

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“EVALUACIÓN DE DOS TÉCNICAS PARA LA MICROINJERTACIÓN DE  
BABACO (*Vasconcella heilbornii* cv. *pentagona*) Y CHIHUALCÁN  
(*Vasconcella heilbornii* cv. *chrysopetala*) EN PATRONES DE PAPAYA (*Carica  
papaya*) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO, SANTA CATALINA -INIAP”**

**Proyecto previo a la obtención de Grado Académico o Título de:**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**DANIEL LEONARDO CRIOLLO FIGUEROA**

**Sangolquí, mayo del 2008.**

# HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

---

Daniel Leonardo Criollo Figueroa

COORDINADOR DE LA CARRERA

---

Dra. Marbel Torres Arias

SECRETARIO ACADÉMICO

---

Ab. Vinicio Zabala

Sangolquí, 23 de mayo del 2008

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sr. DANIEL LEONARDO CRIOLLO FIGUEROA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

23 de mayo del 2008

---

M sC. Mónica Jadán  
Profesor Director

---

Dra. Karina Proaño  
Profesor Codirector

## DEDICATORIA

*A Elvira por ser madre y por enseñarme el valor de la vida.*

*Daniel Criollo Figueroa.*

## AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos sinceros para todas las personas que colaboraron para la culminación de este trabajo y la finalización de esta etapa de mi vida.

A mis padres por su ayuda, por sus consejos y por apoyarme en estos años de estudio.

A mis abuelos Daniel y Elvira por sus cuidados. A mis tíos y tías que siempre me han tratado como a un hijo más.

A mis hermanos por formar parte de mi vida.

A la Ingeniera Jacqueline Benítez, por su colaboración en el proyecto y sus consejos.

Al Dr. Wilson Vásquez por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A mis compañeros de laboratorio y a todo el personal de INIAP, un gran grupo humano.

A Viviana por su aliento y apoyo y a todos mis amigos que de una u otra forma siempre han estado conmigo.

Y gracias a Dios por darme la oportunidad de vivir.

*Daniel Criollo Figueroa*

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE TABLAS	x
LISTADO DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPITULO 1: INTRODUCCION	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	1
1.3 Objetivos	2
1.3.1 Objetivo General del proyecto	2
1.3.2 Objetivos Específicos del proyecto	3
1.4 Marco Teórico	4
1.4.1 Babaco ( <i>Vasconcella helbornii cv pentagona</i> )	4
1.4.1.1 Taxonomía y distribución geográfica	4
1.4.1.2 Propagación	5
1.4.1.3 Enfermedades	6
1.4.2 Chihualcán ( <i>Vasconcella heilbornii cv chrysopetala</i> )	7

1.4.2.1	Taxonomía y distribución geográfica	8
1.4.2.2	Propagación	8
1.4.2.3	Enfermedades	9
1.4.3	Papaya	9
1.4.3.1	Taxonomía y distribución geográfica	10
1.4.3.2	Propagación	10
1.4.3.3	Enfermedades	11
1.4.3.4	Resistencia	12
1.4.4	Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	12
1.4.5	Microinjertación	14
1.4.5.1	Antecedentes	14
1.4.5.2	Procesos histológicos	15
1.4.5.3	Factores que intervienen en la microinjertación	18
1.4.5.4	Compatibilidad e incompatibilidad	19
1.4.5.5	Técnicas de Microinjertación	23
1.4.5.6	Aplicaciones de la microinjertación	24
CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS		27
2.1	Participantes: instituciones, empresas, personas.	27
2.2	Zona de estudio	27
2.2.1	Laboratorio	27
2.3	Período de investigación	28
2.4	Diseño	28

2.4.1	Unidad Experimental	28
2.4.2	Diseño experimental	28
2.4.3	Factores de estudio	28
2.4.4	Tratamientos	29
2.4.5	Análisis estadístico	29
2.5	Procedimiento	29
2.5.1	Introducción del Material Vegetal	29
2.5.1.1	Papaya	29
2.5.1.2	Babaco y Chihualcán	30
2.5.2	Microinjertación	31
2.5.2.1	Estandarización de medios	31
2.5.2.2	Pretratamiento de ápices	31
2.5.2.3	Microinjertación, técnica de Mosella y Ascui	32
2.5.2.4	Microinjertación, técnica de Navarro <i>et al.</i>	33
2.6	Variables de evaluación	34
2.6.1	Prendimiento	34
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION		35
3.1	Introducción del material vegetal	35
3.1.1	Papaya	35
3.1.2	Babaco y Chihualcán	38
3.2	Microinjertación	41
3.2.1	Estandarización de medios	41



3.2.2 Pretratamiento de los brotes	43
3.2.2.1 Técnica Mosella y Ascui	44
3.2.2.2 Técnica de Navarro <i>et al.</i>	45
3.2.3 Corte del portainjerto	47
3.2.3.1 Técnica de Navarro <i>et al.</i>	47
3.3 Prendimiento de los microinjertos babaco-papaya y chihualcán-papaya	48
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES	58
CAPÍTULO 5: RECOMENDACIONES	60
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA	61

## LISTADO DE TABLAS

**Tabla 3.1** Prueba de Chi cuadrado para el porcentaje de contaminación en relación al tamaño del explante y la temperatura de crecimiento

41

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> Decapitación <i>in situ</i> del porta-injerto.	32
<b>Figura 2.2</b> Cortes en el porta-injerto.	33
<b>Figura 3.1</b> Gráfico del porcentaje acumulado de semillas germinadas en el tiempo.	35
<b>Figura 3.2</b> Gráfico del intervalo de confianza de semillas de papaya sembradas completas y sin testa.	36
<b>Figura 3.3</b> Fotografía de semillas de papaya sin testa germinadas.	37
<b>Figura 3.4</b> Fotografía de semillas de papaya enteras germinando.	38
<b>Figura 3.5</b> Fotografía de explantes de babaco antes de introducir al sistema <i>in vitro</i> .	39
<b>Figura 3.6</b> Fotografía explantes de babaco sin contaminación inicial.	40
<b>Figura 3.7</b> Fotografía de plántula de papaya en medio de elongación para papaya de Roque (2001).	42
<b>Figura 3.8</b> Fotografía de plántulas de chamburo obtenidas a partir de semillas germinadas <i>in vitro</i> .	43
<b>Figura 3.9</b> Fotografía de brotes de babaco pretratados.	44
<b>Figura 3.10</b> Gráfica del porcentaje de prendimientos de homo injertos de papaya versus el tiempo de pretratamiento de los ápices.	45
<b>Figura 3.11</b> Gráfica del porcentaje de prendimientos de homo injertos de papaya versus el tiempo de pretratamiento de los ápices.	46
<b>Figura 3.12</b> Fotografía de microinjerto de papaya-papaya realizado con la técnica de Mosella y Ascui.	46
<b>Figura 3.13</b> Gráfica del porcentaje de prendimiento de homo microinjertos de papaya según al tipo de corte en el patrón.	

	47
<b>Figura 3.14</b> Fotografía de ápice de babaco microinjertado en plántula de chamburo.	
	48
<b>Figura 3.15</b> Fotografía de microinjerto babaco-papaya un día luego de injertado.	
	49
<b>Figura 3.16</b> Fotografía de microinjerto babaco-papaya 20 días luego de injertado.	
	50
<b>Figura 3.17</b> Fotografía de microinjerto babaco-papaya.	
	51
<b>Figura 3.18</b> Fotografía de homo microinjerto papaya-papaya, corte en hendidura en el patrón.	
	54
<b>Figura 3.19</b> Fotografía de microinjertos realizados con la técnica de Navarro <i>et al.</i> .	
	55

## RESUMEN

La microinjertación de babaco (*Vasconcella heilbornii* cv *pentagona*) y chihualcán (*Vasconcella heilbornii* cv *crhysophetala*) en patrones de papaya (*Carica papaya*) se realizó mediante las técnicas de Mosella - Ascui (1984) y de Navarro *et al.* (1975).

Se analizó la germinación de semillas de papaya *in vitro* sembradas enteras o desprovistas de su testa. Las plántulas de papaya se cultivaron en el medio de Pedroza y Perea (1990) y en el medio de Roque (2001) para determinar el más adecuado para su crecimiento. Se usaron ápices de babaco y chihualcán, para la microinjertación en papaya, los cuales se colocaron previamente en una solución líquida que contenía sales MS, AIA (30 ppm) y sacarosa (25 g/l) por 2 minutos, 30 minutos, 24 horas y 48 horas.

Los resultados demostraron que las semillas sembradas sin testa germinaron en menor tiempo que las semillas enteras. Las plántulas resultantes de semillas sin testa presentaron tallos delgados y su índice de germinación llegó cerca del 58%. En cambio, las plántulas provenientes de semillas enteras presentaron plántulas con tallos gruesos y un índice de germinación de aproximadamente el 80%. Las plántulas de papaya cultivadas tanto en el medio de Pedroza y Perea (1990) como en el medio de Roque (2001) mejoraron la elongación del tallo sin encontrarse diferencias significativas entre ambos medios.

En el prendimiento de microinjertos papaya – papaya se obtuvo cerca de un 90% de éxito al tratar los ápices previamente por 2 a 30 minutos en soluciones concentradas de AIA. En los microinjertos de babaco-papaya y chihualcán-papaya hubo falta de prendimiento posiblemente debido a una incompatibilidad entre los géneros *vasconcellas* y *carica*.

## ABSTRACT

The Mosella - Ascui and of Navarro *et al.* techniques were evaluated for the micrografting of babaco (*Vasconcella heilbornii cv pentagona*) and chihualcán (*Vasconcella heilbornii cv crhysophetala*) in patterns of papaya (*Carica papaya*).

For this process, the *in vitro papaya seed* germination of seeds was analyzed with both the entire seed and the seed with its covering removed. The papaya seedlings were cultivated in the Pedroza and Perea and in the Roque medium to determine which is most suitable for the growth of the seedlings. The shoot tips were used for micrografting. These were placed in a liquid solution that contained MS salts, AIA (30 ppm) and saccharose (25 g/l) for the following periods of the time: 2 minutes, 30 minutes, 24 hours and 48 hours. The incidence of this process was proved in papaya-papaya micrografts.

The results demonstrated that a seed without its covering germinated in less time. However, the resulting plants had thin stems and an index of germination at 58%. At the same time, the entire seeds which took more time to emerge, presented plants with heavy stems and an index of germination of 80%. Papaya plants in both the Pedroza and Perea medium as well as Roque medium their stem grown without showing significant differences between the two mediums.

When the shoot tips were treated for 2 to 30 minutes in concentrated AIA solutions, the results showed a 90% papaya-papaya micrografts success. The lack of successful micrografts of babaco-papaya and chihualcán-papaya is due to a possible incompatibility between *vasconcellas* and *carica papaya*.

# CAPITULO 1: INTRODUCCION

## 1.1 Formulación del problema

El babaco y el chihualcán son especies de papayas andinas originarias de nuestro país con un excelente potencial económico, ya sea que se comercialice como fruta exótica en el mercado internacional o por sus composiciones químicas para usos industriales (enzimas proteolíticas), medicinales y terapéuticos (arteriosclerosis). Sin embargo, pese a estas cualidades, han sido limitadamente cultivadas en el país, ya sea por la escasa investigación realizada sobre estos frutales como por la baja oferta de plantas libres de patógenos.

El ataque del hongo *Fusarium oxysporum* es el principal problema que tienen los productores de babaco hoy en día. Este patógeno, que ataca el sistema radicular de las *vasconcellas*, ha sido controlado medianamente por medio de tratamientos químicos de los suelos donde se cultiva babaco. No obstante, la solución más económica y con menos impacto ambiental es la injertación en campo en patrones de papaya.

El inconveniente que se presenta con la injertación es la poca disponibilidad de material vegetal (babaco y papaya). Esto origina que no exista la cantidad suficiente de plantas injertadas para cubrir la demanda nacional de estos frutales. Es por tanto necesario el empleo de técnicas que permitan la masificación del material vegetal.

## 1.2 Justificación del problema

La aplicación de técnicas biotecnológicas nos permite solucionar problemas que impiden trabajar con varios frutales en los que no es posible una reproducción masiva en el campo de los mismos. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, una de estas técnicas, brinda la posibilidad de producir la cantidad suficiente de plantas

de babaco y chihualcán libres de patógenos y con las mejores características agronómicas.

La microinjertación, que es otra técnica biotecnológica, que permitirá obtener injertos en mejores condiciones fitosanitarias. Actualmente la técnica de microinjertación está encaminada a la obtención de plantas libres de virus, siendo en cítricos donde más investigaciones se han llevado a cabo. Por esta razón, es necesario el desarrollo de una técnica optimizada para la microinjertación de las *vasconcellas*, babaco y chihualcán.

Igualmente, la consecución de los objetivos del proyecto será el inicio para la investigación de la compatibilidad entre las *vasconcellas* (babaco y chihualcán) y con papaya, debido a que anteriormente se los agrupaba en un mismo género. Pues sería necesaria la búsqueda de patrones genéticamente más cercanos a babaco y chihualcán para realizar los microinjertos.

Además, se dejará sentado un precedente de la utilización de la técnica de microinjertación para su uso en otros frutales andinos. Y ya que estas técnicas permiten reducir el uso de agentes químicos para el control de patógenos, se verá beneficiado el medio ambiente, se logrará impulsar la agricultura orgánica y disminuir la toxicidad por plaguicidas.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General del proyecto**

- Evaluar las técnicas de Navarro *et al.* (1975) y Mosella y Ascui (1984) para la microinjertación de babaco y chihualcán en patrones de papaya bajo condiciones de laboratorio.



### 1.3.2 Objetivos Específicos del proyecto

- Obtener patrones de papaya germinados *in vitro*.
- Estandarizar y optimizar la técnica de microinjertación desarrollada por Navarro *et al.* (1975).
- Estandarizar y optimizar la técnica de microinjertación desarrollada por Mosella y Ascui (1984).
- Evaluar la técnica desarrollada por Navarro *et al.* (1975) para la microinjertación de babaco y chihualcán en patrones de papaya.
- Evaluar la técnica desarrollada por Mosella y Ascui (1984) para la microinjertación de babaco y chihualcán en patrones de papaya.

## **1.4 Marco Teórico**

### **1.4.1 Babaco (*Vasconcella helbornii cv pentagona*)**

El babaco es una planta arbustiva de tallos semileñosos. Es un híbrido natural producto del cruzamiento entre chamburo (*Vasconcella pubescens*) y el toronche (*Vasconcella estipulata*). Es un árbol nativo de la sierra sur del Ecuador, en las provincias de Loja y el Azuay (Scheldenman *et al*, 2000).

El fruto es una baya sin semilla de sección pentagonal que mide aproximadamente unos 20 cm de largo por 6 cm de diámetro y pesa de 300 a 1200 g. La epidermis del fruto es verde cuando está en crecimiento y a la madurez es amarilla. La pulpa es acuosa, de color crema y de olor especial, sobre todo cuando está maduro (PROEXANT, 2000).

En el Ecuador la producción babaco es baja debido a la susceptibilidad que tiene el cultivo a *fusarium sp*. Para evitar la enfermedad se ha probado con éxito la injertación en diferentes patrones (SICA, 2001).

#### **1.4.1.1 Taxonomía y distribución geográfica**

Anteriormente, el babaco formaba parte del género *Carica*, al que pertenece la papaya (*Carica papaya*), tomando el nombre científico de *Carica pentagona*. Yaguachi y Medina (2003) realizan una nueva clasificación de la familia *Caricácea* y coloca al babaco como parte del género de las *Vasconcellas*, cabe señalar que todas las “papayas de montaña” se encuentran en este género. Su nombre científico actual es *Vasconcella helbornii cv. pentagona*, su nombre común en otros países es chamburo (PROEXANT, 2000).

El babaco es originario del Ecuador y se ha distribuido en forma natural por toda la región andina, desde Colombia hasta Chile. Las zonas de cultivos para

este frutal en el Ecuador son: Imbabura (Atuntaqui, Perucho); en el callejón interandino (Tumbaco, Patate, Baños, Gualaceo, Santa Isabel) según Falconí (2001). El cultivo de babaco se introdujo a Italia en 1985, a Francia en 1987, en España hay plantaciones comerciales desde 1989, en los Estados Unidos existen cultivos de babaco bajo invernadero específicamente en California, en el Reino Unido en Guernsey, además de Israel y en Nueva Zelanda (PROEXANT, 2000).

Las zonas ecológicas en la que se desarrolla este cultivo es el bosque seco montano bajo, en un clima templado, con una temperatura promedio anual de 13.3° C, con un porcentaje de humedad de alrededor del 75.2%, la precipitación anual de 499 mm y una luminosidad de 1658.7 horas por año (SICA, 2001).

#### **1.4.1.2 Propagación**

El babaco se puede reproducir solamente por vía asexual o vegetativa, debido a que posee un fruto partenocárpico, es decir que no produce semilla, siendo este un problema para el desarrollo del babaco (SICA, 2001).

Un método de propagación es por medio de estacas en vivero, la plantación se realiza cuando las plantas tienen de 30 a 40 cm de altura. El tiempo que generalmente se demora en alcanzar dicha altura es de 60 a 70 días luego de haber sido sembrada (Falconí, 2001).

Otro método es por medio de brotes tiernos, forma de propagación muy utilizada a nivel de invernadero o en camas de enraizamiento protegido con plástico (semitransparente). El método consiste en extraer brotes que tengan una longitud de 10 cm y un diámetro de 1.5 a 2.5 cm de plantas en crecimiento. Luego se procede a enraizar el brote que previamente se corta de la parte superior para estimular la brotación de las yemas. A la sexta o séptima semana los brotes están listos para ser transplantados a fundas plásticas. El sustrato de dichas fundas

debe contener dos partes de tierra negra y una de pomina, además de encontrarse adecuadamente desinfectado (Falconí, 2001).

La técnica por injerto más usual en estos casos es la de púa terminal o asa terminal, que consiste en decapitar el patrón a una altura de 10 a 15 cm., luego se realiza una hendidura diametral longitudinal donde se injerta al babaco con 2 o más yemas, por último se cubre con cinta plástica para favorecer la unión del patrón y evitar el ingreso de agentes nocivos al vegetal (SICA, 2001).

### **1.4.1.3 Enfermedades**

#### ***Fusariosis***

Esta enfermedad es conocida también como la pudrición de las raíces, debido a que por la raíz inicia su ataque causando el marchitamiento de la planta. Presenta síntomas muy similares a la muerte descendente. Los principales agentes causales de esta enfermedad son: *Phytophthora sp.*, *Pythium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, y *Fusarium sp.*, los cuales ocasionan la destrucción del sistema radical del babaco. Al nivel de la corona el tejido se torna de un color café que conforme avanza la enfermedad su consistencia se forma acuosa, las hojas se vuelven cloróticas, se marchitan hasta que se caen, los frutos caen también hasta que muere toda la planta (Falconí, 2001).

#### ***Oidio***

Se conoce como la cenicilla, su agente causal es *Oidium sp.* Se presenta un polvillo de color blanco con manchas irregulares en las hojas, específicamente en el envés. En el haz, aparecen manchas cloróticas que se agrandan y agrupan, reduciendo notoriamente el área fotosintética de la planta. Los órganos atacados se deforman y abarquillan. Su máximo daño es cuando su ataque se encuentra

situado a nivel floral donde no produce fruto por la caída de la flor (PROEXANT, 2000).

### ***Pudrición radicular***

Se da por el agente causal *Erwinia carotovora*, es un habitante del suelo, su ataque es aisladamente y sus consecuencias fatales para la plantación (produce la muerte de la planta) especialmente durante los primeros estadios. Produce una pudrición suave que color negro o pardo oscuro a nivel de la base del tallo, como consecuencia el follaje se torna flácido, amarillento y finalmente muere la planta (PROEXANT, 2000).

#### **1.4.2 Chihualcán (*Vasconcella heilbornii* cv *chrysopetala*)**

El chihualcán es una planta con características parecidas a las variedades *pentagona* y *fructifragans*. Presentan estipulas espiciformes pequeñas y blandas y sus hojas son glabras, lobadas, palmadas con cinco nervaduras. Al igual que el babaco, es descendiente del cruzamiento natural entre *V. pubescens* y *V. stipulata* (Yaguache, 2003).

Su fruto presenta cinco lóbulos y sus caras son planas, su tamaño llega hasta los 20 cm. La cantidad de semillas por fruto varía, puede presentar de 6 a 12 semillas. El sabor y aroma que presenta este fruto, así como su tamaño, le convierten en un potencial producto de exportación, inclusive sobre el babaco (Vásquez<sup>1</sup>, 2006 comunicación personal).

Sin embargo, pese a las propiedades del fruto andino, se tiene muy poca información acerca del área cultivada en el país debido a que su producción está manejada en pequeñas huertas particulares y sólo se comercializa en pequeños

---

<sup>1</sup> Líder del Programa de Fruticultura, Granja Experimental Tumbaco, INIAP.

mercados como en Gualaceo (se conoce como toronche) en la provincia del Azuay (Encalada<sup>2</sup>, 2006 comunicación personal).

Para Scheldman (2000), las papayas de montaña, como llama a las *vasconcellas*, tienen una gran importancia económica, ya que se han registrado alta actividad enzimática en estos realizados a estos frutales, inclusive llegan a superar a la obtenida en variedades de papayas que se usan para la extracción de proteasas como la papaína.

#### **1.4.2.1 Taxonomía y distribución geográfica**

El chihualcán pertenece a la familia de las *Caricáceas*, su nombre científico es *Vasconcella heilbornii cv chrysopetala*, se conoce como una variedad dentro del grupo de *Vasconcella heilbornii* (Yaguache, 2003). La forma de la flor es la razón por la que se le conoce como crisopétala.

Al igual que la mayoría de *Vasconcellas*, el chihualcán se encuentra distribuido en la región interandina, siendo su lugar de origen la provincia de Loja. A diferencia del babaco y otras *vasconcellas*, como el chamburo y el toronche, el chihualcán es un fruto muy particular de los valles de la sierra como en Vilcabamba y Malacatos (Loja), Gualaceo (Azuay), Patate (Tungurahua), Mejía (Pichincha) entre otros (Yaguache, 2003).

#### **1.4.2.2 Propagación**

Los métodos de propagación del chihualcán son similares a los del babaco. Aunque presenta semillas (6 a 12 semillas por fruto), tienen muy pobres porcentajes de germinación (Encalada, 2006 comunicación personal).

---

<sup>2</sup> Jefe del Programa de Fruticultura, Granja Experimental Bullcay (Gualaceo Prov. Azuay), INIAP.

Normalmente, se usan estacas de 20 cm de largo de árboles adultos. Para su trasplante en macetas se coloca sustrato de enraizamiento normal. Cinco semanas después se obtienen brotes que pueden ser usados para multiplicar el frutal (Encalada, 2006 comunicación personal).

#### **1.4.2.3 Enfermedades**

Existe poca información sobre las principales enfermedades que afectan al chihualcán. Galarza (2001) encontró que algunas *vasconcellas*, como *v. monoica*, presentan un grado de resistencia a *fusarium* que produce fusariosis o marchitez vascular. Sin embargo, en la Granja Experimental de Bullcay en la provincia del Azuay, *V. heilbornii* sp. tiene gran susceptibilidad a *fusarium* y a otras enfermedades que atacan al babaco. Por esta razón se conoce que tanto el babaco como el chihualcán pueden padecer las mismas enfermedades por su cercanía genética.

#### **1.4.3 Papaya (*Carica papaya*)**

La papaya es un frutal de origen centro americano, conocida en este continente desde hace varios siglos atrás. Presenta hojas grandes reunidas en el extremo del tronco, palmatopartidas, con lóbulos a su vez divididos en forma pinnada, pecioladas y sin estípulas (Albiñana, 1985).

Posee flores actinomorfas, pentámeras, unisexuales o hermafroditas. Las flores masculinas tienen una corola largamente tubular y diez estambres unidos a ella; las femeninas tienen la corola tubular corta y de tres a cinco carpelos unidos formando un ovario súpero unilocular, con numerosos óvulos de placentación parietal. Las flores hermafroditas son de tipo intermedio a las mono sexuadas (Albiñana, 1985).

### 1.4.3.1 Taxonomía y distribución geográfica

La papaya, cuyo nombre científico es *Carica papaya*, pertenece a la familia de las caricáceas, orden parietales. En Centroamérica es conocida vulgarmente por los nombres de higueras de las islas, lechosa (Puerto Rico), papaya calentana, mammeira (Brasil) y fruta bomba (Cuba) (Suquilanda, 1995).

La papaya tiene su origen natural en América Central, probablemente al sur de México, de donde se ha extendido por todos los países tropicales, cultivándose desde tiempo inmemorables en esta zona, las Antillas, Brasil y en África Tropical (Kenia, Tanganika) y en Norteamérica (California, Florida entre otros estados) (Suquilanda, 1995).

Los españoles y portugueses la introdujeron en Filipinas y Malasia, y de allí paso a las Islas Hawai, a la India y a Ceilán, donde se cultiva en gran escala. Uno de las variedades más conocidas a nivel mundial es la hawaiana, debido a su sabor y a su escaso tamaño (Suquilanda, 1995).

En el Ecuador, la papaya es una fruta muy solicitada. Por esta razón se cultiva en gran medida todos los valles cálidos del país, especialmente en la región costera. Aunque la variedad más apreciada es la hawaiana, aún se encuentran en el mercado variedades nacionales como la *puna* y la *criolla*, estas dos se han demostrado su resistencia a *fusarium* siendo usadas como patrones para injertos con babaco (Galarza, 2001).

### 1.4.3.2 Propagación

La forma más fácil y económica de propagar papaya es por medio de las semillas. A pesar de las dificultades que se presentan al obtener plantas de diferente sexo, y que las plantas resultantes a veces no reproducen exactamente las características de la planta originaria (Albiñana, 1985).



Cada fruto contiene de 800 a 1000 semillas. En este caso será suficiente depositar un par de semillas por maceta y una vez germinadas, cuando las plantas hayan alcanzado una altura de 10 cm, dejar una sola plántula. El poder germinativo de las semillas de papaya suele ser corto, por lo que conviene hacer la siembra lo más cerca posible a la época de recolección. Si bien la siembra puede hacerse directamente en el lugar definitivo, es mejor proceder a la siembra previa en semillero (Suquilanda, 1995).

Si se quiere tener la seguridad de obtener plantas exactamente iguales a la originaria, tanto en sus características como en su sexo, no hay otra solución que proceder a la multiplicación de la planta por medio de esquejes.

Los esquejes se obtienen de las ramificaciones del árbol y puesto que éste no se ramifica normalmente, sino cuando ya es viejo (al cabo de tres o cuatro años de cultivo), se debe proceder a la obtención artificial de los esquejes. Para ello, en los árboles de tres años que ya deben retirarse del cultivo se procede a la operación de desmoche, que consiste en eliminar la cabeza o cogollo del árbol, con lo que se le obliga a ramificarse, produciendo unas ramas o cogollos laterales (Albiñana, 1985).

#### **1.4.3.3 Enfermedades**

La planta de papaya puede ser atacada por dos plagas muy generalizadas, como son los nemátodos y la araña roja. También por la mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*) ó por otra mosca, la *Toxotrypana curricanda*, que también ataca a los frutos (Suquilanda, 1995).

Las llamadas moscas blancas que atacan a las hojas y el pulgón del melocotonero (*Myzodes persicae*), que también ataca al papayo, es además transmisor de un virus productor del llamado mosaico (Suquilanda, 1995).

#### **1.4.3.4 Resistencia**

Es comúnmente conocido que la simple aplicación de ácido salicílico hace a la planta más resistente a ser infectada. Sería importante obtener una variedad que sintetizara por sí misma el ácido salicílico al nivel requerido para conseguir el mismo efecto. Se ha encontrado la implicación de algunas señales químicas que aparecen, como el jasmónico, como respuesta de las plantas a heridas y picaduras de insectos (Suquilanda, 1995).

Otro dato a tener en cuenta también, es la síntesis de péptidos antimicrobianos del tipo de las mencionadas defensinas, como son las tioninas y las recientemente caracterizadas snakinas, además de los compuestos de otra naturaleza, las fitoalexinas, presentes en los exudados radicales (Olivares, 2000).

Se ha venido trabajando en la obtención de variedades de papaya resistentes a enfermedades como la marchitez vascular, que ataca las raíces del babaco, para utilizarlos como patrones en injertos de babaco. En este contexto, en el 2001 en la granja experimental de Tumbaco perteneciente al Programa de Fruticultura del INIAP, se determinó la resistencia de dos variedades de papaya locales (puna y criolla) a *Fusarium sp.*, hongo productor de marchitez vascular (Galarza, 2001)

#### **1.4.4 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro***

La técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, está basada en la totipotencialidad que presentan las células vegetales. Es decir, la capacidad de las mismas para reproducir un organismo completo y con igual carga genética que el vegetal de donde procede la célula (Jiménez, 1998).

Los orígenes de estas técnicas de cultivo de tejidos vegetales, se remontan al año 1902 como lo menciona Jiménez (1998) y el principal investigador de esta área fue Haberlandt quien postuló el principio de la totipotencia celular. Desde esa época se han desarrollado varios métodos para la regeneración de plantas en base a este principio. Entre los principales métodos de regeneración podemos mencionar, la organogénesis y la embriogénesis somática.

Las aplicaciones de estas técnicas son variadas y está en dependencia de lo que el investigador o productor requiera realizar. Una de estas aplicaciones es la obtención de plantas libres de patógenos. Se ha demostrado que mediante el cultivo de meristemos pueden producirse tejidos que no han sido atacados por una infección viral (Peña, 2000).

Otra aplicación de la micropropagación, quizás la más importante, es la propagación masiva de plantas. Según Jiménez (1998), este uso se dio a partir de los años 80 y fue popularizada por Kitto (1997). Entre las ventajas que sugiere el autor tenemos: altos coeficientes de multiplicación y manejo de elevados volúmenes de plantas, introducción rápida de nuevas variedades y clones, producción independiente de las condiciones ambientales, incremento en rendimientos, uniformidad de plantas producidas, mayor facilidad en la comercialización, entre otras.

La mejora por mutagénesis y selección *in vitro* es una herramienta muy poderosa del cultivo de tejidos vegetales. La facilidad para trabajar a nivel celular o callos con estos sistemas, permiten mayor eficiencia en la aplicación de las técnicas de mutación para el mejoramiento genético (Pérez, 1998).

El uso de la ingeniería genética en plantas ha tenido un gran desarrollo en los últimos años, producto de la unión de la biología molecular y el cultivo de tejidos (Jiménez, 1998).

## 1.4.5 Microinjertación

### 1.4.5.1 Antecedentes

El injerto en campo es el resultado de un acoplamiento entre dos individuos, donde se produce una unión y existe un crecimiento (Moore, 1984). El objetivo final de una injertación es permitir a una planta mejorar problemas asociados con juvenilidad, oxidación, pérdida de estabilidad genética, resistencia a enfermedades con patrones resistentes, entre otras (Mosella y Ascui, 1984).

El método de microinjertación fue desarrollado por Murashige *et al.* (1972), posteriormente mejorado por Navarro *et al.*, (1975 y 1982) y Mosella y Ascui (1984). El procedimiento patrón usado en la mayoría de los laboratorios comprende los siguientes pasos: preparación del portainjerto, preparación de la copa, injerto *in vitro*, crecimiento de las plantas injertadas *in vitro* y transferencia al suelo.

El objetivo de la microinjertación es la unión de dos vegetales, al igual que en campo. Las principales aplicaciones de esta técnica son: obtención de plantas libres de virus, importación de plantas por procedimientos de cuarentena, separación de virus en infecciones mezcladas (Navarro, 1988) y estudios sobre incompatibilidad en el injerto (Zecca, 1995). Otras aplicaciones se podrían realizar en dependencia de la necesidad de la investigación; por ejemplo, para reproducir plantas *in vitro* que presentan problemas de enraizamiento.

Se ha propuesto además, la producción masiva de injertos *in vitro* para obtener plantas injertadas que puedan ser llevadas al campo en tales condiciones. Una variante en la técnica de microinjertación podría permitir la obtención de plantas injertadas en mayores cantidades que con los métodos convencionales, aunque la aplicación de esta técnica se ha enfocado principalmente en la limpieza de plantas contaminadas con virus. Mosella *et al.* (1984) propone germinar las

semillas en macetas en invernaderos y realizar una multiplicación de los ápices *in vitro* de tal manera que la cantidad de patrones e injertos sean mayores para la injertación.

#### **1.4.5.2 Procesos histológicos**

Moore (1984), describe que a nivel celular la unión de un injerto que es compatible ocurre debido a tres procesos que lo hacen posible:

- a) Existe una deposición de materiales de la pared celular y la polimerización de los mismos produce una cohesión entre el injerto y el portainjerto.
- b) Luego ocurre una proliferación de callo.
- c) Y finalmente ocurre una re diferenciación vascular de las plantas involucradas como respuesta a la producción de auxinas.

La unión continua que se produce entre las dos partes permite un estado dinámico de comunicación que a su vez favorece esta unión, este evento es vital para que la planta injertada actúe como un solo organismo (Aguilar, 1990).

La formación del callo que se da en la zona de unión del injerto, es producto de la intensa actividad mitótica que se considera como condición básica para que sea posible la unión (Yeoman y Brown, 1976). En microinjertos realizados en *Prunus* se pudo observar que el desarrollo de las células callosas proliferan principalmente del parénquima medular del patrón y del injerto (Aguilar, 1990). La coalescencia de las paredes celulares del callo se observan a partir del séptimo día después de realizado el injerto (Gedhardt y Goldbach, 1988).

Existe entonces un engrosamiento visible en a zona de unión del injerto, una característica que denuncia este hecho, es la presencia de polisacáridos que han sido sintetizados por las dos partes vegetales inherentes en el injerto y que se depositan en la zona de contacto del mismo, estas sustancias y otras

macromoléculas se difunden por la pared celular de las células callosas y fomenta la unión (Yeoman y Brown, 1976).

Las comunicaciones intercelulares se dan por el plasmodesma que existe entre las células del patrón y del injerto. Existen también conexiones citoplasmáticas entre protoplastos no relacionados y por puentes celulares que se forman entre células que no se encuentran en reproducción (Kollmann y Glockmann, 1985). Estas uniones primarias son necesarias por el significado funcional que representan, pues ocurren en el lugar mismo donde se interrumpe el transporte de sustancias (Kollmann y Glockmann, 1985).

En una planta con desarrollo normal, el ápice representa la fuente natural de auxinas, que son los reguladores de crecimiento responsables de la extensión y la polaridad de la diferenciación vascular (Aguilar, 1990). Cuando ocurre la injertación, es decir el ápice es cortado, el transporte basipétalo de este regulador es bloqueado, de tal manera que los haces vasculares que preceden al ápice se convierten en receptores de esta hormona. Se hace indispensable por este motivo la formación de nuevo elementos vasculares para garantizar la conexión del injerto (Gedhardt y Goldbach, 1988).

Este tipo de conexiones entre los nuevos tejidos vasculares formados y entre las dos plantas injertadas, es solo posible en aquellas especies que tienen un alto grado de compatibilidad, pues estas uniones restauran el flujo de agua y nutrimentos en el injerto y establecen la fuerza mecánica suficiente para sostenerla unión del injerto (Parkinson *et al.*, 1987).

Las células del callo ya diferenciadas en elementos del sistema vascular, xilema y floema, tienden a fusionarse con sus símiles de la otra planta al momento de perder su pared celular (Aguilar, 1990). Se conoce que los elementos del xilema del patrón toman una forma acropétala y son elementos cortos. Las células del xilema en proceso de diferenciación que existían antes del corte, no forman

lignificados y se mantienen en ese estado. Las células que forman el procambium son producto de divisiones periclinales de células del parénquima las cuales en lo posterior dan origen a los elementos del xilema y floema y luego al cambium vascular (Monzer y Kollman, 1986).

En microinjertos realizados en *Prunus* el cambium vascular se desarrolla a partir del tejido interfascicular, es decir que los elementos del xilema se originan en el brote injertado alrededor de la región medular (Aguilar, 1990). Los poros cribosos continuos existentes entre injerto y portainjerto son una señal de la unión, además se apunta que teóricamente se atribuye la presencia de estos poros en las zonas donde antes existía plasmodesma y por tanto, que su formación es el resultado de desarrollo de nuevas células del floema (Kollmann y Glockmann, 1985).

Se atribuye que las áreas cribosas se forman en un estado de reconocimiento celular que ocurre entre el patrón y el injerto y que las moléculas encargadas de este reconocimiento de compatibilidad esta a cargo de las auxinas (Moore, 1984). Para demostrar esta teoría Parkinson *et al.* (1987) aplicaron diferentes reguladores de crecimiento en la zona de injertación y se observó que estos afectaron el número de uniones vasculares y en la formación de callo.

Una ventaja de las condiciones del cultivo *in vitro* es la en su alteración de los niveles de carbohidratos endógenos necesarios para la xilogénesis y la formación de paredes celulares, mediante la variación en la concentración de sacarosa de los medios. Así también, se favorece la deposición de pectinas que se asocian con la unión inicial (Aguilar, 1990). Otras ventajas de la microinjertación en cuanto a control de factores contrarios a la unión, como la fenolización que afecta la cicatrización, se evitan fácilmente *in vitro* (Gedhardt y Goldbach, 1988).

### 1.4.5.3 Factores que intervienen en la microinjertación

El éxito del microinjerto depende de una serie de factores intrínsecos en el procedimiento básico que consta de cinco pasos: preparación del patrón, preparación del ápice, ejecución del microinjerto, cultivo de las plantas microinjertadas y transplante de plantas injertadas *in vitro* al invernadero (Navarro, 1988).

Navarro *et al.* (1975) manifiesta que, en la obtención del patrón, el porcentaje de microinjertos exitosos se ve influenciado por tres factores tales como: el efecto de la luz en la germinación de la semilla, la edad de la plántula al realizar el microinjerto y la especie utilizada como patrón.

De igual manera Navarro (1988) señala que se han conseguido mejores resultados en la microinjertación con ápices procedentes de brotes vegetativos de árboles de campo. Sin embargo, esta fuente de brotes vegetativos depende de la época del año. Por tal razón en climas subtropicales es necesario injertar las variedades en estudio sobre patrones vigorosos y cultivarlos en invernadero, de esta forma se obtiene brotes cuando sea necesario mediante la defoliación de las plantas que se encuentran bajo condiciones controladas.

El tamaño del ápice es para Navarro *et al.* (1975) un factor primordial que se debe analizar antes de injertar. El mismo autor obtuvo un 47% de microinjertos exitosos con ápices de la variedad Robertson Navel de 0,4-0,7 mm. y únicamente un 14,6% cuando el ápice fue de 0,1-0,15 mm. Sin embargo, el porcentaje de plantas libres de psoriasis aumentó de 15% a 100% cuando se utilizó ápices de mayor tamaño. Actualmente, se recomienda usar un ápice caulinar compuesto por el meristemo apical con tres primordios foliares (0,1-0,2 mm) para recobrar plantas libres de virosis de cítricos.



Navarro *et al.*(1975) ha encontrado mejores resultados cuando el ápice ha sido colocado sobre el anillo vascular en la superficie del corte de epicótilo o en una incisión tipo T invertida, en el punto de decapitación del epicótilo.

El tratamiento previo al microinjerto de ápices y plántulas decapitadas con reguladores de crecimiento ha incrementado el porcentaje de ápices exitosos. Edriss y Burger (1984) incrementaron en 250% el número de plantas brotadas de Star Ruby cuando sumergiendo los ápices en una solución de 2,4-D (10 mg/l) o Kinetina (1 mg/l) durante 5 a 10 minutos.

Starrantino *et al* (1986) también encontraron prendimientos del 90, 85 y 86% al sumergir la parte decapitada del patrón y brotes vegetativos por 10 minutos en soluciones de 0,5 mg/l de BAP, 10 ppm 2,4-D y 0,5 ppm de Kinetina respectivamente. En cambio Navarro *et al.* (1975) y Plastira (1987) no tuvieron éxito al embeber la parte superior del patrón decapitado y ápices durante 5 segundos en soluciones de benciladenina (BA) a 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,1, 0,2 y 1,0 mg/l (Aguilar 1990).

#### **1.4.5.4 Compatibilidad e incompatibilidad**

La compatibilidad entre dos especies a injertar puede ser un parámetro decisivo cuando se espera el prendimiento del mismo, pues si estas no tienen un parentesco genético, muy difícilmente puede ocurrir una unión y un crecimiento normal del injerto. Para Salaya (1985), como lo menciona Zecca (1995), la compatibilidad es la capacidad del injerto y el portainjerto para producir una unión exitosa que permite a la nueva planta compuesta, desarrollarse satisfactoriamente.

El mismo autor señala que la incompatibilidad puede presentar diferentes grados de intensidad:

a) Total: el injerto no prende.

- b) Seria: la unión es muy débil, escasa conexión vascular, ocurre muerte de plantas en poco tiempo (hasta 3 años).
- c) Moderada: la conexión es suficiente para mantener la vida de la planta, pero existe una gran debilidad general, unión pobre del injerto, pudiendo ocurrir desprendimientos con facilidad.
- d) Leve: solo ocurre diferencia de crecimiento entre portainjerto e injerto y/o una disminución del vigor, que no afecta la sobrevivencia ni la eficiencia productiva.

Se puede señalar además que la incompatibilidad viene asociada con algunos síntomas que se evidencian luego de realizar la injertación según Hartmann y Kester (Zecca, 1995). De los cuales se pueden mencionar:

- a) Falla para formar unión de injerto en un gran porcentaje de casos.
- b) Amarillamiento del follaje en la última parte de la estación de crecimiento, seguido de defoliación anticipada.
- c) Declinación del crecimiento vegetativo, muerte de los tejidos periféricos del injerto y, en general, falta de sanidad de la planta.
- d) Muerte prematura del árbol, que puede vivir sólo uno o dos años en el vivero.
- e) Diferencias marcadas en la tasa de crecimiento o vigor entre portainjerto e injerto.
- f) Diferencias entre portainjerto e injerto en la época en que comienza o termina el crecimiento de la estación.
- g) Desarrollo excesivo en la unión del injerto, arriba o abajo del punto de injerto.
- h) Producción de plantas enanas o raquílicas.

Cabe señalar también que muchos de estos síntomas se producen por un efecto negativo de las condiciones a las que se mantiene el injerto, por lo cual no se puede afirmar la incompatibilidad de una combinación de vegetales, si no se tiene un control de las condiciones ambientales donde se desarrolla el mismo (Zecca, 1995). Por este motivo, la microinjertación *in vitro*, es un método válido para comprobar si dos especies son o no compatibles.

Para Mosse (1962) manifiesta que existen dos tipos de incompatibilidad: incompatibilidad translocada e incompatibilidad localizada.

La incompatibilidad translocada se trata de los casos en que la condición incompatible no es superada por la inserción de un injerto intermediario compatible con ambas partes, debido aparentemente a alguna sustancia lábil que puede moverse a través de él (Mosse, 1962) . Los problema que se producen al existir este tipo de incompatibilidad van desde la falta de unión o la unión débil con tejidos deformados, hasta la unión fuerte con tejidos conectados en forma normal.

Según Moore (1984), los problemas se reflejan en la parte aérea de los injertos con este tipo de incompatibilidad, que termina en la muerte más o menos rápida de la planta. Ese proceso es muy rápido en el caso de duraznero (*Prunus persica*) injertado sobre Myrabolan (*Prunus cerasifera*) (Zecca, 1995). Cuando los problemas no se producen en forma inmediata, se habla entonces de incompatibilidad de manifestación retardada. Por ejemplo, el caso del injerto de duraznero sobre portainjerto franco de almendro, donde la mortalidad aparece después del décimo año.

Existe incompatibilidad inducida por virus los cuales se incluyen como una incompatibilidad translocada (Zecca, 1995). Generalmente ocurre cuando uno de los dos, injerto o patrón, es portador de un virus que puede transmitir al otro y por tanto causar un daño en uno de los dos componentes vegetales.

Se habla de una incompatibilidad localizada cuando las reacciones de incompatibilidad aparentemente están relacionadas con el contacto mismo entre portainjerto e injerto. La separación de los componentes por la inserción de un portainjerto intermediario, mutuamente compatible, supera las manifestaciones de incompatibilidad. Con frecuencia, los síntomas externos se desarrollan con lentitud, apareciendo en proporción al grado de perturbación anatómica que existe

en la unión del injerto. Al final, se presenta el agotamiento de las raíces debido a las dificultades de translocación a través de la unión defectuosa del injerto (Moore, 1984).

Como se ha señalado, las condiciones del medio, como temperatura o humedad relativa, pueden afectar el desarrollo del injerto. Es debido a ello que se utilizan técnicas de microinjertación *in vitro* porque permiten controlar las condiciones en las que se realiza la operación. Otra ventaja de la técnica es la que proporciona excelentes tejidos para ser utilizados en estudios histológicos (Zecca, 1995). No obstante, han sido publicados relativamente pocos trabajos sobre este aspecto.

El microinjerto *in vitro* fue utilizado para estudiar incompatibilidad en diferentes especies de *Prunus* por Martínez *et al.* (1981), este estudio permitió una rápida determinación de dos tipos de incompatibilidad, muchas veces observada años después de la injertación: como es el caso de la injertación localizada (Cerezo/Myrabolan) y translocada (Duraznero/Cerezo y Duraznero/Myrabolan) (Zecca, 1995).

Martínez *et al.* (1981), mencionado por Zecca (1995) estudiaron la incompatibilidad localizada de damasquero sobre Myrabolan y la incompatibilidad translocada de duraznero sobre Myrabolan. Con el primer tipo de compatibilidad, observaron un leve desarrollo inicial de los ápices, pero 14 días después de la injertación era visible un área necrosada en la unión del injerto. El crecimiento paró y todos los injertos murieron en 60 días. En el caso de la incompatibilidad translocada, obtuvieron plantas viables por injerto de ápices *in vitro*, que fueron trasplantadas al suelo. No obstante, 2 meses después observaron síntomas de incompatibilidad y la mayoría de las plantas murieron.

Generalmente, existe una rápida actividad celular en el área de unión a pocos días de injertado el ápice. En estudios realizados por Jonard *et al.* (1983),

las primeras señales de actividad celular fueron observadas 2 días después del injerto y en 15 días ya había una conexión de cambium entre el injerto y el portainjerto. En la combinación incompatible de damasco sobre myrabolan fue observada una débil actividad mitótica con falta de conexión vascular entre el injerto y el portainjerto, con la presencia de células necróticas en la unión (Zecca, 1995).

Jonard *et al.* (1983) trabajaron con microinjertos de diferentes especies de *Prunus*, consiguieron cerca del 80 % de prendimiento en los homo injertos utilizados como testigos y en el caso de los hetero injertos observaron que en las combinaciones con incompatibilidad localizada, las primeras indicaciones aparecían ya en la segunda semana con el rápido deterioro de los injertos, sin ningún desarrollo posterior. Con incompatibilidad traslocada los síntomas aparecieron cerca de 2 meses después de la injertación.

Zecca (1995) evaluó la microinjertación como técnica para determinar la incompatibilidad de peral sobre membrillero. Para estas pruebas utilizó combinaciones compatibles e incompatibles del género *Plus* sobre *Cydonia oblonga*. El microinjerto *in vitro*, confirmó ser un método eficiente para determinar incompatibilidad entre diferentes combinaciones peral/membrillero a 50 días de realizado el injerto.

#### **1.4.5.7 Técnicas de Microinjertación**

Las técnicas de microinjertación actuales, parten de la desarrollada originalmente por Murashige en 1972. Sin embargo, la más usada es la propuesta por Navarro en 1975. En 1984, Mosella hizo una modificación a la técnica realizada por Navarro, en la microinjertación de *Prunus*, con mejores resultados que los que obtuvo este último (Mosella *et al.*, 1984).

Navarro *et al.* (1972), propone 4 pasos para la microinjertación:

- a) Germinación de las semillas *in vitro* en situaciones estériles.
- b) Obtención e introducción de plantas enfermas con virus.
- c) Decapitación del patrón a 2 cm. desde la raíz y microinjertación del ápice.
- d) Incubación de la planta microinjertada en un tubo con medio líquido.

Mosella y Ascui (1984) a su vez propone una variante en la técnica de Navarro. Este cambio ocurre en el instante del corte, la planta que ejerce como patrón no abandona su medio original y la decapitación ocurre *in situ*. Además, antes de colocar el ápice en la zona de corte, este recibe un tratamiento previo a base de soluciones concentradas con auxinas, posibles promotoras de la unión como se menciona anteriormente. Al colocar el ápice se coloca también soluciones anti oxidantes. De esta manera Mosella y Ascui (1984), mejoró los porcentajes de prendimiento de microinjertos en *Prunus* del 20%, obtenido por Navarro *et al.* (1975), a un 60% en la misma especie (Mosella y Ascui, 1984).

#### **1.4.5.5 Aplicaciones de la microinjertación**

Entre las aplicaciones más reconocidas de la microinjertación, tenemos la obtención de plantas libres de virus. Se conoce que con éxito se ha logrado reproducir plantas herbáceas libres de virus, a través del cultivo de meristemos *in vitro* (Mosella y Ascui, 1984).

El logro desarrollado con la utilización de meristemos en herbáceas se intentó reproducirlo en frutales con potencial comercial y en los que las enfermedades virales eran difíciles de eliminar. Sin embargo, los resultados favorables obtenidos en herbáceas no se repitieron en frutales, por esta razón Murashige *et al.* (1972) plantea la posibilidad de microinjertar estos ápices en patrones compatibles que permitan el desarrollo de los mismos y finalmente obtener plantas libres de virus Mosella y Ascui (1984).

Las primeras microinjertaciones se aplicaron a especies de duraznero (*Prunus persica* (L) Batsch) y a varios cítricos (Mosella y Ascui, 1984). El procedimiento del microinjerto de ápices caulinares *in vitro*, ha demostrado ser la técnica más efectiva en la eliminación de las principales virosis de los cítricos, debido a que las plantas obtenidas por este procedimiento no presentan caracteres de juvenilidad, son fieles a su tipo y en la mayoría de los casos se recuperan libres de los principales síndromes que afectan a los cítricos (Navarro, 1988).

Pruebas semejantes se han realizado con éxito en manzano por Alkskief y Villemur (1978), en damasco Martínez *et al.* (1979) y en vides probó Engelbrecht y Schwerdtfeger (1979) como lo menciona Mosella y Ascui(1984).

En rosáceas, la técnica de microinjertación se aplico con eficientes resultados a partir de plantas contaminadas con el virus "*Plum Pox*". A diferencia de las técnicas aplicadas en cítricos para rosáceas se probaron otros métodos, como tratamiento de ápices con soluciones de minerales de MS y concentraciones de auxinas y citocininas. Se obtuvo buenos resultados al introducir una capa de medio de MS con agar entre el ápice y el patrón mejorado con BA y Zeatina (Jonard *et al.*, 1983).

En las especies maderables las aplicaciones de la microinjertación son diferentes a la de los cítricos. Las limitaciones de la reproducción sexual en forestales, han hecho necesario utilizar la selección clonal para el mejoramiento genético de especies forestales (Aguilar, 1990). Sin embargo, los problemas de la plagiotropia y la pérdida de la capacidad morfogénica en árboles en su etapa de adultez, cuando han sido reproducidos por propagación vegetativa, son un obstáculo en la producción de plantas forestales mejoradas (Aguilar, 1990).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales tampoco fueron la solución para las dificultades presentes en la propagación convencional de estas especies. Por

esta razón, Bonga (1982) probó la microinjertación para aprovechar la estabilidad genética y características morfológicas de los ápices que le asegura el patrón a los ápices. Otra ventaja que asegura el patrón al ápice, es que supera la problemática del enraizamiento necesario de este, difícil conseguir *in vitro* en especies forestales (Aguilar, 1990).

En *Pinus pinaster*, *Sequoiadendron giganteum* y *Cedrela odorata*, se aplicó la microinjertación para rejuvenecer los meristemos antes de la mejora genética que se quiera aplicar a estas especies (Aguilar, 1990).

Por último, Aguilar (1990) probó con éxito la reproducción de embriones somáticos a partir de la microinjertación de los mismos en patrones de especies compatibles con cacao. Esta aplicación es muy adecuada para tratar embriones somáticos con problemas de germinación en especial especies tropicales arbóreas como mango, *Enterolobium* y cacao.



## **CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. Participantes: instituciones, empresas, personas.**

El proyecto se realizó bajo el auspicio del Departamento de Fruticultura, del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). El desarrollo experimental de la investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales “Oscar Malamud” del Departamento de Producción de Semillas perteneciente a la misma institución, ubicado en la estación experimental “Santa Catalina”.

Los colaboradores científicos del proyecto fueron: Ing. Agr. Jacqueline Benítez (Jefa del Laboratorio de Cultivo de Tejidos “Oscar Malamud”) y Ph D. Wilson Vásquez (Jefe del Departamento de Fruticultura).

### **2.2. Zona de estudio**

#### **2.2.1. Laboratorio**

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales “Oscar Malamud”, perteneciente al Departamento de Producción de Semillas de la estación experimental “Santa Catalina” está ubicado en la parroquia Cutuglagua del cantón Mejía de la provincia de Pichincha. Esta localidad se encuentra a 3058 metros sobre el nivel del mar, a 00° 22’ 00” de latitud sur y a 79° 32’ 00” de longitud occidental. La precipitación promedio anual en la Estación es de 1127.5 mm., y presenta una humedad relativa del 76%.

Este laboratorio de cultivo de tejidos vegetales se dedicada a la producción se semilla prebásica de papa. Sus instalaciones están conformadas por la sala de preparación de medios, cuarto de multiplicación donde se encuentran las cámaras

de flujo laminar, cuarto de crecimiento, sala de termoterapia, cuarto para el cultivo en el sistema autotrófico hidropónico y bodega.

### **2.3. Período de investigación**

El tiempo que se empleó para el desarrollo de la investigación fue de 11 meses.

### **2.4. Diseño**

#### **2.4.1 Unidad Experimental**

La unidad experimental está representada por un tubo de ensayo de 10 x 100 mm., con un medio nutritivo previamente esterilizado en autoclave a 15 psi de presión por 20 minutos. Cada tubo contenía una plántula de babaco o chihualcán microinjertada en plántulas de papaya bajo condiciones *in vitro*.

#### **2.4.2 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño Completamente al Azar con 10 observaciones en arreglo factorial de 2x2

#### **2.4.3 Factores de estudio**

##### **a) Material vegetativo**

- Babaco (b)
- Chihualcán (c)

##### **b) Método de injertación**

- Técnica de Mosella y Ascui (1)
- Técnica de Navarro *et al.* (2)

#### 2.4.4 Tratamientos

<b>Nº Tratamiento</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Material vegetativo</b>	<b>Técnica de microinjertación</b>
1	b1	Babaco	Técnica de Mosella y Ascui
2	b2	Babaco	Técnica de Navarro <i>et al.</i>
3	c1	Chihualcán	Técnica de Mosella y Ascui
4	c2	Chihualcán	Técnica de Navarro <i>et al.</i>

#### 2.4.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico para la evaluación de la microinjertación de babaco-papaya y chihualcán-papaya, no se desarrolló debido a la falta de prendimiento de los microinjertos.

### 2.5 Procedimiento

#### 2.5.1 Introducción del Material Vegetal

##### 2.5.1.1 Papaya

Frutos de la variedad nacional *Puna*, previamente desinfectado mediante lavados con jabón comercial y enjuagues, se introdujeron en la cámara de flujo laminar. En la cámara se colocó sobre el fruto alcohol en la zona donde se realizó el corte con la ayuda de un bisturí número 11. Una vez abierto el fruto se tomaron las semillas que se encontraban dentro con una pinza y se colocaron en una caja petri previamente esterilizada, el extrajeron alrededor de 100 por fruto. La parte restante del fruto se deshecho y se procedió a retirar el mucílago que recubría las semillas, sujetándolas con una pinza y retirándola con el bisturí.

De las semillas recogidas en la caja petri, 20 se colocaron en tubos de ensayo con medio nutritivo. A otras 20 semillas se desprendió su testa para sembrar el embrión con sus cotiledones en tubos. Semillas enteras y sin testa se sembraron también en frascos de 390 cm<sup>3</sup> de volumen. Para todos los casos, el medio usado estaba compuesto de sales MS (4,8 g/l), sacarosa (25 g/l) y agar (7 g/l), se lo esterilizó previamente en autoclave a 15 psi por 20 minutos. Se dejaron los tubos y los frascos con las semillas en el cuarto de crecimiento a 30° C en total oscuridad. Cuando empezaron a germinar las semillas, se colocaron en un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a la misma temperatura.

### **2.5.1.2 Babaco y Chihualcán**

En el caso del babaco y el chihualcán se recolectaron brotes apicales y laterales de plantas de los invernaderos ubicados en la Granja Experimental de Tumbaco perteneciente al INIAP. Los brotes usados tenían una longitud de 5 a 10 cm. La desinfección se llevo a cabo en el laboratorio en la estación “Santa Catalina”. El material vegetal fue previamente lavado en una solución con detergente comercial por 5 minutos, luego se enjuagada 2 veces con agua destilada.

A estos se los sometió en una solución de cloro diluido al 1% por 30 minutos, posteriormente se realizó 3 enjuagues con agua destilada. Estos brotes fueron llevados a la cámara de flujo laminar, donde se los sometió primero a una solución de etanol al 70% por 1 minuto, siendo enjuagados luego por 2 veces con agua destilada estéril. Los brotes se colocaron posteriormente en una solución al 2% de cloro comercial por 2 minutos, realizándose 3 enjuagues con agua destilada y esterilizada en autoclave a 15 psi por 60 minutos. Se secaron los brotes en servilletas estériles. Se analizó la adaptación de los brotes de tamaños 5 cm, 2 cm y 5 mm, para lo cual se colocaron los mismos en tubos de ensayo 150 x 10 mm con 3 ml de medio con sales MS (2,4 g/l), sacarosa (15 g/l) y agar (7 g/l)

previamente esterilizado. Los tubos de ensayo fueron colocados a dos temperaturas diferentes, 15° C y 24° C.

## **2.5.2 Microinjertación**

### **2.5.2.1 Estandarización de medios**

Se probaron varios medios para la microinjertación de babaco y chihualcán en patrones de papaya. Inicialmente se utilizó un medio simple con sales MS (2,4 g/l), sacarosa (25 g/l) y agar (7 g/l). El segundo medio usado, se componía de sales MS (2,4 g/l), AIB (0,5 ppm), sacarosa (25 g/l) y agar (7 g/l), este medio se utiliza para la elongación de yemas en babaco (Pedroza y Perea, 1990). Finalmente se usó un medio para elongación *in vitro* de brotes de papaya que está formado por sales MS (4,7 g/l), Kinetina (1 ppm), Agar (7 g/l) y sacarosa (30 g/l) (Roque *et al.*, 2001). Se colocaron en los medios plántulas de papaya para analizar el comportamiento de las mismas.

### **2.5.2.2 Pretratamiento de ápices**

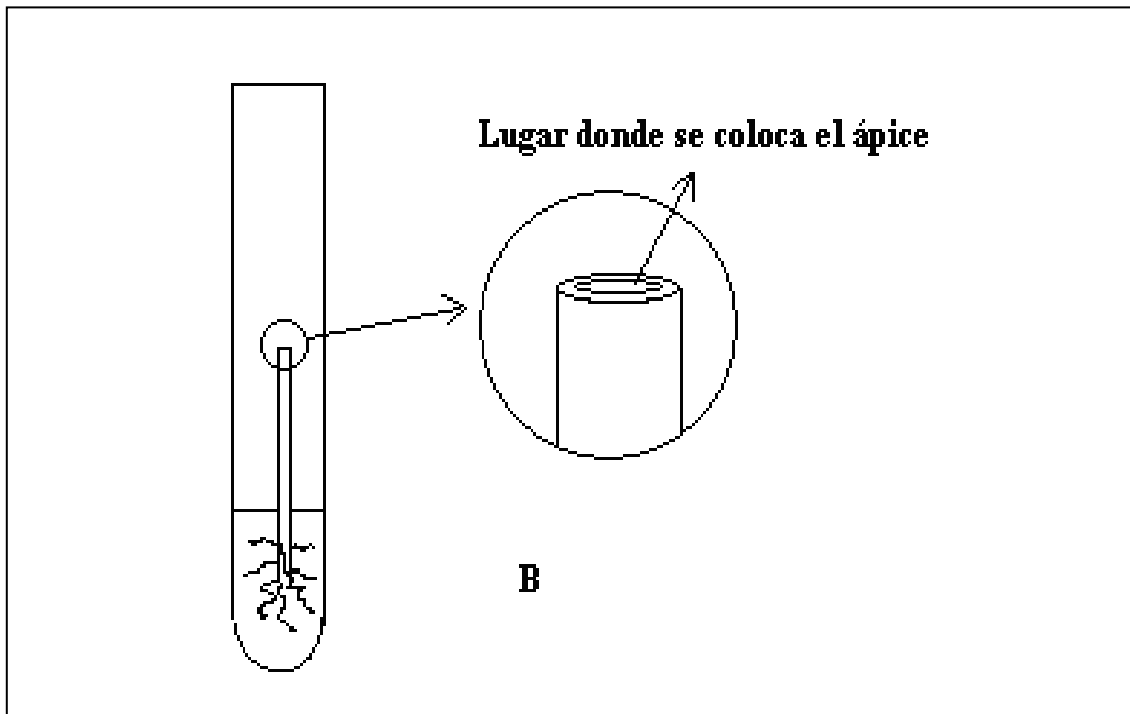
Siguiendo la técnica de Mosella y Ascui, se probó colocar los ápices de chihualcán y babaco en un medio rico en auxinas para mejorar el prendimiento de los mismos en papaya.

Los ápices se cortaron hasta llegar a 5 mm de longitud, estos fueron colocados luego en cajas petri recubiertas con papel absorbente estéril embebido en una solución de sales MS (2.4 g/l), AIA (30 ppm) y sacarosa (15g/l) que fue esterilizado con anterioridad. Las cajas fueron colocadas por tiempos diferentes 2 y 30 minutos y luego por 24 y 48 horas en el cuarto de crecimiento a 1300 lux y 24°C. El mismo proceso se realizó tanto para el chihualcán como para el babaco.

Se probaron como microinjertos de papaya-papaya para probar el efecto del pretratamiento de los ápices.

### 2.5.2.3 Microinjertación, técnica de Mosella y Ascui (1984)

Se usaron las plántulas de papaya cinco días luego de germinar las semillas. Se separan los cotiledones *in situ* mediante una pinza (guillotina), se decapita la plántula (5 cm de altura) haciendo un corte liso donde se colocó el ápice (Figura 2.1).



**Figura 2.1** Decapitación *in situ* del porta-injerto. Se coloca el ápice de la planta a injertar (babaco o chihualcán) en la zona señalada.

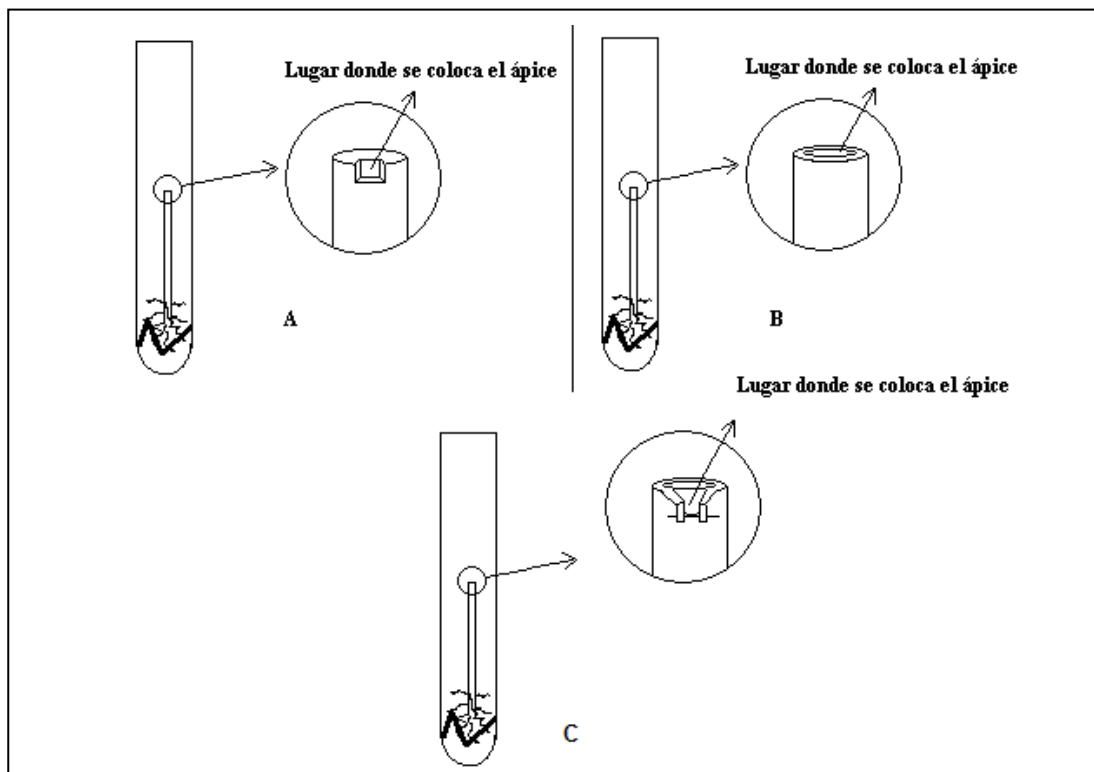
El meristemo de las *vasconcellas* se obtiene con la ayuda de un estereoscopio en la cámara de flujo para injertarlo en el patrón, en la zona de corte se colocan además solución antioxidante y gotas de solución con sales MS

(2.4 g/l), AIA (30 ppm) y sacarosa (15g/l), con ayuda de una jeringuilla estéril al igual que las soluciones.

Las plantas microinjertadas se incuban a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , hasta el momento de trasplantar el microinjerto al sistema de aclimatización. Se probaron como microinjertos de papaya para estandarizar la técnica.

#### 2.5.2.4 Microinjertación, técnica de Navarro *et al.* (1975)

Los portainjertos, plántulas de papaya, se decapitaron fuera de los tubos donde germinaron. Se probaron tres diferentes cortes en los patrones en hendidura, recto y en T invertida (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Cortes en el porta-injerto. A) En hendidura. B) Recto. C) T invertida

Los ápices tratados de babaco y chihualcán se colocaron en la zona de corte, además, con ayuda de una jeringuilla estéril, se adicionó solución antioxidante y gotas de solución con sales MS (2,4 g/l), AIA (30 ppm) y sacarosa (15 g/l).

Una vez injertada la planta, se procedió a traspasar la misma a un medio líquido. El tubo que contiene el microinjerto tiene una base de papel filtro con 2 ml de medio. Los tubos de ensayo probados fueron de 10 x 100 mm. La temperatura de incubación fue  $24 \pm 2^{\circ}$  C. Se realizaron también, homo microinjertos de papaya aplicando esta técnica.

## **2.6 Variable de evaluación**

### **2.6.1 Prendimiento**

El prendimiento es la unión que se produce entre el ápice y el porta injerto. Esta unión define el éxito del injerto. Además, es una prueba de la compatibilidad entre el injerto y el portainjerto. El objetivo del análisis de esta variable es medir, en porcentaje, el número de plantas microinjertadas exitosamente.

Se tomó el tubo con la planta injertada y se observó la zona del injerto para determinar anomalías, como decoloración o presencia de necrosis. Además, con una pinza estéril y en la cámara de flujo, se estiró levemente del ápice injertado para detectar la unión. Se realizó este análisis 20 días después de efectuada la microinjertación. Para todos los ensayos se esperó este tiempo para determinar el prendimiento.



## CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1 Introducción del material vegetal

#### 3.1.1 Papaya

Las semillas que se sembraron sin testa germinaron en menos tiempo que las semillas completas, pues a partir del quinto día de sembradas empezaron con su proceso germinativo. Hasta el día 20, las semillas sin testa germinan en un 52% alcanzando finalmente un 58% hasta el día 35 (Figura 3.1).

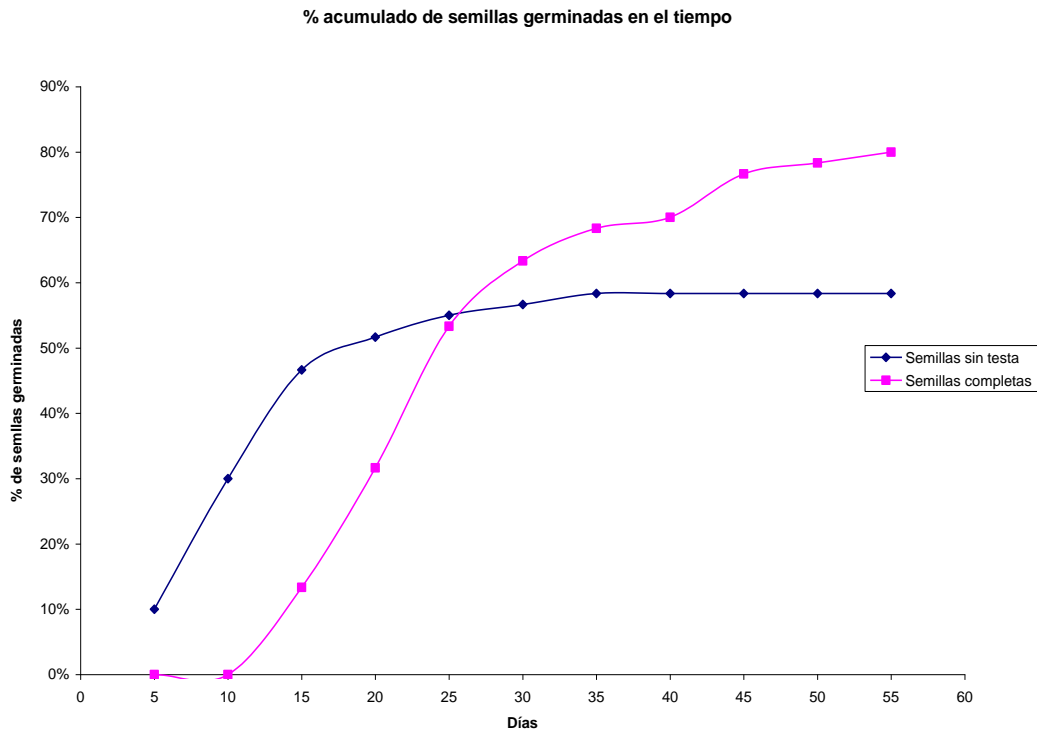


Figura 3.1 Gráfico del porcentaje acumulado de semillas germinadas en el tiempo. Germinación de las semillas sin testa a partir del quinto día.

A su vez, las semillas completas empiezan a germinar desde el día 15. Las medias más altas de germinación se obtuvieron hasta el día 25 donde ya se obtuvo un 53% de semillas germinadas, mientras que las semillas desprovistas de

testa, en este mismo intervalo de tiempo, alcanzaron un 55% de germinación. Lo que implica que no hubo una gran diferencia en la cantidad de semillas germinadas entre los dos procedimientos con relación al tiempo. A su favor, las semillas completas lograron al final un alto índice de germinación 80% hasta el día 55.

El análisis del intervalo de confianza de los dos tipos de semillas sembradas (Figura 3.2), demuestran que las semillas completas tienen mejores índices de germinación.

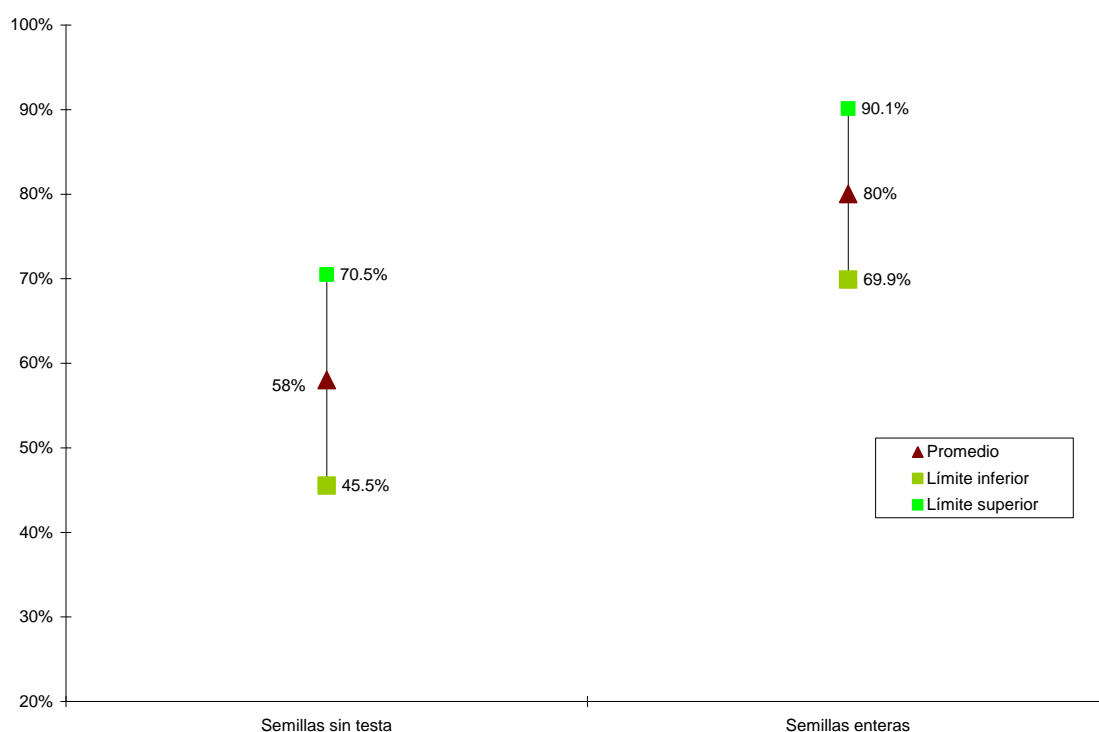


Figura 3.2 Gráfico del intervalo de confianza de semillas de papaya sembradas completas y sin testa.

Trabajos realizados por Fernández *et al.* (2002), en la germinación de semillas de papaya en campo, confirma que la semilla de papaya con un poder germinativo del 70% se considera como semilla certificada y solamente en semillas tratadas con diferentes agentes como hormonas, medios físicos y

químicos, se ha llegado a obtener hasta 86% de germinación. Basados en esta información, podemos asegurar que los dos métodos de germinación utilizados en la presente investigación son adecuados para la obtención de plántulas de papaya, ya que los dos presentan altos índices de germinación. Sin embargo, el tiempo que se emplea para desprender la testa de la semilla y el daño mecánico que se produce al realizar esta operación, son factores que se deben tener en cuenta cuando se utiliza este método (Figura 3.3) (Figura 3.4).



Figura 3.3 Fotografía de semillas de papaya sin testa germinadas.

Cabe señalar que se sembraron semillas sin testa en condiciones de invernadero, en cajas plásticas con turba y perlita como sustrato. Se obtuvo como resultado semillas germinadas desde los 3 días pero el 90% se perdieron al ser atacadas por hongos. Por esta razón se recomienda germinar las semillas sin testa en el sistema *in vitro*, puesto que las condiciones de asepsia total evita ataques de microorganismos.



Figura 3.4 Fotografía de semillas de papaya enteras germinando.

Se intentó germinar las semillas, con y sin testa, en medio líquido de tal manera que permitiesen realizar la injertación con el método de Mosella y Ascui sin necesidad de cambiar de medio a las plántulas. La problemática que se halló fue que las semillas no germinaban y aumentaban su tamaño al absorber el líquido existente. Este fenómeno fue más notorio en las semillas que no tenían testa. Por este motivo se descartó este procedimiento por no ofrecer ninguna ventaja.

### **3.1.2 Babaco y Chihualcán**

Para la desinfección de los brotes de babaco y chihualcán (Figura 3.5), se utilizó el protocolo propuesto por Pedroza y Perea (1990). Los brotes de 5 cm de longitud no presentaron contaminación hasta los 3 días de introducidos,

detectándose luego el crecimiento de microorganismos, principalmente bacterias, en la superficie del medio y bajo el mismo. Al disminuir la temperatura de crecimiento, de 24°C a 15°C, los brotes se mantuvieron hasta 15 días sin presentar contaminación evidente (Figura 3.6). Sin embargo esto se debió a que la temperatura reduce la tasa de crecimiento de las bacterias, ya que finalmente todos los brotes se perdieron por contaminación bacteriana en los días posteriores.



Figura 3.5 Fotografía de explantes de babaco antes de introducir al sistema *in vitro*.

Al disminuir el tamaño del corte de los explantes obteniendo brotes de hasta 2 cm de longitud, no se presentó contaminación hasta los 21 días, cuando la temperatura de crecimiento se fijaba en 15°C, formándose luego un halo bacteriano bajo el explante. Para Pérez (1998), se trata de un contaminante interno cuando este forma un halo de crecimiento por debajo de los haces vasculares del explante que ha sido introducido. También señala que una de las

técnicas utilizadas para su control es la termoterapia, aunque los índices de éxito con la misma no son buenos. Finalmente aclara que el mejor método para poder obtener brotes limpios de contaminantes internos, es el cuidado con fungicidas y bactericidas de las plantas de donde se obtendrán los explantes, el mejor manejo se lo hace en invernadero. Cabe señalar que las plantas que se utilizaron, aunque estaban en invernadero, no tenían un control contra microorganismos.



Figura 3.6 Fotografía explantes de babaco sin contaminación inicial. Presencia de un halo bacteriano en la zona inferior.

No se detectó el tipo de contaminante, pero se pudo evidenciar que mientras más pequeño era el tamaño de los brotes introducidos menor contaminación se obtenía. Por esta razón, los explantes de 5 mm de longitud no presentaron altos índices de contaminación. Debido a esto, las futuras introducciones se realizaron utilizando este tamaño de explante.

Los resultados de las pruebas con Chi cuadrado, demuestran que hay una dependencia entre la temperatura y el tamaño del explante. Es evidente que el tamaño ideal para la introducción de babaco y chihualcán es de 5 mm para el ápice y es preferible incubarlo a 15° C (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Prueba de Chi cuadrado para el porcentaje de contaminación en relación al tamaño del explante y la temperatura de crecimiento.

		<i>Frecuencia observadas</i>			<i>Sumatoria</i>
		<i>Tamaño</i>			
<i>Temperatura</i>		<i>5 cm</i>	<i>2 cm</i>	<i>5 mm</i>	
	<i>15° C</i>	100	94.6	8.7	203.3
	<i>24° C</i>	100	100	22.6	222.6
	<i>Sumatoria</i>	200	194.6	31.3	425.9

		<i>Frecuencias esperada</i>		
		<i>Tamaño</i>		
<i>Temperatura</i>		<i>5 cm</i>	<i>2 cm</i>	<i>5 mm</i>
	<i>15° C</i>	95.47	195.08	14.94
	<i>24° C</i>	104.53	101.71	16.36
	<i>Valor p</i>	<i>3.8326E-13</i>		

### 3.2 Microinjertación

#### 3.2.1 Estandarización de medios

Las plántulas de papaya mostraron tallos con mayor grosor cuando se usó el medio de elongación para babaco (Pedroza y Perea, 1990) y el medio de elongación para papaya (Roque *et al.*, 2001) (Figura 3.7). Mientras que en babaco y chihualcán no se pudo evaluar el crecimiento de los brotes con ninguno de los medios utilizados, debido a que estos perecían por contaminación bacteriana. En

el caso de los explantes de 5 mm de las vasconcellas se encontró que estos se mantuvieron vivos sin presentar cambios.



Figura 3.7 Fotografía de plántula de papaya en medio de elongación para papaya de Roque (2001).

Se germinaron semillas de chamburo (*Vasconcella pubescens*) en el sistema *in vitro*. Con las plántulas resultantes se probaron los tres diferentes medios siendo en el medio de Pedroza y Perea (1990) en el que alcanzaron mayor grosor del tallo (Figura 3.8).

En los trabajos desarrolladas tanto por Navarro *et al.* (1975) como por Mosella y Ascui (1984) los microinjertos se plantan en medios que benefician la multiplicación celular en el tallo del patrón favoreciendo la formación del callo en la zona de corte. Por esta razón, los medios usados en el desarrollo de los



microinjertos son aquellos que generalmente se emplean para la elongación de tallos en protocolos de micropropagación.



Figura 3.8 Fotografía de plántulas de chamburo obtenidas a partir de semillas germinadas *in vitro*.

En base a los resultados obtenidos en la elongación y engrosamiento de las plántulas de papaya y chamburo, el medio recomendado para la microinjertación entre las vasconcellas (babaco y chihualcán) y papaya es el propuesto por Pedroza y Perea (1990) para la elongación de babaco.

### 3.2.2 Pretratamiento de los brotes

Los ápices pretratados no presentaron señal de daño y se mantuvieron vivos hasta el momento de realizar la injertación. Se realizaron homo microinjertos, papaya en papaya, para analizar los efectos de los tratamientos en la injertación (Figura 3.9).

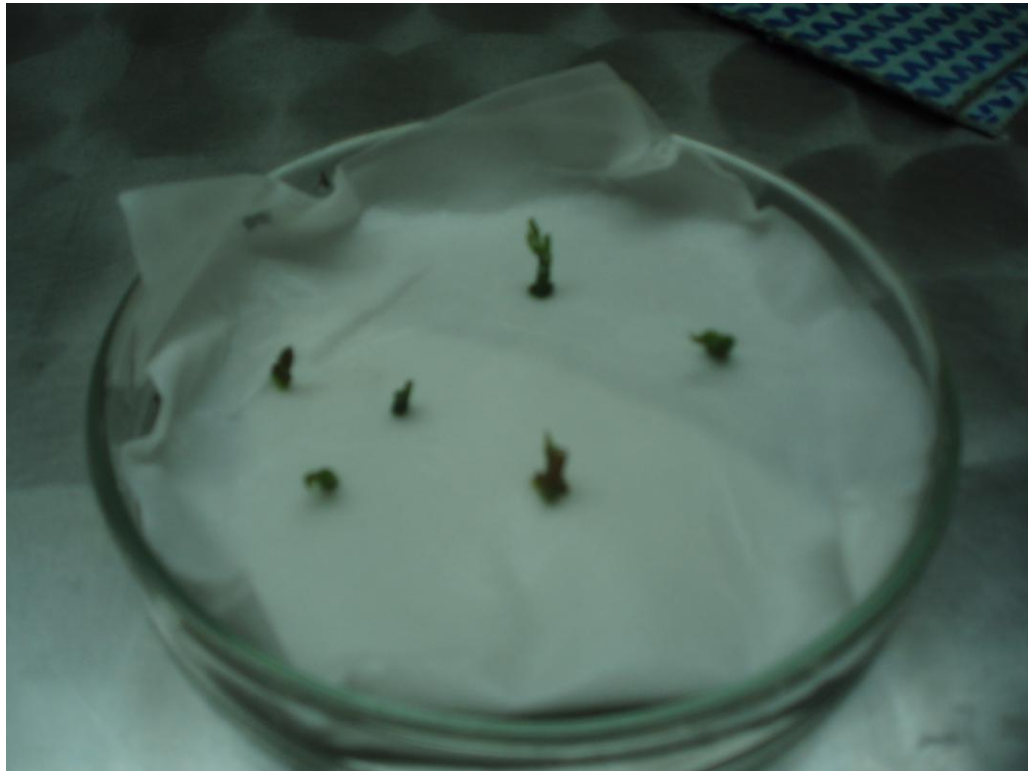


Figura 3.9 Fotografía de brotes de babaco pretratados. Solución con 30 ppm de AIA.

### **3.2.2.1 Técnica Mosella y Ascui (1985)**

Los resultados de los homo-microinjertos, realizados con esta técnica como se muestran en la Figura 3.10, demostraron que hubo mejores prendimientos cuando el tiempo de exposición de los brotes a soluciones ricas en auxinas era de 2 minutos y 30 minutos. Aunque los porcentajes de prendimiento fueron menores, con la exposición a 24 horas y 48 horas, no presentan diferencias evidentes.

Mosella y Ascui (1985) señalan que alcanzaron un 84% de éxito en el prendimiento de microinjertos de durazneros. Indican que este logro es posible por el pretratamiento de los ápices. De tal manera que se puede sugerir, utilizar un pretratamiento del microinjerto en soluciones con alta concentración de auxinas

por un tiempo entre 2 a 30 minutos a fin de mejorar el porcentaje de plantas injertadas con prendimiento exitoso.

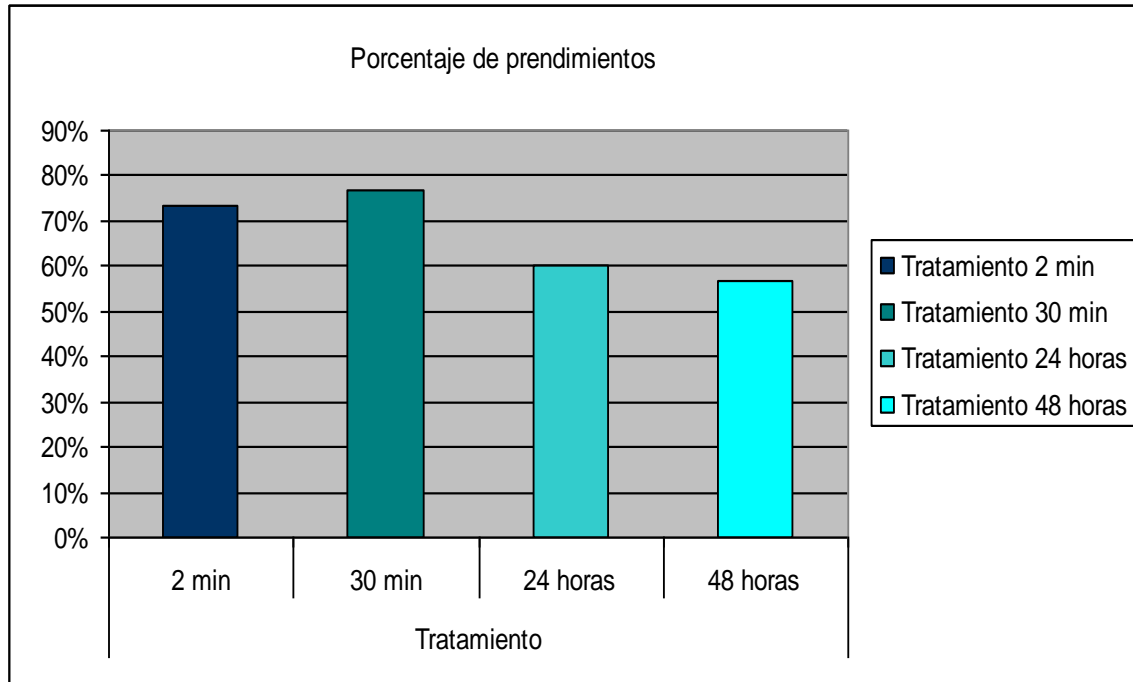


Figura 3.10 Gráfica del porcentaje de prendimientos de homo injertos de papaya versus el tiempo de pretratamiento de los ápices. Técnica de Mosella y Ascui.

### 3.1.2.2 Técnica de Navarro *et al.* (1979)

Con la técnica de Navarro *et al.* se obtuvieron mejores resultados que con la técnica de Mosella y Ascui. La mayor cantidad de prendimientos exitosos se observaron cuando los ápices fueron expuestos a 30 minutos y 2 minutos. Pero los resultados fueron bajos cuando se pretrataron los brotes por 48 y 24 horas (Figura 3.11).

En la técnica de Navarro *et al.* (1979) no se describe el pretratamiento de los ápices. Los datos obtenidos demuestran que se debe usar ápices pretratados por 2 minutos o 30 minutos (Figura 3.12).

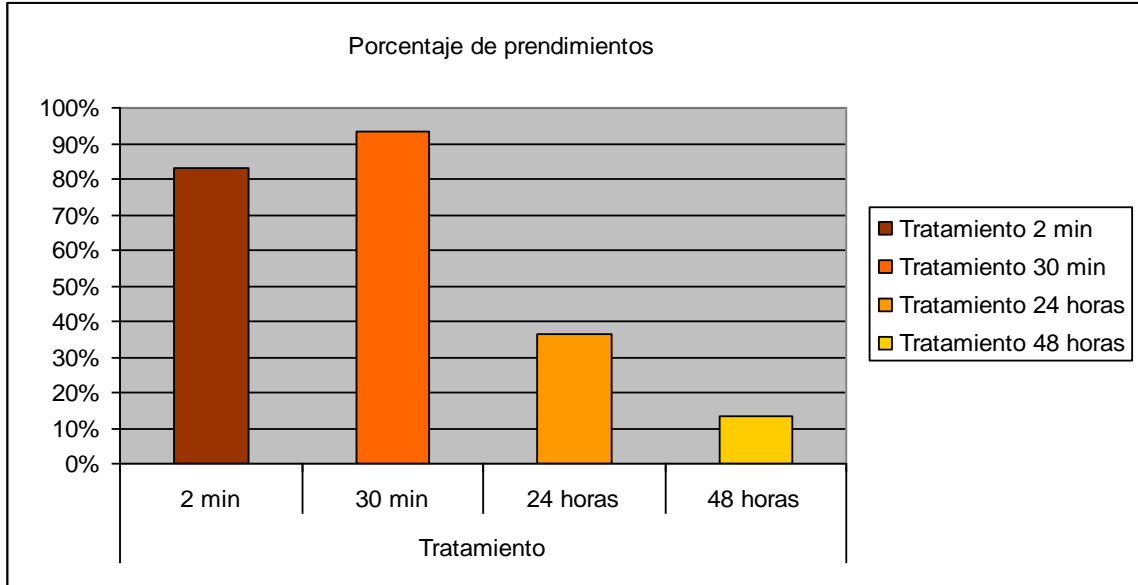


Figura 3.11 Gráfica del porcentaje de prendimientos de homo injertos de papaya versus el tiempo de pretratamiento de los ápices. Técnica de Navarro *et al.*.

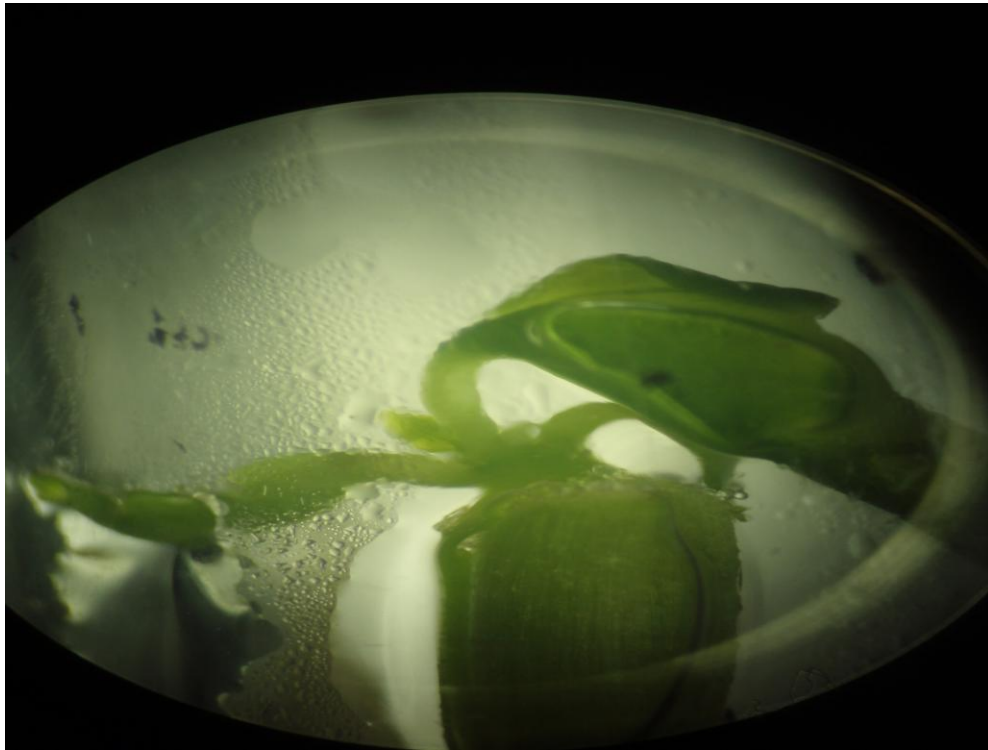


Figura 3.12 Fotografía de microinjerto de papaya-papaya realizado con la técnica de Mosella y Ascui. Ápice pretratado por 2 minutos en solución con 30 ppm de AIA. Vista al estereoscopio aumento 3X. 20 días después de realizado la microinjertación.

### 3.2.3 Corte del portainjerto

Mosella y Ascui sugieren en su técnica que el corte del patrón sea en forma recta, esto se debe a la dificultad para realizar otro tipo de corte ya que el mismo se realiza *in situ*. La técnica de Navarro *et al.* permite mejor operabilidad para probar diferentes tipos de corte en el portainjerto.

#### 3.1.3.1 Técnica de Navarro *et al.* (1979)

Los homo microinjertos de papaya realizados con tres diferentes cortes no demostraron diferencias significativas entre ellos (Figura 3.13). No obstante, Navarro *et al.* sugieren que los ápices deberían colocarse siguiendo la técnica de T invertida. En pruebas empíricas microinjertando chihualcán-chamburo se encuentran mejores resultados usando el corte recto y en hendidura en el patrón. No fueron posibles más pruebas con este injerto (chihualcán-chamburo) por la poca disponibilidad de plántulas de chamburo. A pesar de esto, es recomendable usar un corte recto o en hendidura en el patrón, para la microinjertación en vasconcellas, porque son procedimientos sencillos y evitan la deshidratación del ápice.

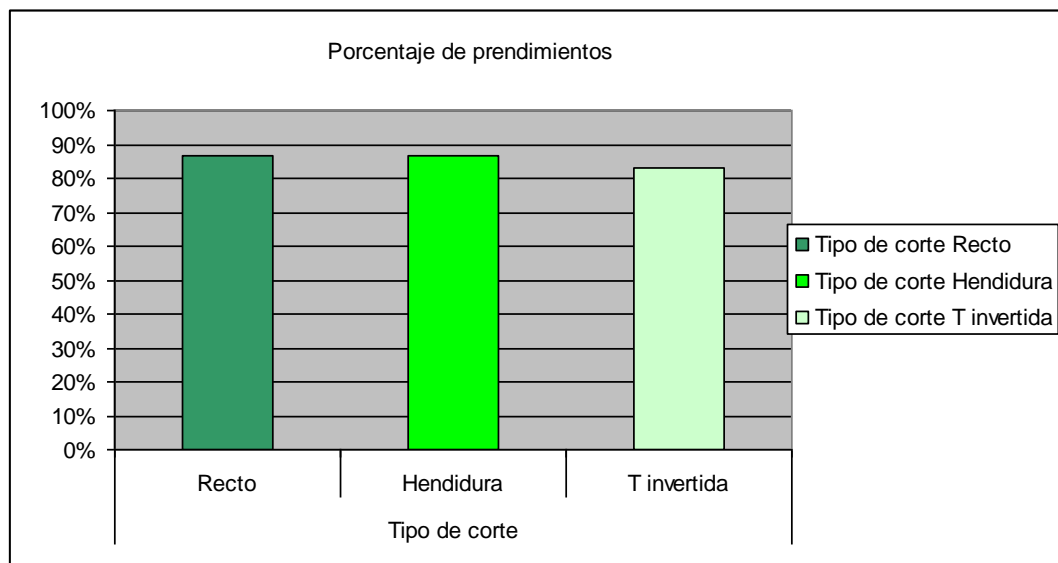


Figura 3.13 Gráfica del porcentaje de prendimiento de homo microinjertos de papaya según al tipo de corte en el patrón.

Los mejores resultados se encuentran cuando los cortes son rectos o con hendidura. (Figura 3.14).

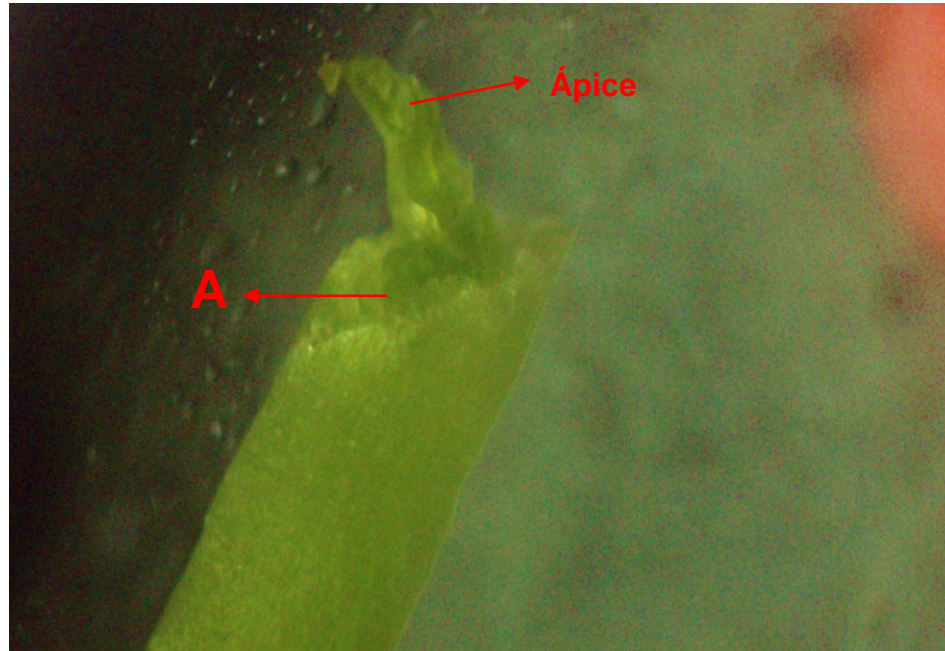


Figura 3.14 Fotografía de ápice de babaco microinjertado en plántula de chamburo. En el punto A se observa la formación de callo.

### 3.3 Prendimiento de los microinjertos babaco-papaya y chihualcán-papaya

En la presente investigación no se logró obtener la microinjertación de los ápices de babaco y chihualcán en patrones de papaya. En otras palabras, al no haber prendimiento en ningunos de los dos casos, no fue posible observar la presencia de hojas y la elongación del tallo de los injertos. La formación de callo fue sólo visible en los patrones y las muestras de tejido para los análisis histológicos no proporcionaron imágenes claras que permitiesen distinguir estructuras celulares.

Inicialmente, los ápices microinjertados presentaban una coloración verde oscuro, lo que denota la vitalidad del tejido (Figura 3.15). En lo posterior, a partir

de los seis días de realizado el injerto, la coloración del mismo cambió. Este problema es mucho más evidente en los injertos que se realizaron siguiendo la técnica de Mosella y Ascui (1984). Es así que después de 10 días de injertado, los ápices presentan una necrosis total (Figura 3.16).

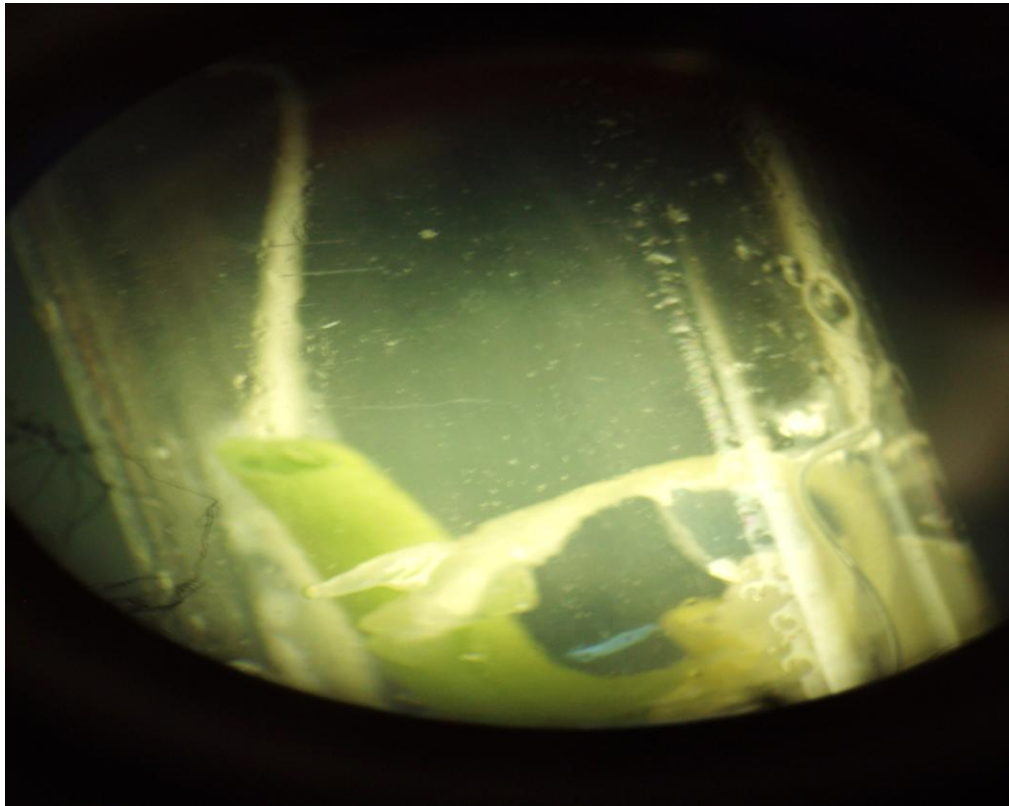


Figura 3.15 Fotografía de microinjerto babaco-papaya un día luego de injertado. Vista al estereoscopio aumento 3X.

Las plántulas de papaya, que fueron decapitadas para realizar el microinjerto, no presentaron daños en su estructura y se mantuvieron estables hasta 40 días después de realizado el corte. En el área de escisión se pudo presenciar la formación de un callo y la presencia de azúcares depositados en la misma. Los ápices no presentaron formación de callo. Debido a estos problemas de prendimiento, se realizaron microinjertaciones en las que se probaron tanto

medios, como pretratamientos de los ápices, tipo de corte del patrón y edad del portainjerto.

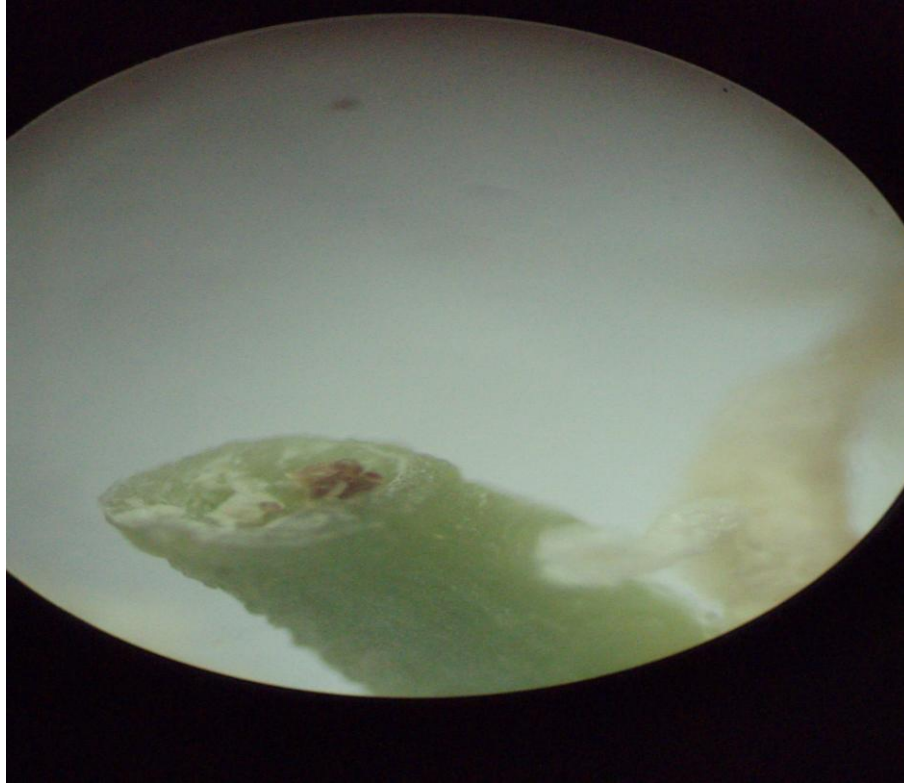


Figura 3.16 Fotografía de microinjerto babaco-papaya 20 días luego de injertado. Vista al estereoscopio aumento 3X.

En un principio se usó como medio para el desarrollo de la planta microinjertada, el propuesto por Pedroza y Perea (1990). Fue seleccionado este medio ya que en las pruebas hechas para la elongación de las plántulas de papaya, patrón del injerto, fue con el que se obtuvieron mejores resultados junto con el medio propuesto por Roque *et al.* (2001), que es exclusivo para papaya. Pero al probar en chamburo los medios, se encontraron mejores resultados con el de Pedroza y Perea (1990).

Es así, que las nuevas plantas microinjertadas, de babaco en papaya y chihualcán en papaya, fueron sembradas en los medios de Pedroza y Perea y en el medio de elongación propuesto por Roque. Los resultados obtenidos fueron



igual para los dos casos, es decir, no hubieron ápices microinjertados que se mantuvieran vivos más de 11 días. Los daños en los ápices se reconocían por la variación en la coloración de los mismos, estos iban desde el verde, que es el que tenía al microinjertarlo, pasando por una coloración amarilla, que se distinguía por la coloración del patrón, hasta un café oscuro, que demostraba la muerte del ápice (Figura 3.17).



Figura 3.17 Fotografía de microinjerto babaco-papaya. Visto en estereoscopio, aumento 3X.  
Presencia de coloración amarilla en el ápice.

Aguilar (1990) señala que al injertarse dos especies, las partes afectadas desarrollan inicialmente un callo. Esto quiere decir, que no existen células diferenciadas que permitan un intercambio de nutrientes desde el patrón hacia el ápice. Dicho en otras palabras, es necesario la diferenciación de las células callosas en haces vasculares, tanto en el injerto como en el portainjerto, para que su unión permita la formación de un solo tejido o soldadura entre las partes, lo que a su vez permita, la absorción de los nutrientes desde el medio hasta el injerto.

Mosella y Ascui (1984) sugieren que la edad ideal del patrón para la microinjertación es 5 días después de haber germinado. De igual forma, en las pruebas realizadas en este trabajo se tomó la edad de cinco como referencia para realizar los microinjertos. Sin embargo, basándose en la información de Navarro *et al.*, se probaron 2 diferentes edades de los portainjertos, las mismas fueron 15 y 30 días.

No se observó resultados favorables con estos cambios ya que tampoco hubo prendimientos entre babaco-papaya y chihualcán-papaya. Las edades de los patrones pudieran influir en el desarrollo del microinjerto como lo señala Navarro *et al.* (1979). En las pruebas realizadas en durazneros, encuentra que en las plantas jóvenes usadas como patrón, tienden a desarrollar precozmente el callo y que en las más viejas, no existe la humedad adecuada para el prendimiento del ápice.

Aguilar (1990) señala que la edad adecuada del patrón, en la microinjertación de cacao, es de dos semanas. Además advierte que las plantas mas viejas presentan mayor porcentaje de oxidación lo que finalmente no permite el prendimiento del ápice.

De igual forma, pese a que en ensayos preliminares con homo microinjertos de papaya se encontró mejores resultados en el prendimiento cuando los ápices se expusieron 2 minutos y 30 minutos, se repitieron los análisis para la microinjertación de babaco y chihualcán en papaya, utilizando ápices pretratados por 24 y 48 horas también

Los resultados con las pruebas realizadas no evidenciaron mejora alguna. El pretratamiento del ápice, como lo señalan Mosella y Ascui (1984), favorece el incremento de la multiplicación celular en la zona de corte, permitiendo la rápida

formación de callo en la misma. Esto ocurre por la presencia de la auxina presente en el medio.

Como se conoce, el tejido meristemático es un gran productor de auxinas, en especial ácido indolacético (AIA), necesarias para el desarrollo de la planta. Cuando es desprendido el ápice de la planta, esta capacidad de producción disminuye. Gil (1995) indica que al realizar un corte cercano al tejido meristemático del ápice, las células cercanas a la escisión se convierten en receptores de esta hormona.

Por esta razón, pretratar los ápices, debería mejorar el porcentaje de prendimiento de los microinjertos, como ocurrió en las pruebas realizadas por Mosella y Ascui (1984). Sin embargo, posiblemente en el caso de las vasconcellas, la auxina (AIA) utilizada no sea la que más favorezca el prendimiento del ápice en el patrón.

Se hicieron pretratamientos usando como regulador de crecimiento IBA, para encontrar la posibilidad del prendimiento de las vasconcellas, babaco y chihualcán, en patrones de papaya. En los resultados obtenidos tampoco se lograron prendimientos exitosos.

Al igual que en las pruebas previas en homo microinjertos de papaya, se probaron tres cortes: recto, hendidura y en T invertida. Aunque no se obtuvieron prendimientos exitosos, se observó que el ápice se mantuvo vivo por más tiempo cuando se hacía una hendidura en el patrón.

Aguilar (1990) obtuvo mejores prendimientos al microinjertar embriones somáticos de cacao, cuando los hacía en la hendidura que se realizaba previamente en el portainjerto. Señala además, que al colocar en una hendidura al ápice no sólo evita la deshidratación sino que permite una mejor conexión entre el ápice y el tejido vascular del patrón (Figura 3.18).

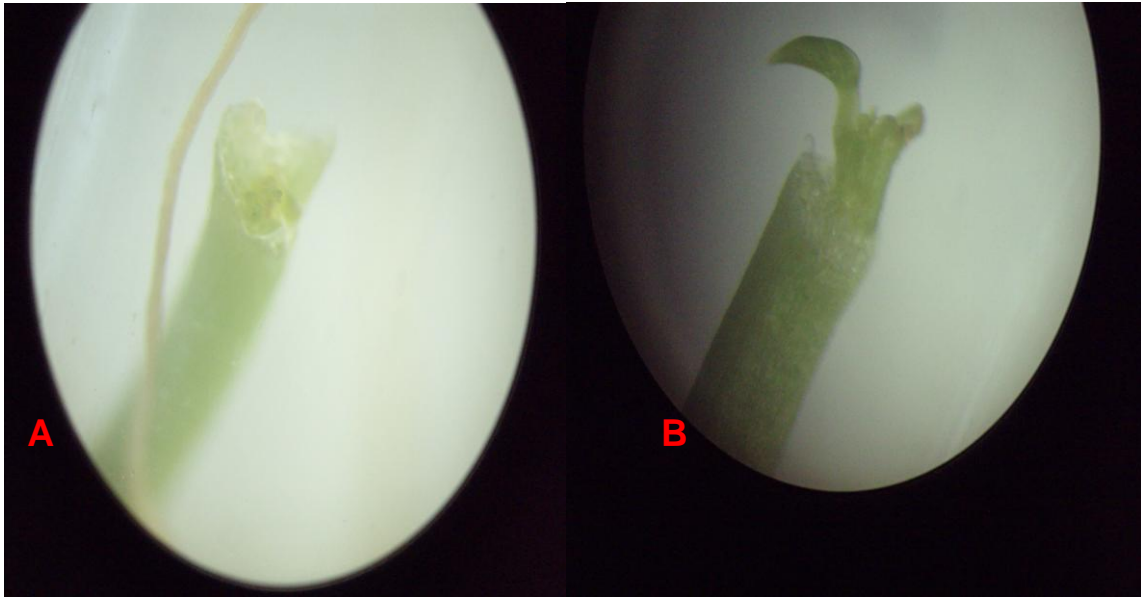


Figura 3.18 Fotografía de homo microinjerto papaya-papaya, corte en hendidura en el patrón. Vista al estereoscopio, aumento 3X.. A) Tres días de microinjertado. B) 22 días de microinjertado.

Es preciso señalar, que con las variantes en las técnicas de microinjertación realizadas a partir de la propuesta inicialmente por Murashige, se ha intentado mejorar los porcentajes de prendimiento y el manejo de la técnica, partiendo del hecho que con todas se ha encontrado prendimientos exitosos en las especies probadas como lo detallan Mosella y Ascui (1984), Navarro *et al.* (1975), Jonard *et al.* (1983) y Aguilar (1990).

Como se indicó anteriormente, se obtuvieron homo microinjertos de papaya con altos índices de prendimiento. Se suma a esto, el prendimiento de los microinjertos entre chamburo y chihualcán que afirman que los procedimientos de microinjertación pueden ser aplicadas a *vasconcellas*. Estos resultados descartan la posibilidad que la falta de prendimiento, se deba a errores en el manejo de las técnicas de microinjertación (Figura 3.19).

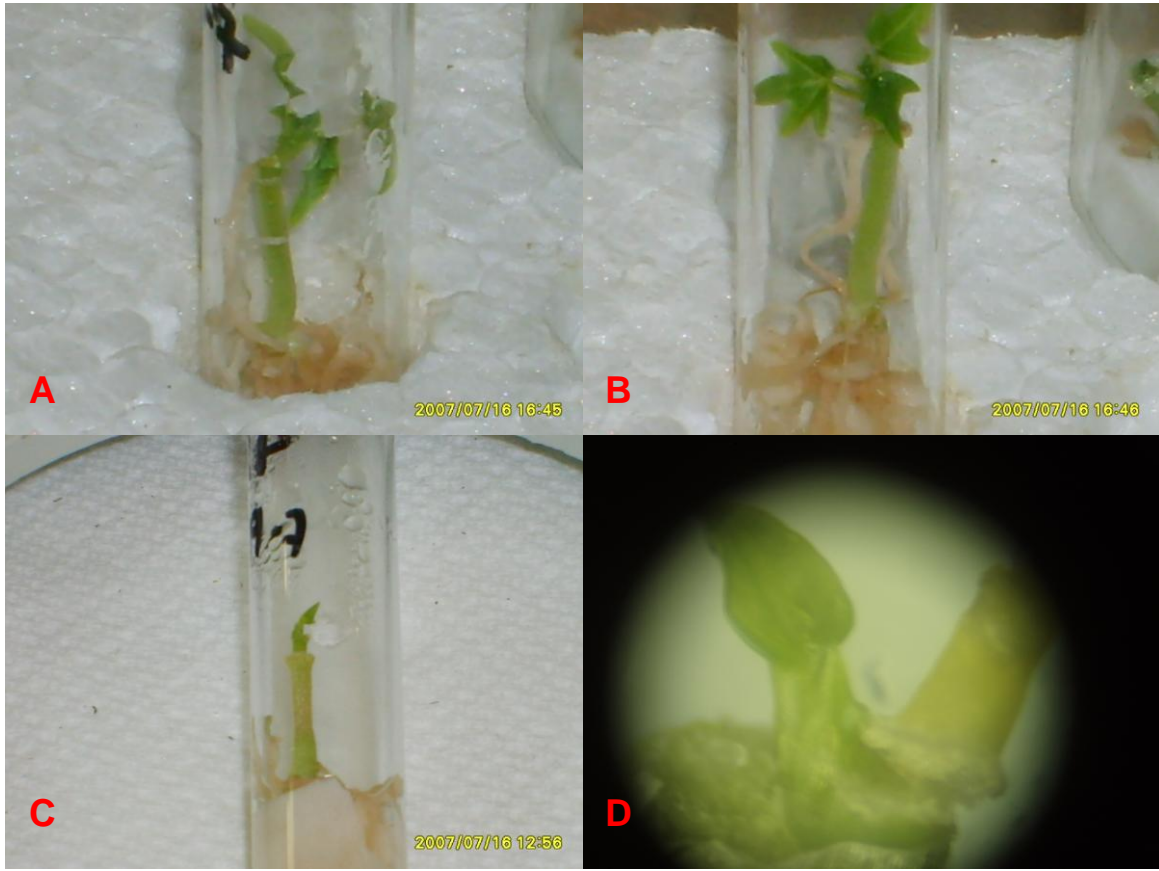


Figura 3.19 Fotografía de microinjertos realizados con la técnica de Navarro *et al.*. A) Microinjerto chihualcán-chamburo. B) Homo microinjerto de papaya. C) Microinjerto babaco-chamburo. D) Homo microinjerto de papaya, vista al estereoscopio aumento 3X.

La conexión entre el patrón y el ápice esta mediado principalmente por la compatibilidad entre los dos. Por este motivo se dice que un prendimiento es compatible cuando existe un total acoplamiento de las estructuras celulares tanto del injerto como del patrón (Aguilar, 1990). La compatibilidad de dos especies vegetales está relacionada con la cercanía genética existente entre las mismas.

Anteriormente, el babaco y la papaya pertenecían al mismo género *Carica*. Galarza (2001) afirma que el babaco es compatible con papaya en pruebas de injertación realizadas en campo. Sin embargo, no se tienen detalles de estudios histológicos y el comportamiento posterior del injerto de estos frutales.

Hoy se conoce, con la ayuda de la caracterización molecular de estas especies (Yaguache, 2003), que el babaco forma parte del género *Vasconcella*. La mayoría de los miembros del mismo, son conocidos como papayas de montaña y originalmente se desarrollaron en las zonas andinas (Scheldenman, 2000). Esta distancia genética entre papaya y babaco, hallada recientemente, pudiera sugerir una posible incompatibilidad entre las dos especies.

Zecca (1995) afirma que se ha demostrado la existencia de un tipo de incompatibilidad entre *Junglans regia* y *Junglas nigra* que después de 25 años produjeron la muerte del injerto. Este tipo de incompatibilidad se conoce como retardada. Señala además, que la mejor técnica para determinar la incompatibilidad de dos especies vegetales, es la microinjertación. Zecca (1995) manifiesta que el rápido crecimiento celular en la zona de injertación permite observar la formación de callo y la soldadura entre el patrón y el ápice.

Además, los sistemas de cultivo *in vitro* permite manejar las condiciones en los que se relacionan los injertos. Es decir, el control de temperatura, humedad relativa, posición del injerto en el patrón, contaminantes que pudieran perjudicar la soldadura del injerto, el control de sustancias oxidativas y el mejor aprovechamiento de reguladores de crecimiento que mejoran el crecimiento del injerto.

En los trabajos de Zecca (1995), la muerte de los microinjertos entre peral y membrillero y los bajos índices de prendimientos de los mismos, le llevaron a plantear la posibilidad que exista una incompatibilidad entre estos. Esto apoya lo indicado por Kollman y Glockmann (1985), quien señala como síntomas de incompatibilidad la muerte prematura del injerto y fallas en el prendimiento del mismo.

Sustancias químicas que no son producidas en plantas jóvenes de papaya y las vasconcellas (babaco y chihualcán), suelen ser fundamentales en la unión de

las células que intervienen en un injerto. Hartmann y Kester (1975), en estudios bioquímicos de injertos entre peral y membrillero, encuentran que algunas sustancias pueden determinar el éxito del prendimiento del injerto. Por ejemplo, la diferencia de concentración de lignina existente en las células de peral y membrillero, no permitieron una fuerte unión entre los mismos, lo que ocasionó el fracaso del injerto.

Es posible que los microinjertos que entre papaya y las vasconcellas, babaco y chihualcán, puedan existir sustancias que no pueden ser metabolizadas por los ápices y que producen su muerte. Breen (1974) al estudiar injertos entre rosáceas, familia a las que pertenece tanto el membrillero como el peral, comprobó que la producción de ácido cianhídrico por parte del patrón, no era degradada por el injerto y esto ocasionaba la muerte total del mismo por intoxicación. Así mismo, encontró algunas variedades de rosáceas que podían degradar ciertos porcentajes de esta sustancia y que por tanto no era tan letal en los tejidos del injerto y permitían que el prendimiento se establezca aunque pobremente (Zecca, 1995).

Los casos anteriormente citados pueden ser las razones para el fracaso del prendimiento de los microinjertos de babaco y chihualcán en papaya, además que permiten entender porque inicialmente el injerto en campo puede desarrollarse sin inconvenientes. Las células maduras de los dos frutales, podrían ofrecer mejores condiciones para el prendimiento. Otro motivo que apoya esta hipótesis, es el hecho que en la microinjertación se la realiza entre las células de los haces vasculares del patrón, en este caso papaya, y las células meristemáticas del ápice de babaco o chihualcán que se encuentran en constante multiplicación y no están diferenciadas. Por el contrario, la injertación en campo de babaco y papaya se realiza entre los haces vasculares de los dos vegetales adultos.

## CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES

- Las semillas sembradas desprovistas de su testa, germinan en menos tiempo que las semillas que se sembraron enteras. Sin embargo, el índice de germinación de semillas enteras es más alto.
- Las plántulas que se desarrollaron a partir de semillas desprovistas de su testa presentan tallos delgados y menor cantidad de raíces, mientras que, las semillas enteras desarrollan plántulas con tallos más gruesos y mayor número de raíces. Siendo estas características esenciales para realizar un buen injerto, las plántulas provenientes semilla enteras presentan mejores cualidades para el manejo de las técnicas de injertación, en especial en los cortes que se realizan en el patrón.
- Mientras menor es el tamaño del material vegetal que se intenta introducir, menor es la probabilidad de que se pueda contaminar el mismo. En babaco es adecuado utilizar explantes menores a 2 cm., siendo lo óptimo aquellos que no sobrepasan los 5 mm. de longitud.
- Los medios de elongación propuestos por Pedroza-Perea (1990) y el propuesto por Roque (2001), que se usaron en el desarrollo del microinjerto, son los más adecuados cuando se emplea a papaya (*Carica papaya*) y chamburo (*Vasconcella pubescens*) como patrones. Es decir, el medio ideal para cualquier microinjerto será el que permita un desarrollo del portainjerto en su estructura y en su sistema radicular, lo que garantizará la vitalidad del microinjerto.
- Los ápices sumergidos por 2 y 30 minutos, en soluciones ricas en auxinas, permiten obtener mayores porcentajes de prendimiento en pruebas realizadas en homoinjertos de papaya (*Carica papaya*) tanto con la técnica de Mosella y Ascui (1984), como la propuesta por Navarro *et al.*(1979).



- El corte recto o el corte con hendidura, que se realiza en el patrón, es el indicado para la microinjertación de *vasconcellas*.
- La microinjertación de babaco y chihualcán en papaya, aplicando las técnicas de Mosella-Ascui y de Navarro *et al.*, no es factible. El fracaso en el prendimiento se puede deber a una posible incompatibilidad entre las *vasconcellas* y papaya.

## CAPÍTULO 5: RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar pruebas de compatibilidad entre las vasconcellas, babaco y chihualcán, y papaya utilizando técnicas más precisas como la microinjertación entre callos, estudios histológicos y estudios bioquímicos de las mismas.
- Se sugiere intentar otras técnicas como la fusión de protoplastos de babaco-papaya y chihualcán-papaya, para obtener plantas con mejores características agronómicas.
- Realizar microinjertaciones de babaco y chihualcán utilizando patrones con linajes genéticos cercanos a estas vasconcellas, como chamburo (*Vasconcella pubescens*), toronche (*Vasconcella estipulata*) o *Vasconcella monoica*, que han demostrado brindar injertos en buenas condiciones y con baja susceptibilidad a *fusarium sp*, en pruebas de campo.
- Se recomienda también, desarrollar protocolos para la germinación de las vasconcellas anteriormente citadas. Así mismo, realizar ensayos para determinar la edad ideal del patrón para la microinjertación.
- Debido a que en campo se obtienen bajos índices por medio de multiplicación vegetativa de babaco, es necesario estandarizar los protocolos existentes para su propagación, ya que se ha encontrado dificultades en el manejo *in vitro* de este frutal. De igual manera, se debe desarrollar un protocolo de multiplicación *in vitro* de chihualcán.

## CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M. 1990. Obtención de Plantas de Cacao (*Theobroma cacao* L.) a partir de icroinjerto de Embriones Somáticos. Tesis MSc. Costa Rica, Turrialba, CATIE. 31 p.
- Albiñana L. 1985. Cultivo del aguacate, chirimoya, mango y papaya. Técnicas agropecuarias. Editorial AEDOS. Barcelona- España.
- Fernández, S; Nodals, A; Dibut, B. 2002. Estimulación de la germinación de semillas de Fruta bomba ( *Carica papaya*). Instituto de investigaciones fundamentales en agricultura tropical “Alejandro Humboldt. La Habana Cuba. Boletín informativo.
- Galarza, V. 2001. Estudio de la afinidad de especies de caricaceae como patrones de babaco (*Carica heilbornii pentagona*) y su reacción a *Fusarium*. Tesis de grado para Ingeniería Agronómica. Universidad Central del Ecuador. 98 p.
- Gedhardt, K; Goldbach, H. 1988. Establishment, grafo union characteristics; growth of *Prunus* micrografts. *Physiologia Plantarum*. 72: 153 – 159.
- Guerrero, D; Castro, S. 1999. El cultivo de babaco en Loja. Universidad Nacional de Loja, Proyecto VLIR. 34 p.
- Jiménez, E.1998. Generalidades del cultivo in Vitro. Instituto de Biotecnología de las plantas. Cuba. P:13-22.
- Jordan, M. 1986. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures in *Carica candamarcensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 7: 257-261.

- Jordan, M; Cortes, I; Montenegro, G. 1982. Regeneration of plantlets by embryogenesis from callus cultures of *Carica candamarcensis*. Plant Science Letters 28: 321-326.
- Jordan M. y Velozo J; 1996. Improvement of Somatic Embryogenesis in Highland-papaya Cell Suspensions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 189-194.
- Jonard, R; Macheix, J; Macheix, J. 1983. In vitro micrografting and its applications to fruit science. Sci Hortic 20: 147-159.
- Kollmann, R; Glockmann Ch. 1985. Studies on graft unions 1. Plasmodesmata between cells of plant belonging to different unrelated taxa. Protoplasma. 124: 224-235.
- Monzer, J; Kollman, R. 1986. Vascular connections in the heterograft *Lophophora williamsii* on *Trichocereus spchianus*. Jorunal of plan physiology. 123: 359 – 372.
- Moore, R. 1984. A model for graft compatibility - incompatibility in higher plants. American Journal of Botany. 71 (5): 752-758.
- Mosella, L; Ascui, L. 1984. Obtención de plantas frutales libres de virus a partir de ápices meristemáticos cultivados *in vitro*. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica 23:514-533.
- Mosse, B. 1962. Graft-incompatibility in fruit trees. Technical Communication No. 28. East Malling, Kent, UK: Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops.

- Murashige, T.; Bitters, W P.; Rangan,T.S.;Nauer,E.; Roistacher,CN.; Holliday,P.B. 1972. A technique of shoots apex grafting and its utilization toward recovering virus-free citrus clones. Hort. Science, 7(2): 118- 119.
- Navarro L (1988) Applications of shoot-tip grafting in vitro to woody species. Acta Hortic. 227: 43–55
- Navarro, L; Roistacher, C; Murashige, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free Citrus. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 100: 471–479.
- Olivares, J. (2000, Junio 29) Plantas resistentes a las enfermedades. Diario de Sevilla p. B2.
- Parkinson, M; Jeffree, C; Yerman, M. 1987. Incompatibility in cultured explant grafts between members of the Solanaceae. New Phytologist. 107: 489-498.
- Pedroza, J; Perea M. 1990. Propagación vegetativa “*In vitro*” del babaco (*Vasconcella heilbornii Babaco*) mediante proliferación de yemas caulinares e inducción de embriogénesis somática. Boletín científico 2(3):11-19.
- Peña, C. 2000. Adaptación de técnicas para la microinjertación a partir de meristemos de *Vitis vinifera* (Vid). Tesis para la obtención de título en Biología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Pérez, J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de plantas. Villa Clara, Cuba.
- Roque, A; Héctor, E; Vento, H; Godoy, L. 2001. Efecto de diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina y kinetina en el establecimiento in vitro de segmentos nodales de papaya (*Carica papaya*), cv. Maradol Rojo.

Revista "SCIENTIA ET TÉCNICA" No. 17. Diciembre 2001: 121-124. Colombia.

- Suquilanda, M. 1995. Papaya: Manual para la Producción Orgánica. FUNDAGRO, Quito, Ecuador. Agricultura Orgánica No 12. 39 pp.
- Yaguache, B. 2003. Diversidad genética y filogenia de los géneros Carica y Vasconcellea del Sur del Ecuador. Tesis de grado para Ingeniería Agrónoma. Universidad Nacional de Loja.
- Yerman, M; Brown, R. 1976. Implications of formation of graft union for organization in the intact plant Annals of Botany. 40; 1265 – 1276.
- Falconí, C; Brito, D. 2001. El Babaco. Servicio de información y censo agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería (SICA). Extrñado el 12 de abril del 2006, <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/frutas/babaco/babac.html>
- PROEXANT, 2000. Babaco. Producción de exportaciones de productos agrícolas no tradicionales. Visitada el 12 de octubre del 2006 [www.proexant.org.ec/HT\\_Babaco](http://www.proexant.org.ec/HT_Babaco)
- PROEXANT, 2001. Chamburo. Producción de exporciones de productos agrícolas no tradicionales. Visitada el 12 de octubre del 2006 [www.proexant.org.ec/HT\\_Chamburo](http://www.proexant.org.ec/HT_Chamburo)
- Sánchez, R. 2000. Manual del Chamburo. Programa Pichincha Compite. Consejo provincial de Pichincha. Consultado 23 de abril 2006. Disponible en:

[http://www.pichinchacompite.gov.ec/modules/biblioteca/documentos/Manual Chamburo.doc](http://www.pichinchacompite.gov.ec/modules/biblioteca/documentos/Manual_Chamburo.doc)

- Scheldenman, X; Romero, J. 2000. Potential of highland papayas (*Vasconcella* spp.) in southern Ecuador. Visitada 18 de abril del 2006. [http://www.lyonia.org/Archives/Lyonia%205\(1\)%202003\(1-100\)/Scheldeman,%20X.,%20%20J.P.%20Romero%20Motoche,%20V.%20Van%20Damme,%20V.%20Heyens%3B%20Lyonia%205\(1\)%202003\(73-80\).pdf](http://www.lyonia.org/Archives/Lyonia%205(1)%202003(1-100)/Scheldeman,%20X.,%20%20J.P.%20Romero%20Motoche,%20V.%20Van%20Damme,%20V.%20Heyens%3B%20Lyonia%205(1)%202003(73-80).pdf)
  
- SICA, 2001. Manual del babaco. Servicio de información y censo agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Visitada el 14 de abril del 2006, [http://www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/productos/babaco\\_mag.pdf](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/productos/babaco_mag.pdf)
  
- Zecca, A. 1995. Incompatibilidad del injerto peral – membrillo. Facultad de Ciencias Agrarias. Río Negro-Argentina. Visitada 25 de noviembre del 2007, <http://www.intecace.com.ar/articulos/incompatibilidad.htm>