

## Inducción *in vitro* de raíces de *Carica papaya* mediante *Agrobacterium rhizogenes* y ácido 3-indolbutírico\*

### *In vitro* induction of *Carica papaya* roots through *Agrobacterium rhizogenes* and 3-indolebutyric acid

Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán<sup>1</sup>, Pedro Valadez Ramírez<sup>2</sup>, Marco Tulio Buenrostro Nava<sup>2</sup>, Gilberto Manzo Sánchez<sup>2</sup> y Salvador Guzmán González<sup>2§</sup>

<sup>1</sup>Campo Experimental Tecomán- INIFAP. Autopista Colima-Manzanillo, km 35. Tecomán, Colima, C. P. 28100, México. Tel: (313) 32 29405 Ext-52250. <sup>2</sup>Universidad de Colima, Laboratorio de Biología Molecular y Cultivo de Tejidos Vegetales. Autopista Colima-Manzanillo, km 40. Tecomán, Colima, C. P. 28100, México. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: sguzman@ucol.mx.

#### Resumen

El enraizamiento de plántulas *in vitro* es una de las etapas más importantes en el proceso de micropropagación y en *C. papaya* ha sido una de las principales limitantes, obteniéndose porcentajes de sobrevivencia inferiores al 50%. El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Colima en 2009. Con el propósito de inducir un sistema radicular eficiente, se evaluaron brotes de papaya var. "Maradol" de aproximadamente 3 cm de longitud que fueron inoculados con *A. rhizogenes* a concentraciones de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  células mL<sup>-1</sup> y establecidos en medio MS con acetosiringona (100 mM) y floriglucinol (25 mg/L). Para el experimento con la auxina, los brotes se subcultivaron en medio líquido MS con 0, 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu$ M de AIB; se incubaron en oscuridad durante 126 h, seguido del subcultivo en sustrato BM2 + sales minerales del MS. Ninguno de los brotes inoculados con las concentraciones bacterianas formó raíces; en contraste, 100% de los brotes tratados con AIB a una concentración de 3  $\mu$ M formaron raíces. Con lo anterior se demuestra que las plántulas de *C. papaya* posiblemente no son susceptibles a la cepa A4 de *A. rhizogenes*, mientras que el empleo de AIB resultó ser la opción más viable y efectiva para la inducción *in vitro* de raíces en brotes de papaya.

#### Abstract

*In vitro* rooting of seedlings is one of the most important steps in the process of micropropagation and in *C. Papaya* has been one of the major limiting, having survival percentages below 50%. The present research was conducted in the laboratory of Biotechnology of the University of Colima in 2009. In order to induce an efficient root system, evaluated papaya shoots var. "Maradol" of approximately 3 cm length, inoculated with *A. rhizogenes* at concentrations of  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  cells ml<sup>-1</sup> and established on MS medium with acetosyringone (100 mM) and phloroglucinol (25 mg / L). For the experiment with auxin shoots were subcultured in MS liquid medium containing 0, 1, 2, 3, 4 and 5  $\mu$ M IBA; incubated in the dark for 126 h, followed by subculture in substrate BM2 + MS mineral salts. None of the inoculated shoots with bacterial concentrations formed roots; in contrast, 100% of the treated shoots with IBA to a concentration of 3  $\mu$ M formed roots. With the above demonstrates that seedlings of *C. papaya* may not be susceptible to strain A4 *A. rhizogenes*, while the use of IBA proved to be the most viable and effective option for *in vitro* root induction in shoots of papaya.

\* Recibido: enero de 2013  
Aceptado: agosto de 2013

**Palabras clave:** *C. papaya*, *A. rhizogenes*, auxina, enraizamiento, micropropagación.

## Introducción

A nivel mundial México es el quinto productor de papaya con una producción aproximada de 616 215 toneladas por año (FAOSTAT, 2010); en el estado de Colima aporta una importante derrama económica para el desarrollo de la comunidad productora, por lo que se ha ido incrementando su extensión y producción, convirtiéndose este cultivo en uno de los tres principales después del limón y el plátano (COEPAPAYA, 2008). Debido a lo anterior se ha incrementado la demanda de plantas con características homogéneas deseables; por esta razón, como alternativa de producción masiva de plantas de papayo, se han hecho diversos estudios sobre la micropropagación de la misma (Yu *et al.*, 2000; Guzmán-González *et al.*, 2005; Ascencio-Cabral *et al.*, 2008; Kaity *et al.*, 2009); sin embargo, la etapa de enraizamiento representa la principal limitante (Guzmán-González *et al.*, 2005; Kaity *et al.*, 2009), aún mediante la aplicación de hormonas de crecimiento (Damiano *et al.*, 1991).

En plantas de papaya, se ha logrado la inducción de raíces *in vitro* exponiendo brotes en ácido 3-indolbutírico (AIB) a 10  $\mu\text{M}$  durante 3 días, seguido de un subcultivo sin auxinas (Guzmán-González *et al.*, 2005), así como a la exposición de 2.5  $\mu\text{M}$  de AIB en completa oscuridad durante una semana y posteriormente en medio sin la hormona (Yu *et al.*, 2000). Sin embargo, se obtienen sistemas radiculares deficientes, lo que origina una baja tasa de sobrevivencia (menor a 60%) (Guzmán-González *et al.*, 2005).

Como estrategia a este problema, en muchas especies vegetales se ha empleado a *A. rhizogenes*, un patógeno natural del suelo que infecta principalmente a plantas dicotiledóneas herbáceas o leñosas, en el proceso de enraizamiento de la micropropagación para obtener un sistema radicular eficiente (MacRae y Van Staden, 1993; Rugini *et al.*, 1993; Damiano *et al.*, 1995; Caro *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2003).

En el caso de la papaya no se tienen reportes sobre la eficiencia en la inducción de raíces utilizando *A. rhizogenes*, con base en las experiencias antes mencionadas este trabajo tiene como propósito evaluar el efecto de la inoculación de distintas concentraciones de la agrobacteria ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y

**Palabras clave:** *C. papaya*, *A. rhizogenes*, auxin, rooting, micropropagation.

## Introduction

Globally Mexico is the fifth largest producer of papaya with an approximate production of 616 215 tons per year (FAOSTAT, 2010); in the state of Colima brings a significant economic benefit to the development to the community of producers, so its area and production has been increasing, making this crop one of the top three after the lemon and banana (COEPAPAYA, 2008). Because of this has increased the demand for plants with similar characteristics; for this reason, as an alternative to mass production of papaya, there have been several studies on the micropropagation of the same (Yu *et al.*, 2000; Guzmán-González *et al.*, 2005; Ascencio-Cabral *et al.*, 2008; Kaity *et al.*, 2009); however the rooting stage represents the main limitation (Guzmán-González *et al.*, 2005; Kaity *et al.*, 2009), even by application of growth hormone (Damiano *et al.*, 1991).

In papaya plants, has been able to induce roots *in vitro* by exposing shoots to 3-indolebutyric acid (IBA) to 10  $\mu\text{M}$  for 3 days, followed by a subculture without auxin (Guzmán-González *et al.*, 2005); thus to the exposure of 2.5  $\mu\text{M}$  IBA in complete darkness for a week and then in hormone-free medium (Yu *et al.*, 2000). However, poor root systems are obtained, resulting in a low rate of survival (less than 60%) (Guzmán-González *et al.*, 2005).

As a strategy to this problem, in many plant species has been used *A. rhizogenes*, a natural soil pathogen that infects primarily dicotyledonous woody or herbaceous plants, in the rooting process of the micropropagation to obtain an efficient root system (MacRae and Van Staden, 1993; Rugini *et al.* 1993; Damiano *et al.*, 1995; Caro *et al.* 2000; Martins *et al.*, 2003).

In the case of papaya there are no reports on the efficiency of induction of roots using *A. rhizogenes*, based on the experiences above mentioned; this work aims to evaluate the effect of inoculation with different concentrations of Agrobacterium ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) and 3-indole butyric acid (0, 1, 2, 3, 4 and 5  $\mu\text{M}$  IBA) *in vitro* root formation in shoots of papaya.

$1 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) y ácido 3-indolbutírico (0, 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu\text{M}$  de AIB) sobre la formación de raíces *in vitro* en brotes de papaya.

## Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Colima, ubicado en el km 40 de la autopista Colima-Manzanillo, en el municipio de Tecomán. Se muestrearon papayas inmaduras colectadas de la comunidad de "Los Asmoles", Tecomán. El municipio se encuentra entre los paralelos  $18^\circ 40'$  y  $19^\circ 08'$  de latitud norte y los meridianos  $103^\circ 37'$  y  $103^\circ 59'$  de longitud oeste. La altitud oscila entre 0 y 1 200 msnm con una temperatura de entre  $22\text{-}28^\circ\text{C}$  y un clima cálido subhúmedo y semiseco con lluvias en verano con una precipitación de 600 a 1 100 mm.

**Generación de brotes de papaya.** Las plántulas fueron generadas mediante embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos (Cai *et al.*, 1999) obtenidos de semillas de frutos inmaduros de plantas de papaya hermafroditas de tres meses de crecimiento. La desinfección superficial de los frutos se realizó durante 1 h en una solución de cloro comercial al 20% (v/v) con dos gotas de Tween 20/L; se enjuagaron con etanol al 70% y se partieron con un cuchillo estéril. Se extrajeron las semillas, se les retiró la sarcotesta con pinzas y bisturí y el embrión cigótico fue extraído con un corte de bisturí evitando su daño,

Posteriormente, los embriones (tipo torpedo) fueron colocados en cajas de petri conteniendo medio MS al 50% de la concentración de sales,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a pH 5.8 y 0.8% de fitagel.

Se incubaron durante ocho semanas en oscuridad a  $27^\circ\text{C}$  hasta la aparición de los embriones somáticos y se subcultivaron por periodos de cuatro semanas para inducir su multiplicación en medio de maduración compuesto por las sales MS a 80%,  $0.9 \mu\text{M}$  de bencilaminopurina (BA) y  $0.1 \mu\text{M}$  de ácido naftaleno acético (ANA). Se incubaron a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  y un fotoperíodo de 16 h luz al día. Después de cuatro semanas, las masas embriogénicas diferenciadas (color verde) se colocaron en medio de regeneración, compuesto por sales MS,  $0.32 \mu\text{M}$  de BA,  $0.06 \mu\text{M}$  de kinetina (KIN) y  $0.16 \mu\text{M}$  de ANA y solidificado con 0.8% de fitagel. Se

## Materials and methods

This research was conducted in the laboratory of Molecular Biology and Plant Tissue Culture at the University of Colima, located at km 40 of the highway Colima-Manzanillo, in the municipally of Tecomán. Collected unripe papayas, sampled from the community "Los Asmoles" Tecomán. The municipality is located between parallels  $18^\circ 40'$  and  $19^\circ 08'$  north latitude and meridian  $103^\circ 37'$  and  $103^\circ 59'$  west longitude. The altitude ranges from 0 to 1 200 masl with a temperature of  $22\text{-}28^\circ\text{C}$  and a hot-dry semi-humid climate with summer rainfall of 600 to 1 100 mm.

**Generation of papaya shoots.** Seedlings were generated by somatic embryogenesis from zygotic embryos (Cai *et al.*, 1999) obtained from seeds of unripe fruits from hermaphroditic papaya plants of three months. Surface disinfection of the fruits was made for 1 h in a solution of commercial bleach 20% (v/v) with two drops of Tween 20 / L; rinsed with ethanol 70% and split with a sterile knife. Seeds were extracted and removed the sarcotesta with forceps and scalpel and zygotic embryo was removed with scalpel cut avoiding harm.

Then, the embryos (torpedo type) were placed in Petri dishes containing MS medium at 50% salt concentration,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at pH 5.8 and 0.8% phytagel.

Incubated for eight weeks in the dark at  $27^\circ\text{C}$  until the appearance of somatic embryos and sub cultured for periods of four weeks to induce its multiplication in maturation medium consisting of MS salts at 80%,  $0.9 \mu\text{M}$  benzylaminopurine (BA) and  $0.1 \mu\text{M}$  naphthalene acetic acid (NAA); incubated at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  and a photoperiod of 16 h light per day. After four weeks, differentiated embryogenic masses (green) were placed on regeneration medium, consisting of MS salts,  $0.32 \mu\text{M}$  of BA,  $0.06 \mu\text{M}$  of kinetin (KIN) and  $0.16 \mu\text{M}$  of NAA and solidified with 0.8% phytagel and incubated at light and temperature mentioned above, to obtain seedlings of approximately 3 cm length.

**Agrobacterium rhizogenes strain.** Strain A4 from *A. rhizogenes* was used, this bacteria is agropine type and contains the wild Ri plasmid that confers the phenotype of hairy roots and the binary vector pESC4, containing the

incubaron a las condiciones de luz y temperatura antes mencionadas hasta obtenerse plántulas de 3 cm de longitud aproximadamente.

**Cepa de *Agrobacterium rhizogenes*.** Se utilizó la cepa A4 de *A. rhizogenes*, ésta bacteria es de tipo agropina y contiene el plásmido silvestre Ri que confiere el fenotipo de raíces pilosas y el vector binario pESC4, que contiene el gen marcador de selección de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) bajo el control del promotor y terminador *nos* y el gen reportero de la  $\beta$ -glucuronidasa (*gus*) bajo el control del promotor *cab* y el terminador *ocs*. Las bacterias se mantuvieron en cajas de Petri, conteniendo medio YM sólido complementado con 50 mg L<sup>-1</sup> de rifampicina y 50 mg L<sup>-1</sup> de kanamicina. Se incubaron durante 72 h a 27 °C y se almacenaron a 4 °C. Posteriormente, fueron subcultivadas cada mes para mantener las generaciones bacterianas frescas al momento de la inoculación (Serna-Pérez y Pérez-Molphe, 2002).

#### Verificación de la presencia del plásmido Ri y el vector binario ESC4 en *A. rhizogenes*.

Se purificó DNA plasmídico de la cepa A4 de *A. rhizogenes* con el kit de extracción QIAGEN. Este DNA fue utilizado como molde para la amplificación de los genes *rolB*, *gus* y *nptII* mediante PCR. El primer gen se encuentra en la región vir del plásmido Ri y los otros dos genes marcadores se encuentran contenidos en el plásmido ESC4. La reacción de PCR se llevó a cabo de acuerdo a Serna-Pérez y Pérez-Molphe, 2002, y consistió de 100  $\mu$ M de dNTPs, 1  $\mu$ M de cada iniciador específico para cada gen (Cuadro 1), 1.5 U de Taq DNA polimerasa, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y amortiguador de reacción 1X. La mezcla se llevó a un volumen final de 25  $\mu$ L con agua desionizada estéril.

selectable marker of neomycin phosphotransferase gene (*nptII*) controlled by the promoter and *nos* terminator and the reporter gene  $\beta$ -glucuronidase (*gus*) under the control of the *cab* promoter and the *ocs* terminator. Bacteria were maintained on Petri dishes containing solid YM medium supplemented with 50 mg L<sup>-1</sup> of rifampicin and 50 mg L<sup>-1</sup> of kanamycin and incubated for 72 h at 27 °C and stored at 4 °C. Subsequently, were subcultured every month to keep fresh bacterial generations at the time of inoculation (Serna-Pérez and Pérez-Molphe, 2002).

#### Verifying the presence of Ri plasmid and the binary vector ESC4 in *A. rhizogenes*.

Plasmid DNA was purified from strain A4 of *A. rhizogenes* with the extraction kit QIAGEN. This DNA was used as mold for amplification of the *rolB*, *gus* and *nptII* genes through PCR. The first gene is located on the vir region from Ri plasmid and the other two gene markers are contained in plasmid ESC4. The PCR reaction was conducted according to Serna-Pérez and Perez-Molphe, 2002 and consisted of 100  $\mu$ M of dNTPs, 1  $\mu$ M of each specific primer for each gene (Table 1), 1.5 U Taq DNA polymerase, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1X reaction buffer. The mixture was brought to a final volume of 25  $\mu$ L with sterile deionized water.

The reaction conditions were: initial denaturation for 3 min at 94 °C, denaturation for 1 min at 94 °C, alignment for 1 min at 55 °C and extension for 3 min at 72 °C with 30 cycles and a final extension for 5 min at 72 °C (Serna-Pérez and Pérez-Molphe, 2002). Then the PCR products were separated by gel electrophoresis on 1% agarose, stained with ethidium bromide (10 mg mL<sup>-1</sup>) and finally captured with a MiniBis pro (fotodocumentador).

#### Cuadro 1. Iniciadores utilizados para la amplificación por PCR de los genes *rolB*, *gus* y *nptII* con DNA bacteriano aislado de *A. rhizogenes*.

Table 1. Primers used for PCR amplification of the *rolB*, *gus* and *nptII* genes with bacterial DNA isolated from *A. rhizogenes*.

Gen	Secuencia de iniciadores	Fragmento (pb)
<i>rolB</i>	5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA-3' 3'-TTAGGCTTCTTCTTCAGGTTACTGCAGC-5'	780
<i>gus</i>	5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG-3' 3'-GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA-5'	1 200
<i>nptII</i>	5'-TATTCGGCTATGACTGGGCA-3' 3'-GCCAACGCTATGTCCTGAT-5'	517

Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización inicial por 3 min a 94 °C, desnaturalización durante 1 min a 94 °C, alineamiento durante 1 min a 55°C y extensión durante 3 min a 72°C con 30 ciclos y una extensión final por 5 min a 72 °C (Serna-Pérez y Pérez-Molphe, 2002). Luego, los productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (10 mg mL<sup>-1</sup>) y finalmente capturado con un fotodocumentador.

**Inoculación de brotes de papaya con *A. rhizogenes*.** Una masa pequeña de bacterias fue tomada de un cultivo en medio sólido e inoculada en medio YM líquido, complementado con 50 mg L<sup>-1</sup> de rifampicina y 50 mg L<sup>-1</sup> de kanamicina. Se incubó durante 72 h a 27 °C con agitación orbital a 120 rpm (Serna-Pérez y Pérez-Molphe, 2002) y se determinó la concentración de las células bacterianas utilizando la cámara de Neubauer. Se prepararon diluciones a concentraciones de 1x10<sup>7</sup>, 1x10<sup>8</sup> y 1x10<sup>9</sup> células mL<sup>-1</sup>.

Las plántulas de papaya de aproximadamente 3 cm de longitud fueron heridas con bisturí en la parte basal, luego se sumergieron durante 45 min en las suspensiones bacterianas a concentraciones de 0, 1x10<sup>7</sup>, 1x10<sup>8</sup> y 1x10<sup>9</sup> células mL<sup>-1</sup>; se eliminó el exceso de líquido con una gasa esterilizada. Después de la inoculación, los brotes se transfirieron a medio de cultivo MS libre de hormonas y complementado con 0, 50 y 100 mM de acetosiringona y uno más con 100 mM de acetosiringona combinado con 25 mg L<sup>-1</sup> de floriglucinol, utilizando como soporte el sustrato BM2. Luego, se incubaron a 25 ± 1 °C en la oscuridad durante 72 h y posteriormente a la misma temperatura pero con 16 h luz (Serna-Pérez y Pérez-Molphe, 2002).

Como control positivo se utilizaron segmentos de zanahoria (Blanco *et al.*, 2003), los cuales se enjuagaron con agua corriente, se les eliminó la cáscara con ayuda de un cuchillo y se desinfectaron mediante la inmersión en etanol al 95% (v/v) durante 10 s, seguido de la inmersión en solución de NaOCl al 1% durante 15 min. Los cortes transversales fueron de aproximadamente 0.5 cm de grosor y se colocaron en cajas de Petri conteniendo medio M (Beard y Fortin, 1988). Los explantes de zanahoria se inocularon mediante incisiones en el floema, el xilema y el cámbium vascular con un bisturí previamente sumergido en la suspensión bacteriana a 1x10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>. Se incubaron en oscuridad a 27 °C.

**Expresión de la β-glucuronidasa (GUS) en brotes de *C. papaya* y raíces de zanahoria.** Para la prueba histoquímica de la expresión del gen *gus* se preparó una solución X-glcA,

**Inoculation of papaya shoots with *A. rhizogenes*.** A small mass of bacteria was taken from a solid medium and inoculated in liquid YM medium supplemented with 50 mg L<sup>-1</sup> of rifampicin and 50 mg L<sup>-1</sup> kanamycin; incubated for 72 h at 27 °C with orbital shaking at 120 rpm (Serna-Pérez and Pérez-Molphe, 2002) and determined the concentration of bacterial cells using a Neubauer chamber. Dilutions were prepared at concentrations of 1x10<sup>7</sup>, 1x10<sup>8</sup> and 1x10<sup>9</sup> cells mL<sup>-1</sup>.

Papaya seedlings of approximately 3 cm length were wounded with a scalpel in the basal part, and then immersed for 45 min in the bacterial suspensions at concentrations of 0, 1x10<sup>7</sup>, 1x10<sup>8</sup> and 1x10<sup>9</sup> mL<sup>-1</sup> cell; removed the excess of liquid with a sterile gauze. After inoculation, the shoots were transferred to MS medium free of hormones and supplemented with 0, 50 and 100 mM acetosyringone and one more with 100 mM acetosyringone combined with 25 mg L<sup>-1</sup> phloroglucinol, using as support the BM2 substrate. Then incubated at 25 ± 1 °C in the dark for 72 h and then at the same temperature but with 16 h light (Serna-Pérez and Pérez-Molphe, 2002).

As positive control were used carrot segments (Blanco *et al.*, 2003) which were rinsed with tap water, removed the skin with a knife and disinfected by immersion it in ethanol at 95% (v/v) for 10 seconds, followed by immersion in NaOCl at 1% for 15 min. Transverse cuts of approximately 0.5 cm thick and placed in Petri dishes containing medium M (Beard and Fortin, 1988). Carrot explants were inoculated through incisions in the phloem, xylem and vascular cambium with a scalpel previously immersed in the bacterial suspension at 1x10<sup>8</sup> cells mL<sup>-1</sup>; incubated in the dark at 27 °C.

**Expression of β-glucuronidase (GUS) in shoots of *C. papaya* and carrot roots.** For the histochemical test of expression of the *gus* gene was prepared the X-glcA solution consisting of 1 mL 2X buffer (0.1 M sodium citrate and 0.2N of HCl) at pH 7.0, 0.02 mL of 0.1M of K<sub>4</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> 3H<sub>2</sub>O, 0.02 mL 0.1M K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>, 1 mg of 5-bromine-4-chloro-3-indoxyl β-D-glucuronide (X-glcA) dissolved in 0.1 mL of methanol, 0.01 mL of Triton X-100 10% (w/v) and 0.85 mL of sterile deionized distilled water. The final solution was sterilized through filters of 45 μm pore size. The papaya shoots were placed in Eppendorf tubes to full cover with the prepared solution and incubated for 12 h at 37 °C (Vitha *et al.*, 1993). Similarly cut the transformed carrot roots with a scalpel and processed in the same way.

compuesta por 1 mL de amortiguador 2X (0.1M de citrato de sodio y 0.2 N de HCl) a pH 7.0, 0.02 mL de 0.1M de  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ , 0.02 mL 0.1M de  $K_3Fe(CN)_6$ , 1 mg de 5-bromo-4cloro-3-indoxil  $\beta$ -D-glucuronido (X-glcA) disuelto en 0.1 mL de metanol, 0.01 mL de Triton X-100 10% (p/v) y 0.85 mL de agua destilada desionizada estéril. La solución final se esterilizó mediante filtros de 45  $\mu$ m de tamaño de poro. Se colocaron los brotes de papaya en tubos Eppendorf hasta cubrirlos por completo con la solución preparada y se incubaron durante 12 h a 37 °C (Vitha *et al.*, 1993). De manera similar se cortaron las raíces transformadas de zanahoria con ayuda de un bisturí y se procedió de la misma forma.

#### **Inducción de raíces en brotes de papaya utilizando AIB.**

Se utilizaron brotes de papaya de aproximadamente 3 cm de longitud con cuatro a cinco hojas bien desarrolladas; éstos se transfirieron a tubos de 1.5 x 19 cm conteniendo 4 mL de medio de maduración complementado con 0, 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu$ M de AIB e incubados en oscuridad durante 126 h. Posteriormente, los brotes se cultivaron en frascos con sustrato BM2, sales al 100% del medio MS y libre de hormonas, e inmediatamente se incubaron en una cámara de crecimiento a condiciones de temperatura de  $27 \pm 1$  °C y fotoperíodo de 16 h, durante cuatro semanas.

**Arreglo experimental y análisis estadístico.** El experimento con inoculación de *A. rhizogenes* fue bifactorial (factor A= tres concentraciones de *A. rhizogenes* y factor B= cuatro concentraciones de inductores: tres de acetosiringona y uno de acetosiringona combinado con floriglucinol) con arreglo combinatorio y distribución completamente al azar, lo que dio un total de 12 tratamientos y cuatro repeticiones tomando como unidad experimental tres frascos con tres explantes cada uno. Para el experimento utilizando AIB a concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu$ M, los tratamientos fueron distribuidos completamente al azar con cuatro repeticiones y la unidad experimental fue la anteriormente descrita.

Para la medición de las variables en ambos experimentos se cuantificó el porcentaje de brotes que formaron raíces, número de raíces primarias, número de raíces secundarias y longitud de raíces primarias. Los datos se sometieron a análisis de varianza y prueba de medias de Duncan al 0.05% de probabilidad mediante el paquete estadístico SAS (1998) (Montgomery, 2004).

**Induction of roots in shoots of papaya using IBA.** Papaya shoots of approximately 3 cm length with four to five leaves well developed, were transferred to tubes of 1.5 x 19 cm containing 4 mL of maturation medium supplemented with 0, 1, 2, 3, 4 and 5  $\mu$ M IBA and incubated in the dark for 126 h. Subsequently, the shoots were cultured in flasks with substrate BM2, salts at 100% from MS medium and hormone-free and immediately incubated in a growth chamber at temperature conditions of  $27 \pm 1$  °C and a photoperiod of 16 h, during four weeks.

**Experimental array and statistical analysis.** The inoculation experiments of *A. rhizogenes* was bifactorial (factor A= three concentrations of *A. rhizogenes* and factor B= four concentrations of inductors, three acetosyringone and one of acetosyringone combined with phloroglucinol) with a combinatorial array and random distribution, giving a total of 12 treatments and four replications, taking as experimental unit three flasks with three explants each. For the experiment using IBA at concentrations of 0, 1, 2, 3, 4 and 5  $\mu$ M, the treatments were distributed completely random with four replications and the experimental unit was described above.

To measure the variables in both experiments was quantified the percentage of shoots forming roots, number of primary and secondary roots and length of primary roots. Data was subjected to analysis of variance and Duncan mean test at 0.05% probability using the statistical package SAS (1998) (Montgomery, 2004).

## **Results and discussion**

The behavior observed on the non-root formation *in vitro*, in shoot tissue of papaya inoculated with *A. rhizogenes* (strain A4) was probably due to the species of *C. papaya* used in this study is not compatible with *Agrobacterium*, not activating the mechanism of recognition and establishment of infection between plant-bacteria (Valderrama-Fonseca *et al.*, 2005). Moreover Serna-Pérez and Pérez-Molphe (2002), in grapefruit and lime plants inoculated with the same bacterial strain, reported percentages of explants forming roots of 78% in Duncan grapefruit, 68% in Río Red grapefruit and 60% in sweet lime. It is also possible that the strain used didn't have the ability to infect cells of

## Resultados y discusión

El comportamiento observado sobre la no formación de raíces *in vitro* en tejido de brotes de papaya inoculadas con *A. rhizogenes* (cepa A4) posiblemente se debió a que la especie *C. papaya* empleada en este estudio no sea compatible con la agrobacteria, no activándose el mecanismo de reconocimiento y establecimiento de infección entre planta-bacteria (Valderrama-Fonseca *et al.*, 2005). Por otra parte Serna-Pérez y Pérez Molphe (2002), en plantas de toronja y lima inoculadas con la misma cepa bacteriana, reportan porcentajes de explantes que formaron raíces del 78% en toronja Duncan, 68% en toronja Río Red y 60% en lima dulce. También, es posible que la cepa empleada no haya tenido la capacidad de infectar células de papaya, ya que esta reportado que otras cepas de *A. rhizogenes* como la LBA9402, inoculada en hojas de *C. papaya* variedad "yellow-large", induce formación de raíces pilosas hasta 74.8% en un periodo de 1 a 4 semanas (Cabrera-Ponce *et al.*, 1996).

Con base en lo anterior, se evaluó el tipo de tejido de papaya inoculado y se observó que tallo y hoja no mostraron formación de raíces en respuesta a la inoculación de la cepa A4 de *A. rhizogenes*; en contraste, los resultados obtenidos por Rodríguez-Hernández *et al.* (2007), en *Agave salmiana*, obtuvieron formación de raíces pilosas en hoja, tallo y raíz, a cualquiera de las concentraciones bacterianas empleadas ( $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^9$  células mL<sup>-1</sup>) y con la misma cepa (A4). De igual manera el hecho observado en explantes de cotiledón de rubia (*Rubia tinctorum*) inoculados con la cepa 2 628, solo formaron callo, mientras que los inoculados con las cepas 15 834, R1 000 y 9 365, mostraron la formación de raíces pilosas (Ercan *et al.*, 1999). Con lo anterior se demuestra que el tipo de cepa es un factor importante para la infección del explante y lo más probable es que *C. papaya* no es susceptible a la cepa A4 de *A. rhizogenes* empleada.

### Verificación de la presencia del plásmido Ri y el vector binario ESC4 en la cepa A4 de *A. rhizogenes*.

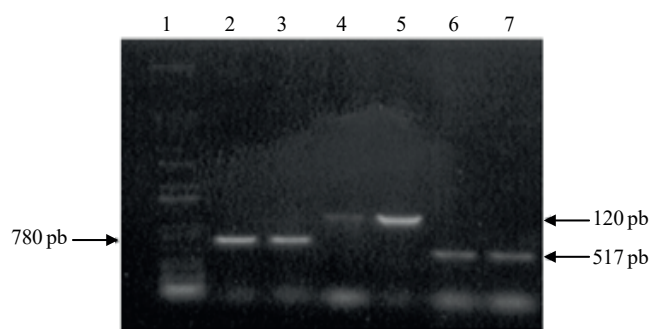
Los productos de PCR separados en geles de agarosa por electroforesis muestran que la bacteria contiene el plásmido Ri y el vector binario ESC4, ya que luego de analizar el gel en transiluminador, se observaron las bandas correspondientes a los genes *rolB* (780 pb) en los carriles 1 y 2, *gus* (1200 pb) en los carriles 3 y 4 y *nptII* (517 pb) en los carriles 5 y 6 con sus respectivos pesos moleculares (Figura 1), evidenciándose la presencia de los plásmidos Ri y ESC4 contenidos en la cepa A4 de *A. rhizogenes*.

papaya, since is reported that other strains of *A. rhizogenes* as LBA9402, inoculated in leaves of *C. papaya* variety "yellow-large", induce hairy root formation to 74.8% over a period of 1 to 4 weeks (Cabrera-Ponce *et al.*, 1996).

Based on the above, was evaluated the type of tissue of papaya inoculated and observed that stem and leaf showed no formation of roots in response to the inoculation of strain A4 from *A. rhizogenes*; in contrast, the results obtained by Rodríguez-Hernández *et al.* (2007), in *Agave salmiana*, obtained hairy root formation in leaf, stem and root, at any of the bacterial concentrations used ( $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^9$  cells mL<sup>-1</sup>) and with the same strain (A4). Similarly the observed fact in explants of common madder (*Rubia tinctorum*) inoculated with strain 2 628, only formed callus, while those inoculated with strains 15 834, R1 000 and 9 365, showed the formation of hairy roots (Ercan *et al.*, 1999). The above shows that strain type is an important factor to infect the explant and most likely that *C. papaya* is not susceptible to strain A4 from *A. rhizogenes*.

### Verifying the presence of Ri plasmid and binary vector ESC4 in strain A4 of *A. rhizogenes*.

PCR products separated in agarose gel by electrophoresis show that the bacteria contains the Ri plasmid and binary vector ESC4, because after analyzing the gel in transilluminator, the corresponding bands to the *rolB* gene (780 bp) in the lanes 1 and 2, *gus* (1200 bp) in lanes 3 and 4 and *nptII* (517 bp) in lanes 5 and 6 with their respective molecular weights (Figure 1), demonstrating the presence of Ri plasmids and ESC4 contained in strain A4 of *A. rhizogenes*.



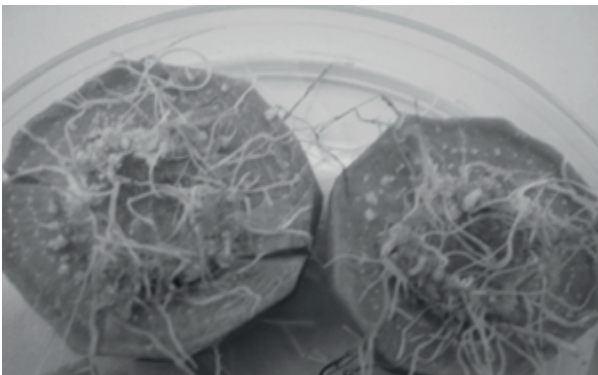
**Figura 1. Amplificación por PCR de los genes *rolB*, *gus* y *nptII* a partir de la extracción de DNA plasmídico de *A. rhizogenes*.** Línea 1, marcador de peso molecular 1 Kb plus; líneas 2 y 3, gen *rolB*; líneas 4 y 5, gen *gus*; líneas 6 y 7, gen *nptII*.

**Figure 1. PCR amplification of *rolB*, *gus* and *nptII* genes from plasmid DNA extraction of *A. rhizogenes*.** Lane 1, molecular weight marker 1 Kb plus; lines 2 and 3, *rolB* gene; lines 4 and 5, the *gus* gene; lines 6 and 7, *nptII* gene.

### Inoculación de brotes de papaya con *A. rhizogenes*.

Después de dos semanas de la inoculación evaluando el tipo de explante (tallo y hoja) con la solución bacteriana a una concentración de  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *A. rhizogenes*, no se obtuvo evidencia de formación de raíces pilosas en ninguna parte del explante. Además, el tejido vegetal presentó necrosis y amarillamiento, mientras que los explantes utilizados como control (sin inocular) permanecieron verdes.

La funcionalidad de *A. rhizogenes* se comprobó utilizando cortes de zanahoria empleados como control positivo; aproximadamente 100 raíces por segmento de zanahoria crecieron por la parte superior del explante brotando de las incisiones que se hicieron con el bisturí (Figura 2). También se inocularon los segmentos de zanahoria con bacterias tomadas directamente de la placa con asa bacteriológica; sin embargo, no hubo presencia de raíces pilosas en los segmentos de zanahoria inoculados de esta forma.



**Figura 2. Inducción de raíces mediante *A. rhizogenes*.** Raíces pilosas obtenidas mediante la inoculación de *A. rhizogenes* a una concentración de  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  en segmentos de zanahoria después de dos semanas.

**Figure 2. Root induction through *A. rhizogenes*.** Hairy roots obtained through inoculation of *A. rhizogenes* at a concentration of  $1 \times 10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$  in carrot segments after two weeks.

### Expresión de la $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en tejido de *C. papaya* y raíces de zanahoria.

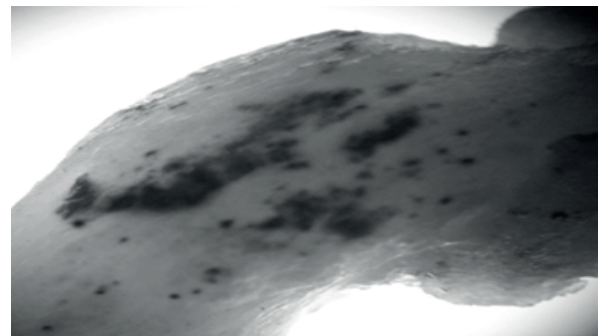
Brotos de papaya inoculados con *A. rhizogenes* con 2-3 semanas se les realizó la prueba histoquímica; dos horas después fue visible el color azul característico de la expresión del gen *gus* en el tejido de papaya (Figura 3). Lo anterior indica que las agrobacterias están presentes en el tejido vegetal, sin embargo, el hecho de no observarse raíces pilosas probablemente se deba a una expresión transitoria (Chávez-Camacho *et al.*, 2002) o que se trate de residuos bacterianos

**Inoculation of papaya shoots with *A. rhizogenes*.** After two weeks of inoculation and evaluating the type of explant (stem and leaf) with the bacterial solution at a concentration of  $1 \times 10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of *A. rhizogenes*, there was no evidence of hairy root formation in any part of the explant. Moreover, the plant tissue showed necrosis and yellowing while explants used as control (not inoculated) remained green.

The functionality of *A. rhizogenes* was checked using carrot slices as positive control; approximately 100 root segments of carrot grew on the top of the explant sprouting from the incisions made with a scalpel (Figure 2). Also inoculated the carrot segments with bacteria taken directly from the plate with a bacteriological loop; however, there was no presence of hairy roots in the inoculated segments of carrot in this way.

### Expression of $\beta$ -glucuronidase (GUS) in tissue of *C. papaya* and carrot roots

Shoots of papaya inoculated with *A. rhizogenes* with 2-3 weeks were performed a histochemistry test; after two hours was visible the distinctive blue color of *gus* gene expression in tissue of papaya (Figure 3). This indicates that agrobacteria are present in plant tissue, however, the fact of not observing hairy roots, is probably due to a transient expression (Chávez-Camacho *et al.*, 2002) or that it be attached bacterial debris to the tissue surface. Moreover, as expected, control showed no *gus* gene expression in the tissue.



**Figura 3. Expresión del gen *gus* en brotes de *C. papaya*.**

Las manchas de color azul evidencian el producto  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) después de tres semanas de su inoculación con *A. rhizogenes*.

**Figure 3. *gus* gene expression in shoots of *C. papaya*.** The blue spots show the product  $\beta$ -glucuronidase (GUS) after three weeks of its inoculation with *A. rhizogenes*.

The results of the *gus* gene expression in roots of carrot contained in the solution X-glcA showed 4 to 5 roots that turned blue, i.e. approximately 20%, which is



adheridos a la superficie del tejido. Por otra parte, como se esperaba, los controles no presentaron expresión del gen *gus* en el tejido.

Los resultados de la expresión del gen *gus* en las raíces de zanahoria contenidas en la solución X-glcA mostraron de 4 a 5 raíces que se tornaron color azul; es decir, aproximadamente 20%, por lo que se confirma con esta prueba la eficiencia de la cepa A4 de *A. rhizogenes* para infectar y producir raíces pilosas (Figura 4).

**Enraizamiento de brotes de *C. papaya* utilizando AIB.** El mejor tratamiento fue 3  $\mu\text{M}$  de AIB, con el cual se obtuvo 100% de enraizamiento, una longitud de las raíces de 4.9 mm y 7.5 raíces primarias por explante, pero no hay diferencias estadísticas con otros tratamientos, mientras que la mayor longitud de raíces (9 mm) se obtuvo con 5  $\mu\text{M}$  de AIB ( $p=0.05$ ). En relación al número de raíces laterales, el tratamiento con 3 y 4  $\mu\text{M}$  de AIB produjeron el valor más alto (2).

Todas las raíces presentaron anatomía gruesa y de 3 a 4 hojas verdes bien desarrolladas. De manera similar Yu *et al.*, 2000, utilizaron 2.5  $\mu\text{M}$  de AIB, y reportaron porcentajes de enraizamiento de 90 y 94.5% en brotes de *C. papaya* cultivados en vermiculita como sustrato en condiciones de aireación y no aireación, respectivamente; sin embargo las raíces que se formaron tienen una constitución gruesa, lo cual dificulta el proceso de aclimatación.

Por otra parte, nuestros resultados son similares a Kaity *et al.*, 2009, quienes obtuvieron 100% de enraizamiento en brotes de papaya, utilizando AIB a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y como sustratos fitagel y vermiculita, con lo cual reportan que los brotes indujeron raíces pilosas de buena calidad y estructura, lo que facilita la aclimatación de las plántulas de *C. papaya* (Cuadro 2).

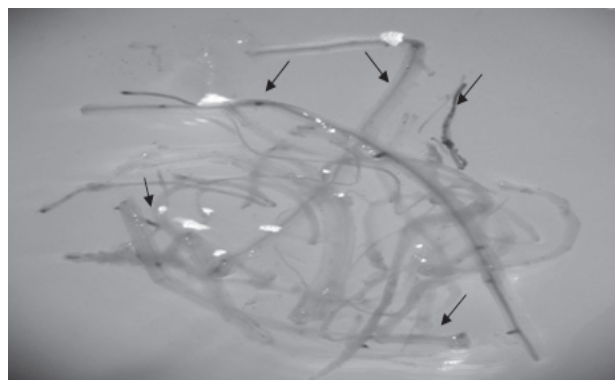
**Cuadro 2. Efecto de las concentraciones de AIB sobre el porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíces en brotes de *C. papaya* var. Maradol.**

**Table 2. Effect of IBA concentrations on rooting percentage, number and length of roots in shoots of *C. papaya* var. Maradol.**

[AIB] $\mu\text{M}$	Porcentaje de enraizamiento	Número de raíces primarias	Número de raíces laterales	Longitud de raíces primarias [mm]
0	0.0 c	0.0 b	0.0 a	0.0 b
1	0.0 c	0.0 b	0.0 a	0.0 b
2	40 bc	2.7 ab	1.0 a	3.9 ab
3	100 a	7.5 a	2.0 a	4.9 a
4	60 ab	1.6 ab	2.0 a	5.2 ab
5	20 bc	1.0 ab	0.0 a	9.0 ab

Los valores seguidos por letras diferentes dentro de las columnas muestran diferencias significativas a una  $p \leq 0.05$ .

confirmed through this test the efficiency of strain A4 from *A. rhizogenes* to infect and produce hairy roots (Figure 4).



**Figura 4. Raíces de segmentos de zanahoria transformadas por *A. rhizogenes*.** Las flechas indican las raíces de color azul características de la expresión del gen *gus* (20%).

**Figure 4. Carrot root segments transformed by *A. rhizogenes*.** Arrows indicate the blue roots distinctive from the *gus* gene expression (20%).

**Shoot rooting of *C. papaya* using IBA.** The best treatment was 3  $\mu\text{M}$  of IBA, which obtained 100% rooting, a root length of 4.9 mm and 7.5 primary roots per explant, but there were no statistical differences with other treatments, while the greater length of roots (9 mm) was obtained with 5  $\mu\text{M}$  of IBA ( $p=0.05$ ). In relation to the number of lateral roots, treatment with 3 and 4  $\mu\text{M}$  of IBA produced the highest value (2).

All roots showed gross anatomy and 3 to 4 green leaves well developed. Similarly Yu *et al.*, 2000, used 2.5  $\mu\text{M}$  of IBA, and reported rooting percentages of 90 and 94.5% in shoots of *C. papaya* grown in vermiculite as substrate with and without aeration, respectively; but the roots formed have a gross constitution, which difficult the process of acclimatization.

## Conclusiones

La formación del sistema radicular *in vitro* en brotes de *C. papaya* var. Maradol fue más eficiente mediante el tratamiento con AIB a una concentración de 3  $\mu\text{M}$  en comparación con la inoculación de *A. rhizogenes* cepa A4 a concentraciones de  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Ninguna parte de tallo y hojas de brotes generados *in vitro* de *C. papaya* mostró susceptibilidad a la infección con la cepa A4 de *A. rhizogenes*.

## Agradecimientos

El presente trabajo de investigación es producto de una tesis de licenciatura con la cual el primer autor obtuvo el grado de Licenciado en Biología. Un amplio agradecimiento a la Universidad de Colima y al Dr. Salvador Guzmán González, Director del Laboratorio de Biotecnología, por la prestación de la infraestructura necesaria y al Ing. Pedro Valadez Ramírez por el apoyo técnico.

## Literatura citada

- Ascencio-Cabral, A.; Gutiérrez-Pulido, H.; Rodríguez-Garay, B. and Gutiérrez-Mora, A. 2008. Plant regeneration of *Carica Papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Sci. Hortic.* 118:155-160.
- Becard, G. and Fortin, J. A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108:211-218.
- Blanco, M.; Valverde, R. y Gómez, L. 2003. Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agron. Costarricense* 27:19-28.
- Cabrera-Ponce, J. L.; Vegas-García, A. and Herrera-Estrella, L. 1996. Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *In vitro Cell Develop. Biol. Plant.* 32:86-90.
- Cai, W.; Gonsalves, C.; Tennant, P.; Fermin, G.; Souza, M.; Sarindu, N.; Jan, F. J.; Zhu, H. Y. and Gonsalves, D. 1999. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In vitro Cell Develop. Biol. Plant.* 35:61-69.
- Caro, L.; Marinangeli, P.; Curvetto, N. R. and Hernández, L. 2000. *Agrobacterium rhizogenes* vs inducción auxínica para la rizogénesis *in vitro* de *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz. *Multequina* 9:47-53.
- Chávez-Camacho, M.; Valadez-Moctezuma, E.; Carrillo-Castañeda, G. y Lozoya-Gloria, E. 2002. Expresión transitoria del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa y efecto del bombardeo en tejido de crisantemo (*Dendrathera grandiflorum*). *Rev. Chapingo Serie Horticultura.* 8:107-121.

Moreover, our results are similar to Kaity *et al.*, 2009, who obtained 100% rooting in shootings of papaya, using IBA at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  and phytigel and vermiculite as substrates, which reported inducing hairy roots of good quality and structure, facilitating the acclimation *C. papaya* seedlings (Table 2).

## Conclusions

Root system formation *in vitro* in shoots of *C. papaya* var. Maradol was more efficient through the treatment with IBA at a concentration of 3  $\mu\text{M}$  compared to inoculation of *A. rhizogenes* strain A4 at concentrations of  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^9$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . No part of stem and leaves from shoots of *C. papaya* generated *in vitro* showed susceptibility to infection with strain A4 from *A. rhizogenes*.

*End of the English version*



- Consejo Estatal de Productores de Papaya de Colima, A. C. (COEPAPAYA). 2008. <http://www.campocolima.gob.mx/sitioSPRODUCTO/COEPAPAYA/index.php> (consulta diciembre, 2010).
- Damiano, C.; Archilietti, T.; Caboni, E.; Lauri, P.; Falasca, G.; Mariotti, D. and Ferraiolo, G. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of almond: *in vitro* rooting through localised infection of *A. rhizogenes* w.t. *Acta Horticulturae* 392:161-169.
- Damiano, C.; Chiariotti, A.; Cabori, E.; Quarta, R. and Boumis, G. 1991. Some factors affecting the induction and the expression of rooting in different fruit species *in vitro*. *Acta Hort.* 300:211-224.
- Ercan, A. G.; Taşkin, K. M.; Turgut, K. and Yuce, S. 1999. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. populations grown in Turkey. *Turkish J. Bot.* 23:373-377.
- Food and Agriculture Organization Statistics (FAOSTAT). 2010. <http://faostat.fao.org/default.aspx> (consulta diciembre, 2011).
- Guzmán-González, S.; Jiménez, J.; Robles, M.; Hernández, M. y Salazar, C. 2005. Propagación clonal de papaya *in vitro* a partir de plantas maduras. VIII Congreso de Horticultura. Manzanillo, Colima, México 5 p.
- Kaity, A.; Parisi, A. M.; Ashmore, S. A. and Drew, R. A. 2009. Root initiation and acclimatization of papaya plants. *Acta Hort.* 812: 387-394.
- MacRae, S. and Van Staden, J. 1993. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation to improve rooting ability of eucalypts. *Tree Physiology* 12:411-418.
- Martins, T. M.; Domingos, A.; Novo, C. and Lourenco, P. M. L. 2003. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* infection on *in vitro* rooting of *Vitis vinifera*. *J. Grapevine Res.* 3:159-161.
- Montgomery, D. C. 2004. Diseño y análisis de experimentos. (Ed.). Limusa Wiley, segunda edición, México, D. F., 686 pp.
- Rodríguez-Hernández, G.; Morales-Domínguez, F.; Gutiérrez-Campos, R.; Aguilar-Espinosa, S. y Pérez Molphe-Balch, E. 2007. Generación de raíces transformadas de *Agave salmiana* Otto y su colonización por *Glomus intraradices*. *Rev. Fitotec. Mex.* 30:215-222.

- Rugini, E.; Pellegrinechi, A.; Mencuccini, M. and Mariotti, D. 1993. Increase of rooting ability in the woody species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) by transformation with *Agrobacterium rhizogenes* rol genes. *Plant Cell Rep.* 10: 291-295.
- Serna-Pérez, A. y Pérez-Molphe, E. 2002. Generación de raíces y plántulas transgénicas de toronja y lima dulce mediante el uso de *Agrobacterium rhizogenes*. *Rev. Fitotec. Mex.* 27:251-259.
- Valderrama-Fonseca, A. M.; Arango-Isaza R. y Afanador-Kafuri, L. 2005. Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "ingeniería genética natural aplicada". *Rev. Facultad Nacional de Agronomía, Medellín.* 58:2569-2585.
- Vitha, S.; Beneš, K.; Michalová, M. and Ondrej, M. 1993. Quantitative  $\beta$ -glucuronidase assay in transgenic plants. *Plant Biol.* 35:151-155.
- Yu, T. A.; Yeh, S. D.; Cheng, Y. and Yang, J. S. 2000. Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 61:29-35.