



Ministerio
de Agricultura

Instituto Nacional
de Innovación Agraria



Micropropagación del Papayo (*Carica papaya* L.) Libre de Virus



MINISTERIO DE AGRICULTURA
INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA - INIA
ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGRARIA DONOSO - HUARAL

MICROPROPAGACIÓN DEL PAPAYO (*Carica papaya* L.) LIBRE DE VIRUS

Ing. M.Sc. Julio Olivera Soto

© INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA - INIA

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN AGRARIA

DIRECCIÓN DE EXTENSIÓN AGRARIA

Diagramación e Impresión:

Unidad de Medios y Comunicación Técnica

Primera Edición:

Diciembre, 2009

Tiraje : 500 ejemplares

Av. La Molina N° 1981, Lima 12 Casilla N° 2791 - Lima 1

Telefax: 3495631 / 3492600 - Anexo 248

Prohibida la reproducción total o parcial sin autorización

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N°: 2009 - 15683

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	5
2. VIROSIS DEL PAPAYO	6
3. MICROPROPAGACIÓN	7
3.1 Medio de cultivo.....	7
3.1.1 Composición del medio de cultivo.....	8
3.1.2 Preparación del medio de cultivo	9
3.2 Fase de inicio.....	9
3.2.1 Desinfección de explantes.....	9
3.2.2 Condiciones de incubación	10
3.2.3 Siembra del meristema.....	10
3.3 Fase de multiplicación.....	12
3.4 Fase de enraizamiento.....	13
4. ACLIMATACIÓN	16
5. DIAGRAMA DE FLUJO DE LAS FASES DE MICROPROPAGACIÓN DEL PAPAYO.....	18
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

1. INTRODUCCIÓN

El papayo (*Carica papaya* L.), es una especie semiperenne, dioica, de reproducción sexual. Se presentan plantas femeninas y masculinas, siendo las primeras las de interés comercial, por la mayor producción de frutos. También es común encontrar plantas con flores de ambos sexos.

La superficie cosechada de papayo en nuestro país al 2008 es de alrededor de 11 000 hectáreas, localizadas principalmente en la región selva, concentrándose la mayor área en el departamento de Ucayali, siendo uno de los cultivos de mayor importancia económica en esta zona. El rendimiento promedio a nivel nacional es de 14,2t/ha y en Ucayali 18,3t/ha según la OIA-MINAG.

El bajo rendimiento de esta especie se debe principalmente a que es afectada por virus que disminuyen drásticamente su rendimiento, muchas veces destruyendo plantaciones y también debido a que no se cuenta con variedades resistentes al virus. Como consecuencia se produce la disminución del rendimiento y baja calidad de los frutos obtenidos. Esta fruta tiene fuerte demanda por su alto contenido en vitaminas A, B1, B2, B3, C, además de un alto contenido de hierro.

Contar con un protocolo de micropropagación en papayo permite disponer de una importante alternativa de propagación y facilita su uso en trabajos de mejoramiento genético con fines de regeneración de material *in vitro*, debido principalmente al vigor que presentan las plantas de papayo que están libre de virus y otros patógenos. Para establecer un plan de producción de semilla de papayo es imprescindible el uso de material libre de virus para instalación de plantas madres en los viveros.

En esta publicación se recopila los resultados de investigación realizados en el laboratorio de biotecnología de la Estación Experimental Agraria Donoso - Huaral del Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA, durante los años 2004 - 2006, como parte del proyecto de papayo financiado por FONTAGRO "Desarrollo tecnológico para procesos de innovación con pequeños productores", ejecutado por especialistas del INIA, empleando la variedad PTM-331, que fue obtenida por el IIAP y seleccionada para este trabajo por sus buenas características de fruto y alto rendimiento.

2. VIROSIS DEL PAPAYO

El virus de la mancha anillada del papayo (Papayo Ring Spot Virus, PRSV) familia de los potyvirus, es el virus que más afecta a este cultivo a nivel mundial y está presente en nuestro país. Es muy destructivo y no hay forma de controlarlo una vez que ataca una plantación. También afecta especies de las familias: *Caricaceae*, *Cucurbitaceae* y *Chenopodiaceae*. La transmisión se realiza en forma no persistente a través de vectores que son diferentes especies de áfidos, afectando a plantas de cualquier edad.

El control de la virosis se ha intentado con roguing, prácticas culturales, cruzamientos para obtener variedades tolerantes y protección cruzada, sin que se haya obtenido un control efectivo. Aunque se han desarrollado variedades de papaya transgénicas resistentes a este virus, como el caso de "Rainbow" y "Sun Up" en Estados Unidos, estas no están permitidas para su comercialización en nuestro país de acuerdo a la legislación vigente.

El cultivo de meristemas y la micropropagación de plantas libres de virus permiten propagar material sano, el cual debe ser chequeado para la certificación correspondiente. La técnica más utilizada para detectar virus que actualmente se emplea es ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) o técnica inmunoenzimática. Estos test son relativamente de bajo costo y permite analizar muestras en protocolos simples de tejido meristemático o de cualquier otro tejido de interés para detectar la presencia de virus. Los antiseros de alta especificidad se pueden obtener para los virus que afectan este cultivo, principalmente para el PRSV.



Foto 1. Partículas virales del virus de la mancha anillada del papayo (PRSV).



Foto 2. Hojas de papayo de planta infectada con el virus de la mancha anillada (PRSV).

3. MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación se presenta como una alternativa para la propagación masiva de plantas madres de sanidad comprobada. Esta técnica se viene empleando en muchos cultivos, principalmente los de reproducción vegetativa, que por tener este tipo de reproducción transmiten enfermedades causadas por virus y otros patógenos de generación en generación.

Para el caso concreto del papayo, se han realizado diferentes trabajos de investigación a nivel mundial para estandarizar una técnica de micropropagación rápida y eficiente. Los resultados son muy variados, se han empleado diferentes explantes y diferentes variedades, que han determinado que se emplee distintos medios de cultivo y concentraciones de reguladores de crecimiento en cada fase de propagación.

3.1 Medio de cultivo

En trabajos anteriores realizados en micropropagación de papayo se han empleado diferentes medios de cultivo, entre ellos el MS o de Murashige y Skoog (Murashige, 1962) completo y a mitad de concentración, MS con otras vitaminas y otras variaciones. Por lo tanto, el medio de cultivo MS es el que se utilizó en este trabajo. Las modificaciones del medio de cultivo MS, se hicieron en el contenido de vitaminas, modificadas sin glicina. Se diferencia del medio formulado por Linsmaier y Skoog en 1965, conocido como LS, que lleva solo tiamina en concentración de 0,4 ppm. También se diferencia del medio formulado por Murashige y Tucker en 1969, que contiene tiamina 10 ppm, ácido nicotínico 5 ppm y piridoxina 10 ppm. En todos los casos la concentración de mio-inositol de 100 ppm no varía.

Es importante mencionar que también hay trabajos de investigación en la obtención de embriones somáticos como alternativa de propagación, para lo cual se ha utilizado contenedores de inmersión temporal denominados RITA®, en la cual se ha utilizado el medio líquido MS, pero con resultados limitados. Se optó por el método de micropropagación en sustrato semi-sólido por ser el más estandarizado y por ser el más utilizado actualmente

en diferentes países como Estados Unidos para la obtención de plantas genéticamente modificadas de papayo y en trabajos de mejoramiento genético.

3.1.1 Composición del medio de cultivo

La solución stock empleada se preparó de acuerdo a la formulación siguiente:

Cuadro 1. Medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) Modificado

Sales	Fórmula	Concentración mg/l
Nitrato de Potasio	KNO_3	1 900,00
Nitrato de Amonio	NH_4NO_3	1 650,00
Sulfato de magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370,00
Cloruro de calcio	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440,00
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	170,00
Cloruro de potasio	KI	0,83
Cloruro de cobalto	$CoCl \cdot 6H_2O$	0,025
Sulfato de manganeso	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,30
Sulfato de zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,60
Sulfato cúprico	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
Acido bórico	H_3BO_3	6,20
Molibdato de sodio	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
EDTA disódico	Na_2EDTA	37,30
Sulfato ferroso	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,80
Mio - inositol		100,00
Tiamina		0,4
Ácido nicotínico		0,5
Piridoxina		0,5

Los reguladores de crecimiento se agregaron de acuerdo a la fase de desarrollo de las microplantas. Se debe tener en cuenta que la respuesta de los diferentes cultivares a las combinaciones de reguladores de crecimiento y sus diferentes concentraciones es variada y puede cambiar aún al realizarse más subcultivos.

3.1.2 Preparación del medio de cultivo

El pH del medio de cultivo puede oscilar de 5,6 a 5,7 y se debe medir luego de haber agregado sacarosa al 3%. Seguidamente se agrega agar al 0,8 % como solidificante, pero también funciona la vermiculita como medio de soporte, como se verá en la fase de enraizamiento. El medio de cultivo preparado se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1,1 kg/cm². Se dispensa en tubos de ensayo de 100 x 25 mm para la fase de inicio y en cajas de polipropileno con tapas de policarbonato, mas conocidas como "magentas" o en frascos de vidrio para la fase de multiplicación y de enraizamiento, con alícuotas de 40 ml de medio de cultivo por recipiente.

3.2 Fase de inicio

3.2.1 Desinfección de explantes

Los explantes utilizados fueron yemas tomadas de plántulas germinadas de papayo a partir de semilla botánica en condiciones de invernaderos, sembradas en bandejas de germinación con sustrato a base de musgo durante 20 días. Se optó por este método, debido a que cuando se obtuvo yemas de plantas de campo, la contaminación con microorganismos externos y endofíticos es elevada, lo que corroboran diferentes trabajos de investigación. En esta fase realizada en condiciones de laboratorio de la EEA Donoso Huaral, después de seleccionar el material en invernadero, las yemas (foto 3) se separaron de las plántulas germinadas. Se llevaron a laboratorio y se lavaron con abundante agua de caño y jabón y luego se enjuagaron 3 veces con agua destilada. Luego se llevó el material a la cámara de flujo laminar, para trabajar en condiciones asépticas y así evitar contaminación.



Foto 3. Yema axilar de planta de papayo.

Las yemas se lavaron con etanol al 70 % durante 30 segundos y luego se sumergieron en hipoclorito de sodio al 2% + 1 gota de Tween -20 durante 10 minutos, seguidamente se enjuagaron bien tres veces con agua destilada esterilizada en autoclave. No se requiere agregar antioxidante por que las yemas se mantienen sin fenolización hasta que se siembran.

3.2.2 Condiciones de incubación

Las microplantas regeneradas a partir de meristemas deben permanecer en condiciones artificiales de incubación (foto 4) con temperatura promedio de 25 °C, que puede fluctuar de 23 °C a 27 °C, el fotoperiodo puede variar de 12 a 16 horas luz y la luminosidad se incrementa gradualmente con el desarrollo de las microplantas hasta alcanzar 3000 lux.



Foto 4. Cámara de incubación del laboratorio de cultivo de tejidos

3.2.3 Siembra del meristema

Con ayuda del microscopio estereoscópico se elimina los primordios foliares (foto 5) y finalmente se deja el meristema con dos primordios foliares (foto 6). Luego se procede a hacer la disección del tejido meristemático con ayuda del bisturí y se siembra en un tubo de prueba. Se coloca en la cámara de incubación hasta la regeneración. La temperatura promedio indicada para esta fase es de 25 °C. La intensidad de luz se aumenta gradualmente con el desarrollo de las microplantas, a pesar de que la fenolización es prácticamente nula.



Foto 5. Apice caulinar de papayo.



Foto 6. Meristema de papayo.

En esta fase el empleo del medio MS ha sido ampliamente usado con la combinación de auxinas y citoquininas que induce la formación de brotes laterales. En ensayos en el laboratorio de biotecnología de la EEA Donoso se probó diferentes combinaciones de reguladores, siendo los mejores resultados de regeneración cuando se suplementó el medio de cultivo con ANA (ácido naftaleno acético) 0,03 ppm + BAP (bencil amino purina) 0,1 ppm. La regeneración del meristema se logra en 8 a 10 semanas dependiendo del cultivar y en ese lapso se llega a formar la microplanta de 0,5 a 1,5 cm de longitud (foto 7 y 8).



Foto 7. Regeneración de meristema de papayo en medio de cultivo semisólido.



Foto 8. Microplantas de papayo en fase de inicio en medio de cultivo MS modificado.

3.3 Fase de multiplicación

Después de que las microplantas de papayo se han regenerado a partir del meristema se pasan a un medio de cultivo de multiplicación. Se siembran las microplantas en magentas (cajas de polipropileno) (foto 9) ó en frascos de vidrios (foto 10) con tapas de papel aluminio. Se siembra de 4 a 6 brotes por envase, dependiendo de la capacidad del mismo.



Foto 9. Microplantas de papayo 'PTM-331' instaladas en medio de cultivo de multiplicación.



Foto 10. Microplantas de papayo en fase de multiplicación con brotes múltiples.

El medio de cultivo que se utilizó es el medio MS, modificado en contenido de vitaminas y adicionado con reguladores de crecimiento del grupo de las citoquininas. La respuesta a la adición de reguladores de crecimiento es variada y en parte depende del cultivar que se está propagando. En promedio para el cv. 'PTM-331' se obtuvo 4-5 brotes por microplantas por subcultivo en 6 semanas promedio, observándose una tendencia a disminuir el número de brotes cuando se incrementa el número de subcultivos.

En general para diferentes cultivares en esta fase de multiplicación se logró un mayor número de brotes (foto 10) cuando se adicionó al medio de cultivo MS, BAP 0,2 ppm + KIN 0,1 ppm. Los parámetros de multiplicación se mantienen sin diferencia significativa en el segundo subcultivo si los brotes son grandes.

También se probó otras combinaciones de reguladores de crecimiento que muestran que a medida que se eleva la concentración de los mismos se induce la formación de callo (tejido no diferenciado) y deformación de hojas. Después de algunos subcultivos la tendencia es a formar brotes mas reducidos de tamaño en longitud y área foliar. Es necesario, en algunos casos pasar por una etapa de elongación, para lo cual, se debe pasar los brotes a un medio de cultivo de elongación conteniendo ácido giberélico en concentraciones de 0,5 a 1,0 ppm, durante un periodo de 20 a 30 días.

Durante la fase de inicio o la fase de multiplicación se presentó algunas veces un desarrollo anormal de las microplantas que se denomina "vitrificación". Esta anomalía se produce por la excesiva absorción de humedad de las microplantas al estar en contacto con el medio de cultivo. Las hojas se alargan en desproporción y presentan una apariencia traslúcida y empiezan a necrosarse y posteriormente muere el brote. Las microplantas que presentaron esta anomalía fueron descartadas.

3.4 Fase de enraizamiento

Culminada la fase de multiplicación se separaron los brotes y se sembraron en medio de cultivo de enraizamiento, para inducir la formación del sistema radicular. Esta fase conjuntamente con la aclimatación son críticas

para el establecimiento de las plántulas. Se ha utilizado diferentes auxinas para inducir el enraizamiento, tales como el Ácido Indol Butírico (AIB), Ácido Naftaleno Acético (ANA) y otros, sin embargo se observa que en algunos casos el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento también genera sistema radicular.

Es necesario cambiar la concentración de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo para inducir la formación de raíces. Para el cv. "PTM-331" en medio de cultivo MS semisólido se adicionó AIB de 1,0 a 2,0 ppm (foto 11). La formación de raíces fue menor que en vermiculita, observandose raíces gruesas y callo en la base.

Foto 11. Microplantas de papayo en medio de cultivo MS semisólido de enraizamiento.

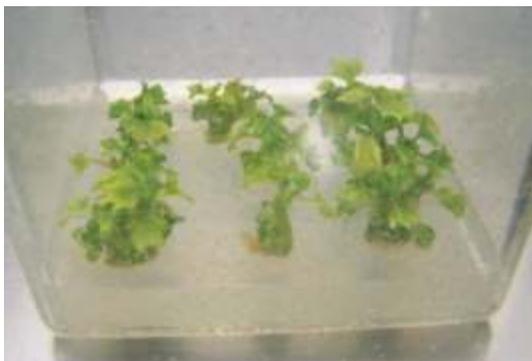


Foto 12. Esterilización por filtración de solución de AIB para enraizamiento de papayo.

Para la fase de enraizamiento se puede emplear el medio de cultivo solidificado con agar o se puede emplear el medio líquido y usando como soporte vermiculita. Para este último se debe introducir las microplantas en una solución de AIB de 1 a 2 %, esterilizada por filtración (foto 12), durante algunos segundos (foto 13) y luego sembrarlas en una magenta conteniendo vermiculita y medio de cultivo líquido (foto 14). En el medio de cultivo con agar las raíces son más gruesas, pero son menores en longitud y en menor cantidad. En cambio, en vermiculita las raíces primarias que proliferan tienen abundantes raicillas, lo que influye en el vigor y color de las hojas.



Foto 14. Siembra de microplantas en sustrato de vermiculita. →

← **Foto 13.** Inmersión de microplantas en ácido indol butírico.



El uso de la vermiculita también facilita la limpieza de las raíces al momento de extraer las microplantas de los contenedores en que se mantuvieron en la cámara de incubación. La formación del sistema radicular se logra en 8 semanas promedio en ambos casos.

4. ACLIMATACIÓN

Las microplantas de papayo enraizadas, se extrajeron del medio de cultivo de condiciones asépticas (foto 15). Se lavaron bien las raíces y luego se sembraron en bandejas de almácigo o en bolsas de plástico negras conteniendo sustrato pasteurizado (foto 16). Se puede utilizar como una alternativa sustrato comercial a base de turba de musgo sphagnum mezclado con vermiculita y yeso agrícola "Premix 3"; (foto 17). También se puede usar como sustrato fibra de coco de textura fina "Golden mix". De no contar con estos sustratos comerciales, se puede probar con musgo de altura ó humus mezclado con arena de río, previamente lavado para evitar problemas de presencia de sales.

Foto 15. Proliferación de raíces en sustrato de vermiculita.



Foto 16. Plántula enraizada en vermiculita lista para aclimatación.

Al final del periodo de aclimatación, que puede durar entre 20 a 40 días, ó en menor tiempo en época de calor, las plántulas se encuentran listas (foto 18) para ser trasladadas a terreno definitivo.

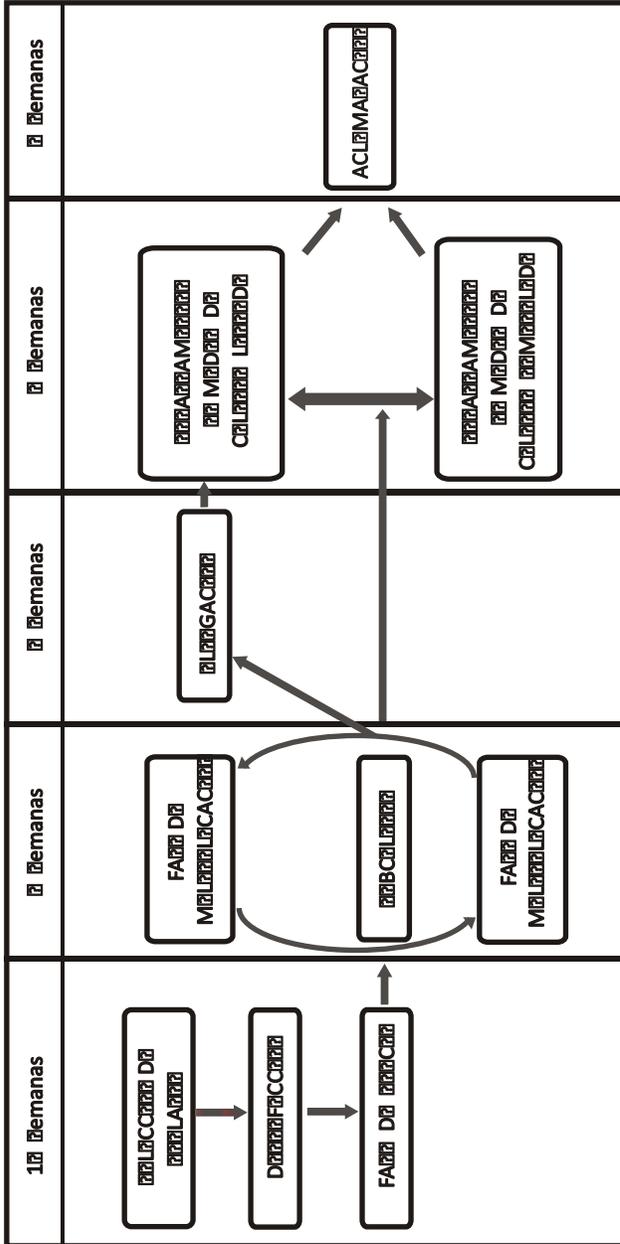


Foto 17. Plántulas de papayo en sustrato de aclimatación.



Foto 18. Plántulas de papayo aclimatadas en invernadero.

5. DIAGRAMA DE FLUJO DE LAS FASES DE MICROPROPAGACIÓN DEL PAPAYO



6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CARBAJAL C.; REMUZGO R. 2007. Guía técnica del cultivo de papayo. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP).p.40.
2. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M. Mroginski, L. A.(Eds.). Cali, Colombia.p.xii,970.
3. GEORGE E.F.1996. Plant propagation by tissue culture. Part 2. In practice. Ed. Exegetics Ltd. England.p.1022 1025.
4. INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS. 1998. Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Perez Ponce, J. N. (Ed.). Santa Clara, Cuba.p.400.
5. LINSMAIER E. M. & SKOOG F.1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. V 18.P.100 127.
6. MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2007. Anuario de Estadísticas Agropecuarias. Dirección General de Información Agraria. Lima Perú.p.201.
7. MURASHIGE T. & SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. V 15.p. 473 497.