

## PRODUCCION DE EMBRIONES *in vitro* A PARTIR DE ÓVULOS Y OVARIOS DE PAPAYA (*Carica papaya* L.)

Eric Mora<sup>1</sup>, Eric Guevara<sup>2</sup>

### RESUMEN

**Producción de embriones *in vitro* a partir de óvulos y ovarios de papaya (*Carica papaya* L.).** Se estudió la posibilidad de obtener plantas a partir del cultivo de óvulos y ovarios provenientes de flores no fecundadas de *C. papaya*. Para esto se evaluó la influencia del tamaño del ovario y del efecto de diferentes reguladores de crecimiento: 2,4-D (1 a 5 mg/l); ANA (0,1 a 2 mg/l), CPPU (forchlorfenurón) (0,1 mg/l), Kinetina (0,1 mg/l), así como de sacarosa (3 a 10%). Los cultivos se mantuvieron inicialmente en oscuridad. Solo los ovarios cultivados en presencia de ANA (0,5 y 1 mg/l) formaron embriones. La formación de tallos y posteriormente de plantas se logró cuando los embriones se transfirieron a un medio desprovisto de auxina. Se discuten los posibles efectos de los tratamientos realizados.

**Palabras clave:** *Carica papaya*, cultivo *in vitro*, embriones vegetales, cultivo de embriones, técnicas de cultivo, medio de cultivo, Costa Rica.

### ABSTRACT

***In vitro* production of papaya (*Carica papaya* L.) embryos from ovules and ovaries.** The potential of producing papaya plants from unpollinated ovules and ovaries was determined. The variables studied were flower bud size and levels of 2,4-D (1 to 5 mg/l), NAA (0.1 to 2 mg/l), CPPU (0.1 mg/l), kinetin (0.1 mg/l) and sucrose (3 to 10%). The explants were initially cultivated in complete darkness. Only the ovaries with NAA (0.5 and 1 mg/l) produced embryos. The production of plantlets was obtained after their transfer to an auxin-free medium. The possible effects of the treatments are discussed.

**Keywords:** *Carica papaya*, *in vitro* culture, plant embryos, embryos culture, culture techniques, culture medium, Costa Rica



### INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente la papaya se ha mejorado siguiendo la metodología de selección de progenies autofecundadas (“pedigree”) para producir líneas puras, ya que esta especie, a pesar de ser alógama, no pierde vigor al autofecundarse. Existe también gran interés en la producción de híbridos, pues va-

rios informes mencionan un efecto heterótico importante (Aquilizan, 1986; Chan, 1992).

La mayor parte de las características genéticas de interés agronómico y comercial de este cultivo son de carácter cuantitativo, por lo que se necesita un alto número de individuos por progenie para realizar una selección eficiente. Sumado a lo ante-

<sup>1</sup> Estación Experimental Fabio Baudrit (EEFBM), Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica .

<sup>2</sup> Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica. San Pedro, Costa Rica, Fax (506)2074346.

rior, las bajas densidades de siembra, que requiere este frutal, encarecen este proceso debido a la gran área requerida para manejar dichas progenies. Por estos motivos, la producción de plantas haploides (poseen un solo juego de cromosomas) podría constituir una técnica atractiva para facilitar el proceso de mejoramiento.

La producción de plantas totalmente homocigotas mediante el cultivo de anteras y/u ovarios es un proceso rutinario para algunas especies como espárrago, maíz, arroz, tabaco, trigo, cebada, remolacha, melón, cebolla y girasol principalmente (Bohanec y Javornik, 1994; Atanassov *et al*, 1995). Sin embargo, en el caso de la papaya, el cultivo de anteras no ha brindado resultados satisfactorios (Litz y Conover, 1978; Tsay y Tsu, 1985; Manshardt, 1992).

Además, el genotipo hermafrodita de mayor interés comercial en papaya es de naturaleza heterocigótico, por lo que en teoría no podría regenerarse a partir de tejidos haploides. Por este motivo, el interés principal de desarrollar tal metodología para esta especie sería producir líneas femeninas parentales que sirvan para la posterior producción de híbridos con otras líneas ya existentes.

El objetivo del presente trabajo de producir embriones de papaya a partir de tejidos ovulares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente investigación se consideraron tres tipos de tratamientos: a) tratamientos inductivos de la embriogénesis a partir de óvulos inmaduros, b) tratamientos de manipulación de estructuras globulares y óvulos posteriores a los tratamientos inductivos, y c) tratamientos adicionales de inducción de embriones.

### a- Origen y tipo de los explantes

Para la etapa de tratamientos inductivos se utilizaron flores provenientes de dos siembras experi-

mentales de material “criollo” de Costa Rica. Una de ellas se ubicó en Río Frío (cantón Sarapiquí, provincia de Heredia) a una altura de 50 msnm y la otra en Labrador (cantón de Orotina, provincia de Alajuela) a una altura de 70 msnm. El material que se utilizó en la segunda etapa consistió en el cultivo de las estructuras obtenidas durante la primera.

Para la etapa de tratamientos adicionales se utilizaron flores provenientes de una F2 resultante de el cruce entre la línea “Sunrise” y una planta criolla seleccionada. La siembra se localizó en la Estación Experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica (provincia de Alajuela) a una altura de 840 msnm.

### b- Desinfección de explantes

En todos los casos, la desinfección se realizó colocando las flores en agua corriendo durante 30 minutos; luego se sumergieron en un beaker con etanol (70%) por 30 segundos, y después se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio (0,5%) con agitación manual por 5 minutos. Posteriormente, bajo condiciones asépticas, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Los botones florales se disectaron eliminándoles los pétalos y las anteras.

### c- Medio de cultivo empleado

En todos los casos el medio base fue el de Murashige y Skoog (MS)(1962), con los macroelementos reducidos a la mitad y un contenido de sacarosa del 3%.

### d- Tratamientos

d1- Tratamientos inductivos. Al medio de cultivo anterior se le añadieron los siguientes tratamientos: 1) 0; 1; 2,5 y 5 mg/l de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) con ovarios mayores y menores a 16 mm de longitud; 2) 0;0,1;0,5; 1 y 2 mg/l de ANA (ác. Naftalen-acético) con ovarios mayores y menores a

16 mm; 3) 3, 6 y 10% de sacarosa; 4) 0,6 y 0,8 g/L de agar y 5) transferencia a un medio sin reguladores luego de un cultivo previo de 15, 22 y 30 días en un medio con 0,5 mg/l de ANA.

Para cada tratamiento se evaluaron como mínimo 50 mitades de ovarios. Todos los cultivos se colocaron en oscuridad continua las 24 horas durante dos meses.

d2- Tratamientos a estructuras globulares y óvulos: Dependiendo de la respuesta presentada por los óvulos de los ovarios tratados durante los tratamientos inductivos, se realizaron los siguientes tratamientos:

d2a. A los óvulos que presentaron aumento de volumen durante los tratamientos inductivos se les aplicó los siguientes tratamientos:

1) 1 mg/l ANA + 0,1 mg/l CPPU (forchlorfenuron); 2) 1 mg/l ANA + 0,5 mg/l kinetina y 3) 1 mg/l ANA + 400 mg/l de glutamina. En todos los casos se trabajó con óvulos enteros y partidos por la mitad. Para cada tratamiento se utilizaron 50 óvulos. Los cultivos se colocaron en oscuridad constante.

d2b. A las estructuras globulares producidas durante esta primera etapa, se les transfirió a los siguientes tratamientos:

1) 1; 5 y 10 mg/l 2,4-D; 2) 1 mg/l ANA + 400 mg/l glutamina; 3) 1 mg/l ANA + 0,5 mg/l kinetina y 4) 1 mg/l ANA + 0,1 mg/l CPPU. En todos los casos se utilizaron estructuras globulares enteras y partidas por la mitad, dando origen a mitades simétricas longitudinalmente. En aquellos casos en los que se utilizaron estructuras partidas, la cara seccionada siempre se colocó sobre el medio. Se utilizaron como mínimo cuatro estructuras globulares por tratamiento. Los cultivos se colocaron en oscuridad constante por dos meses.

d3- Tratamientos adicionales de inducción de embriones:

d3.a. En un primer experimento se colocaron ovarios partidos en un medio MS con 0,5 mg/l de ANA y sin sacarosa. Luego se transfirieron al mismo medio basal al cual únicamente se le adicionó 3% de sacarosa en períodos de 15, 22 y 30 días luego de permanecer en el primer medio.

d3.b. En otro experimento, con el fin de evaluar la influencia de la presencia de la antera sobre el desarrollo del óvulo, se cultivaron mitades de ovarios alrededor de las cuales se añadieron anteras, en una relación de cinco anteras por cada mitad de ovario. Todas las estructuras cultivadas se distribuyeron uniformemente dentro de los frascos. Los cultivos se colocaron en oscuridad constante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de 2,4-D en el medio tuvo un efecto estimulador muy bajo sobre la formación de estructuras globulares, se obtuvo, sobretodo la formación de callo compacto, particularmente en concentraciones de 1 y 2,5 mg/l (Cuadro 1). Por el contrario, la utilización de ANA en bajas concentraciones (0,1 y 0,5 mg/l) (Cuadro 2), además de producir abundante callo (Fig 1a), permitió la obtención de mayores porcentajes de estructuras globulares. La mayor respuesta se obtuvo con ovarios de tamaño superior a 16 mm (Cuadros 1 y 2).

Las estructuras globulares emergieron del interior de los óvulos y al hacerlo, rompieron los tegumentos de los mismos. Estos glóbulos se caracterizaron por ser esféricos y huecos en su interior. En su extremo micropilar presentaron estructuras que se asemejaron a hojas cotiledonares incipientes y fusionadas lateralmente entre sí (variaron en número entre dos y cuatro). No se pudo confirmar su haploidía, pues la tasa de crecimiento fue muy bajo, por lo que no se encontraron fases mitóticas en los preparados celulares al examinarse con el microscopio de luz.

Estas estructuras globulares se asemejaron a los embriones de *Brassica juncea* obtenidos por

**Cuadro 1.** Efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D y del tamaño del ovario sobre el desarrollo *in vitro* de ovarios de papaya (*Carica papaya* L.) luego de dos meses de cultivos (110 mitades de ovarios por tratamiento).

2,4-D (mg/l)	Tamaño de ovario (mm)	Formación de callo		Aumento volumen de óvulos (%)	Formación de estructuras globulares (%)	Contaminación (%)	Sin respuesta (%)
		compacto (%)	friable (%)				
1,0	>16	30,9	0	30,8	0	0	38,3
1,0	<16	10,1	0	5,4	0	0	85,0
2,5	>16	23,5	0	4,0	0	0	72,5
2,5	<16	21,1	0	0,0	3,7	6,1	69,1
5,0	>16	10,2	0	12,8	0	2,4	74,6
5,0	<16	9,5	0	0,0	2,4	13,7	74,2

**Cuadro 2.** Efecto de diferentes concentraciones de ANA y del tamaño del ovario sobre el desarrollo *in vitro* de ovarios de papaya (*Carica papaya* L.) luego de dos meses de cultivos (110 mitades de ovario por tratamiento).

ANA (mg/l)	Tamaño de ovario (mm)	Formación de callo		Aumento volumen de óvulos (%)	Formación de estructuras globulares (%)	Contaminación (%)	Sin respuesta (%)
		compacto (%)	friable (%)				
0	>16	10,4	0	4,1	0	15,8	69,7
0	<16	9,9	0	2,3	0	20,1	67,7
0,1	>16	57,3	0	25,7	9,0	0	8
0,1	<16	32,6	0	0	18,3	0	49,1
0,5	>16	59	2	22	7	0	10
0,5	<16	29,2	0,8	0	22,1	0	47,9
1,0	>16	45	3	11,1	6,7	3,3	31
1,0	<16	34,2	0	7,2	6,6	3,1	48,9
2,0	>16	66	2,2	13,8	3,6	10,2	4,2
2,0	<16	47,1	0	16,3	0	0	36,6

Liu *et al.* (1993) en presencia de inhibidores del transporte polar de auxinas. No obstante, en el caso de la papaya, éstos no avanzaron más allá del estado globular. Ello se podría deber a la presencia del 2,4-D en el medio. Fischer y Neuhaus (1996) observaron que el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de trigo en estado globular y en presencia continua de auxinas sintéticas, producía únicamente un crecimiento radial, sin que se estableciera la simetría bilateral propia de los estados más desarrollados. Michalczuk *et al.* (1992) sugirieron que la auxina del medio de cultivo eleva exageradamente los niveles naturales de AIA, que impide la formación de un gradiente natural de esta auxina dentro del embrión y con ello, la inhibición de su desarrollo hacia los estados polarizados.

Solamente en dos de los tratamientos de inducción se obtuvo la formación de embriones. En el primer caso ello se logró con la transferencia de óvulos a medios sin auxina, luego de 15 días de cultivo en presencia de ésta (0,5 mg/l) (Cuadro 3). Los embriones obtenidos en esta condición se caracterizaron por tener cotiledones grandes, bien diferenciados (Fig. 1c y d) y dieron origen a una gran cantidad de plántulas (Fig. 1e y 1f) luego de varios subcultivos en el mismo medio y su transferencia a un fotoperíodo de 16 horas de luz y a una temperatura de 26-28°C durante el día y 21-23°C durante la noche.

En el segundo tratamiento se observó la formación de embriones cuando ovarios menores de

**Cuadro 3.** Efecto de la eliminación de ANA (0.5 mg/l) al cabo de cinco meses de cultivo en el desarrollo *in vitro* de ovarios de papaya (*Carica papaya* L.)

Eliminación del ANA a partir de:	Formación de embriones (%)	Formación de estructuras globulares (%)	Sin respuesta (%)
15 días	1,1	3,3	95,6
22 días	0	7,3	92,7
30 días	0	4	96

16 mm se cultivaron inicialmente en un medio con 0,5 mg/l de ANA sin la posterior transferencia a un medio sin auxina. Esta formación de embriones se observó a partir de los ocho meses de cultivo (Fig. 1b). Contrario a lo observado en el primer caso, estos embriones tenían cotiledones pequeños, un eje central muy grueso y nunca llegaron a diferenciarse hasta formar plántulas. La causa de esta ausencia en desarrollo se debió probablemente a que, aún luego de varios meses de cultivo, permaneciera suficiente auxina activa en el medio, la cual interfirió con el desarrollo normal de los embriones. El hecho de que en los tratamientos en que se suprimió el ANA del medio los embriones obtenidos se desarrollaran normalmente, refuerza esta posibilidad, ya que probablemente permitió a los embriones establecer la transición normal del estado globular al bilateral y su posterior germinación.

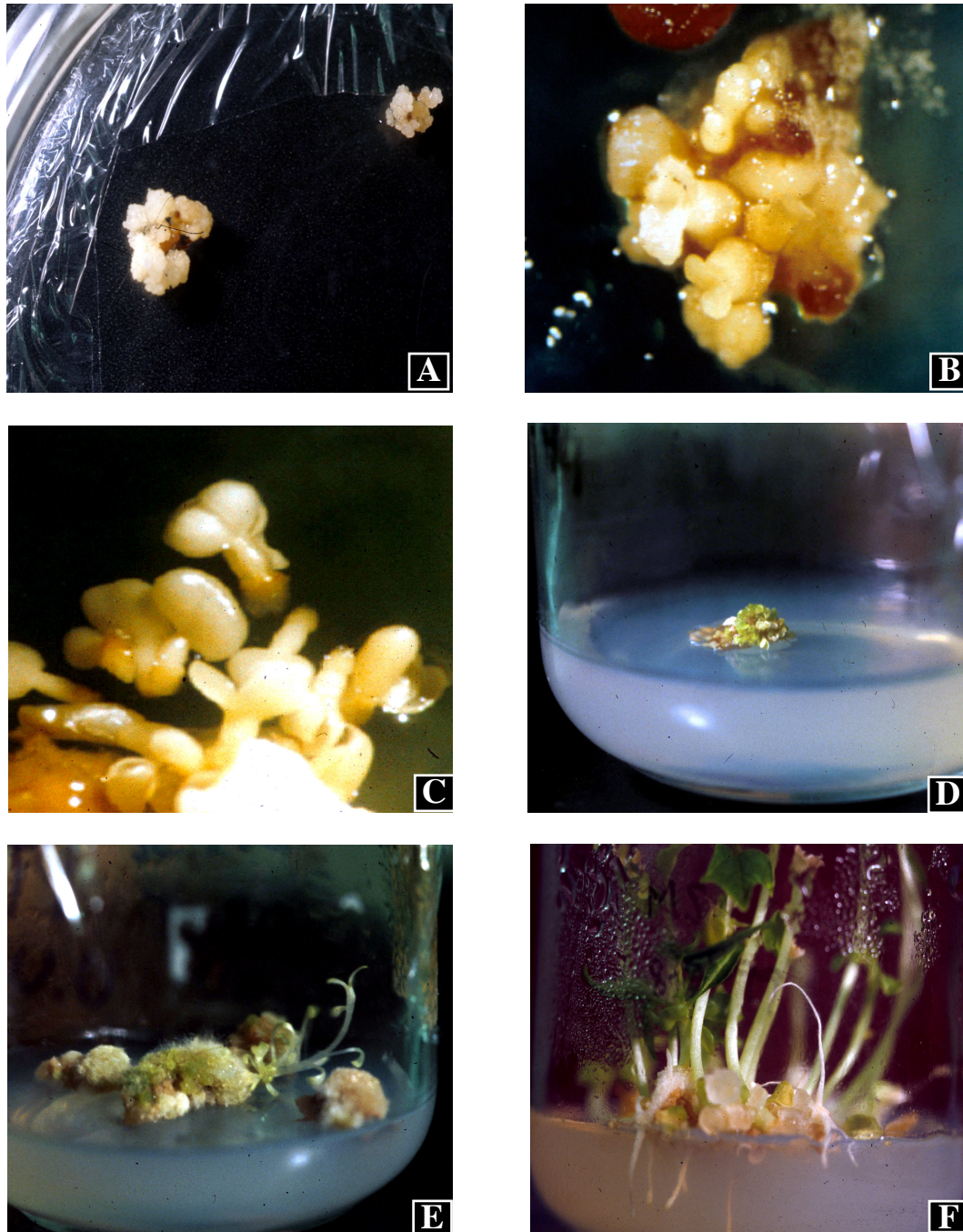
La sacarosa puede inducir respuesta en los tejidos por su efecto como fuente de energía. Sin embargo, la mayor parte de los estudios se centran en su función como regulador del potencial osmótico del medio. La utilización de medios inductores altos en sacarosa y subsiguientes subcultivos a otros

medios con menores cantidades de este carbohidrato, ha mejorado el desarrollo de embriones de algunas especies como el trigo (Fischer y Neuhaus, 1995), así como también ha incrementado la tasa de embriogénesis a partir de anteras en varios cultivos (Atanassov *et al.*, 1995). Sin embargo, en este trabajo los tratamientos con bajos niveles de sacarosa en el medio (1 y 3%) (Cuadro 4) prácticamente duplicaron la inducción de estructuras globulares, en comparación con las concentraciones intermedias y altas (6 y 10%). Este hecho se pudo deber a que la disminución del potencial hídrico en los tratamientos con alta concentración de sacarosa disminuyera el flujo de agua y algunos factores de crecimiento hacia los ovarios, y por ende, hacia los óvulos. El hecho de que estos tratamientos presentaran menores porcentajes de formación de callo, posiblemente por la misma razón, refuerzan esta posibilidad.

Otro aspecto que influyó notablemente fue la posición en que fue colocado el ovario sobre el medio de cultivo. Cuando la cara cortada se puso en contacto con el medio, se logró aumentar la producción de estructuras globulares de 5 a 11,4% en rela-

**Cuadro 4.** Efecto de la concentración de sacarosa sobre el desarrollo *in vitro* de ovarios de papaya (*Carica papaya* L.) luego de dos meses de cultivo.

Cantidad de sacarosa (%)	Formación de callo		Aumento volumen de óvulos (%)	Formación de estructuras globulares (%)	Sin respuesta (%)
	compacto (%)	friable (%)			
1	27	0	35,5	9,5	28
3	49,5	0	37,1	13,4	0
6	38,2	1,1	36	4,5	20,2
10	20	0	40	3	37



**Figura 1.** Regeneración de plantas a partir de óvulos provenientes de frutos inmaduros de *Carica papaya*. 1a. Formación de callo en un medio MS con 0,5 mg/l de ANA a los dos meses de cultivo. 1b. Desarrollo incompleto de embriones debido a la presencia continua en el medio de ANA. 1c. Embriones en estado de torpedo luego de la transferencia de los explantes a un medio sin auxina. 1d. Aspecto de los embriones iniciando fotosíntesis a los 16 meses de cultivo. 1e. Formación de tallos. 1f. Regeneración de plántulas.

ción a su colocación con la parte externa en contacto con el medio. Lo anterior indica que la pared del ovario es un tejido de poca permeabilidad, y por ende, no permite el paso de sustancias hacia su interior. Lo anterior es lógico si se toma en cuenta su función de protección de los óvulos.

Dada la posibilidad de que las estructuras globulares fueran embriones haploides en estado globular, se intentó lograr la producción de callo a partir de ellas. De igual forma, se buscó el mismo objetivo utilizando los óvulos que habían aumentado de volumen durante la etapa de inducción con ANA. Como se puede observar en el Cuadro 5, se logró la producción de dicho callo a partir de los óvulos subcultivados, pero no a partir de las estructuras globulares.

Este experimento puso de manifiesto la impermeabilidad de las paredes de los óvulos, ya que los tratamientos con óvulos partidos produjeron cantidades de callo bastante superiores al de los óvulos enteros (Cuadro 5). Sin embargo, un examen histológico al estereoscopio, mostró que el callo provino

de residuos del tejido del funículo en el caso de los óvulos enteros, mientras que en el caso de los óvulos partidos, provino de los tejidos tegumentarios. Debido a lo anterior, el callo obtenido en ambos casos fue probablemente de naturaleza diploide y no haploide como se buscaba.

Las estructuras globulares fueron sometidas también a tratamientos con 1 mg/l de ABA (ácido abscísico), en vista de la existencia de informes sobre embriogénesis secundaria a partir de embriones somáticos de papaya (Chen *et al.* 1991). Sin embargo, luego de dos meses de cultivo, la tendencia observada fue la oxidación.

Varios estudios han demostrado la necesidad de inducir un estado de reposo (etapa G0 de la mitosis) en células diferenciadas para conferirles la capacidad de percepción de estímulos del proceso embriogénico. La metodología más exitosa para lograr dicho estado de reposo ha sido la eliminación de fuentes energéticas. Esta técnica fue utilizada con éxito para clonar el primer mamífero a partir de células adultas (Wilmot *et al.* 1997), así como indu-

**Cuadro 5.** Efecto de diversos tratamientos sobre óvulos y estructuras globulares de papaya (*Carica papaya* L.) obtenidas durante la primera etapa a los dos meses de cultivo *in vitro*. (Datos expresados en porcentaje).

Tratamientos (mg/l)	Estructuras globulares		Óvulos	
	Formación de callo	Sin respuesta	Formación de callo	Sin respuesta
1 ANA+ 400 glutamina				
óvulos enteros	NR	NR	1,3	98,7
óvulos partidos	NR	NR	55,3	44,7
1 ANA + 0,1 CPPU				
óvulos enteros	0	100	2,7	97,3
óvulos partidos	0	100	11	89
1 ANA + 0,5 KIN				
óvulos enteros	0	100	2,5	97,5
óvulos partidos	0	100	51,1	48,9
1 2,4-D				
óvulos enteros	0	100	NR	NR
óvulos partidos	0	100	NR	NR

NR = no realizado

cir por primera vez el proceso de embriogénesis a partir de anteras de roble (Bueno *et al.* 1997). En el presente trabajo, la eliminación de sacarosa del medio de cultivo efectivamente impidió la manifestación de cambios en los ovarios tratados, pero no logró la activación del proceso embriogénico. Luego de una semana de cultivo en el medio sin sacarosa, los ovarios comenzaron a tornarse blancos; no formaron callo como es lo usual, a pesar de que el medio sí contenía ANA. La transferencia a medios sin ANA y con sacarosa (al 3%) 15, 22 y 30 días después, no produjo cambios visibles luego de más de cinco meses de cultivo. Lo anterior indica que, probablemente, la baja actividad metabólica inducida por la falta de sacarosa impidió la percepción del estímulo del ANA. Ello sugiere que debería utilizarse un medio con sacarosa + ANA luego del tratamiento de estrés nutricional, para finalmente transferir a un medio con sacarosa únicamente. Este tratamiento también pone de manifiesto el hecho de que las paredes de los ovarios inmaduros no contienen reservas utilizables para los óvulos, y por lo tanto, los períodos de estrés nutricional debieron ser menores.

El tratamiento de cocultivo de ovarios y anteras se incluyó debido a que en experimentos preliminares de cultivo de anteras se había obtenido la formación de embriones a partir de ovarios que accidentalmente caían al medio durante la disección de las flores. Con el empleo del cocultivo se obtuvo la formación de estructuras similares a embriones luego de dos meses de cultivo (9,4% contra 0 del testigo). Sin embargo, no se logró el desarrollo de los mismos hasta plántulas. Existen varios reportes en la literatura sobre posibles efectos de acondicionamiento del medio con anteras (Kolher y Wenzel, 1985), ovarios y embriones (Dudits *et al.* 1995). Es interesante notar también que la polinización con polen irradiado logra iniciar el proceso de embriogénesis a partir de tejidos haploides maternos del ovario, sin mediar el proceso de fecundación. Este fenómeno ha sido aprovechado para producir plantas haploides de manzana (Huang y Lespinasse, citados por Bohanec y Javornik, 1994) y cebolla (Dore y Marie, 1993). Las mismas sustan-

cias presentes en el polen podrían ser las responsables del acondicionamiento del medio.

Los resultados de este trabajo confirman la tendencia generalizada sobre la importancia de las auxinas para la inducción de la embriogénesis, así como de la necesidad de su eliminación del medio de cultivo para que dicho proceso continúe con su desarrollo normal.

La obtención de embriogénesis a partir de tejidos diferenciados podría requerir de dos pasos. El primero sería la abolición del desarrollo de los programas de diferenciación, los cuales estarían reprimiendo al proceso embriogénico. Esto conllevaría a la inducción de un estado de reposo, en el cual la célula sería receptiva. Durante este estado, la falta de fuentes de energía obligaría a la célula a mantener activos solamente los procesos vitales para su supervivencia (genes constitutivos). En esta situación, es posible que los sistemas genéticos embriogénicos tengan la vía libre para percibir estímulos que los activen. El término "competencia" podría referirse precisamente a este estado (Mordhorst *et al.*, 1997).

La naturaleza del estímulo embriogénico es aún desconocida, pero puede ser inducida por una gran cantidad de tratamientos poco específicos como se demuestra en la literatura. Para la inducción de la embriogénesis a partir de anteras, se citan la aplicación de ethrel, centrifugación, irradiación, agentes químicos, altas y bajas temperaturas, etc. (Atanassov *et al.*, 1995). Una vez abolido el patrón de desarrollo e inducido un estado de reposo, es posible que una gran cantidad de estímulos puedan iniciar el proceso, en vista de que la embriogénesis es la única vía natural que le permitiría a las células perpetuarse. En este sentido, Dudits *et al.*, (1995) señalan que el proceso embriogénico podría interpretarse como un caso extremo de plasticidad.

Podría especularse que muchos de los tejidos que adquieren competencia, lo hacen debido a que pasaron por un estado de reposo inducido por algún estrés. Esta podría ser la razón por la cual algunos



tratamientos físicos (alteración del potencial hídrico, pretratamientos con frío, etc.) son tan efectivos para inducir la embriogénesis. Es importante notar que posiblemente una gran diversidad de dichos tratamientos tengan en realidad un efecto común: la eliminación de fuentes energéticas. En este sentido, cabe recordar que la disminución del potencial hídrico de un medio produce una disminución del transporte de solutos (entre ellos sacarosa) hacia el explante. Por su parte, las bajas temperaturas podrían afectar la actividad enzimática asociada al metabolismo de los carbohidratos. Finalmente, muchos explantes, aún con tejidos carnosos, no necesariamente tienen reservas utilizables (como se comprobó en los tratamientos de eliminación de sacarosa), y su separación del tejido materno puede inducir una carencia energética momentánea pero suficiente para volverla competente, aún en ausencia de otros tratamientos. Es posible que esta sea la razón por la cual se obtuvieron embriones en los tratamientos con la eliminación del ANA a los 15 días (Cuadro 3).

### **Agradecimiento:**

Los autores desean agradecer al Dr. Víctor Jiménez G. por la revisión y sugerencias.

### **LITERATURA CITADA**

- AQUILIZAN, F.A. 1986. Breeding systems for fixing stable inbred lines with breeding potential for hybrid variety production. *In* Symposium of horticultural breeding (1986, Taichung, Taiwan) Taichung, Taiwan. p. 56- 61.
- ATANASSOV, A.; ZAGORSKA, P.; BOYADIJEV, P.; DJILIANOV, D. 1995. *In vitro* production of haploid plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:400-408.
- BOHANEK, B.; JAVORNIK, B. 1994. Induction of gynogenesis in agricultural crops: a review. *In* Proceedings of the international colloquium on impact of plant biotechnology on agriculture (1994 Rogla, Slovenia) p.43-45.
- BUENO, M.A.; GOMEZ, A.; BOSCAIU, M.; MANZANERA, J.A.; VICENTE, O. 1997. Stress-induced formation of haploid plants through anther culture in cork oak (*Quercus suber*). *Physiologia Plantarum*, 99:335-341.
- CHAN, Y.K. 1992. Progress in breeding F1 papaya hybrids in Malaysia. *Acta Horticulturae* 292:41-49.
- CHEN, M.H.; CHEN, C.C.; WANG, F.C. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *C. papaya* x *C. cauliflora* cultured *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* 69:1913-1918.
- DORE, C.; MARIE, F. 1993. Production of gynogenetic plants of onion (*Allium cepa*) after crossing with irradiated pollen. *Plant Breeding* 111: 142-147.
- DUDITS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L.; BAKO, L. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. *In*: *In vitro* embryogenesis. Ed. por T.A. Thorpe. Dordrecht, Holanda, Kluwer. pp. 267-308.
- FISCHER, C.; NEUHAUS, G. 1996. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. *The Plant Journal* 9(5):659-669.
- KOHLER, F.; WENZEL, G. 1985. Regeneration of isolated barley microspores in conditioned medium and trials to characterize the responsible factor. *Journal of Plant Physiology* 121: 181-191.
- LITZ, R.E.; CONOVER, R.A. 1978. Recent advances in papaya tissue culture. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 91:180-182.
- LIU, C.M.; XU, Z.H.; CHUA, N.A. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell* 5:621-630.
- MANSHARDT, R.M.; 1992. Papaya. *In* Biotechnology of perennial fruit crops. Ed. por R. Litz. Wallington, Oxon, CAB International. p. 489-511.
- MICHALCZUK, L.; COOKE, T.J.; COHEN, D. 1992. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry* 31(4): 1097-1103.

MORDHORST A.P.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. 1997. Plant embryogenesis. Crit. Rev. Plant Sci. 16:535-576

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497

TSAY, H.S.; TSU, C.Y. 1985. Anther culture of papaya (*Carica papaya*). Plant Cell Reports 4: 28-30.

WILMUT, I.; SCHNIERE, A.E.; McWHIR, J.; KIND, A.J. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385:810-813.

---