interkingdom heterokaryons. *Protoplasma* 126(1-2): 30-35.
- SCHELDEMAN, X; WILLEMEN, L; D'EECKENBRUGGE, GC; ROMEIJN-PEETERS, E; RESTREPO, MT; MOTOCHÉ, JR; JIMÉNEZ, D; LOBO, M; MEDINA, CI; REYES, C; OCAMPO, JA; VAN DAMME, P; GOETGEBEUR, P; RODRÍGUEZ, D. 2007. Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in tropical and subtropical America. *Biodiversity and Conservation* 16(6): 1867-1884.
- SCHELDEMAN, X; KYNDT, T; D'EECKENBRUGGE, GC; MING, R; DREW, R; VAN DROOGENBROECK, B; VAN DAMME, P; MOORE, PH. 2011. *Vasconcellea*. In: Kole, C (ed.). *Wild Crop Relatives: genomic and breeding resources, tropical and subtropical fruits*. Berlin, Alemania. p. 213-249.
- SHILLITO, RD; PASZKOWSKI, J; POTRYKUS, I. 1983. Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Reports* 2(5): 244-247.
- SIHACHAKR, D; DUCREUX, G. 1987. Cultural behavior of protoplasts from different organs of eggplant (*Solanum melongena* L.), and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11(3): 179-188.
- SILVA, RO; DA COSTA, BL; DA SILVA, CN; DAMATA MARTINS, TM; DOURADO, LFN; DE GOES, AM; ... DA SILVA, FR. 2020. The proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* accelerates wound healing after corneal chemical burn in rabbits. *Burns* 46(4): 928-936.
- SOLÓRZANO-CASCANTE, P; SÁNCHEZ-CHIANG, N; JIMÉNEZ, VM. 2018. Explant type, culture system, 6-benzyladenine, meta-topolin and encapsulation affect

- indirect somatic embryogenesis and regeneration in *Carica papaya* L. *Frontiers in Plant Science* 9: 1769.
- SOLTIS, DE; KUZOFF, RK. 1995. Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the *Heuchera* group (Saxifragaceae). *Evolution* 49(4): 727-742.
- TABERLET, P; GIELLY, L; PAUTOU, G; BOUVET, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- TANG, W; LU, G., LIAO, F; HUANG, M; HUANG, W; HUANG, L. 2011. Isolation of protoplast from young leaves of papaya. *Journal of Southern Agriculture* 42(5): 468-470.
- TAO, R; TAMURA, M; YONEMORI, K; SUGIURA, A. 1991. Plant regeneration from callus protoplasts of adult Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Plant Science* 79(1): 119-125.
- TASKI-AJDUKOVIC, K; VASIC, D; NAGL, N. 2006. Regeneration of interspecific somatic hybrids between *Helianthus annuus* L. and *Helianthus maximiliani* (Schrader) via protoplast electrofusion. *Plant Cell Reports* 25(7): 698-704.
- TEIXEIRA-DA SILVA, J; RASHID, Z; NHUT, DT; SIVAKUMAR, D; GERA, A; SOUZA, MT; TENNANT, PF. 2007. Papaya (*Carica papaya* L.) biology and biotechnology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 1(1): 47-73.
- TEMPELAAR, MJ; JONES, MG. 1985. Directed electrofusion between protoplasts with different responses in a mass fusion system. *Plant Cell Reports* 4(29): 92-95.
- TJAHJONO, AE; KAKIZONO, T; HAYAMA, Y; NAGAI, S. 1993. Formation and regeneration of protoplast from a unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 75(3): 196-200.
- TORRES, MJ; TREJO, SA; MARTIN, MI; NATALUCCI, CL; AVILES, FX; LOPEZ, LM. 2010. Purification and characterization of a cysteine endopeptidase from *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil. latex displaying high substrate specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(20): 11027-11035.

- TORRES-OSSANDÓN, MJ; VEGA-GÁLVEZ, A; SALAS, CE; RUBIO, J; SILVA-MORENO, E; CASTILLO, L. 2019. Antifungal activity of proteolytic fraction (P1G10) from (*Vasconcellea cundinamarcensis*) latex inhibit cell growth and cell wall integrity in *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology, 289: 7-16.
- TRIFINOPOULOS, J; NGUYEN, LT; VON HAESELER, A; MINH, BQ. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. Nucleic Acids Research 44(W1): W232-W235.
- ULLOA, MAR; JADÁN, M. 2010. Aislamiento, purificación y fusión de protoplastos de babaco (*V. heilbornii*) y jigacho (*V. stipulata*). Eídos 3: 3-7.
- UMATE, P; RAO, KV; KIRANMAYEE, K; SREE, TJ; SADANANDAM, A. 2005. Plant regeneration of mulberry (*Morus indica*) from mesophyll-derived protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 82(3): 289-293.
- VAN DROOGENBROECK, B; KYNDT, T; MAERTENS, I; ROMEIJN-PEETERS, E; SCHELDEMAN, X; ROMERO-MOTOCHI, JP; VAN DAMME, P; GOETGHEBEUR, P; GHEYSEN, G. 2004. Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (Caricaceae) using PCR-RFLP. Theoretical and Applied Genetics 108(8): 1473-1486.
- VATSYA, B; BHASKARAN, S. 1982. Plant regeneration from cotyledonary protoplasts of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis L.). Protoplasma 113(2): 161-163.
- VERMA, N; BANSAL, MC; KUMAR, V. 2008. Protoplast fusion technology and its biotechnological applications. Chemical Engineering Transactions 14: 113-120.
- WATTS, JW; KING, JM. 1984. A simple method for large-scale electrofusion and culture of plant protoplasts. Bioscience Reports 4(4): 335-342.
- WEBSTER, RE; WATERWORTH, WM; STUPPY, W; WEST, CE; ENNOS, R; BRAY, CM; PRITCHARD, HW. 2016. Biomechanical, biochemical, and morphological mechanisms of heat shock-mediated germination in *Carica papaya* seed. Journal of Experimental Botany 67: 6373-6384.

- WHITE, TJ; BRUNS, T; LEE, S; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M; Gelfand, D; Sninsky, J; White, T. (eds.). PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego, Estados Unidos, Academic Press. p. 315–322.
- WILLIAMSON, FA; FOWKE, LC; WEBER, G; CONSTABEL, F; GAMBORG, O. 1977. Microfibril deposition on cultured protoplasts of *Vicia hajastana*. *Protoplasma* 91(2): 213-219.
- XIAO, W; HUANG, XL; HUANG, X; CHEN, YP; DAI, XM; ZHAO, JT. 2007. Plant regeneration from protoplasts of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90(2): 191-200.
- XU, ZQ; JIA, JF. 1996. Callus formation from protoplasts of *Artemisia sphaerocephala* Krasch and some factors influencing protoplast division. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44(2): 129-134.
- XU, ZH; XUE, HW. 1999. Plant regeneration from cultured protoplasts. *In*: Soh, WY; Bhojwani, SS (eds.) *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures*. Berlin, Alemania, Springer Science & Business Media. p. 37-70.
- XU, X; XIE, G; HE, L; ZHANG, J; XU, X; QIAN, R; LIANG, G; LIU, JH. 2013. Differences in oxidative stress, antioxidant systems, and microscopic analysis between regenerating callus-derived protoplasts and recalcitrant leaf mesophyll-derived protoplasts of *Citrus reticulata* Blanco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 114: 161-169.
- YAMADA, T; SAKAGUCHI, K. 1982. Comparative studies on *Chlorella* cell walls: Induction of protoplast formation. *Archives of Microbiology* 132(1): 10-13.
- YU, C; CHEN, Z; LU, L; LIN, J. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration from litchi protoplasts isolated from embryogenic suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61(1): 51-58.
- YU, Y; YE, W; HE, L; CAI, X; LIU, T; LIU, J. 2013. Introgression of bacterial wilt resistance from eggplant to potato via protoplast fusion and genome components of the hybrids. *Plant Cell Reports* 32(11): 1687-1701.

- ZHANG, GN; JIA, JF; HAO, JG; WANG, XR; HE, T. 2008. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed *Astragalus melilotoides*. *Biologia Plantarum* 52(2): 373-376.
- ZHANG, J; SHEN, W; YAN, P; LI, X; ZHOU, P. 2011. Factors that influence the yield and viability of protoplasts from *Carica papaya* L. *African Journal of Biotechnology* 10(26): 5137-5142.
- ZHU, L; WANG, B; ZHOU, j; CHEN, L; DAI, C; DUAN, C. 2005. Protoplast isolation of callus in *Echinacea augustifolia*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 44(1): 1-5.
- ZIMMERMANN, U; VIENKEN, J. 1982. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *Journal of Membrane Biology* 67: 165-182.

8. Anexos

Anexo 1. Composición del medio de cultivo MS líquido para el aislamiento de protoplastos según Boyes y Sink (1989), modificado luego por Oh et al. (1994) (MSBSOH).

Compuesto	Concentración (mg/L)	Referencia
Macronutrientes		
NO ₃ NH ₄	560,3	Oh (2003)
KNO ₃	1700	Boyes y Sink (1989)
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	Murashige y Skoog (1962)
KH ₂ PO ₄	170	Murashige y Skoog (1962)
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	Murashige y Skoog (1962)
Micronutrientes		
	MS	Murashige y Skoog (1962)
Otros		
Tiamina	2	Boyes y Sink (1989)
L-Glutamina	250	Boyes y Sink (1989)
Mio-inositol	1000	Boyes y Sink (1989)
Sacarosa	30000	Boyes y Sink (1989)

Anexo 2. Preparación de 10 mL de la solución de fusión Eppendorf a tres osmolalidades diferentes a partir de las soluciones hipoosmolar e isoosmolar.

Osmolalidad (mOsmol/kg)	Solución hipoosmolar Eppendorf (mL)	Solución isoosmolar Eppendorf (mL)
90	10,0	0,0
150	6,8	3,2
200	4,2	5,8

Anexo 3. Composición de las soluciones de fusión propuestas por otros autores.

Reactivos	Solución de fusión*		
	Yu et al. (2013)	Duquenne et al. (2007)	Bates et al. (1983)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2 mM	1 mM	-
Manitol	6,35%	0,5 M	0,5 M
MES	-	1 mM	-

*El pH se ajustó a 5,8 en las tres soluciones.

Anexo 4. Resultados del BLAST para la región *trnL-trnF* de *Vasconcellea* sp.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Vasconcellea cundinamarcensis tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; trnL-trnF intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-Phe (trnF) gene, partial sequence	793	793	100%	0.0	100.00%	JX091866.1
Vasconcellea sprucei tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; trnL-trnF intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-Phe (trnF) gene, partial sequence	789	789	100%	0.0	99.77%	JX091872.1
Vasconcellea monoica tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; trnL-trnF intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-Phe (trnF) gene, partial sequence	782	782	100%	0.0	99.53%	JX091860.1
Vasconcellea sphaerocarpa tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; trnL-trnF intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-Phe (trnF) gene, partial sequence	771	771	99%	0.0	99.30%	JX091870.1
Vasconcellea cundinamarcensis tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; trnL-trnF intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-Phe (trnF) gene, partial sequence	763	763	96%	0.0	99.76%	JX091865.1
Vasconcellea hybrid cultivar trnL-trnF intergenic spacer, partial sequence; chloroplast	761	761	98%	0.0	99.29%	DQ061125.1

La flecha indica la secuencia seleccionada.

Anexo 5. Comparación en BLAST de la secuencia *trnL-trnF* de *Vasconcellea* sp. obtenida contra la secuencia AYA461550.1

Vasconcellea cundinamarcensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [AYA461550.1](#) Length: 640 Number of Matches: 1

Range 1: 285 to 640 [GenBank](#) [Graphics](#) Y Next Match A Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
387 bits(209)	4e-103	314/364(86%)	9/364(2%)	Plus/Plus

```

Query 3 AGAACGCAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGCGAATCATCGAGTCT 62
Sbjct 285 AGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGCGAATCATCGAGTCT 344

Query 63 TTGAACGCAAGTTGCGCCCCAGGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTCGCCTGGGTGTCACGC 122
Sbjct 345 TTGAACGCAAGTTGCGCCCTAGGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTCGCCTGGGTGTCACGC 404

Query 123 ACAGTCGCCCAGAAAAAGAAACCTCCTTCCCGCGAAGGTTGTTGCTCACCGGGGG 182
Sbjct 405 ACAGTCGCCCCAAAA--GTA---CTCCTTCCCGCGAAGGTTATTGCTCACCGGGGG 459

Query 183 GATGCTGGCCTCCCGCTCACGCCACCTGGCCGTAGCGGTTGGCCAAATACGAAGCTC 242
Sbjct 460 GATGCTGGCCTCCCGTTACCGGCCCATGGCCGTAGCGGTTGGCCAAATACGAAGCC 519

Query 243 GGGCGGGGAGCAGCAAG-GACGAGTTGGTGGTTGAAAAAACGGCGCTATCTCGTCTGG 301
Sbjct 520 GGGGAGCGAGCGGCAAGCGATGACGA-GTGGTTAAACAACGCTAAGCTATCTCGGCTGG 578

Query 302 CCCTGCTCCCCCGCTCACAGACCCCTGGAGTGTCTCCCCCATTGGGAAATCTTCGCAC 361
Sbjct 579 CTCTGCCCCCCCC-CGAAATGACCCCTTGAGCATCT-CCCCCATCCGGGAAAGCTCGCAC 636

Query 362 AGCG 365
Sbjct 637 CGCG 640
    
```

Anexo 6. Resultados del BLAST para la región *ITS3-307R* de *Vasconcellea* sp.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Vasconcellea quercifolia voucher Feuer, T. 7428, Bolivia (M) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r	701	701	89%	0.0	91.75%	JX092083.1
Vasconcellea sphaerocarpa voucher Silverstone, P. 6786, Colombia (MO) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RN	669	669	88%	0.0	90.77%	JX092079.1
Vasconcellea candicans voucher Leiva, S. 1201, Peru (MO) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r	656	656	82%	0.0	92.13%	JX092074.1
Jacaratia dolichaula voucher Calzada, J.I. 4785, Mexico(F) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rib	656	656	62%	0.0	99.72%	JX092058.1
Carica papaya isolate CAPA_PL3_1of3 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and la	627	627	89%	3e-175	89.26%	KY700258.1
Carica papaya 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene,	627	627	88%	3e-175	89.37%	KX108701.1
Vasconcellea glandulosa voucher Novara, L.J. 8655, Argentina (M) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1,	616	616	80%	6e-172	91.05%	JX092077.1
Carica papaya voucher 09 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit r	612	612	87%	8e-171	89.09%	MN719093.1
Carica papaya voucher 08 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit r	599	599	86%	6e-167	89.05%	MN719095.1
Carica papaya isolate CAPA_1_PA_PM_2of3 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence;	588	588	85%	1e-163	88.91%	KY700259.1
Vasconcellea monoica voucher HCAR171 (M) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcri	582	582	77%	6e-162	90.60%	JX092081.1
Carica papaya isolate CAPA_2_PA_PM_3of3 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence;	568	568	82%	2e-157	88.79%	KY700260.1
Jacaratia corumbensis voucher Fiebrig, 1468, Paraguay (M) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r	564	564	64%	2e-156	94.32%	JX092056.1
Carica papaya bio-material AHP_Lot_3787 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; an	551	551	82%	2e-152	88.11%	MK087885.1
Horovitzia cnidoscoloides voucher Torres, R.C. 8167, Mexico (MEXU) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA ge	549	549	84%	6e-152	87.10%	JX092054.1
Jarilla chocola voucher Lott, E.J., Mexico 31 (MEXU) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosom	536	536	83%	5e-148	87.21%	JX092064.1
Jacaratia chocoensis voucher Fonnegra, R. 5758, Colombia (MO) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5	536	536	64%	5e-148	93.24%	JX092055.1
Jacaratia sp. Honorio_1365 voucher Honorio, E. 1365, Peru (M) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and	531	531	64%	2e-146	92.97%	JX092063.1
Vasconcellea quercifolia voucher HCAR226 (M) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RN	523	523	71%	4e-144	90.00%	JX092084.1
Jacaratia spinosa voucher Honorio, E. 1348, Peru (MOL) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and intern	518	518	64%	2e-142	91.87%	JX092062.1
Jacaratia digitata voucher EHC1202 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and inter	477	477	61%	3e-130	91.45%	MK914407.1
Jacaratia digitata voucher AMM19820 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and intr	477	477	61%	3e-130	91.45%	MK914406.1
Jacaratia digitata voucher KD3565 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and intern;	477	477	61%	3e-130	91.45%	MK914405.1
Jacaratia digitata voucher EHC1375 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and inter	477	477	61%	3e-130	91.45%	MK914404.1
Jacaratia digitata voucher EHC1301 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and inter	477	477	61%	3e-130	91.45%	MK914403.1
Jacaratia digitata voucher EHC1049 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and inter	477	477	61%	3e-130	91.45%	MK914402.1
Jacaratia digitata voucher KD90 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal t	477	477	61%	3e-130	91.45%	MK914401.1
Jacaratia digitata voucher EHC1242 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and inter	477	477	61%	3e-130	91.45%	MK914400.1
Jacaratia digitata voucher EHC1623 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and inter	477	477	61%	3e-130	91.45%	MK914399.1
Jacaratia digitata voucher KD49 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal t	477	477	61%	3e-130	91.45%	MK914398.1
Jacaratia digitata voucher EHC1416 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and inter	477	477	61%	3e-130	91.45%	MK914396.1
Jacaratia digitata voucher AMM19254 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and intr	472	472	61%	1e-128	91.17%	MK914397.1

Continuación anexo 6. Resultados del BLAST para la región ITS3-307R de *Vasconcellea* sp.

Carica papaya 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	470	470	70%	5e-128	88.18%	KP406147.1
Vasconcellea x heilbornii cultivar Babaco 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	470	470	63%	5e-128	90.36%	AY461528.1
Vasconcellea crassipetala 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	468	468	63%	2e-127	90.16%	AY461532.1
Vasconcellea candidans 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	460	460	63%	3e-125	89.53%	AY461531.1
Vasconcellea microcarpa subsp. microcarpa 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g	455	455	63%	1e-123	89.62%	AY461536.1
Vasconcellea stipulata 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trans	453	453	63%	5e-123	89.53%	AY461548.1
Vasconcellea omnilingua 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	449	449	63%	7e-122	89.34%	AY461534.1
Vasconcellea chilensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trans	449	449	63%	7e-122	89.26%	AY461533.1
Vasconcellea parviflora 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	446	446	63%	8e-121	89.04%	AY461526.1
Vasconcellea longiflora 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	444	444	63%	3e-120	89.07%	AY461542.1
Uncultured eukaryote clone HMPS100ITS20TU927 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 2, complete sequ	442	442	68%	1e-119	87.69%	KY935410.1
Vasconcellea x heilbornii 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	442	442	63%	1e-119	88.98%	AY461529.1
Vasconcellea hybrid cultivar 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	438	438	63%	1e-118	88.77%	AY461539.1
Vasconcellea quercifolia 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	438	438	63%	1e-118	88.74%	AY461530.1
Vasconcellea weberbaueri 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	438	438	63%	1e-118	88.71%	AY461527.1
Vasconcellea sprucei internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed	435	435	57%	2e-117	90.66%	AY461549.1
Vasconcellea cauliflora 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	435	435	63%	2e-117	88.46%	AY461546.1
Vasconcellea monoica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trans	433	433	63%	7e-117	88.52%	AY461537.1
Vasconcellea goudotiana 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	429	429	63%	8e-116	88.25%	AY461540.1
Vasconcellea hybrid cultivar 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	427	427	63%	3e-115	88.25%	AY461538.1
Carica papaya isolate PM604 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, cor	424	424	66%	4e-114	87.37%	KC984643.1
Vasconcellea horovitziana 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	424	424	63%	4e-114	87.95%	AY461543.1
Vasconcellea glandulosa internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcri	422	422	55%	1e-113	91.11%	AY461545.1
Vasconcellea pulchra 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trans	420	420	63%	5e-113	87.95%	AY461541.1
Vasconcellea palandensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal t	420	420	63%	5e-113	87.98%	AY461535.1
Vasconcellea cf. goudotiana HCAR167 voucher HCAR167 (M) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S	418	418	62%	2e-112	88.27%	JX092078.1
Carica papaya voucher Kufer, J. 399, Guatemala (M) internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr	401	401	64%	2e-107	86.79%	JX092051.1
Carica papaya 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed	399	399	56%	7e-107	89.26%	AY461547.1
Vasconcellea sphaerocarpa 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complet	399	399	55%	7e-107	89.91%	AY461544.1
Vasconcellea cundinamarcaensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and int	387	387	63%	5e-103	86.26%	AY461550.1

La flecha indica la secuencia seleccionada.

Anexo 7. Comparación en BLAST de la secuencia *ITS3-307R* de *Vasconcellea* sp. obtenida contra la secuencia AY461550.1.

Vasconcellea cundinamaricensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [AY461550.1](#) Length: 640 Number of Matches: 1

Range 1: 285 to 640 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
387 bits(209)	4e-103	314/364(86%)	9/364(2%)	Plus/Plus
Query 3	AGAACGCAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAATCATCGAGTCT	62		
Sbjct 285	AGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAATCATCGAGTCT	344		
Query 63	TTGAAACGCAAGTTGCGCCCCAGGCCATCCGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGC	122		
Sbjct 345	TTGAAACGCAAGTTGCGCCCCAGGCCATCCGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGC	404		
Query 123	ACAGTCGCCCaaaaaaaaGAAACCTCCTTCCCCGCGAAGGTTGTTGCTCACTGCGGGCG	182		
Sbjct 405	ACAGTCGCCCCAAAA--GTA--CTCCTTCCCAGCGAAGGTTATTGCTCACCGGGGGCG	459		
Query 183	GATGCTGGCCTCCCGCTCACGCGCCACCTGGCCGTAGCGGTTGGCCAAATACGAAGCTC	242		
Sbjct 460	GATGCTGGCCTCCCGTTCACGCGGCGCATGGCCGTAGCGGTTGGCCAAATACGAAACCC	519		
Query 243	GGGCGGCGAGCAGCAAG-GACGAGTTGGTGGTTGAAAAAACGCGGCTATCTCGTCTGG	301		
Sbjct 520	GGGAAGCGAGCGGCAAGCGATGACGA-GTGGTTTAAACAAACGCTAAGCTATCTCGGCTGG	578		
Query 302	CCCTGCTCCCCCGCTCACAGACCCTGGAGTGTCTCCCCCATTCGGGAAACTCTCGCAC	361		
Sbjct 579	CTCTGCCCCCCCC-CGAAATGACCCCTTGAGCATCT-CCCCATCCGGGAAAAGCTCGCAC	636		
Query 362	AGCG 365			
Sbjct 637	CGCG 640			