

# PROPAGACIÓN CLONAL DE PLANTAS ÉLITE DE *Carica papaya* L.

## USANDO MICROINJERTACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO*

Rutsarai Nava, Ariadne Vegas García, Carlos Marín R. y Zaith Villegas

### RESUMEN

La poca disponibilidad y los altos costos de la semilla nacional e importada limitan la siembra de lechosa (*Carica papaya* L.) en Venezuela. En las plantaciones comerciales se siembran híbridos de Maradol, Red Lady y Carmen, y en menor escala, el cultivar Cartagena, debido a la calidad de los frutos y la resistencia que presentan algunos materiales frente al virus de la mancha anillada en zonas de alta incidencia. El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar la técnica de microinjertación *in vivo* e *in vitro* en el cultivar Maradol, con la finalidad de obtener clones élite hermafroditas. Para ello, se injertaron brotes de 0,5 y 5mm de longitud sobre plántulas procedentes de semillas, cortadas horizontalmente y en *V*, en condiciones *in vitro*. En la microinjertación *in vivo* se emplea-

ron plantas decapitadas de dos meses de edad como portainjerto, las cuales se injertaron con brotes *in vitro* de 2 a 4cm. Se realizaron dos tipos de injerto, enchapado lateral y corte en *V*. Las plantas injertadas se colocaron en tres ambientes diferentes. Se evaluó el porcentaje de unión de los injertos y la contaminación en el sitio de corte. No se encontraron diferencias significativas entre los injertos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, se recomienda la microinjertación *in vivo*, ya que es menos laboriosa y las plantas injertadas estuvieron aptas para la siembra en campo en un periodo más corto (3 a 4 meses). Esta tecnología puede ser adoptada por los viveristas y agricultores para producir clones hermafroditas.

### Introducción

La lechosa (*Carica papaya* L.) es una especie que se destaca por su importancia económica dentro de la familia Caricaceae. Se usa como frutal en los trópicos y subtropicos. Además, produce un fermento proteolítico, la papaína, de múltiples aplicaciones en la industria (Badillo, 1971). En la actualidad se estima que se producen mundialmente unas 7.207.534 toneladas de lechosa y la producción en Latinoamérica es de más del 50% de esta producción (FAO, 2007).

*Carica papaya* L. se propaga convencionalmente por semillas, lo que tiene como desventaja la heterogeneidad de las plantas producidas cuando se siembran semillas de plan-

tas no seleccionadas e híbridos (Bhattacharya y Khuspe, 2000), así como la dificultad de producir clones de plantas hermafroditas. Se ha señalado que la presencia de plantas andróicas o masculinas ha llegado a disminuir hasta en 40% los rendimientos del cultivo (Gutiérrez, 2002).

Las metodologías de micropropagación asexual de la lechosa son ampliamente conocidas. El establecimiento *in vitro* se ha logrado satisfactoriamente a partir de ápices terminales y axilares de plantas de semillero o adultas de campo, y de domos meristemáticos apicales (Hossain *et al.*, 1993; Litz y Conover, 1977, 1978, 1981; Rajeevan y Pandey, 1986; Tovar, 1989). Para ello se han empleado medios de cultivo con las

sales de Murashige y Skoog (1962; MS), más 0,05-2mg·l<sup>-1</sup> de las citocininas 6-bencilaminopurina (BAP) o cinetina (CIN) y el ácido naftalenacético (ANA) (Litz y Conover, 1978; Miller y Drew, 1990). Se han establecido las concentraciones óptimas de reguladores del crecimiento para la multiplicación rápida: BAP y ANA entre 0,4-0,6 y 0,1-0,08mg·l<sup>-1</sup>; o BAP y CIN a 0,2 y 0,1mg·l<sup>-1</sup> respectivamente (Rajeevan y Pandey, 1986; Tovar, 1989; Fitch, 1993). Por otro lado, Miller y Drew (1990) propusieron la propagación de plantas a partir de microesquejes de nudos en lugar de la proliferación de yemas, para garantizar la fidelidad del material. Las tasas de multiplicación pueden variar para los diferentes clones y alcanzar

3-15 veces el número de brotes con respecto al implante inicial (Litz y Conover, 1977, 1978; Rajeevan y Pandey, 1986; Tovar, 1989; Miller y Drew, 1990; Hossain *et al.*, 1993). Después de ocho semanas, los brotes elongan lo suficiente para su transferencia a suelo. Se ha inducido el enraizamiento *in vitro* en 60-95% de los brotes de lechosa al añadir ácido indolbutírico (AIB), ANA o ácido indol-3-acético (AIA) al medio básico MS completo o a la mitad, en concentraciones de 0,5-6,0mg·l<sup>-1</sup> (Litz y Conover, 1977, 1978; Rajeevan y Pandey, 1986; Tovar, 1989; Hossain *et al.*, 1993). Algunos autores adicionan ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) a los medios de enraizamiento (Hossain *et al.*, 1993). El trasplante de los brotes enraizados

### PALABRAS CLAVE / Injertación / Lechosa / Propagación Asexual /

Recibido: 15/01/2010. Modificado: 10/05/2011. Aceptado: 16/05/2011.

**Rutsarai Nava.** Estudiante Graduada, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela.

**Ariadne Vegas García.** B.Sc. en Botánica, University of Manchester, RU. M.Sc. en Agro-nomía y Doctora en Ciencias Agrícolas, Universidad Cen-

tral de Venezuela (UCV). Investigadora y Docente, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Dirección: Unidad de Biotecnología Vegetal, INIA-CENIAP, Apartado Postal 5653, Mara-

cay 2101, Venezuela. e-mail: [avegas@inia.gob.ve](mailto:avegas@inia.gob.ve)

**Carlos Marín R.** Ingeniero Agrónomo, UCV, Venezuela. Especialista en Bioestadística y Bioinformática, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Université Paris-Sud, Francia.

TAI y Docente, INIA-CENIAP, Venezuela.

**Zaith Villegas.** Licenciada en Biología y M.Sc. en Fruticultura, LUZ, Venezuela. Docente e Investigadora, LUZ, Venezuela.

## CLONAL PROPAGATION OF ELITE *Carica papaya* L. PLANTS USING *IN VITRO* AND *IN VIVO* MICROGRAFTING

Rutsarai Nava, Ariadne Vegas García, Carlos Marín R. and Zaith Villegas

### SUMMARY

The poor availability and high costs of national and imported seeds limit papaya growing in Venezuela. In commercial plantations, hybrids of Maradol, Red Lady and Carmen are grown, and in a smaller scale the Cartagena cultivar, due to fruit quality and to the resistance shown to papaya ringspot virus in zones of high incidence. This work aimed at standardizing the micrografting technique both *in vivo* and *in vitro* for the Maradol cultivar, with the purpose of producing hermaphrodite elite clones. Buds of 0.5 and 5mm length were grafted on plantlets cut either horizontally or in V, obtained under *in vitro* conditions from seeds. For *in vivo* micrografting, two

month-old decapitated plants were used as rootstock and grafted with *in vitro* buds of 2 to 4cm. Two types of grafting were used, side and V cuttings. Micrografted plants were placed in three different environments. Percentage of successful grafting and contamination at the cutting site were evaluated. There was no significant difference between the techniques used. *In vivo* micrografting is recommended as it is less laborious and grafted plants were ready for planting in a shorter period (3-4 months). This technique could be adopted by nurseries and farmers to produce hermaphrodite clones.

## PROPAGAÇÃO CLONAL DE PLANTAS ÉLITE DE *Carica papaya* L. USANDO MICRO ENXERTIA *IN VITRO* E *IN VIVO*

Rutsarai Nava, Ariadne Vegas García, Carlos Marín R. e Zaith Villegas

### RESUMO

A pouca disponibilidade e os altos custos da semente nacional e importada limitam a plantação de mamão (*Carica papaya* L.) na Venezuela. Nas plantações comerciais são semeados híbridos de Maradol, Red Lady e Carmen, e em menor escala, o cultivar Cartagena, devido à qualidade dos frutos e a resistência que apresentam alguns materiais diante do vírus da mancha anelar em zonas de alta incidência. O presente trabalho teve como objetivo estandarizar a técnica de micro enxertia *in vivo* e *in vitro* no cultivar Maradol, com a finalidade de obter clones elite hermafroditas. Para isto, se enxertaram brotos de 0,5 e 5 mm de comprimento sobre plântulas procedentes de sementes, cortadas horizontalmente e em V, em condições *in vitro*. Na micro enxertia *in vivo* se empregaram plantas deca-

pitadas de dois meses de idade como porta enxerto, as quais foram enxertadas com brotos *in vitro* de 2 a 4cm. Realizaram-se dois tipos de enxerto, enchapado lateral e corte em V. As plantas enxertadas se colocaram em três ambientes diferentes. Avaliou-se a porcentagem de união dos enxertos e a contaminação no local de corte. Não se encontraram diferenças significativas entre os enxertos *in vitro* e *in vivo*. No entanto, se recomenda a micro enxertia *in vivo*, já que é menos laboriosa e as plantas enxertadas estiveram aptas para o plantio no campo em um período mais curto (3 a 4 meses). Esta tecnologia pode ser adotada pelos viveiristas e agricultores para produzir clones hermafroditos.

no presenta dificultad cuando se transfieren a una mezcla de turba-perlita o turba-arena-tierra estéril o tratada con fungicida y se colocan bajo un nebulizador (Hossain *et al.*, 1993).

Alonso (1946) señaló que la lechosa puede propagarse por injerto y por estacas. Sin embargo, enfatizó que existen limitantes en estos procedimientos: los árboles seleccionados deben ser decapitados para estimular la brotación de yemas axilares; la planta donante de yemas debe tener menos de dos años para obtener brotes vigorosos y frutos de tamaño aceptable; y a partir del enraizamiento de estacas se producen plantas pero con crecimiento lento. El injerto de púa o hendidura central fue el más

exitoso, injertado en plantas de semilla decapitadas; la púa se prepara dándole un corte a bisel a ambos lados de una rama, se introduce en la hendidura central realizada y se amarra con tela de injertar, rafia o cordel. El injerto lateral, ideado por Wester en 1916, se realizaba a 10cm de altura del tallo, haciendo un pequeño corte a menos de la mitad del grueso del tallo y utilizando una púa de 6cm de longitud (Alonso, 1946). En la familia *Caricaceae* se han llevado a cabo injertos entre especies introducidas y autóctonas, con fines de conservación de las especies provenientes de climas fríos y para el mejoramiento genético de la lechosa, obteniéndose 29-93% de injertación. *C. papaya* fue el patrón recomendado de-

bido a que otras especies resultaron susceptibles a la pudrición de las raíces. En todos los casos, el injerto empleado fue el de cuña apical, protegido con una bolsa de papel transparente por 15 días (Riccelli, 1963).

La microinjertación *in vitro* e *in vivo* ha servido para eliminar virus en programas de certificación, producir cultivares sobre patrones resistentes a enfermedades, implementar procedimientos cuarentenarios, e indexar virus en cultivos como los de cítricos y de uva (Navarro, 1992; Tanne *et al.*, 1993; Valat *et al.*, 2003; Pathirana y McKenzie, 2005).

La microinjertación ha tenido amplias aplicaciones para la propagación rápida y el enraizamiento de especies vegetales comestibles y forestales. La pro-

pagación de la uva (*Vitis* spp.) se realiza a partir de brotes enraizados del patrón, los cuales son cortados en V e injertados con brotes de la copa. En los primeros seis días se forma callo en la herida y la unión vascular se establece 8-12 días después de la injertación, con un 60% de sobrevivencia. Después de 5-6 semanas las plantas pueden ser transferidas a suelo (Mhatre y Bapat, 2007). En el caso del pistacho (*Pistacia vera* L.), el aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies de *Pinus*, la microinjertación *in vitro* e *in vivo* ha sido usada para establecer ápices provenientes de copas adultas sobre patrones juveniles de la misma especie (Pliego-Alfaro y Murashige, 1987; Onay *et al.*, 2007; Materán *et al.*, 2008).

En pistacho se han usado tres métodos de corte del patrón decapitado: hendidura central, corte en V y horizontal. El éxito del injerto aumentó con el tamaño del brote hasta 6mm, mientras que con brotes mayores decreció el porcentaje de injertación; los ápices <0,5mm se necrosaron y cerca de un tercio de los ápices sobrevivieron cuando midieron entre 0,5 y 1mm (Onay *et al.*, 2007). La injertación *ex vitro* de genotipos de aguacate derivados del cultivo de ápices o nudos usados como copa ha resultado con porcentajes de pegue de 52-76%, ocurriendo la brotación de yemas 20-25 días después de la injertación. El éxito de los injertos de hendidura central y enchapado lateral fueron similares (68-72%); sin embargo, en el primero hubo brotación precoz (Litz, *et al.*, 2007). En aguacate y en *Garcinia indica*, la microinjertación incrementa el enraizamiento, después de un injerto o microinjertos sucesivos de brotes adultos (Pliego-Alfaro y Murashige, 1987; Meera y Manjoshri, 2006). Además, se han microinjertado *in vitro* brotes provenientes de embriones somáticos de aguacate para aumentar la eficiencia de regeneración de plantas mejoradas por transformación genética y mutagénesis *in vitro* (Raharjo y Litz, 2005). La transferencia de las plantas injertadas a condiciones ambientales debe ser gradual, retirando progresivamente las cubiertas plásticas o de vidrio, y deben ser conservadas en condiciones controladas de temperatura, luz y humedad (Mhatre y Bapat, 2007; Onay *et al.*, 2007). En el caso de la uva, después de 2-4 meses las plantas se transfirieron a recipientes más grandes y se mantuvieron en el invernadero hasta el desarrollo de 3-4 yemas del injerto (Mhatre y Bapat, 2007).

El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar la microinjertación *in vivo* e *in vitro* en la variedad de lechosa Maradol, para contribuir con los avances en la propagación asexual del cultivo y la producción de plantas elite hermafroditas seleccionadas en el

campo por sus características agronómicas.

## Materiales y Métodos

### Selección del material vegetal

Frutos elite procedentes de plantas hermafroditas de *Carica papaya* L., cultivar Maradol, elongados, lisos, sin abultamientos ni deformaciones y fisiológicamente maduros, fueron recolectados en la finca 'La Bandera', caserío Los Novillos, vía San Francisco, Estado Lara. Las semillas de los frutos se usaron para producir patrones *in vitro* e *in vivo*. Los brotes *in vitro* provinieron del banco de germoplasma de la Unidad de Biotecnología Vegetal del INIA-CENIAP, Estado Aragua, obtenidos a partir de clones hermafroditas seleccionados en campo y conservados *in vitro* en medios de cultivo semisólidos de germinación (MG, MS suplementado con BAP y CIN; Fitch, 1993), y en condiciones de 16h luz/8h oscuridad, con una intensidad de 531 lux.

### Establecimiento de material vegetal *in vitro*

**Desinfección de las semillas.** Los frutos fisiológicamente maduros se trasladaron en cavas de anime hasta la Unidad de Biotecnología Vegetal del INIA-CENIAP. Para la desinfección se empleó el procedimiento reportado por Vegas *et al.* (2003), lavando primero los frutos con jabón líquido. En la cámara de flujo laminar horizontal se realizó la desinfección superficial de los frutos mediante la aspersión de alcohol isopropílico 70%. Sobre papel aluminio estéril se hizo un corte longitudinal a cada fruto, eliminando previamente los extremos con un cuchillo para extraer las semillas con ayuda de pinzas. Luego de colocar estas semillas en cápsulas de Petri estériles se les retiró la sarcotesta usando pinzas, para lograr la escarificación. Las semillas fueron desinfectadas sumergiéndolas en hipoclorito de sodio 2% durante 20min y luego en alcohol

isopropílico 70% (5min). A las semillas desinfectadas se le realizaron tres lavados de 5min con agua destilada estéril y se colocaron sobre servilletas estériles para su secado con el aire de la cámara de flujo laminar.

**Siembra de semillas en medio de cultivo semisólido.** Para el establecimiento de las semillas *in vitro* se realizó un corte en cada extremo y otro longitudinal a cada semilla, con la finalidad de exponer el embrión al medio de cultivo (Vegas *et al.*, 2003), y se sembraron en tubos de ensayo, con 20ml de medio MS semisólido, esterilizado a 121°C y 15 lbs de presión por 20min. Los tubos fueron tapados con tapas plásticas, sellados con Envoplast® y se colocaron en oscuridad a 25 ±2°C. Después de 15 días se descartaron las plántulas contaminadas con bacterias u hongos. Se realizaron cuatro siembras, de 200 semillas cada una.

**Siembra de semillas en papel Whatman.** Se utilizó el procedimiento descrito anteriormente para la desinfección de semillas. Previamente se ajustaron discos de papel Whatman al diámetro de una placa de Petri y se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lbs de presión por 20min. En cada placa de Petri se colocaron cinco semillas enteras desinfectadas, entre dos discos de papel Whatman, los cuales se humedecieron con agua destilada estéril. En total se sembraron 18 placas. Una vez germinadas las plántulas se implantaron en medios de cultivos semisólidos MS básico (Murashige y Skoog, 1962) y MG (medio de germinación; Fitch, 1993) en condiciones de oscuridad.

**Microinjertación *in vitro*.** Se realizaron dos tipos de corte en las plántulas de un mes de sembradas utilizadas como patrones: corte horizontal y corte en V. Para ambos cortes se injertaron ápices *in vitro* de 0,5 y de 5mm. Al combinar el tipo de corte con el tamaño del ápice se obtuvo un total de

cuatro tratamientos (con 30 plántulas cada uno), para los cuales se determinó la media de plantas injertadas.

**Corte horizontal.** Se extrajeron las plántulas germinadas de los tubos de ensayo y se colocaron en cápsulas de Petri estériles, limpiando los restos de agar de las raíces. Bajo un microscopio estereoscópico, se hizo un corte horizontal al nivel de los cotiledones, para eliminar el ápice de cada plántula, colocando en el lugar de corte un ápice de 0,5 o de 5mm, proveniente de un brote de un clon hermafrodita multiplicado *in vitro*. Cada plántula microinjertada se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 20ml del medio MS líquido, suplementado con 75mg<sup>-1</sup> de sacarosa. Las plántulas microinjertadas se cultivaron durante dos meses a 25 ±2°C bajo iluminación.

**Corte en V.** Se repitió el proceso descrito anteriormente, sobre un corte en forma de V en la plántula, a nivel de los cotiledones.

**Cultivo de ápices.** Se sembraron individualmente 10 ápices de 0,5mm y 10 ápices de 5mm en tubos de ensayo conteniendo 20ml de medios MS y MG semisólidos, para un total de cuatro tratamientos y 10 repeticiones/tratamiento. El cultivo de ápices se llevó a cabo a 25 ±2°C en condiciones de luz. Los ápices sembrados se observaron semanalmente durante dos meses para comparar su desarrollo con respecto a los ápices de las plántulas microinjertadas.

### Establecimiento del material vegetal *in vivo*

Frutos del cultivar Maradol fueron cortados longitudinalmente para extraer las semillas, las cuales se lavaron con agua corriente y se les eliminó la sarcotesta frotándolas contra la superficie de un colador. Las semillas se secaron a temperatura ambiente durante 24h y se trasladaron al Invernadero 'Tropical Plants', en El Tocuyo, Estado Lara,

para someterlas a un tratamiento pre-germinativo. Este tratamiento consistió en sumergirlas durante un día en una solución compuesta por 0,5l de ácido fúlvico, 0,25l de agua de coco y 10 litros de agua potable. Se oxigenó la solución con una bomba de aire. Después de 24h se descartaron las semillas flotantes, envolviendo el resto en toallas gruesas para mantenerlas húmedas por un periodo de tres horas.

**Siembra de semillas in vivo.** Después de realizar el tratamiento pre-germinativo se sembró un total de 600 semillas en un sustrato estéril compuesto por arena y fibra de coco (1:1). Para ello se utilizaron bandejas plásticas de 72 hoyos, desinfectadas con hipoclorito de sodio 1%. La germinación se llevó a cabo en condiciones de umbráculo, a 35-38°C, humedad relativa de 25-38,8%, luz solar como única fuente de iluminación y riego por aspersión dos veces al día.

**Microinjertación in vivo.** Las plántulas provenientes de semillas de dos meses de edad germinadas en condiciones de umbráculo fueron injertadas aplicando enchapado lateral y corte en V, de la siguiente manera. Para el injerto de enchapado lateral, las plantas fueron decapitadas y se realizó un corte longitudinal cerca de la mitad de los tallos, a nivel de un entrenudo para evitar la competencia entre el crecimiento del injerto y las yemas axilares; con pinza y bisturí se colocó en la superficie del corte realizado un brote del clon *in vitro* de 2-4cm de largo que se sujetó con Parafilm®. Para el injerto en V, luego de decapitar la planta se hizo un corte en V en el extremo superior y con una pinza se insertó en el sitio de corte un brote del clon *in vitro* de 2-4cm de longitud con forma de bisel en ambos lados, que se unió con Parafilm®.

En las dos técnicas de microinjertación descritas se procuró que el portainjerto y el injerto tuvieran formas

complementarias. Después de siete días de realizar la microinjertación se hizo una aspersión con Kazumin 100mg·l<sup>-1</sup> para el control de hongos y bacterias en condiciones de umbráculo. Este producto no fue utilizado en la cámara de crecimiento de la Unidad de Biotecnología Vegetal.

Las plantas microinjertadas fueron protegidas con bolsas de celofán transparentes de 2cm de largo y 7cm de ancho, las cuales se sujetaron con ligas a los tallos de las plantas para evitar la desecación de los microinjertos. Se mantuvieron cubiertas por un mes y se observaron diariamente con el fin de eliminar el exceso de humedad de la bolsa mediante el uso de servilletas de papel. Transcurridos 30 días, las plantas microinjertadas se continuaron aclimatando por cuatro semanas. En la primera semana las plantas se destaparon completamente por periodos cortos (minutos u horas), colocando las bolsas nuevamente al observar algún síntoma de flacidez. En la segunda semana se retiraron las ligas que sujetaban las bolsas a los tallos y se mantuvieron las bolsas protegiendo los injertos con palitos de madera de 20cm, colocados verticalmente en el sustrato. Durante la tercera semana las plantas se destaparon completamente. En la cuarta semana se realizó el trasplante a recipientes de 1kg de capacidad.

La microinjertación *in vivo* se llevó a cabo en tres ambientes diferentes: 1) el umbráculo de 'Tropical Plants', en El Tocuyo, Estado Lara, constituido por un techo de bolsas plásticas gruesas bien adosadas, paredes con malla antiáfidos y piso de grava, con riego automático mediante un sistema de aspersores; 2) el umbráculo del Laboratorio de Virología del INIA-CENIAP, que consta de cuartos con bloques, ventanas de vidrio, aire acondicionado, luz artificial permanente, doble puerta y trampas amarillas contra insectos; 3) un cuarto climático de la Unidad de Biotecnología Vegetal INIA-

CENIAP, en el cual se dispuso de un estante, aire acondicionado y luz artificial (16h luz/8h oscuridad).

En los tres ambientes se registraron la humedad relativa, la temperatura y la intensidad luminosa. Las mediciones se realizaron durante una semana en cada ambiente, a fin de caracterizar el microclima donde se desarrollaron los experimentos y determinar los parámetros en que se lograron mejores resultados. La humedad y la temperatura se midieron simultáneamente con un equipo de Extech Instruments (Waltham, MA, EEUU). Se usó un luxómetro para determinar el máximo y el mínimo valor de la intensidad luminosa.

Con cada una de las técnicas empleadas (enchapado lateral y corte en V) se injertaron 30 plantas, para un total de 60 plantas injertadas por ambiente. Los injertos se observaron diariamente durante dos meses para evaluar el proceso de injertación, los promedios de plantas injertadas y la proliferación de hongos y bacterias en el sitio de unión.

#### *Análisis estadístico*

Se registraron los porcentajes de semillas germinadas *in vitro* e *in vivo*, realizando una prueba de t-Student (muestras independientes, asumiendo varianzas desiguales) para comparar las medias de los tres tipos de siembra (en medio de cultivo, papel Whatman y sustrato estéril). Se realizaron análisis estadísticos para explorar si los tratamientos aplicados en las dos formas de microinjertación (*in vitro* e *in vivo*) mostraban diferencias significativas. Los datos fueron analizados a través de estadística descriptiva y el análisis no paramétrico de la varianza para muestras independientes de Kruskal y Wallis. En el análisis de medias *a posteriori* se empleó la prueba de rangos múltiples a un nivel de confianza del 90%.

En cuanto a la humedad, temperatura y luz en los am-

bientes donde se realizó la microinjertación *in vivo*, los resultados fueron sometidos a análisis de la varianza según el modelo lineal aditivo para dos factores con k-muestras independientes, 3 ambientes × 7 muestreos. En este caso, el análisis de las medias se basó en la prueba de la mínima diferencia significativa honesta (mdsh) de Tukey a un nivel de confianza del 95%.

La matriz de datos fue tabulada y procesada mediante la estadística descriptiva con la hoja de cálculo electrónica Microsoft® Office Excel 2003 y los análisis de la varianza y las pruebas de medias *a posteriori* se realizaron utilizando Infostat (2002).

## **Resultados y Discusión**

### *Germinación de semillas*

De las cuatro siembras realizadas en el medio Murashige y Skoog se obtuvo un promedio de germinación de 16,9% y se observó que este proceso se inició ocho días después de las siembras. El total de plántulas contaminadas por hongos y bacterias fue 8,25%. Las semillas colocadas en papel Whatman germinaron 15 días después de la siembra, con 56,7% de germinación. Las plántulas, al ser transferidas al medio MG demostraron un mayor desarrollo con respecto a las sembradas en el medio MS básico. Esto pudo estar directamente relacionado con las citocininas presentes en el medio MG. Cuarenta y ocho horas después de la siembra *in vitro* se observó una alta incidencia de bacterias, posiblemente debido a contaminación endógena, imperceptible cuando las plántulas estaban en el papel de filtro. En el sustrato estéril se registró un promedio de germinación de 100%, y se apreció que todas las semillas germinaron con uniformidad a los 15 días de la siembra.

A través de la prueba t-student se detectaron diferencias altamente significativas (p=0,0000) entre las medias obtenidas con los tres tipos de siembra de semillas realizadas,

observándose un porcentaje bajo de semillas germinadas *in vitro* en comparación con las semillas sembradas *in vivo* con una diferencia entre 43,3 y 83,1 (Tabla I). Es posible que las diferencias se deban al tratamiento pre-germinativo por 24h de las semillas *in vivo*, que habría estimulado la germinación y eliminado sustancias inhibitorias y bacterias, además de que se descartaron las semillas vanas. Según García *et al.* (2006) en los procesos de germinación, *in vitro* o convencionales, muchas semillas, aun cuando sean morfológicamente maduras, pueden seguir siendo incapaces de germinar debido a que necesitan experimentar una serie de transformaciones fisiológicas, tales como la pérdida de sustancias inhibitorias de la germinación o la acumulación de sustancias promotoras. Otros autores han destacado las ventajas de la germinación *in vitro* con respecto a la realizada en condiciones naturales, en cuanto a que puede solucionar casos de inhibición total de la germinación, evitar el aborto embrionario, aumentar la tasa de germinación y acelerar y sincronizar la germinación (López y González, 2006). Cabe resaltar que los resultados del presente trabajo contrastan con los de estudios realizados en *Carica papaya* L. por Bhattacharya y Khuspe en el año 2000, quienes compararon la germinación *in vitro* e *in vivo*, logrando porcentajes de 99,5 y 23,5%, respectivamente; en esa investigación se concluyó que las condiciones *in vitro* para cualquier cultivar, en general, tienden a aumentar el porcentaje de germinación.

#### Microinjertación *in vitro*

Después de 15 días de realizar la microinjertación sobre plántulas *in vitro*, con ambos tipos de injerto (corte en V y corte horizontal) se observó el inicio del proceso de unión de los ápices sobre las plántulas. La consolidación de ambos tejidos se hizo evidente con la formación de un callo en el lugar donde se realizó el corte

a cada plántula (Figura 1). Estos resultados fueron similares al trabajo realizado en uva, donde Mhatre y Bapat (2007) señalaron el establecimiento de la unión vascular 8-12 días después de la injertación. Por el contrario, en Camu Camu (*Myrciaria dubia*) el proceso fue más lento que en lechosa y uva, estando las plántulas *in vitro* aptas para ser microinjertadas después de dos meses, y obteniéndose plántulas injertadas en otros dos meses (González, 2004).

Las medias de injertación obtenidas de los tratamientos *in vitro* (46,7-60%), se muestran en la Tabla II. Según la prueba de Kruskal y Wallis, no se detectaron diferencias significativas ( $p=0,9161$ ) entre las me-

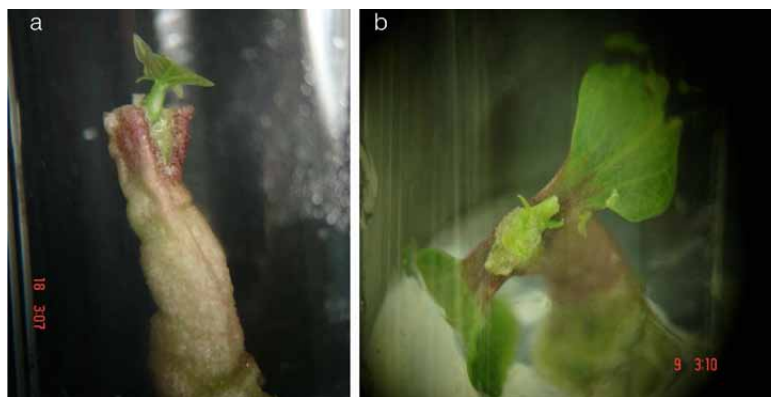


Figura 1. Plantas de *Carica papaya* L. del cultivar Maradol microinjertadas *in vitro*. a: corte en V con un ápice de 5mm, b: corte transversal con un ápice de 0,5mm.

días de los tratamientos. Esto permite inferir que todos los tratamientos son viables y se tienen cuatro opciones para la obtención de plantas elite de lechosa hermafroditas aplicando la técnica de microinjertos *in vitro*, dependiendo de la finali-

dad que se persiga. Los ápices de 0,5mm se pudieran usar para el saneamiento o eliminación de virus y los de 5mm con fines de propagación masiva. En cuanto a los tipos de corte, la microinjertación realizada con el corte horizontal (0,5 y 5mm) fue mucho más laboriosa, puesto que mantener el ápice sobre la plántula resultó difícil al momento de colocar la planta injertada en el

TABLA I  
RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT  
PARA DETECTAR LA DIFERENCIA  
DE MEDIAS ENTRE LOS TIPOS DE  
SIEMBRA DE SEMILLAS DE LECHOSA  
CULTIVAR MARADOL

TS*	Dif	t	P
3 vs 1	39,8	5,243	0,0000
3 vs 2	-43,3	-3,471	0,0000
1 vs 2	-83,1	-15,762	0,0000

\* 1: en medio de cultivo, 2: *in vivo*, 3: en papel Whatman.

tados por Navarro (1992), quien usó el corte de T-invertida y obtuvo 30-60% de pegue al realizar microinjertos de ápices caulinares *in vitro* para producir plantas de cítricos libres de virus. Igualmente, Mhatre y Bapat (2007) registraron un 60% de sobrevivencia en plantas microinjertadas de uva.

En la siembra directa de ápices de 0,5 y 5mm se observó un rápido desarrollo, encontrándose listos para ser transferidos a medios de enraizamiento en un lapso de dos meses. Como era de esperarse, los ápices sembrados en medio MG se multiplicaron con mucha mayor rapidez que los del medio MS, pues los reguladores de crecimiento aceleraron la brotación. Cabe destacar que a través de la microinjertación *in vitro* se lograron plántulas injertadas con raíces pivotantes en dos meses, aptas para la aclimatación, reduciéndose el tiempo de la micropropagación en comparación con la siembra directa de ápices.

#### Microinjertación *in vivo*

En los tres ambientes experimentados se observaron distintos resultados en el proceso de injertación y en la sobrevivencia de los microinjertos. En el umbráculo 'Tropical Plants' se obtuvo una media muy baja de los porcentajes de injertación (3,3%), tanto para el corte en V como para el enchapado lateral. Quince días después de realizados los tratamientos se registró un alto porcentaje de contaminación con hongos y bacterias en el sitio del injerto (96,67%), que se detectó al iniciarse el marchitamiento excesivo de los brotes, siete días después de la injertación, y luego al observarse el micelio o el exudado bacteriano. En el lugar se registraron temperaturas que oscilaban entre 30 y 41°C, con medias durante el día y la noche de 38,8 y 35,4°C, respectivamente, humedad relativa de

TABLA II  
MEDIAS OBTENIDAS DE LOS VALORES DE PEGUE DE  
LOS MICROINJERTOS *IN VITRO* DE LECHOSA CULTIVAR  
MARADOL, DE LOS CUATRO TRATAMIENTOS UTILIZADOS

Tratamiento	Porcentajes promedio de pegue
Corte transversal con ápices de 0,5mm	60,0 ±35,0
Corte transversal con ápices de 5mm	46,7 ±39,0
Corte en v con ápices de 0,5mm	50,0 ±40,0
Corte en v con ápices de 5mm	46,7 ±40,0



TABLA III  
 MEDIAS OBTENIDAS DE LOS VALORES DE PEGUE EN DIFERENTES AMBIENTES  
 DE LOS MICROINJERTOS *IN VIVO* DE LECHOSA CULTIVAR MARADOL  
 DE ÁPICES OBTENIDOS *IN VITRO*

Ambiente	% de injertación <sup>1</sup>		% contaminación <sup>1</sup>		Temp. (°C) <sup>2</sup>		HR <sup>2)</sup>		Lux <sup>2)</sup>
	EL	V	EL	V	am	pm	am	pm	
1	3,3 b	3,3 b	96,67 a	96,67 a	38,8 a	35,4 a	25,0 c	34,6 b	488 c
2	86,6 a	63,33 a	13,33 b	36,67 b	27,0 b	27,0 b	48,0 b	48,0 a	581 a
3	60,0 a	53,33 b	26,67 b	40,0 ab	23,2 c	25,0 b	55,4 a	50,9 a	531 b

EL: enchapado lateral, V: corte en V. Se utilizaron ápices obtenidos *in vitro* de 2-4cm, en 1: umbráculo techado, 2: umbráculo de bloques cerrado, 3: cuarto de crecimiento. Los valores de temperaturas, humedad relativa (HR) y luminosidad son promedio.

Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas según 1: prueba de rangos no paramétrica a nivel de  $p=0,10$  y 2: prueba de la mínima diferencia significativa honesta (mdsh) de Tukey a nivel de  $p=0,05$ .

25-34,6% e intensidad luminosa de 488 lux (Tabla III). Las heridas producidas al injertar, la elevada humedad en el microclima creado por la bolsa de celofán, y las temperaturas altas favorecieron la proliferación de hongos y bacterias en el sitio del injerto, causando la pérdida de los mismos. La aspersión con Kazumin no tuvo efecto, debido probablemente a las condiciones extremas del lugar. En el umbráculo del Laboratorio de Virología del INIA-CENIAP se registró una temperatura constante de 27°C en el día y la noche, humedad relativa constante de 48% e intensidad luminosa de 581 lux, creando un microclima homogéneo durante el periodo de experimentación.

Después de 15 días, el promedio de pegue de los injertos alcanzó 86,6% para el enchapado lateral y 63,33% el corte en V. Se encontró una diferencia significativa ( $p=0,0185$ ) entre ambos tratamientos y se observó que el brote injertado lateralmente se desarrolló con mayor rapidez y vigor (Figura 2). La presencia de hongos y bacterias se detectó al quinto día de realizados los injertos, con un promedio de contaminación de 13,33% para el enchapado lateral y 36,67% para el corte en V. La frecuencia de hongos fue mayor que la de bacterias. En este caso, la aspersión con Kazumin controló la aparición de hongos y bacterias y estimuló la ci-

catrización de los cortes realizados. Esto último concuerda con los resultados de Camacho y Fernández. (2006), quienes en trabajos realizados en viveros de Almería, España, con injertos de hortalizas, recomendaron la aspersión con fungicida a los injertos después de 5 días. No obstante, la presencia de hongos en el presente estudio pudo ser facilitada por la

alta humedad en ciertos momentos dentro de la bolsa.

La aclimatación de las plantas se logró después de un mes, con un promedio de 50% para las injertadas con la técnica de enchapado lateral y 43,3% para el injerto en V. En el experimento realizado en el cuarto climático de la Unidad de Biotecnología del INIA-CENIAP, para las plantas in-

jertadas con enchapado lateral el promedio de pegue fue 60% y para el corte en V 53,33%. La temperatura se mantuvo ~23-25°C y la humedad relativa sobrepasó el 53%, con una intensidad luminosa de 531 lux (Tabla III). Bajo esas condiciones se observó mucho mayor velocidad de pegue del injerto, en 3 días, en comparación con el umbráculo antes mencionado, donde fue evidente en 7 días. En estas condiciones la media de plantas aclimatadas exitosamente fue 60% para las injertadas lateralmente y 43,3% cuando se usó el corte en V. El promedio de contaminación por bacterias y hongos alcanzó 26,67% para el enchapado lateral y 40% para el corte en V, y se logró controlarlos abriendo las bolsas de celofán para reducir la humedad, ya que no se usaron agentes químicos en este ambiente cerrado.

Según ha sido reportado, la temperatura es un factor decisivo para la formación del callo que consolida la unión del ápice sobre la plántula decapitada; de hecho, por debajo de 20°C la producción de callo es lenta y a menos de 15°C no es viable, y posiblemente a 30°C o más aumenta la tasa de multiplicación de hongos y bacterias. Se ha señalado que la humedad relativa del aire menor al punto de saturación (100%) inhibe la formación de callo y aumenta la tasa de desecación de las células (Camacho y Fernández, 2006). En los tres ambientes de experimentación las temperaturas superaron los 20°C, lo cual favoreció la injertación. En el caso específico del umbráculo de 'Tropical Plants', las temperaturas promedios fueron  $\geq 35^\circ\text{C}$  durante todo el día, condición que aunada a la alta humedad dentro de la bolsa, hizo que un alto porcentaje de los injertos pegados no sobrevivieran dada la presencia de hongos y bacterias. Se puede concluir que aun cuando se logró la injertación en todos los ambientes, la sobrevivencia de los mismos

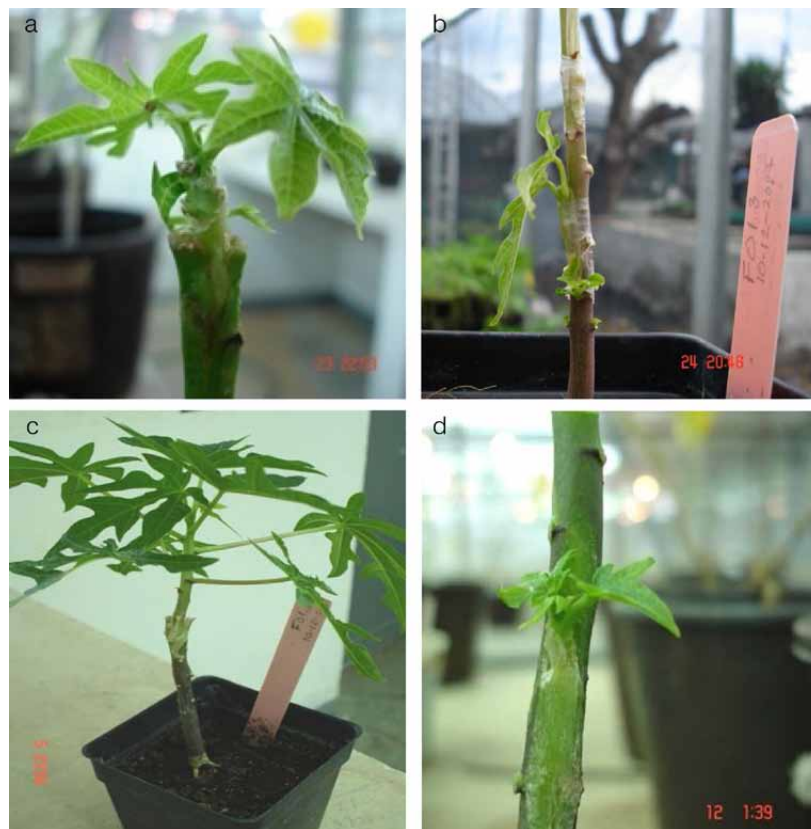


Figura 2. Plantas de *Carica papaya* L. del cultivar Maradol microinjertadas *in vivo*, utilizando como patrón plantas de semilla y como injerto brotes de 2-4cm multiplicados *in vitro*. a: planta microinjertada mediante un corte en V, después de 8 días; b: planta microinjertada con enchapado lateral, después de 5 días; c: planta microinjertada mediante un corte en V, después de 20 días; d: planta microinjertada con enchapado lateral, después de 8 días.

sólo se da en temperaturas de 23-27°C, y que una vez lograda la unión del injerto se debe reducir gradualmente la humedad. En general se observó que para el éxito de la microinjertación *in vivo* las condiciones ambientales deben estar muy bien controladas, y que los brotes *in vitro* con una longitud >2cm tienen mayor probabilidad de sobrevivir en los tres ambientes utilizados para los ensayos. Al comparar los tres ambientes (Tabla III) se observaron diferencias significativas en el porcentaje de pegue ( $p=0,0185$ ), de plantas aclimatadas ( $p=0,0300$ ), y de plantas contaminadas ( $p=0,0193$ ).

#### Microinjertación *in vitro* vs microinjertación *in vivo*

La microinjertación *in vitro* e *in vivo* son técnicas viables para la obtención de plantas élite hermafroditas de lechosa, y se justifican para la producción de plantas sanas y para la conservación de germoplasma *ex situ*. Sin embargo, el proceso de microinjertación *in vitro* fue más laborioso y lento; además, el porcentaje de germinación de las semillas fue bajo (16,9-56,7%), en comparación al 100% obtenido en el sustrato estéril. El porcentaje de pegue fue similar a la técnica *in vivo* (~50%), pero fue mucho más lento y hubo proliferación de callos y brotes axilares indeseables en algunos injertos, lo cual hizo tardía la consolidación de los injertos y la aclimatización, retardando el traslado a campo. Por otro lado, en la microinjertación *in vivo*, las condiciones ambientales fueron críticas para elevar los porcentajes de pegue, la temperatura óptima debe estar entre 23 y 27°C y se requiere una humedad relativa alta, la cual se debe reducir gradualmente para evitar la proliferación de hongos o bacterias y permitir la sobrevivencia del injerto. Las plantas estuvieron aptas para la siembra en campo en un periodo de tres a cuatro meses y fueron morfológicamente normales, similares a las plantas procedentes de semillas. Basados en los resultados se recomienda la microinjertación *in vivo* para

ser adoptada por los viveristas y productores del país a fin de propagar plantas sanas hermafroditas élite de lechosa.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Paulo Briceño, propietario del vivero 'Tropical Plants', por acceder a la ejecución de parte del trabajo en sus instalaciones y por el asesoramiento prestado, y al financiamiento parcial de los proyectos INIA 'Producción masiva de frutales para la industria mediante sistemas de inmersión temporal', 'Actividad Producción masiva de lechosa mediante sistemas de inmersión temporal' (Código FCI-09-P538-05) y 'Mejoramiento genético de la lechosa *Carica papaya* L. en zonas productoras de la zona central, oriente y occidente del país, mediante técnicas convencionales' (Código IDCNS0800106).

#### REFERENCIAS

Alonso R (1946) *Observaciones sobre el Cultivo y Mejoramiento de la Fruta Bomba* (*Carica papaya* L.). Estación Experimental Agronómica. Santiago de las Vegas. Cuba. 60 pp.

Badillo V (1971) *Monografía de la Familia Caricaceae*. Asociación de Profesores. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 220 pp.

Bhattacharya J, Khush S (2000) In Vitro Germination of papaya. (*Carica papaya* L.) seed. *Sci. Hort.* 91: 39-49.

Camacho F, Fernández R (2006) *Injerto de Hortalizas en los Semilleros de Almería*. Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. España. Disponible en [www.terraia.com/revista12/pagina23.htm](http://www.terraia.com/revista12/pagina23.htm). (Cons. 01/04/08).

FAO (2007) <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>

Fitch M (1993) High frequency somatic embryogenesis and plant hypocotyls callus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32: 205-212.

García F, Roselló C, Santamarina S, Pilar M. (2006) *Introducción al Funcionamiento de las Plantas*. Universidad Politécnica de Valencia. España. 183 pp.

González R (2004) *Microinjertación de Camu camu* (*Myrciaria dubia*) *H.B.K. Mc.Vaugh en dos Patrones y Cuatro*

*Medios de Cultivo*. Loreto, Perú. [www.siamazonia.org.pe/-Publicaciones/2003/Junio/Microinjertacion\\_camu\\_camu/contenido.htm](http://www.siamazonia.org.pe/-Publicaciones/2003/Junio/Microinjertacion_camu_camu/contenido.htm)

Gutiérrez W (2002) *Efecto de la Densidad de Plantas, la Laminación de Riego y el Método de Control de Malezas sobre el Desarrollo del Lechosoero Carica papaya L. bajo las Condiciones de la Planicie de Maracaibo*. Trabajo de Ascenso. Universidad del Zulia. Venezuela. pp. 3-11.

Hossain M, Rahman S, Islam R, Joarder O (1993) High efficiency plant regeneration from petiole explants of *Carica papaya* L. through organogenesis. *Plant Cell Rep.* 13: 99-102.

InfoStat (2002) *InfoStat, Versión 1.1. Manual del Usuario*. 1ª ed. Grupo InfoStat. Universidad Nacional de Córdoba / Editorial Brujas. Argentina.

Litz R, Conover R (1977) Tissue culture propagation of papaya. *Proc. Fla. State. Hort. Soc.* 90: 245-246.

Litz R, Conover R (1978) *In vitro* propagation of papaya. *Hort. Sci.* 13: 241-242.

Litz R, Conover R (1981) Effect of sex type, season and other factors on *in vitro* establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106: 792-794.

Litz R, Raharjo S, Gómez-Lim M (2007) Avocado. En Pua EC, Davey MR (Eds.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Crops V*. Springer. Berlin, Alemania. pp. 167-187.

López E, González P (2006) *A Propósito de Semillas*. Estación Experimental La Mayora. CSIC. España. Disponible en [www.encuentros.uma.es/encuentros33/semilla33.html](http://www.encuentros.uma.es/encuentros33/semilla33.html)

Materán ME, Vega MC, Sánchez-Olate M, Sáez K, Rodríguez R, Ríos D (2008) Reactivación de material elite de *Pinus radiata* D. Don mediante microinjertación *in vitro*. *Interciencia* 33: 66-70.

Meera M, Manjoshri A (2006) Restoration of rooting competence in a mature plant of *Garcinia indica* through serial shoot tip grafting *in vitro*. *Sci. Hort.* 108: 194-196.

Mhatre M, Bapat V (2007) Micrografting in grapevine. En Jain SM, Haggman H (Eds.) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer. Holanda. pp. 249-258.

Miller R, Drew R (1990) Effect of explant type on proliferation of *Carica papaya* L. *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 21: 39-44.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Navarro L (1992) Citrus shoot tip grafting *in vitro*. En Bajaj YPS (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, High Tech and Micropropagation II*. Vol 18. Springer. Berlín, Alemania. pp. 327-338.

Onay A, Tilkat E, Isikalan C, Namli S (2007) Micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Siirt). En Jain SM, Haggman H (Eds.) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, The Netherlands. pp. 289-298.

Pathirana R, McKenzie M (2005) Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using *in vitro* micrografting. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81: 11-18.

Pliego-Alfaro F, Murashige T (1987) Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. *HortSci.* 22: 1321-1324.

Rajeevan M, Pandey R (1986) Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 6: 181-188.

Riccelli M (1963) Injertos entre especies de Caricaceae. *Rev. Agron. Trop.* 13: 157-160.

Raharjo S, Litz R (2005) Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 82: 1-9.

Tanne E, Shlamovitz N, Spiegel-Roy P (1993) Rapid diagnosing grapevine corky-bark by *in vitro* micrografting. *HortSci.* 28: 667-668.

Tovar R (1989) *Estudio Preliminar sobre la Propagación in vitro de la Lechosa* (*Carica papaya* L.) a Partir de Yemas Apicales y Axilares. Tesis. Universidad Central de Venezuela. 74 pp.

Valat L, Burrus M, Fuchs M, Mauro M (2003) Review of techniques to inoculate grapevines with fanleaf virus: lessons and perspectives. *Am J. Enol. Vitic.* 54: 279-285.

Vegas A, Trujillo G, Sandra Y, Mata J (2003) Obtención, regeneración y evaluación de híbridos intergenéricos entre *Carica papaya* y *Vasconcellea cauliflora*. *Interciencia* 28: 710-714.