

Variabilidad genética del germoplasma de algunas especies de los géneros *Carica* y *Vasconcellea* (*Caricaceae*) con el uso de marcadores RAPD

Ada Medina^{1*}, Catalina Ramis¹, Dilia Rodríguez² y Ariadne Vegas³

¹Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579. Maracay 2101, Venezuela

²Centro Nacional de Conservación de Recursos Genéticos, Ministerio del Poder Popular para el Ambiente. Apdo. 4661. Maracay, Venezuela

³Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP). Apdo 4653. Maracay 2101, Venezuela.

RESUMEN

La lechosa constituye un cultivo de importancia económica en Venezuela. La conservación de genotipos en colecciones de germoplasma requiere un buen manejo de la diversidad genética, aspecto que puede lograrse eficientemente con técnicas moleculares. En el presente trabajo se realizó la caracterización molecular de 73 accesiones de dos géneros de *Caricaceae* (*Carica* y *Vasconcellea*) conservadas en campo y colectadas de las zonas centro occidental y oriental del país, empleando la técnica RAPD. La evaluación molecular se realizó usando un análisis de conglomerados (Ward) basado en la distancia de disimilitud de Jaccard y un análisis de coordenadas principales (ACP). Se evaluaron seis combinaciones de iniciadores para la amplificación selectiva, las cuales amplificaron un total de 90 bandas con 100% de polimorfismo. Los cebadores OPC 2, OPC 5 y OPA 9 lograron establecer altos niveles de variabilidad entre los dos géneros, evidenciándose la conformación de grupos claramente separados. El ACP apoya los resultados obtenidos por el análisis de conglomerados y ayudó a diferenciar claramente a *Carica* de *Vasconcellea*. También se encontraron patrones de bandas únicas, que permitieron diferenciar los dos géneros. Los resultados indican la existencia de una alta diversidad genética entre las accesiones de *Caricaceae* estudiadas.

Palabras clave: Banco de germoplasma, diversidad genética, marcador molecular.

Genetic Variability of some species of genus *Carica* and *Vasconcellea* (*Caricaceae*) using RAPD markers

ABSTRACT

The papaya is an important crop in Venezuela. The conservation of genotypes in germplasm collections requires good management of genetic diversity. This aspect that can be achieved efficiently with molecular techniques. In this paper, molecular characterization of 73 accessions of *Caricaceae* preserved in the field and collected from the western and eastern central areas of the country was carried out through RAPD technique. The assessment was studied using molecular cluster analysis (Ward) based on the Jaccard dissimilarity distance and principal coordinate analysis. Using six primers combinations, 90 bands with a 100% of polymorphism were obtained. The primers OPC2, OPC5, and OPA9 managed to establish high levels of variability between the two genera, showing the formation of clearly separated groups. The principal coordinate analysis supports the results obtained from cluster analysis and clearly discriminate *Carica* and *Vasconcellea*. We also found unique banding patterns, which allow to differentiate the two genera studied. The results showed the existence of high genetic diversity among *Caricaceae* accessions.

Key words: Germplasm collection, genetic diversity, molecular marker.

*Autor de correspondencia: Ada Medina

E-mail: medinaa@agr.ucv.ve

INTRODUCCIÓN

La lechosa (*Carica papaya* L.), junto con sus parientes silvestres, pertenece a la familia *Caricaceae*, la cual de acuerdo con Badillo (1967, 1971, 1993, 2000, 2001), es una familia compuesta por seis géneros (*Cylicomorpha*, *Jacaratia*, *Jarilla*, *Horovitzia*, *Carica* y *Vasconcellea*). Es una de las frutas tropicales más importantes por su valor nutritivo y por considerarse como un mejorador de la digestión, así como también por el empleo de la papainasa en la industria farmacéutica (Alonso *et al.*, 2006).

En Venezuela, su productividad se encuentra limitada por enfermedades como la mancha anillada del fruto (Trujillo y Vegas, 1999; Vegas *et al.*, 2004), la cual puede ser enfrentada desarrollando cultivares mejorados resistentes, requiriéndose para ello la formación de poblaciones básicas donde se encuentren los genes que se deseen introducir. De allí, la importancia de mantener bancos de germoplasma de este cultivo. Entre 1969 – 1972 se estableció en la Estación Experimental Bajo Seco de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, una de las más grandes colecciones de *Caricaceae*. Para el año 2002, el Centro Nacional de Conservación de los Recursos Fitogenéticos (CNCRF) incorporó especies silvestres provenientes de colectas en distintas zonas del país, con una réplica de seguridad en la Finca Mis Oscars localizada en la región de Tasajera, estado Aragua (CNCRF, 2003).

Las técnicas moleculares permiten una caracterización rigurosa y precisa de los niveles de divergencia genética en un banco de germoplasma (Fernández, 2004). Diversos marcadores han sido utilizados para estudiar la diversidad genética de *Caricaceae* como los microsatélites, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), permitiendo diferenciar claramente *Carica* de *Vasconcellea* y confirmando la reciente reclasificación taxonómica (Kim *et al.*, 2002; Van Droogenbroeck *et al.*, 2002; Coppens, 2003; OECD, 2005; Vegas *et al.*, 2006). Mediante el uso de marcadores moleculares se ha proporcionado información sobre la diversidad genética y la evolución de *Vasconcellea* en comparación con *Carica papaya* y otros géneros relacionados (Kyndt y Gheysen, 2007).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la diversidad genética presente en colecciones de germoplasma de *Caricaceae* de los géneros *Carica* y *Vasconcellea*, colectadas de distintas zonas del país y conservadas en campo, empleando la técnica RAPD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron 73 accesiones de Caricáceas colectadas en las zonas centro occidental y oriental de Venezuela, conservadas en campo en la Finca Mis Oscars (10°10'N 67°11'W), así como la Estación Experimental Bajo Seco (10°27'N 67°11'W) y el Instituto de Genética (IGen) de la Facultad de Agronomía, UCV (10°16'N 67°36'W), todos situados en el estado Aragua (Cuadro 1). La identificación taxonómica de los individuos se basó en la clave desarrollada por Badillo (1971, 1993), según información suministrada por los curadores de las respectivas colecciones.

Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído a partir de hojas jóvenes, de acuerdo al protocolo descrito por Jiménez (2006). Para ello, se pulverizaron 0,5 g de tejido foliar con nitrógeno líquido, los cuales fueron vertidos en tubos con 5 mL de tampón de extracción (100 mM de Tris HCl pH 8, 20 mM de EDTA, 1,4 M NaCl, 2% de CTAB, 1% polietilenglicol y 0,5% sulfito de sodio), previamente incubado en baño de María a 74°C. La mezcla se agitó brevemente e incubó nuevamente a la misma temperatura durante 20 min, para luego ser agitada vigorosamente hasta homogeneizar la suspensión, dejando enfriar a temperatura ambiente. Se le añadieron 5 mL de cloroformo:isoamil en proporción 24:1 y se mezcló suavemente por inversión del tubo. Seguidamente, los tubos fueron centrifugados a 9 000 rpm y 16°C durante 18 min, transfiriendo el sobrenadante a un tubo donde se le agregaron 5 mL de isopropanol, agitando suavemente hasta observar la formación inicial del pellet de ADN, dejándolo

Cuadro 1. Identificación numérica y lugar de colecta de las 73 entradas de *Caricaceae* evaluadas con RAPD.

Especie	Entrada (N°)	Colección ¹
<i>C. papaya</i>	18 a 23	MO
	66 a 68, 72, 73	IGen
<i>V. cundinamarcensis</i>	3 a 8	MO
	24 a 28, 30 a 33	MO
	43 a 47, 50 a 56(2)	MO
	69 a 71	IGen
<i>V. cauliflora</i>	34 a 37, 48, 49	MO
<i>V. monoica</i>	63, 64	MO
<i>V. goudotiana</i>	1	BSco
<i>V. cundinamarcensis</i> x <i>V. goudotiana</i>	65	MO
	57 a 62	MO
<i>V. goudotiana</i>	2	BSco

¹ Finca Mis Oscars (MO), Estación Experimental Bajo Seco (BSco) e Instituto de Genética (IGen) de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.

almacenado a -20°C durante toda la noche para permitir la precipitación del ADN. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados nuevamente bajo las mismas condiciones mencionadas descartando el sobrenadante y, con la ayuda de una pipeta Pasteur moldeada, se colectó el pellet de ADN para ser transferido a un microtubo, al cual se le añadieron 500 mL de etanol 70%. El producto se centrifugó durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se permitió secar a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 500 mL de tampón de resuspensión TE (10mM de Tris-HCl a pH 8,0 y 1mM de EDTA), agitando suavemente hasta alcanzar la resuspensión total del ADN. La concentración de ADN se evaluó en geles de agarosa al 1% por comparación con marcadores estándar de ADN fago λ (sin digerir), visualizado con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) bajo luz UV. Se realizaron diluciones hasta alcanzar la concentración de 20 ng/ μL , utilizada para los RAPD.

Iniciadores utilizados (cebadores)

Para seleccionar el cebador más apropiado, se probaron 17 cebadores de la serie OPERON preparados a una concentración de 10 mM (Cuadro 2).

Condiciones y ciclos de la reacción

La reacción de amplificación de RAPD fue realizada en un volumen final de 20 μL compuesta por Tampón 1X; 2,5 mM MgCl_2 ; 0,17 mM de cada uno de los dNTP's; 0,67 mg/mL BSA; 1,33 μM del cebador Operón; 0,16 U/ μL Taq y 20 ng/ μL de ADN. La amplificación fue realizada en un termociclador DTC 200 BIORAD, empleando un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 45 ciclos de amplificación a 94°C por 1 min, 36°C por 30 seg y 72°C por 2 min y un ciclo final de extensión a 72°C por 7 min (Waugh, 1997).

Electroforesis de los productos de amplificación

La separación de los productos de reacción en cadena

de la polimerasa (PCR) se realizó en geles de agarosa LOW EEO al 2,5%, corridos por dos horas a 100 V y 5 mA en buffer TBE 0,5 X, pH 8,3 y visualizados con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bajo luz UV.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de conglomerados (Ward) basado en el coeficiente de similaridad de Jaccard (d) para RAPD con los cebadores OPC 2, OPC 5 y OPA 9 a partir de una matriz binaria de presencia y ausencia de bandas, utilizando el programa estadístico InfoStat (InfoStat, 2004). También se efectuó un análisis de coordenadas principales (ACP) con base en el coeficiente de Dice para dichos cebadores, empleando el software Palaeontological Statistics (Hammer *et al.*, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 17 secuencias de iniciadores, sólo seis permitieron obtener productos de amplificación con buena resolución, de los cuales cinco son de la serie OPC (OPC 2, OPC 5, OPC 7, OPC 9 y OPC 10) y uno de la serie OPA (OPA 9). La Figura 1 muestra algunos de los patrones de RAPD obtenidos en geles de agarosa para los cebadores seleccionados.

El número de fragmentos de amplificación por cebador osciló entre 9 y 22, para un total de 90 bandas, todas las cuales presentaron patrones de bandas polimórficos. La amplificación de los cebadores con mayor polimorfismo fueron OPC 10 y OPC 7 con 20 bandas cada uno, seguidos de OPC 5 y OPA 9 con 17 y 12 bandas, respectivamente. Los cebadores OPC 9 y OPC 2 presentaron polimorfismo con 10 y 9 bandas, respectivamente; sin embargo, todos alcanzaron 100% en el rendimiento para la determinación de polimorfismo.

El número de pares de bases de los fragmentos oscilaron entre 4147 y 59 pares (Cuadro 3). Vegas *et al.*

Cuadro 2. Cebadores usados para identificar los marcadores RAPD en 73 accesiones de germoplasma de *Caricacaea* (géneros *Carica* y *Vasconcellea*).

Cebador ¹	Secuencia	Cebador ¹	Secuencia
OPC 01	5'-TTCGAGCCAG-3'	OPC 14	5'-TGCGTGCTTG-3'
OPC 02	5'-GTGAGGCGTC-3'	OPC 17	5'-TTCCCCCAG-3'
OPC 05	5'-GATGACCGCC-3'	OPC 19	5'-GTTGCCAGCC-3'
OPC 07	5'-GTCCCGACGA-3'	OPC 20	5'-ACTTCGCCAC-3'
OPC 09	5'-CTCACCGTCC-3'	OPA 02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPC 10	5'-TGTCTGGGTG-3'	OPA 07	5'-GAAACGGGTG-3'
OPC 11	5'-AAAGCTGCCG-3'	OPA 09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPC 12	5'-TGTCATCCCC-3'	OPA 13	5'-CAGCACCCAC-3'
OPC 13	5'-AAGCCTCGTC-3'		

¹ Fuente : Operon Technologies Inc., EUA.

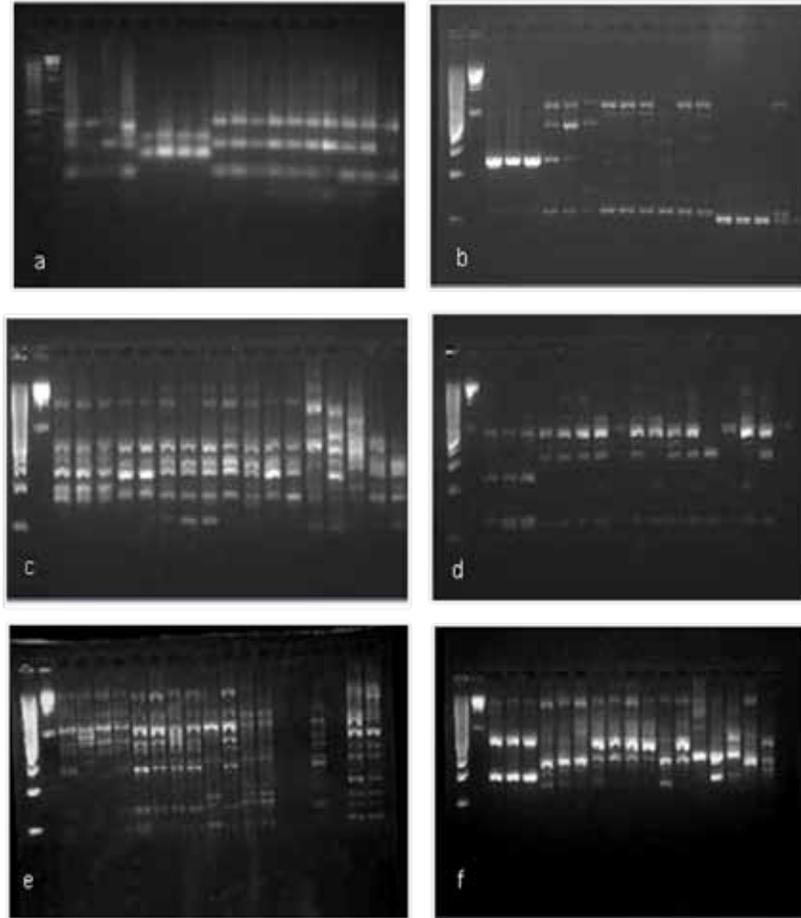


Figura 1. Patrones de RAPD obtenidos en geles de agarosa a partir de muestras foliares de *Caricaceae* generadas por los primers a) OPC 2; b) OPC 5; c) OPC 7; d) OPC 9; e) OPC 10 y f) OPA 9. En todos los casos los dos primeros carriles corresponden con los marcadores moleculares de 200 pb y 1Kb, respectivamente.

(2006) al evaluar poblaciones de la familia *Caricaceae* en Venezuela en un análisis ordinal y empleando 15 cebadores de RAPD, señalan de igual modo un alto contenido de información polimórfica, observando la mayor capacidad discriminatoria con el uso de los cebadores A02, A07 y W06. Por otra parte, de la amplificación de 21 cebadores de 29 materiales de *Caricaceae* colectados en el sur de Ecuador, Morales *et al.* (2004) registraron 205 patrones de bandas polimórficas, los cuales representaron 70,4% del total de bandas obtenidas. El rango de los tamaños de amplificación por cebador varió de 259 a 2455 pares de bases (pb), de un total de 12 a 18 fragmentos amplificados/primer.

De los cebadores evaluados, sólo OPC 2, OPC 5 y OPA 9 lograron presentar cierta asociación entre los grupos formados y los géneros de *Caricaceae*, obteniéndose la formación de tres grupos a partir del análisis de conglomerados (Figura 2). Los grupos I y II se separaron a una distancia de 0,68 y ambos separados del grupo III con un valor de disimilitud de 0,96.

El grupo I se subdividió en tres subgrupos, dos de los cuales estuvieron conformados por las entradas de la especie *Carica papaya*. El subgrupo 1 con entradas de especies comerciales conservadas en el campo IGen (zona baja) y el subgrupo 3 por entradas de la misma especie, pero conservadas en la finca Mis Oscars (zona alta). Ambos subgrupos presentaron un valor de disimilitud cercano a cero (0,15 y 0,1, respectivamente), con una distancia de 0,38 entre ellos. Por otra parte, el subgrupo 2 ($d=0,16$) estuvo conformado principalmente con entradas de *V. cundinamarcensis*. Los valores de distancia alcanzados por las entradas de la especie *Carica papaya*, denotan altos niveles de similitud dentro del género; sin embargo, la poca cantidad de accesiones estudiadas pudiera ser una limitante del estudio sobre la variación intraespecífica, aunque los valores obtenidos coinciden con los de Van Droogenbroeck *et al.* (2002), quienes basados en un análisis de AFLP también encontraron poca variación dentro de las accesiones de esta misma especie.

Cuadro 3. Número de pares de bases de los fragmentos de amplificación (pb) obtenidos para seis cebadores en *Caricaceae*.

Banda	Pares de Bases					
	OPC7	OPC5	OPC10	OPC2	OPA9	OPC9
1	4147	1743	3990	670	3261	2124
2	3278	1482	3654	514	2397	1749
3	2243	1366	3345	395	2350	1441
4	2049	1259	3301	346	1762	1333
5	2027	1147	2805	265	1435	1234
6	1496	987	2351	204	1169	977
7	1351	713	2153	137	1055	837
8	1280	606	1805	105	859	568
9	1012	558	1653	71	700	450
10	900	556	1386	-	514	242
11	632	515	1269	-	378	-
12	562	437	1064	-	136	-
13	445	403	974	-	68	-
14	351	316	817	-	-	-
15	312	291	748	-	-	-
16	278	228	574	-	-	-
17	220	59	526	-	-	-
18	195	-	441	-	-	-
19	154	-	369	-	-	-
20	-	-	310	-	-	-
21	-	-	260	-	-	-
22	-	-	218	-	-	-

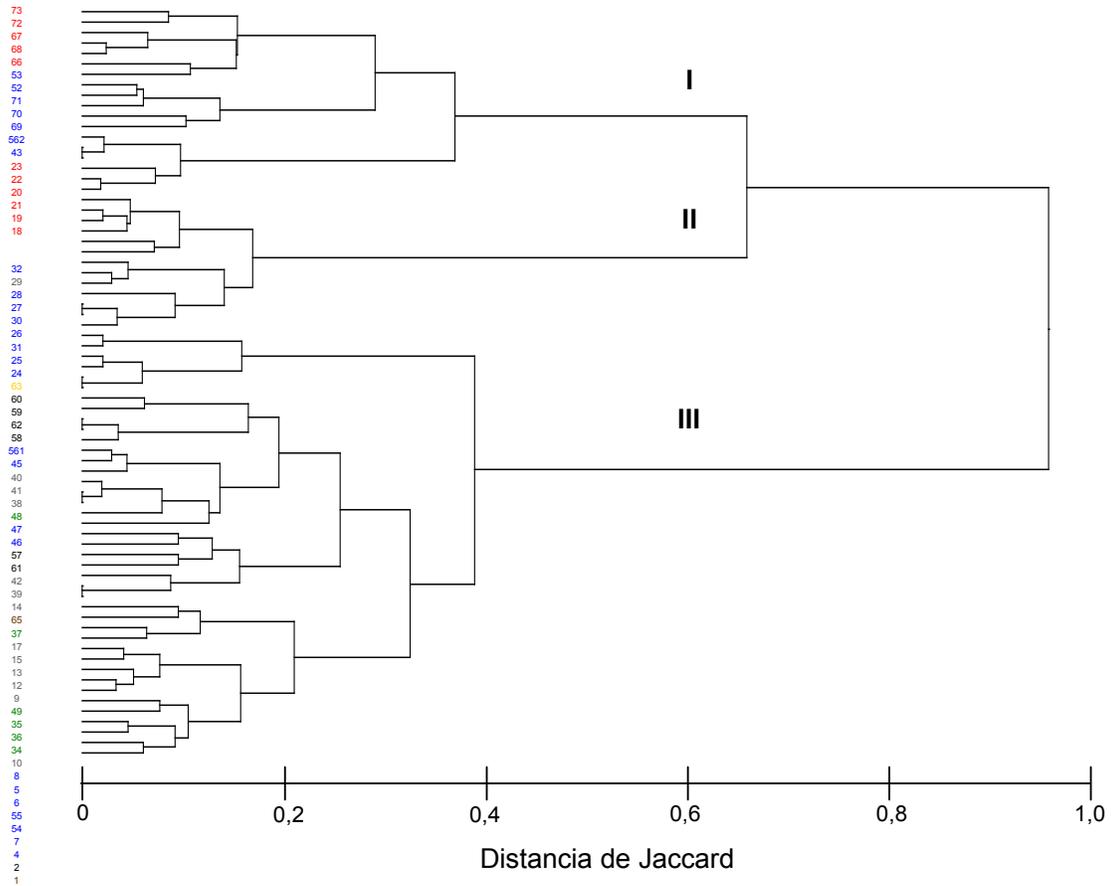
El grupo II ($d=0,18$), que incluyó accesiones de la especie *V. cundinamarcensis*, está separado del grupo I a una distancia de 0,66 y éstos a su vez del grupo III a una distancia de 0,95. El grupo III por su parte, aunque presentó una distancia de disimilitud máxima de 0,39 estuvo conformado por varios subgrupos con valores de disimilitud cercanos a 0,2 e incluyó diferentes especies del género *Vasconcellea*, así como híbridos entre especies del mismo género, lo que denota similitud genética entre todas las especies de *Vasconcellea* consideradas. Van Droogenbroeck *et al.* (2002) obtuvieron resultados similares para todas las especies de este género, excepto para el grupo de cultivares de *Vasconcellea x heilbornii*.

En otros estudios sobre diversidad genética, la técnica de RAPD también logró estimar la relación de algunas especies de *Caricaceae*, encontrándose un valor de disimilitud del 0,69 entre *C. papaya* y seis especies del género *Vasconcellea* (OECD, 2005). Por otra parte, los dendrogramas resultantes de un análisis de agrupamiento molecular realizados por Morales *et al.* (2004) con materiales colectados al sur de Ecuador mostraron tres ramas principales que agruparon las especies de acuerdo a su clasificación taxonómica, con *C. papaya* como la especie más distante del conjunto. Asimismo, Vegas *et al.* (2006) evidenciaron la formación de tres grupos: un primer grupo

conformado por las accesiones de *C. papaya*, el segundo con *V. cundinamarcensis* y el tercero con accesiones de *V. cauliflora* y *V. microcarpa* (subespecies *microcarpa* y *pilifera*).

En el presente estudio, el análisis de conglomerados arrojó altos niveles de variabilidad entre *Carica* y *Vasconcellea*, lo que evidencia claras diferencias entre los dos géneros y confirma la reclasificación taxonómica realizada por Badillo (2000). Estos resultados coinciden con trabajos de diversidad genética con microsatélites realizados por Coppens (2003) con tres genotipos de *C. papaya* y ocho especies del género *Vasconcellea*. Asimismo, Kim *et al.* (2002) con el uso de AFLP señalan un valor de disimilitud (según coeficiente de apareamiento simple) de 0,12 dentro de 63 accesiones de *Carica*, y de 0,26 dentro de seis accesiones de *Vasconcellea*, con un valor de 0,57 entre los dos géneros. Incluso, pruebas filogenéticas con ADN cloroplástico realizados con el marcador RFLP sugieren poca afinidad entre *C. papaya* y 12 especies de *Vasconcelleas* estudiadas y una estrecha relación entre las *Vasconcellea* (Aradhya *et al.*, 1999). También con isoenzimas, se alcanzó un alto valor de disimilitud entre los dos géneros (Jobin-Decor *et al.*, 1997).

Por otra parte, al observar los patrones de RAPD



Especie botánica de cada entrada incluida en el análisis de agrupamiento

Especie	Entrada n°	Especie	Entrada n°
<i>Carica papaya</i>	18-23, 66 67, 72, 73	<i>Vasconcellea monoica</i>	63, 64
<i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	3-8, 24-28 30-33, 43-47 50-56(2), 69, 71	<i>V. cundinamarcensis</i> x <i>V. goudotiana</i>	2, 57-62
<i>Vasconcellea cauliflora</i>	34 - 37, 48, 49	<i>Vasconcellea sp.</i>	9-17 29, 38-42

Figura 2. Dendrograma producido por análisis de conglomerados (Ward) basado en el coeficiente de similaridad de Jaccard para RAPD con los cebadores OPC 2, OPC 5 y OPA 9.

obtenidos con los cebadores OPC 2, OPC 5 y OPA 9 se evidenció la presencia de patrones de bandas únicas entre los dos géneros de *Caricaceae* estudiados. Para el cebador OPC 2 se observó que las bandas 3 y 6, de 395 y 204 pb, respectivamente, se presentaron en todas las entradas de *C. papaya* y estuvieron ausentes en *Vasconcellea*. Igualmente, las accesiones de *Carica* presentaron las bandas 8 (606 pb) y/o 9 (558 pb), con mayor intensidad de tinción, en el cebador OPC 5. En el cebador OPA 9 se observó la presencia de las bandas 1, 5 y 10 (3261, 1435 y 514 pb, respectivamente), destacándose las dos últimas por su mayor intensidad de tinción, únicas para *Carica*. Sin embargo, en dos casos (cebadores OPC 2 y OPC 5) también aparecía con el mismo patrón de bandas la entrada 53, identificada como

Vasconcellea cundinamarcensis procedente de la Finca Mis Oscars. Es posible que debido a la pérdida de identificación de algunos materiales durante su traslado desde el CNCRF, esta entrada esté mal identificada; en vista de que para el cebador OPA 9, esta entrada quedó en un grupo distinto. La Figura 3 destaca las bandas señaladas para la especie *C. papaya* en los tres cebadores seleccionados.

De acuerdo a la representación bidimensional generada por el ACP (Figura 4), las dos primeras dimensiones explican el 17,54% de la variabilidad total, y permiten la formación de dos grupos utilizando tres cebadores RAPD (OPC 2, OPC 5 y OPA 9). El primer grupo quedó conformado principalmente por la especie

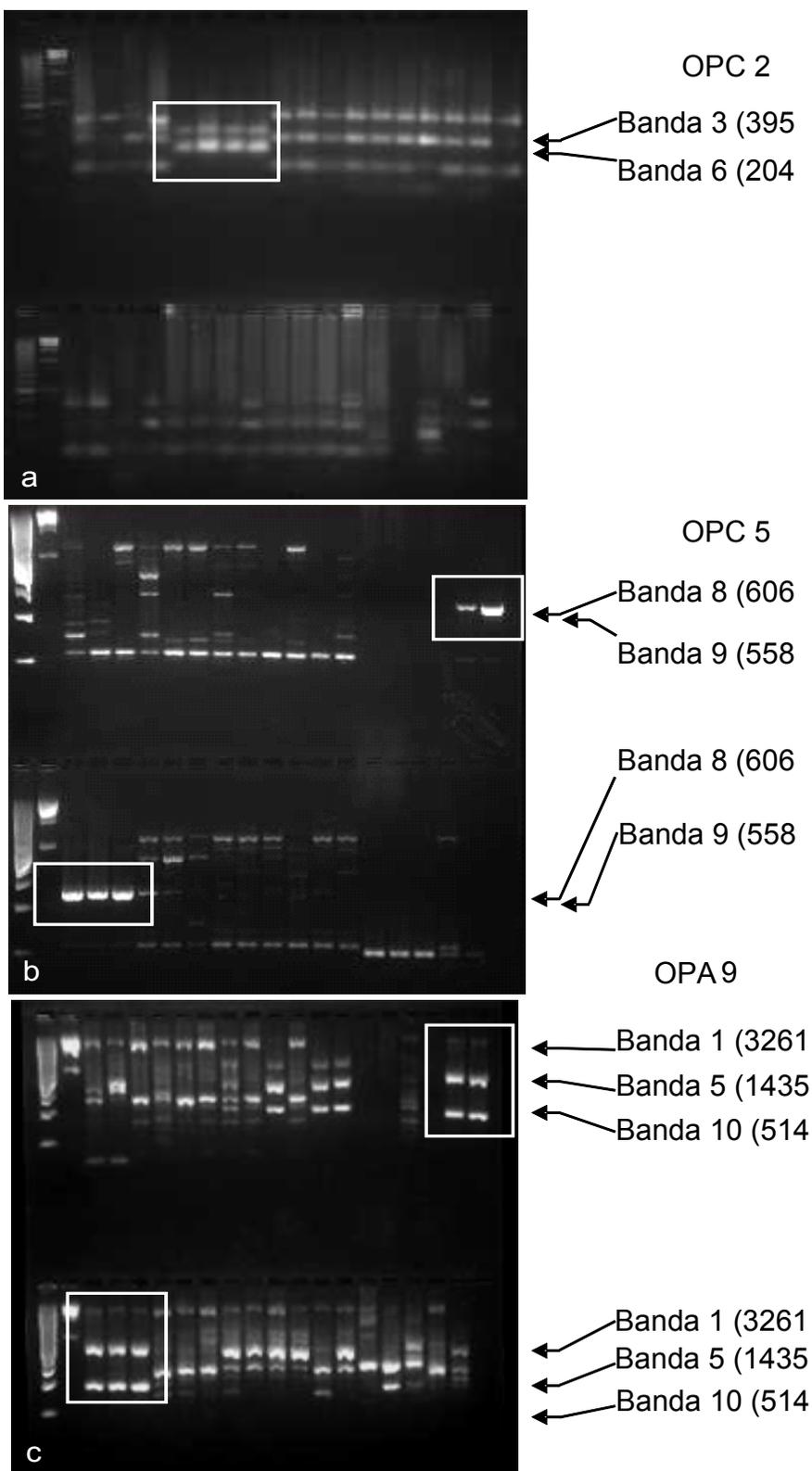


Figura 3. Patrones de RAPD obtenidos en geles de agarosa a partir de muestras foliares de *Caricaceae* generadas por los cebadores a) OPC 2; b) OPC 5 y c) OPA 9, destacando en recuadro los patrones de ADN observados en entradas de la especie *Carica papaya*.

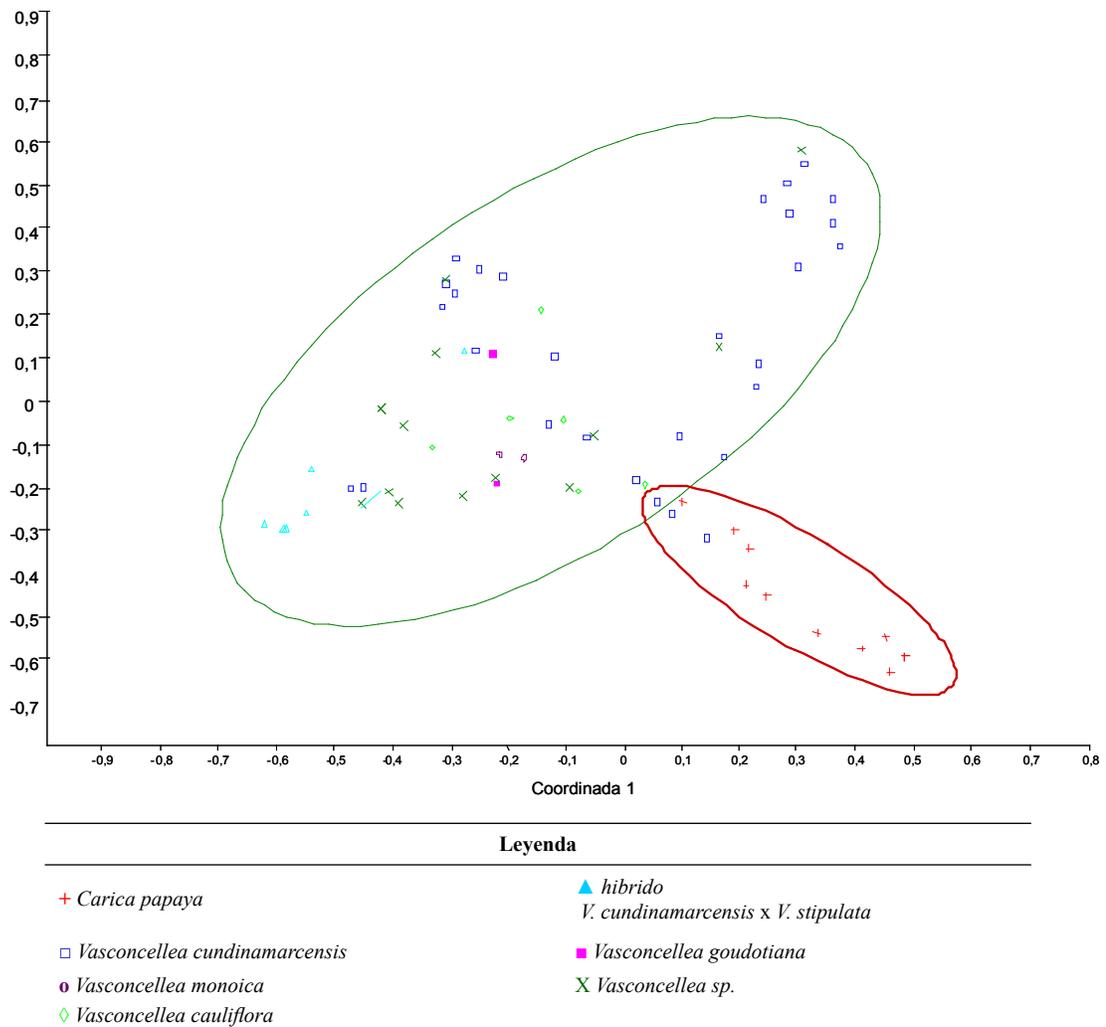


Figura 4. Representación bidimensional generada por los dos primeros vectores "eigen" obtenidos del análisis de coordenadas principales basado en el coeficiente de Dice.

Carica papaya y el segundo por accesiones del género *Vasconcellea*. Esto coincide con los resultados obtenidos por el análisis de conglomerados y ayuda a diferenciar claramente los géneros *Carica* y *Vasconcellea*.

CONCLUSIONES

El uso del marcador molecular RAPD es una herramienta válida para realizar estudios de variabilidad genética en germoplasma en *Caricaceae*, lográndose establecer claras diferencias entre *Carica* y *Vasconcellea*, no solo por la alta variabilidad encontrada entre los géneros, sino también por los patrones de bandas únicas observadas. Los resultados indican la existencia de una alta diversidad genética entre las accesiones de *Caricaceae* estudiadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, M; R. Ramos; Y. Tornet. 2006. Caracterización y evaluación de los recursos genéticos de papaya (*Carica papaya* L). *CitriFruit* 24: 38-42.
- Aradhya, M; R. Manshardt; F. Zee; C. Morden. 1999. A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L (*Caricaceae*) based on restriction fragment length variation in a cp DNA intergenic spacer region. *Genetic Res. Crop Evol.* 46: 579-586.
- Badillo, V.M. 1967. Esquema de las *Caricaceae*. *Agronomía Trop.* 17: 247-272.
- Badillo, V.M. 1971. Monografía de la Familia *Caricaceae*. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela, 221 p. (Mimeografiado).

- Badillo, V.M. 1993. *Caricaceae*. Segundo esquema. Revista Alcance 43: 1-111
- Badillo, V.M. 2000. *Carica* L. vs. *Vasconcellea* St.-Hil. (*Caricaceae*) con la rehabilitación de este último. *Ernstia* 10: 74-79.
- Badillo, V.M. 2001. Nota correctiva *Vasconcellea* St. Hill. y no *Vasconcella* (*Caricaceae*). *Ernstia* 11: 75-76.
- CNCRF, 2003. Colecta, establecimiento y caracterización de las especies de papayas en Venezuela. In: Coppens, G. (ed). Aprovechamiento de los Recursos Genéticos de las Papayas para su Mejoramiento y Promoción. Centro Nacional de Conservación de los Recursos Fitogenéticos. Instituto Interamericano para la Agricultura. Centro Regional Andino. Caracas, Venezuela. Informe Final. 65 p. Disponible en: www.infoagro.net/shared/docs/a5/Informe_Anuar_2000.doc. (Consulta: Febrero 15, 2008).
- Coppens, G. 2003. Aprovechamiento de los recursos genéticos de las papayas para su mejoramiento y promoción. Informe de progreso a mayo 2002. BID/IICA 17p.
- Fernández, H. 2004. Uso de Marcadores Moleculares RAPD en la Caracterización de Bancos de Germoplasma en Venezuela. Revista Digital CENIAP No. 5.
- Hammer, O.; D. Harper; P. Ryan. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9. Disponible en: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm. (Consultado: 13 enero 2010).
- InfoStat. 2004. InfoStat versión 2004. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Jiménez, J. 2006. Caracterización morfológica y molecular del Jardín Clonal de cacao (*Theobroma cacao* L.) ubicado en la Estación INIA-Miranda. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 142 p.
- Jobin-Decor, M.; G. Graham; R. Henry; R. Drew. 1997. RAPD and isozyme analysis of genetic relationships between *Carica papaya* and wild relatives. *Genetic Res. Crop Evol.* Vol. 44 (5): 471 – 477.
- Kim, M.; P. Moore; F. Zee; M. Fitch; D. Steiger; R. Manshardt; R. Paull; R. Drew; T. Sekioka; R. Ming. 2002. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome* 45: 503-512.
- Kyndt, T.; G. Gheysen. 2007. Evolutionary relationships between and within the highland papayas (genus *Vasconcellea*) and the common papaya (*Carica papaya*). *Acta Hort.* 740: 61-73.
- Morales, A.; D. Medina; B. Yaguache. 2004. Genetic diversity, phylogeny and geographic distribution of the genus *Vasconcellea* in Southern Ecuador. *Lyonia* 7: 15-27.
- OECD. 2005. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology. Consensus Document on the Biology of Papaya (*Carica papaya*). Environment, Health and Safety Publications. No. 33. Paris, Francia. 64 p.
- Trujillo, G; Vegas, A. 1999. Enfermedades que afectan el cultivo del lechoso (*Carica papaya* L.) en Venezuela. In: Leal F. y Coppens G. (eds). Taller internacional sobre *Caricaceae*. FONTAGRO-IICA. Cali, Colombia. pp. 67-77.
- Van Droogenbroeck, B.; P. Breynne; P. Goetghebeur; E. Romeijn-Peeters; T. Kyndt; G. Gheysen. 2002. AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (*Caricaceae*) from Ecuador. *Theor. Appl. Genet.* 105: 289–297.
- Vegas, A.; A. Miliani; D. Rodríguez; J. Demey. 2006. Identification and genetic relationships of *Caricaceae* family in venezuelan germplasm. 11th IAPTC&B Congress. Biotechnology and Sustainable Agriculture and Beyond. Beijing, China.
- Vegas, A.; G. Trujillo; E. Marys; A. González; G. Fermín; M. Cermeli. 2004. El virus de la mancha anillada de la lechosa en Venezuela: Descripción e importancia, medidas de prevención y control. Revista digital CENIAP HOY. Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n6/arti/vegas_a/arti/vegas_a.htm (Consultado: Noviembre 3, 2010).
- Waugh, R. 1997. RAPD Analysis: Use of genome characterization, tagging traits and mapping. In: Clark, M.S. (Ed.). *Plant Molecular Biology. A Laboratory Manual*. Cambridge, Inglaterra. pp. 529.