



INFORME TÉCNICO Y DE GESTIÓN

EJECUTOR: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

NOMBRE DEL PROYECTO:

Obtención de plantas de papayos (*V. pubescens*) con sexo definido mediante un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual usando herramientas biotecnológicas y caracteres morfológicos asociados e identificables por los usuarios y a través del perfeccionamiento de la propagación agámica.

CODIGO: PYT-2011-0060

INFORME FINAL

ANGÉLICA SALVATIERRA GONZÁLEZ
NOMBRE Y FIRMA COORDINADOR PROYECTO

USO INTERNO FIA	
FECHA RECEPCION	



II. RESUMEN EJECUTIVO.

El cultivo del papayo es un frutal típico de la región de Coquimbo donde se concentran las plantaciones. La superficie nacional ha sido fluctuante por la rentabilidad del cultivo, que en algún momento afectó principalmente a productores pequeños, los que han dejado de producir, permaneciendo principalmente aún en el rubro, agricultores de tradición en el papayo. Existen algunas iniciativas en el área de la industrialización, que permite vislumbrar algunas otras alternativas que pueden contribuir a mejorar la rentabilidad del cultivo.

Desde el punto de vista técnico, este cultivo tiene una falencia de información, lo que impide proponer mejoras agronómicas, a pesar de que se ha avanzado en algunos aspectos de postcosecha y, propiedades y uso del látex que se obtiene de los frutos.

Uno de los problemas, que se identificó en este proyecto, es el polimorfismo sexual de las plantas, como un factor de heterogeneidad que influye en la producción. Para ello se propuso detectar tempranamente la expresión sexual de las plantas, pero esto no fue posible debido a que no se pudo discriminar molecularmente el sexo de las plantas. Sin embargo, se han identificado algunas prácticas promisorias, dentro del período de proyecto, que permiten disminuir el riesgo de plantas machos improductivos. Se trata del reemplazo de raleo de plantas machos por la injertación de las mismas con material de plantas hembras. Una segunda practica es la producción de plantas a partir de semillas provenientes de plantas hembras polinizadas por flores de plantas ambisexuales. Parte de este material vegetal se estableció en huerto de agricultor de Altovalsol.

Una tercera técnica posible es la propagación in vitro, utilizando los protocolos generados en este proyecto.

Estas prácticas que se han visualizado de manera promisoriosa durante el desarrollo del proyecto, necesitan ser evaluadas en un horizonte de mayor plazo y también en términos de los costos que ello represente y los eventuales incrementos en la productividad.

III. INFORME TÉCNICO.

1. Objetivos del Proyecto.

Este proyecto pretendía desarrollar por una parte un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual en plantas y semillas mediante herramientas biotecnológicas y caracteres morfológicos asociados, identificables por los usuarios. Para ello se establecieron dos objetivos específicos: determinar marcadores moleculares en *V. pubescens* que se asocien al sexo de plantas y establecer caracteres morfológicos de plantas jóvenes y semillas sobre la base de marcadores moleculares ligados al sexo de plantas.

Esto no fue posible, debido principalmente a que los marcadores moleculares utilizados no discriminaron entre los sexos de las plantas. A nivel de carácter morfológico se detectaron algunas diferencias a nivel de semillas plántulas y en las hojas adultas, pero no fue posible asociar estas diferencias a un determinado sexo, ya que la expresión floral de las plantas derivadas de cruzamientos dirigidos, durante el período de duración del proyecto, no se alcanzó.

Los cruzamientos dirigidos permitieron postular una propuesta para evadir el polimorfismo sexual. Esta es seleccionar frutos de plantas hembras, como fuente de semillas, previa eliminación de plantas machos, dejando las plantas ambisexuales como fuente de polen. Así, de esta manera se puede tener sólo plantas hembras y ambisexuales.

La imposibilidad de discriminar entre los sexos de las plantas, fue un riesgo tecnológico que se identificó en la propuesta original, por eso se estableció perfeccionar la propagación vegetativa de plantas de sexo definido por medio de técnicas nuevas y convencionales.

Inicialmente se había propuesto la germinación in vitro como una herramienta para la propagación de cruzamientos dirigidos. Sin embargo, también se incursionó en la probabilidad de propagar a partir de yemas de plantas de sexo conocido, como una posibilidad de subterfugio al polimorfismo sexual, debido a que no se logró correlacionar las diferencias morfológicas encontradas en plantas, plántulas y semillas con caracteres moleculares asociados al sexo de la planta. Entonces, se generó un protocolo de propagación in vitro, que a la fecha no estaba disponible, resolviéndose temas como la desinfección de los explantes, la vitrificación y el enraizamiento de brotes. Para esto, se solicitó extensión del proyecto y se contrató la asesoría de experto Sr. Julio Olivera de INIEA de Perú, quien contribuyó en los puntos críticos mencionados más arriba (Anexo III).

Por otra parte, también se consideró el enraizamiento de estacas y de injertación, mostrando que son técnicas posibles pero que se debe solucionar la disponibilidad de material madre. La injertación es una práctica que puede ayudar a sobrellevar el polimorfismo sexual,

proponiéndose injertar sobre plantas machos, en el momento de raleo, con púas de plantas hembra o ambisexuales.

Una de los objetivos que no se pudo realizar fue en relación a la capacitación de viveristas y agricultores en general, dado que no se tuvo el protocolo esperado. La información generada fue divulgada en el seminario final del proyecto.

Por último, se incorporan dos objetivos más, una fue la determinación de las causas de la disminución de la superficie de papayos y la evaluación económica actualizada del sistema de cultivo actual (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cuantificación relativa del cumplimiento de los objetivos.

Objetivos	Grado de cumplimiento (%)
Determinar marcadores moleculares en <i>V.pubescens</i> que se asocien al sexo de plantas.	0
Establecer caracteres morfológicos de plantas jóvenes y semillas sobre la base de marcadores moleculares ligados al sexo de plantas.	50
Evaluar diferentes alternativas de técnicas de propagación in vitro e in vivo de plantas de sexo determinado aplicando nuevas herramientas.	100
Capacitar a nivel de viveristas y agricultores sobre el reconocimiento de caracteres morfológicos asociados al sexo en plantas a temprana edad y sobre técnicas de propagación.	50
Comparar en términos productivos y económicos el sistema productivo actual con un nuevo sistema que incorpore las innovaciones desarrolladas por el proyecto (objetivo incorporado).	50
Establecer las causas de disminución de la superficie del cultivo de papayos (objetivo incorporado).	100
Generar un protocolo de propagación in vitro (objetivo nuevo).	100

2. Metodología por objetivos del Proyecto.

Objetivo 1: Determinar marcadores moleculares en *V. pubescens* que se asocien al sexo de las plantas.

La metodología se encuentra en detalle en Anexo I. Los problemas metodológicos encontrados se relacionan principalmente con los marcadores moleculares seleccionados los cuales si bien amplificaron para las muestras de ADN, no discriminaron entre los sexos de las plantas.

Objetivo 2: Establecer caracteres morfológicos de plantas jóvenes y semillas sobre la base de marcadores moleculares ligados al sexo de las plantas.

Caracterización morfológica en plantas adultas.

Para el establecimiento de caracteres morfológicos se procedió a marcar plantas adultas de sexo definido en huertos de agricultores. En las parcelas de asociados: Altovalsol de Elicio Moraga y Las Rojas de Marino Ruíz (Agrícola Saturno) se marcaron plantas de sexo definido por el agricultor. En el caso de Altovalsol, esta labor se realizó en el mes de septiembre del año 2011 sobre un huerto de plantas que en ese momento tenía 6 meses de edad, donde aún no se había empezado a eliminar las plantas machos, por lo que fue posible marcar y dejar en huerto 4 de estas plantas, además de 5 plantas hembra y 5 plantas ambisexuales. La marcación se realizó a través de estacas y dentro de cada grupo de plantas que constituyen la unidad, la planta elegida se marcó con una cinta de color (Figura 1). En el caso de Las Rojas, las plantas de una edad de 2 años, ya estaban en producción y la labor de eliminación de machos ya se había realizado por lo que solo se marcaron 5 plantas ambisexuales y 5 plantas hembras.



Figura 1. Planta hembra de papayo marcada para su diferenciación en huerto de Altovalsol.

El marcado de estas plantas se realizó para efectuar la caracterización morfológica, los cruzamientos dirigidos, cosecha de frutos y la extracción de hojas para la caracterización molecular.

En las plantas marcadas se caracterizó tallo, peciolo y foliolos, en base a algunos caracteres de las normas UPOV (2010) para *Carica papaya*, la caracterización morfológica de caricacea en altura de Cadavid et al. (2002) y parte de los descriptores utilizados por Kyndt et al. (2005) en caracterización morfológica de *Vasconcellea*. Con estos descriptores, se elaboró la pauta de caracterización (cuadro 2).

Cuadro 2. Pauta de caracterización de tallo de *Vasconcellea*.

Caracteres del tallo	Medición	Observaciones
Color del tallo.	Solo verde, verde amarillento, marrón, verde púrpura, solo púrpura.	
Altura inserción primera inflorescencia.	cm	Figura 2
Ramificación.	Ausente o presente.	Deberá observarse al comienzo de la floración.
Diámetro del tallo.	mm	Deberá observarse a la mitad de la altura del tallo y comienzo de la floración.
N° de nudos del tallo.	Número.	Desde el suelo hasta la primera flor.
Longitud de entrenudos.	cm	A mitad de camino entre suelo y primera inflorescencia.

Los caracteres anteriores fueron aplicados en plantas macho, hembra y hermafrodita de papayo cuando tenían aproximadamente 10 meses de edad, en el huerto de Elicio Moraga en Altovalsol.

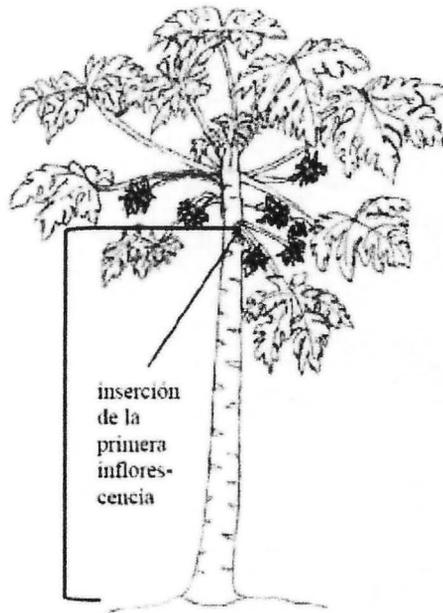


Figura 2. Carácter inserción de la primera inflorescencia.

a. Pauta de caracterización de limbo y peciolo de *Vasconcellea*

Cuadro 3. Pauta para evaluar limbo y peciolo de *Vasconcellea*.

Sexo	N° Hoja	Limbo (cm)		Peciolo		Lamina		Ápice	Base de la Hoja	Largo de la base (vena primaria cm)	Margen de la hoja			Base del Lóbulo 1° con 2°		
		Largo	Ancho	Longitud (cm)	Pigmentación antocianica (Ausente/ Presente)	Altura Ondulación (cm)	Simetría (n° de lóbulos en ambos lados)				Planas	Casi planas	Fuertemente resolutas	Margen (ondulado, liso, girado, otro)	No se estrecha sobre la unión	Se estrecha sobre la unión en el lóbulo apical

Sexo	Lóbulos basales			Categorías de las venas 1°			Categorías de las venas 2°			Categorías de las venas 3°			Nervadura central prolongada		Grosor relativo de venas secundarias (mm)		
	N° Hoja	No se superponen	Se superponen	No aplicable	Palmitenervia	Pinata	Reticulada	Palmitenervia	Pinata	Reticulada	Palmitenervia	Pinata	Reticulada	Ancho en unión de venas primarias (mm)		Ausente	Presente

Sexo	N° Hoja	Número		Conexión entre las venas primarias y secundarias		Conexión entre las venas secundarias y terciarias		Pubescencia de la hoja (haz)			Pubescencia de la hoja (envés)			Estipulas espinosas			
		Basales Primarias	Basales secundarias de un solo lado	Basales terciarias de un solo lado	Indistinto	Distinta	Indistinto	Distinta	Abundante	Mediana	Poca	Abundante	Mediana	Poca	Ausente	Sin espinas	Con espinas

Caracterización morfológica en semillas y plántulas

Para la caracterización de semillas y plántulas, se utilizó cruzamientos dirigidos entre flores de diferente condición sexual. A nivel general se habla de tres sexos en los papayos del género *Vasconcellea*: hembra, hermafrodita (ambisexual) y macho, que dan origen a su vez a tres tipos de árboles: árboles hembras, ambisexuales y machos. En base a esta información se realizaron diferentes cruzamientos (Cuadro 4), para estudiar el tipo de descendencia que ellos originarían y buscar diferencias morfológicas entre plantas provenientes de estos cruzamientos.

Cuadro 4. Cruzamientos dirigidos entre los distintos tipos de flores de *Vasconcellea pubescens*.

	Flor macho de árbol macho.	Flor macho de árbol hermafrodita.	Autopolinización.
Flor femenina de árbol femenino	CR1	CR2	CR6
Flor femenina de árbol hermafrodita	CR3	CR4	CR7
Flor hermafrodita de árbol hermafrodita	-	-	CR5

La polinización se realizó en Altovalsol, en parcela de Elicio Moraga entre los meses de octubre y noviembre del 2011, hasta enero del 2012. La extracción de polen se realizó en la tarde anterior a la polinización, sacudiendo la flor masculina de plantas machos y ambisexuales sobre un frasco oscuro. Este polen se almacenó en refrigerador hasta ser utilizado. Sobre 5 árboles hembras y 5 ambisexuales, se seleccionaron las flores a ser polinizadas (Figura 3) y en cada árbol se polinizaron 5 flores con pincel como se observa en la Figura 4. Posteriormente se colocó una bolsa de papel para que la flor polinizada no se contamine con otro polen (Figura 5).

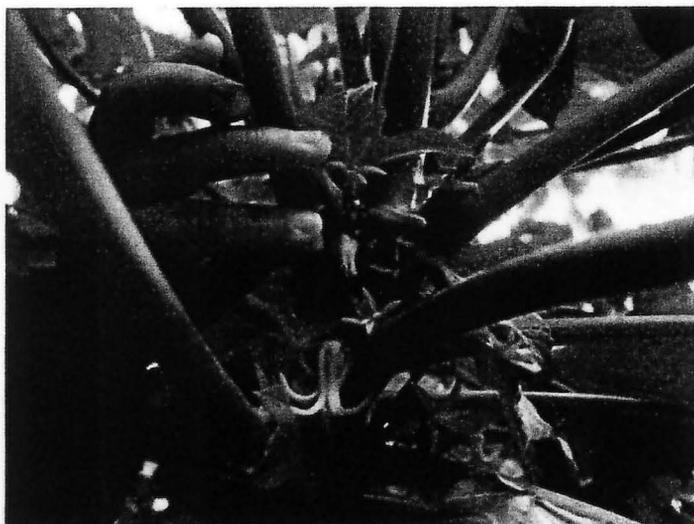


Figura 3. Flor femenina en estado de recepción de polen.



Figura 4. Colocación de polen sobre flor femenina.



Figura 5. Aislación de flores polinizadas en forma dirigida.

Una vez que se desarrolló el fruto, se retiró la bolsa de papel y se esperaron aproximadamente seis meses para la cosecha (Figura 6).



Figura 6. Fruto proveniente del cruzamiento 4, flor macho de árbol hermafrodita, poliniza a flor femenina de árbol hermafrodita.

Los frutos provenientes de cruzamientos fueron cosechados, se evaluaron en relación a:

Diámetro ecuatorial, diámetro polar, número de semillas, peso de frutos, peso de la pulpa, peso de semillas, con el objeto de evaluar posibles diferencias entre frutos.

Posteriormente, las semillas de estos frutos fueron contadas y evaluadas en base a los siguientes caracteres:

- Color semillas según Munsell
- Ancho de semillas
- Largo de semillas
- Radio largo/ancho
- Forma de la semilla (Alargada, ovalada, redondeada)
- Aspecto de la semilla

Las semillas provenientes de estos cruzamientos, fueron pregerminadas in vitro, para evaluar desarrollo radical y cotiledón. Los caracteres medidos fueron:

- Color raíz (Blanco=1, café=2).
- N° de raíces.
- Longitud (mm).
- Ancho cotiledón (mm).
- Largo cotiledón (mm).
- Textura cotiledón (Rugosa=1, Lisa=2).
- Nervadura del cotiledón (Marcada=1, - lisa=2).
- Color cotiledón (Munsell: Dark olive green=5GY-3/4= 1, Olive green =5GY-4/4= 2, Light olive green=5GY-5/4=3).
- Altura desde raíz a inicio de cotiledón (mm).

Por último, estas plantas pregerminadas, se traspasaron a bolsas de propagación con turba y fueron evaluados los primeros cuatro pares de hojas en los siguientes caracteres:

- Pubescencia al tacto.
- Separación entre nudo.
- Largo (mm) de la nervadura central.

Todos estos caracteres fueron sometidos a análisis de varianza por grupos y test de separación de medias (Duncan). Luego, todos los caracteres se combinaron en un análisis multivariado para generar un dendrograma de separación de sexos y agrupación de caracteres.

Principales problemas metodológicos enfrentados

El principal problema metodológico fue que las plantas definidas por el agricultor como plantas macho, realmente eran plantas ambisexuales, que debido a la época en la que se realizó la selección de plantas (invierno) solo tenían flores masculinas, pero que en primavera y verano se expresaron además las flores femeninas.

Los análisis realizados, sobre estas plantas fueron desechados, ya que solo una de las cuatro plantas definidas como macho, resultó ser realmente macho.

Para la polinización dirigida significó que solo se efectuaron dos tipos de cruzamientos: flores femeninas de plantas hembras polinizadas con polen de plantas ambisexuales y flores femeninas de plantas ambisexuales polinizadas con polen de flores ambisexuales, de manera que se analizaron las diferencias solo entre estos grupos de cruzamientos.

También, la polinización dirigida fue más lenta de lo programado debido a la imposibilidad de colecta de polen por la presencia de neblinas.

Otro problema metodológico es que aquellos caracteres en los que se encontrara diferencias significativas, se planteó contrastarlos con los resultados del análisis molecular, para determinar si eran caracteres asociados al sexo que pudieran servir como descriptores del sexo de la planta antes de la floración. Como los análisis moleculares utilizados, no arrojaron ninguna diferencia entre los tres sexos de *Vasconcellea*, esto no pudo ser realizado.

Adaptaciones o modificaciones introducidas

Se incluye el seguimiento de la floración a lo largo del año para definir si la proporción de flores de los distintos sexos presentes en una inflorescencia de planta hermafrodita, varía, relacionándose con la temperatura o humedad del aire.

Esto se hace igualmente en las plantas machos, y se incorporó un segundo sector con condiciones climáticas distintas, ubicado en Algarrobito, a partir de Febrero de 2012.

También para la caracterización de plantas adultas, se incluye a Don Herman Zandonnai, quien por manejo tradicional de sus huertos no elimina a las plantas machos y se realizó evaluación sobre estas plantas de los tres sexos de los caracteres indicados. Se encontraron diferencias significativas para varios caracteres.

En cuanto a la polinización dirigida se amplió el número de cruzamientos entre flores de distinto sexo.

Dado que los resultados no permiten cumplir con el resultado esperado, plantas provenientes de los cruzamientos, se llevaron a campo. Se evaluó el número de plantas hembras, ambisexuales o machos que resultaban de los cruzamientos. Los resultados permiten sugerir una estrategia para obtener plantas hembras en campo, a través de cruzamientos dirigidos.

Seguimiento de la Floración en plantas hembras y ambisexuales.

En Altovalsol y en Algarrobito, se seleccionaron tres racimos florales terminales de tres plantas hermafroditas independientes (Figura 7), y tres plantas machos, con desarrollo similar y en la misma hilera de plantación. En la base del racimo se colocó un colector de las flores que vayan abortando.

Los racimos son monitoreados semanalmente, contabilizando el total de flores desarrolladas en ese momento (sobre 15 mm de largo), identificándose el sexo de flores. Estas fueron colectadas tres veces por semana, y fueron almacenadas en un cooler y llevadas a laboratorio para abrir y ver el interior de ellas para verificar que el sexo estimado estaba en lo cierto. Este seguimiento se hace hasta que abortan la mayoría de las flores y comienza la fructificación. En forma conjunta se instaló un HOBO, en ambas parcelas, para monitorear temperatura y humedad relativa (Figura 8). Esto se realizará en las distintas floraciones del año y se relacionará con las variables monitoreadas en cada caso.



Figura 7. Canasto recolector de flores abortadas de una inflorescencia de planta hermafrodita.

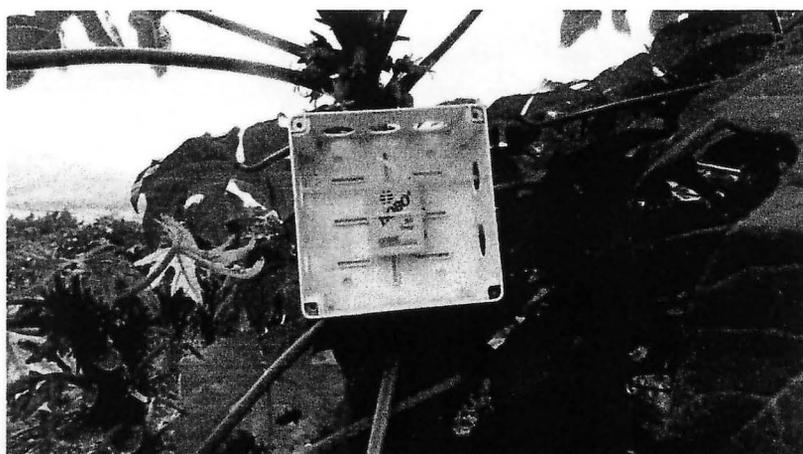


Figura 8. HOBO Instalado en parcela de altovalsol para relacionar floración con condiciones ambientales.

Objetivo 3: Evaluar diferentes alternativas de técnicas de propagación de plantas de sexo determinado aplicando nuevas herramientas.

Multiplicación de semillas in vitro.

Para acelerar el proceso de desarrollo de plantas de sexo conocido, se propuso como objetivo del proyecto evaluar el sistema de multiplicación in vitro en *Vasconcellea*, utilizando para ello semillas provenientes de cruzamientos dirigidos. Esto además permitiría contar rápidamente con material que sería utilizado para extracción de ADN y validación de sexo. El protocolo de

propagación in vitro de *Vasconcellea* a través de semilla, según desinfección del explante y medio MS modificado con reguladores se detalla en Anexo II.

La metodología utilizada consistió en:

- a) Determinación de protocolo para desinfección de semillas.

Se evaluaron diferentes dosis de aplicación de hipoclorito de sodio, inmersión en alcohol, tiempo de desinfección de las semilla con testa o sin ella. Las evaluaciones consistieron en porcentaje de contaminación y de sobrevivencia de semillas, los cuales fueron registrados a las 10, 20 y 30 días.

Tratamientos.

- T1. Inmersión en alcohol por 2 minutos y enjuague 3 veces en agua destilada estéril. Semillas sin testa.
- T2. Inmersión en alcohol por 1 minuto; cloro al 1% x 5 minutos, enjuague 3 veces agua destilada estéril. Semillas con testa partida.
- T3. Inmersión en alcohol por 1 minuto; cloro 1% x 12 minutos, enjuague 3 veces agua destilada estéril. Semillas sin testa.
- T4. Inmersión en alcohol por 1 minuto; cloro al 1% x 20 minutos, enjuague 3 veces agua destilada estéril, con semillas con testa.

Repeticiones: 30 repeticiones por tratamiento.

Dado que los resultados mostraron que se debía trabajar sin testa, se procedió a evaluar tiempo de desinfección.

Tratamientos

- T0 (testigo): Sólo alcohol al 70%, por 2 minutos, sin hipoclorito de sodio.
- T1: alcohol al 70% 2 minutos + Hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos
- T2: alcohol al 70% 2 minutos + hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos

Repeticiones: 20 repeticiones por tratamiento en un diseño: completamente al azar:

Se evaluó 10, 20 y 30 días determinando % de contaminación y % de sobrevivencia.

- b) Validación de medio de cultivo para germinación de semillas y ajuste hormonal.

La literatura recomienda utilizar medio MS en *Carica papaya*, por lo que fue necesario validarlo en *Vasconcellea*. Además se evaluó la necesidad de hormonas ANA (ácido naftalen

acético) y BAP (bencil amino purina) en dos concentraciones 1 y 0,2 ppm y un tratamiento testigo sin hormonas de acuerdo a las combinaciones del Cuadro 5.

Cuadro 5. Tratamientos con diferentes combinaciones de hormonas sobre medio MS para la germinación de semillas de *Vasconcellea* in vitro.

Tratamientos	ANA	BAP
T0	0	0
T1	0	0,1
T2	0	0,2
T3	0,1	0
T4	0,1	0,1
T5	0,1	0,2
T6	0,2	0
T7	0,2	0,1
T8	0,2	0,2

Repeticiones: 20 parcelas (semillas) por cada tratamiento. Diseño: completamente al azar de 9 tratamientos con 20 repeticiones.

Las evaluaciones fueron sobre porcentaje de germinación, de contaminación y de sobrevivencia a los 10,20 y 30 días, además se evaluara días a germinación, tasa de desarrollo en relación a largo y ancho del epicotilo e hipocotilo (suponiendo que estas variables son representativas de vigor), a los 30 días (o menos dependiendo de la respuesta de la semilla).

Propagación in vitro a partir de meristemas.

El protocolo de propagación in vitro de *Vasconcellea* a través de meristema con modificaciones se detalla en Anexo II.

a) Obtención del explante.

Se recolectó material vegetal de huertos de más de un año. Brotes axilares de 3 a 5 cm de longitud provenientes de plantas productivas de sexo conocido, descartando todo material dañado por acción de insectos, daño mecánico y presencia aparente de alguna enfermedad (Figura 9 y 10).



Figura 9. Brotes axilares de papayo adulto en huerto productivo.



Figura 10. Brotes axilares para desinfección y establecimiento in vitro.

b) Lavado del material.

Los brotes fueron lavados con abundante agua corriente más detergente comercial y con ayuda de un hisopo de cerdas finas se cepillaron para sacar restos de tierra, y restos del látex proveniente de la planta al realizar los cortes. También se descartaron restos de hojas viejas, de hojas muy grandes dejando aquellos folíolos que se encuentran en el ápice en la zona de crecimiento como se muestra en la Figura 2.

c) Desinfección de los explantes.

Los explantes son llevados a cámara de flujo laminar esterilizada previamente, siendo sometidos a la irradiación de luz ultravioleta categoría C de acción germicida y bactericida por 30 minutos Figura 11.



Figura 11. Proceso de desinfección en cámara de flujo laminar

Posteriormente se procedió a evaluar 13 tratamientos de desinfección con material proveniente de diferentes épocas de recolección (Cuadro 6).

Cuadro 6. Descripción de tratamientos de desinfección establecidos en diferentes épocas y con distintos agentes desinfectantes.

Establecimiento	Tratamientos	Descripción	N° explantes
29/09/2011 primavera	T0	alcohol al 70% por 1 minuto	10
26/08/2011 Invierno	T1	previo inmersión en Captan x 10 minutos alcohol 70% x 1 minuto +hipoclorito al 1% x5 minutos	15
26/08/2011 invierno	T2	previo inmersión en Captan x 10 minutos alcohol 70% x 1 minuto +hipoclorito al 1% x 10 minutos	15
25/08/2011 invierno	T3	previo inmersión en Captan x 10 minutos alcohol 70% x 1 minuto +hipoclorito al 2% x5 minutos	16
25/08/2011 invierno	T5	previo inmersión en Captan por 10 minutos alcohol 70% x 1 minuto +hipoclorito al 2% x 10 minutos	16
25/08/2011 invierno	T6	previo inmersión en Captan x 10 minutos alcohol 70% x 1 minuto +hipoclorito al 2% x 20 minutos	18
29/09/2011 primavera	T7	alcohol 70% x 1 minuto +hipoclorito de sodio al 1% x 12 minutos	20
29/09/2011 primavera	T8	alcohol 70% x 1 minuto +hipoclorito de sodio al 2% x 12 minutos	20
29/09/2011 primavera	T9	alcohol al 70% por 1 minuto + hipoclorito de sodio al 4 % x12 minutos	20

24/10/2012 primavera	T10	Previo Captan+10 gotas de yodo +alcohol 70% por1 min. +hipoclorito de sodio al 1%x10 minutos	10
24/10/2012 primavera	T11	Previo Captan+10 gotas de yodo +alcohol 70% por1 min. +hipoclorito de sodio al 1%x10 min. +peróxido de hidrogeno x 10 minutos	10
24/10/2012 primavera	T12	Previo Captan+10 gotas de yodo+ alcohol al 70 % X 1 minuto +hipoclorito de sodio al 2% x10 minutos	10
24/10/2012 primavera	T13	Previo Captan+10 gotas de yodo +alcohol al 70% x 1 minuto +hipoclorito de sodio 2% x 10 minutos+ peróxido de hidrógeno x 10 minutos.	10

Los explantes se mantuvieron por 30 días en cámara de crecimiento realizando evaluaciones cada 10 días. Se evaluó porcentaje de contaminación, mortalidad y sobrevivencia.

d) Medio de multiplicación.

Considerando antecedentes para la multiplicación de Carica que utilizan entre 0,1 a 1mg/ L de Bencil amino purina (BAP), en combinación con otros reguladores, con tasas de multiplicación entre 4 a 9 brotes por explante (Olivera 2009, Gallardo, 2002) y considerando la tasas de multiplicación obtenidas en laboratorio de INIA Intihuasi, para alcachofa con índices entre 5 a 11 brotes por planta con 1mg/ L de BAP, se realizó un estudio para conocer la respuesta de *Vasconcellea* a esta última concentración y tener estos antecedentes como testigo, sin embargo, dado los buenos resultados obtenidos, se repitieron esta prueba dos veces más para confirmar estos resultados. Se realizaron 3 pruebas con la aplicación de 1mg/L de BAP a medio MS al 100%, con 30 g de sacarosa a pH 5,7 y 6,5 g. de agar.

Se establecieron en forma individual cada uno de estos brotes en el medio de cultivo, se incubaron por 50 días en condiciones de 25°C, con fotoperiodo de 16 horas de luz y 3000 lux de luminosidad. Se realizaron evaluaciones cada 10 días hasta el día 50, para determinar el periodo óptimo de brotación. Se evaluó número de explantes brotados por cada prueba y número de brotes por explantes. Se realizaron 17 repeticiones por ensayo.

e) Medio de enraizamiento.

El enraizamiento fue considerados uno de los problemas de la propagación in vitro de papayo, por lo que su metodología de estudio se encuentra en el informe del profesional asesor en propagación in vitro, don Julio Oliveira de INEA, Perú en Anexo III.

- **Adaptaciones o modificaciones introducidas.**

El porcentaje de contaminación de plantas in vitro con material proveniente de campo fue demasiado alto, de manera que se decidió obtener material desde estacas previamente desinfectadas y enraizadas, con esto se logró bajar los porcentajes de contaminación y pérdida de plantas.

Propagación vegetativa a través de Enraizamiento de estacas.

Desde un huerto adulto en fase final productiva (más de 12 años) ubicado en Altovalsol, se seleccionaron brotes laterales de similar diámetro menor o igual a 3 cm, desde plantas de sexo determinado (hembras y ambisexuales). Los brotes marcados fueron colectados a inicio de octubre eliminándose las hojas, flores y frutos, dejándoles sólo los primordios de hojas. Luego se cortaron en estacas con su yema apical terminal y estacas distales al ápice, de 20 cm de longitud. El diámetro de ambas tipos de estacas fue similar, sin embargo la condición de las estacas varió en cuanto a que las estacas apicales eran en gran parte herbácea y las basales presentaban un tallo más lignificado, con algunas yemas latentes. Una vez colectadas se desinfectaron en una solución de Benlate 0.75g /L y Captan 1g /L durante 15 minutos. Para aquellos tratamientos con hormona de enraizamiento se aplicó en la base de la estaca (extremo inferior 5 cm), un producto comercial (Keri Root), que tiene una concentración de 4000 ppm de naftil acético (NAA). Las estacas fueron plantadas en igual profundidad. Cada estaca fue puesta en bolsas de 2 L en una mezcla de arena + perlita (1:1) que asegura un buen drenaje evitando problemas de pudrición. En la parte de corte superior en las estacas basales fue aplicada pintura látex con fungicidas.

Las estacas de cada sexo fueron puestas bajo condiciones de invernadero, y al aire libre bajo una malla sombreadora. El riego fue realizado manualmente.

El primer ensayo de las estacas provenientes de plantas ambisexuales se estableció el 7 de octubre de 2011, una semana antes que el ensayo de las estacas hembras. Un segundo ensayo se realizó en el 2012. Las estacas fueron colectadas y plantadas en invierno (julio y agosto). Durante ese tiempo se produjo una lluvia que provocó ataque de Botrytis, por lo cual se replantó principalmente con estacas apicales en agosto de 2012.

Los factores evaluados fueron tipo de estaca: basal y apical; condición ambiental: aire libre con cubierta malla raschel e invernadero y, hormona enraizante: con IBA y sin IBA.

El diseño estadístico usado fue completamente al azar con un arreglo factorial con 8 tratamientos y 4 repeticiones. Cada repetición consta de 4 plantas. Las medias fueron sometidas a un análisis de varianza aplicando test de Duncan con un $\alpha = 0.05$.

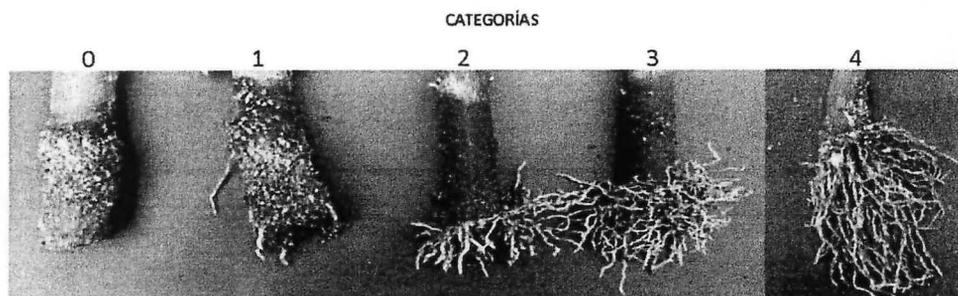
Cada sexo de plantas, femenino y hermafrodita, constituye un ensayo diferente, ya que se desconoce si hay diferencias en la capacidad de enraizamiento.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- T1 apical, con hormona, en invernadero
- T2 apical, sin hormona, aire libre
- T3 apical, con hormona, aire libre
- T4 apical, sin hormona, en invernadero
- T5 basal, con hormona, en invernadero
- T6 basal, sin hormona, aire libre
- T7 basal, con hormona y aire libre
- T8 basal, sin hormona, en invernadero

A los tres y cuatro meses de establecido los ensayos, las estacas de cada tipo de planta se sacaron del sustrato y se evaluaron en las siguientes variables: % estacas sobrevivientes (sin signos de deshidratación total), % estacas enraizadas, longitud de raíces, peso fresco y seco de raíces. El peso seco se determinó mediante secado en estufa a 60 °C por 24 horas.

Para el segundo ensayo se incorporó la variable de categorías de enraizamiento dando valores entre 0 y 4. El valor 0 se les dio a aquellas estacas sin raíces o bien pequeños vestigios de ellas, 1. Muy pocas raíces con longitud menor a 2 cm; 2. Pocas raíces con longitud menor a 3 cm; 3. Raíces abundante con longitud menor a 5 cm y 4. Raíces abundante con longitud igual o mayor que 5 cm, como se muestra en la siguiente figura.



Evaluación en campo de estacas enraizadas

Una vez caracterizadas las plantas fueron llevadas a terreno para ver el comportamiento en condiciones de campo.

La plantación se hizo durante el mes de Mayo, siguiendo las pautas de agricultor, es decir se plantó en camellones a una distancia de 3m*1.5 m. En el hoyo de plantación se incorporó materia orgánica (turba) junto con un nematicida comercial.

Una vez plantadas, 3- 4 meses después, se procedió a despuntar las plantas para inducir a una mayor brotación lateral y, luego de eso se raleó el exceso de ramas que crecían hacia el interior de las plantas. Se plantaron 4 unidades por hoyo de plantación. A los 7 meses de plantación se midió el diámetro de planta, altura de planta.

Propagación a través de Injertación

En vivero se hizo una selección de plantas originadas a partir de semillas, luego se eliminaron plantas dejando solo una por unidad en bolsas de 1.5 L en sustrato arena. Estas plantas se injertaron con púas de igual diámetro de no más de 10 cm de longitud con dos yemas, provenientes de las otras plantas de vivero de igual condición, esto se hizo en dos temporadas. La injertación fue realizada por operarios, quienes tenían experiencia en árboles subtropicales (paltos, chirimoyos, lúcumos), pero no en papayos, ya que no es una práctica usada entre los agricultores.

Las plantas injertadas crecieron bajo condiciones de invernadero, y se le dio igual manejo que las plantas comerciales.

Los injertos fueron de 4 tipos, injertando 16 plantas por tratamiento y distribuyéndose en un diseño completamente al azar, donde cada repetición (4) consistía de 4 plantas. Estas plantas fueron injertadas en Octubre de 2011. Luego en el 2012, se repitió en ensayo, ampliándose el número de plantas por repetición, a 6.

Tipos de injertos.

- Tratamiento 1 : Injerto de aproximación
- Tratamiento 2: Injerto de Montura
- Tratamiento 3: Injerto de Cuña o hendidura
- Tratamiento 4 : Lengüeta o inglés

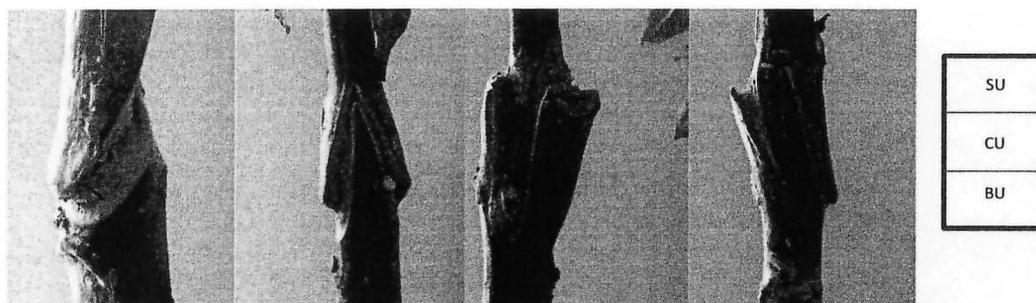


Figura 12. Tipos de injertos y diagrama de cortes realizados en la zona de injerto para cada una de las partes: sobre la unión (SU), centro de unión (CU) y bajo la unión (BU).

Cada una de estas partes, se embebieron por 24 horas en FAA (formalina, ácido acético y etanol (60%) en 5:5:90, v/v), luego se cambiaron a una solución de etanol a 70 %. En esta solución fueron trasladadas al laboratorio de histología de la U. Católica del Norte de Coquimbo, donde las muestras se sometieron a fijación con parafina y las muestras fueron cortadas con un microtomo a 15 y 20 μm de grosor. Los cortes fueron teñidos con ácido tolúdeno.

De cada una de las partes, se tuvieron tres cortes de tres repeticiones por injerto. En definitiva 9 cortes de cada tratamiento de injertación se tomaron a los tres meses desde el inicio de ensayo.



Figura 13. Plantas injertadas durante el mes de Octubre de 2012, usando las técnicas de injertación.

Los tejidos de la zona de unión fueron revisados a través de un microscopio de luz LEICA. Se observó el sellamiento y la conexión de sistemas conductores en forma longitudinal y transversal de los distintos injertos seccionados en tres partes como se indica en la Figura 12.

- **Principales problemas metodológicos enfrentados.**

En el ensayo de enraizamiento, posterior a su plantación, se detectaron material vegetal, que presentó malformaciones en sus hojas lo que puede estar ligado a algún tipo de microorganismo indeterminado.

En el caso de injertación, el número de repeticiones no permitió detectar diferencias entre tratamientos, y la variabilidad fue alta.

- **Adaptaciones o modificaciones introducidas.**

Se elimina de los tratamientos aquellas estacas que presentaron hojas deformes.
Se amplía el número de repeticiones para el segundo ensayo de injertación.

Objetivo 4: Capacitar a nivel de viveristas y agricultores sobre el reconocimiento de caracteres morfológicos asociados al sexo en plantas a temprana edad y sobre técnicas de propagación.

Esta actividad no se realizó como se había presupuestado, debido a que los resultados esperados no se tuvieron.

Los resultados obtenidos, fueron dados a conocer en las reuniones de seguimiento y en el seminario realizado al término del proyecto.

Objetivo 5: Comparar en términos productivos y económicos el sistema productivo actual con un nuevo sistema que incorpore las innovaciones desarrolladas por el proyecto.

En anexo IV, incluido en CD y en informe 3, se detalla la metodología e información colectada en torno al sistema productivo convencional que se realiza en el cultivo del papayo.

La comparación con un nuevo sistema productivo no se realizó, dado que no se generó un protocolo de detección temprana del sexo, ya que los marcadores moleculares no discriminaron entre los sexos de las plantas, impidiendo asociar los diferentes caracteres morfológicos encontrados en las hojas y semillas.

3. Actividades del Proyecto

En el siguiente cuadro se presentan las actividades programadas y las realizadas. Se explican las razones de las diferencias de periodos y duraciones.

Cuadro 7. Actividades programadas en la propuesta original y la real y las razones de las diferencias entre fechas.

Nº OE	Nº RE	Actividades	Fecha de inicio término original	Fecha de inicio término real	Razones
5	7	Evaluación económica inicial del sistema productivo.	Agosto a Noviembre de 2011	1 informe noviembre de 2011 Informe final Junio de 2012	Se presenta en reunión de seguimiento Se realizan observaciones Se incorporan en informe final.
5	9	Estudio de las razones de disminución de superficie de papayo.	Diciembre 2011 a Marzo 2012	Mayo de 2012	Se inicia en Enero de 2012.
1	1,2	Marcar plantas adultas de sexo definido en huerto de agricultor para sexaje.	Agosto de 2011	Agosto de 2011 a enero 2013	Las plantas inicialmente marcadas como machos presentaron flores hembras, en la medida que las temperaturas aumentaban. Se volvió a marcar en otro huerto, asegurándose de la presencia de plantas de los 3 sexos.

1	1	Muestreo de hojas de cada planta marcada.	Agosto 2011	Agosto 2011 a enero de 2013	Debido a lo anterior, se colectaron nuevas muestras.
1	1	Extracción de ADN desde hojas y sexaje PCR	Agosto a Diciembre 2011	Agosto 2011 a enero de 2013	Esta extracción de DNA se repitió ligada a actividad anterior
1	2,3	Caracterizar morfológicamente la parte aérea de plantas adultas	Agosto a Diciembre de 2011	Agosto 2011 a enero de 2013	Se repitió también la caracterización con plantas de los 3 sexos, en huerto.
2	3	Relacionar características morfológicas con marcadores moleculares usando herramientas estadísticas.	Enero de 2012		Actividad no realizada debido a la inexistencia de marcadores moleculares discriminantes
2	2,3	Marcar plantas de sexos diferentes en dos localidades para la polinización	Agosto a Septiembre 2011	Agosto a Septiembre 2011	
2	2,3	Realizar polinización dirigida entre sexos diferentes durante la floración en huerto de agricultores	Septiembre a Octubre de 2011	Septiembre a Enero de 2012	Esta actividad se prolongó debido a que las flores aptas para la polinización dirigida, dependían de las condiciones climáticas
2	2,3	Cosechar frutos y extraer semillas	Abril de 2012	Mayo a noviembre de 2012	La maduración de los frutos demora aproximadamente 8 meses, dependiendo de las condiciones climáticas. Por tanto los frutos fueron cosechándose paulatinamente a partir de Mayo de 2012

2	2,3	Caracterización morfológica de semillas	Abril a Mayo de 2012	Mayo a noviembre de 2012	Esta actividad fue dependiente de la cosecha de frutos.
3	2,3	Ajuste de protocolos de germinación de semillas in vitro	Septiembre a Diciembre de 2011	Septiembre a mayo de 2012	La desinfección de semillas, fue el principal impedimento para avanzar según lo programado. Esto se solucionó extrayendo la testa de la semilla.
2	2,3	Siembra y germinación in vitro del 50% de semillas proveniente de cada polinización dirigida	Mayo a Julio de 2012	Octubre a noviembre de 2012	Esta actividad dependía de la obtención de semillas de los cruzamientos.
2	2,3	Siembra y germinación in vitro del resto de 50% de semillas proveniente de cada polinización para llevar a terreno	Mayo de 2012	Octubre a noviembre de 2012	Esta actividad dependía de la obtención de semillas de los cruzamientos.
2	2,3	Propagación (siembra semillas) in vitro para la caracterización morfológica de plántulas	Junio a Diciembre de 2012	Junio a Diciembre de 2012	
2	2,3	Caracterización morfológica (aérea y radicular) de plántulas	Diciembre de 2012	Julio a diciembre de 2012	Esta caracterización se fue haciendo conforme al crecimiento de las plantas
1	1	Extracción de ADN de plántulas y sexaje por PCR	Diciembre 2012 a Abril de 2013	Diciembre 2012 a Abril de 2013	Esta extracción se realiza en plántulas que presentaron diferentes caracteres morfológicos en semilla. Pero no se determinó sexaje, dado que no se discriminó entre muestras.
2	2,3	Relacionar características morfológicas con marcadores moleculares usando herramientas estadísticas	Abril a Mayo de 2013		Al no existir marcador discriminante, no se pudo establecer relaciones

2	2,3	Caracterizar morfológicamente la parte aérea y radicular de plantas pequeñas (3 meses) de vivero propagadas a partir de semillas	Abril a Mayo de 2013		Esto no se realizó dado que no se tenía el carácter morfológico asociado al sexo
2	2,3	Llevar a terreno plantas propagadas in vitro del 50% restante	Mayo de 2012	Diciembre de 2012 Mayo de 2013	Esta se realiza en dos períodos, la primera en diciembre de 2012, el prendimiento fue bajo. Posteriormente se hace en mayo de 2013
2	2,3	Realizar seguimiento de plantas propagadas in vitro y de vivero	Junio de 2013	Mayo a diciembre de 2013	Esto se prolonga dado que el periodo del proyecto se extiende.
3	4	Recolección de estacas de papayo (2 épocas)	Septiembre 2011 a Junio de 2012	Octubre de 2011 y agosto de 2012	
3	4	Plantación y evaluación de estacas bajo condición controlada y aire libre	Septiembre 2011 a diciembre 2012	Octubre de 2011 a diciembre de 2012	
3	4	Ensayo de Injertación sobre patrón de vivero tamaño normal con púas de huerto	Septiembre 2011 a Mayo 2012	Octubre de 2011 y 2012	Se repite el ensayo en la primavera de 2012, aumentando el número de repeticiones.
3	4	Injertación sobre patrón de vivero (1 mes) con púas in vitro	Enero de 2012 Abril de 2012		Esto no se realiza, por cuanto el protocolo de propagación in vitro se obtiene hacia el final del proyecto.

3	4	Evaluación de técnicas de propagación a través de Injertación	Septiembre de 2011 Junio de 2013	Octubre de 2011 a Noviembre de 2013	Se extiende período de evaluación en campo de plantas injertadas.
4	6	Realizar taller de capacitación	Diciembre de 2012 Junio de 2013	Enero de 2012 a junio de 2013	En reuniones de seguimiento se dan a conocer los resultados del proyecto. No se realizan los talleres debido a que no se obtiene un protocolo de detección temprana del sexo de las plantas
4	6	Asistencia a congreso	Julio de 2012 Julio de 2012	2012 y septiembre de 2013	Se asiste a dos congresos agronómicos nacionales
4	6	Realizar publicación científica	Enero de 2013 Abril de 2013		En etapa de elaboración de borradores
5	7	Evaluación económica del sistema productivo final	Marzo de 2013 Julio de 2013		No se realiza
4	5,6	Realizar Seminario final que incluya productores de papayo	Julio de 2013 Julio de 2013	Diciembre de 2013	Se pospone término de proyecto para finalizar protocolo de propagación in vitro. Se realiza seminario al finalizar esta actividad
3		Elaborar protocolo de propagación in vitro	No considerada	Julio a diciembre de 2013	Se propone generar un protocolo de propagación in vitro a partir de explantes. Para ello se contrata asesoría para solucionar puntos críticos del protocolo.

4. Resultados del Proyecto por objetivos

Objetivo 1: Determinar marcadores moleculares en *V. pubescens* que se asocien al sexo de las plantas.

Este objetivo se realizó a través de servicios de CEAZA. Los resultados en detalle se encuentran en Anexo I. Como conclusión se llegó a que la evaluación de los marcadores con muestras de ADN macho (100%), muestras ambisexuales y muestras hembras en plantas de *Vasconcellea*, NO presentaron diferencias en la obtención de amplicones diferenciales para algunos de ellos, no permitiendo la identificación de marcadores que amplificaran diferencialmente e imposibilitando el sexaje molecular en estadios tempranos.

Los marcadores diseñados a partir de secuencias específicas de *Vasconcellea*, como el marcador P212, no pudieron entregar resultados discriminantes, a pesar de resolver los amplicones, generados para una mejor definición de tamaño, en geles de poliacrilamida.

No hubo conservación entre los fragmentos de ADN asociados al sexo entre *Carica papaya* y *Vasconcellea pubescens*, de seguir en este intento será necesario buscar una nueva estrategia de obtención de marcadores asociados al sexo para *V. pubescens*.

Objetivo 2: Establecer caracteres morfológicos de plantas jóvenes y semillas sobre la base de marcadores moleculares ligados al sexo de las plantas.

En plantas adultas de *Vasconcellea* de los tres sexos conviviendo, plantas femeninas, masculinas y ambisexuales (lo que solo fue posible encontrar en huerto de Don Herman Zandonnai, ubicado en la zona de San Ramón, se obtuvo diferencias significativas en tres caracteres morfológicos a nivel de foliolo, del total de caracteres evaluados (n=24); éstos son: grosor relativo de las venas 2°, número de venas basales secundarias en un lado del foliolo y forma del ápice (Cuadro 8)

Cuadro 8. Variables que presentaron diferencias significativas entre foliolos de plantas hembras, macho y hermafrodita.

Sexo	Grosor relativo de venas 2° (mm)	N° venas basales 2° de un solo lado (mm)	Forma del ápice
Hermafrodita	1,07 a	26,2 a	cuspidado b
Hembra	1,17 ab	24,87 a	cuspidado b
Macho	1,37 b	17,9 b	acuminado a

En el caso de la forma del ápice, las plantas hembras y ambisexuales presentaron forma cuspidada, mientras que las plantas macho, presentaron forma acuminada (Figura 14).

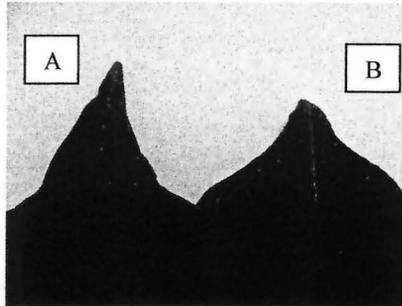


Figura 14. Forma de ápice de foliolo de planta macho (A) y planta hembra (B)

El análisis multivariable de estos caracteres, permite separar a la planta macho en forma significativa de las plantas ambisexuales y hembra (Figura 15).

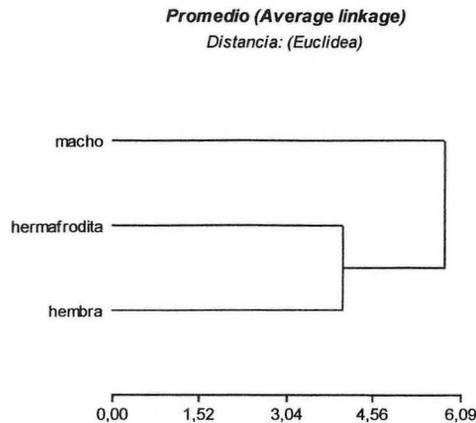


Figura 15. Dendrograma de variables del foliolo en plantas de *Vasconcellea* de tres sexos diferentes

La descendencia de flores hembras de plantas hembra polinizadas con polen de plantas ambisexuales, presentó diferencias significativas en varios caracteres con respecto a la descendencia de flores hembras de plantas ambisexuales polinizadas con polen de plantas ambisexuales. Las diferencias se encontraron en tres caracteres de la semilla: Largo, textura y color (cuadro 9). La Figura 16, muestra estos tipos de semilla

Cuadro 9 Variables que presentaron diferencias significativas entre semillas provenientes de plantas de diferentes orígenes de polinización.

Origen	Largo semillas (mm)	Textura	Color
Hembra	6,39	Lisa	Café claro
Hermafrodita	6,05	Rugosa	Café oscuro

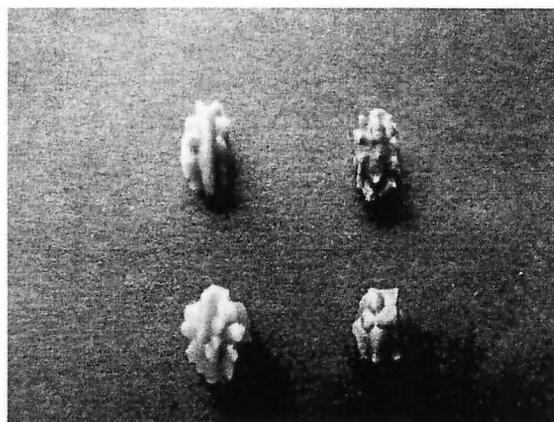


Figura 16. Semillas de *Vasconcellea* de diferentes orígenes de polinización de diferente color y forma.

También se encontró diferencia en dos caracteres de la raíz: Largo y número de raíces y algunas variables evaluadas en el cotiledón ancho, largo, textura y tipo de nervadura (cuadro 10 y Figura 17).

Cuadro 10. Variables que presentaron diferencias significativas entre plántulas en estado de cotiledón, provenientes de plantas de diferentes orígenes de polinización.

Origen	Largo raíz (mm)	N° raíces	Ancho cotiledón (mm)	Largo cotiledón (mm)	Textura cotiledón	Nervadura cotiledón
Hembra	8,06	2,25	3,71	4,64	Lisa	Lisa
Hermafrodita	16,7	4,73	7,95	9,77	rugosa	Pronunciada

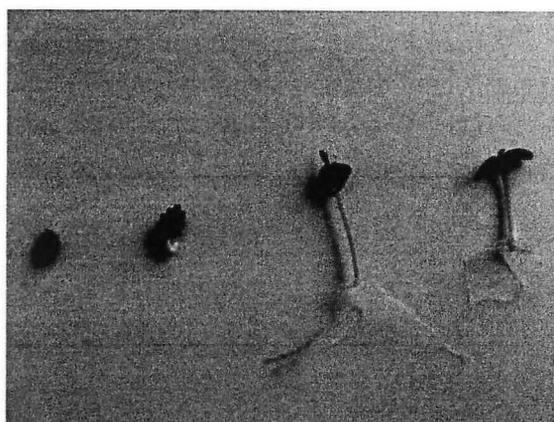


Figura 17. Plántulas en estado de cotiledón de *Vasconcellea* de diferentes orígenes de polinización de diferente color y forma.

A nivel del primer par de hojas verdaderas (PHV), dos caracteres mostraron diferencias: la distancia de separación entre nudos al primer par de hojas verdaderas y al segundo par de hojas verdaderas (cuadro 11 y Figura 18). Dentro de los objetivos de este proyecto, se correlacionarían los caracteres morfológicos con los caracteres moleculares para validar si los caracteres estaban o no ligados al sexo. Lamentablemente como no hubo resultados en la parte molecular, solo se tienen diferencias morfológicas en la descendencia de cruzamientos dirigidos diferentes.

Cuadro 11. Variables que presentaron diferencias significativas entre plántulas en estado de primer a cuarto par de hojas verdaderas, provenientes de plantas de diferentes orígenes de polinización.

Origen	Separación entre nudos 1° PHV (cm)	Separación entre nudos 2° PHV (cm)
Hembra	1,36	1,61
Hermafrodita	1,58	2,06

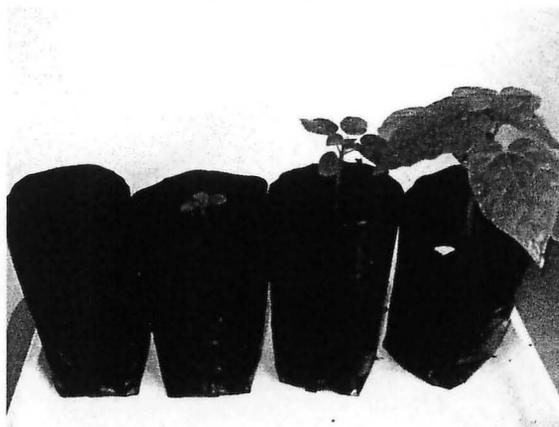


Figura 18. Plantas de *Vasconcellea* en 4 estados fenológicos, en 1°, 2°, 3° y 4° par de hojas verdaderas.

El agrupamiento de caracteres, realizado con el objeto de formar grupos que permitan utilizar sólo aquellos más fáciles de medir o menos destructivos, permitió distinguir claramente cuatro grupos: uno compuesto por los caracteres evaluados en la primeras hojas verdaderas en conjunto con dos caracteres evaluados en las semillas: color y ancho. Un segundo grupo agrupa a los caracteres evaluados en las semillas: forma y textura con los caracteres evaluados en el cotiledón, un tercer grupo con solo dos caracteres: largo y ancho del cotiledón y el cuarto grupo, conformado por longitud de raíces y altura de plántula desde raíz hasta inicio de hojas cotiledonales, grupos todos donde los caracteres tienen igual grado de importancia (Figura 19)

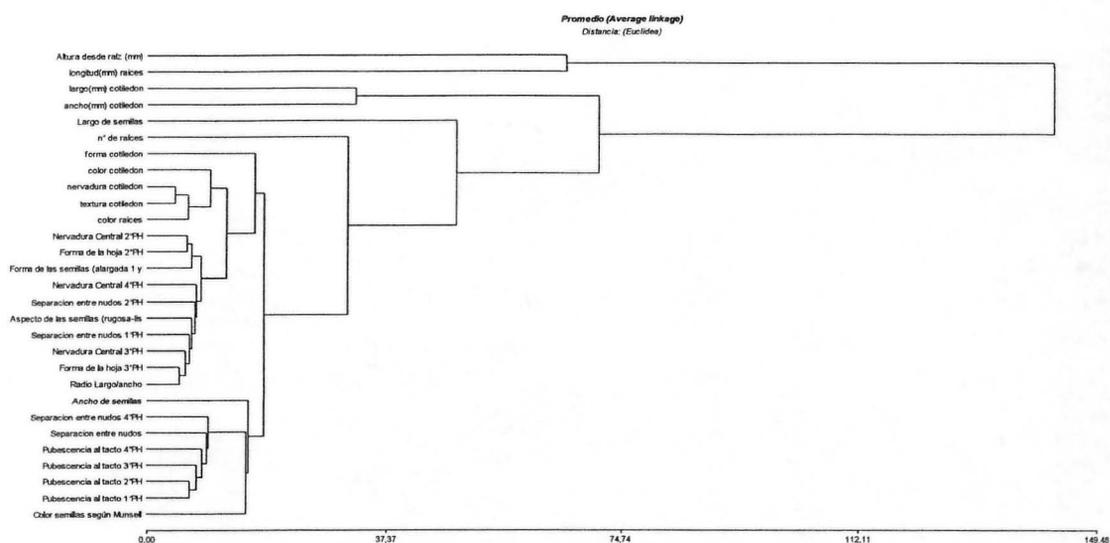
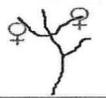
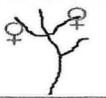
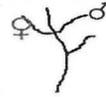
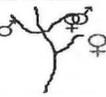
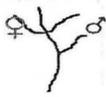
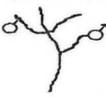
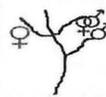
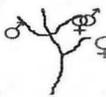
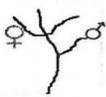
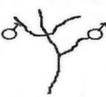
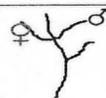
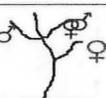
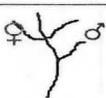
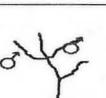


Figura 19. Grupos de variables a través de análisis multivariable para los caracteres morfológicos evaluados en *Vasconcellea*.

Por último, las plantas provenientes de ambos tipos de cruzamientos, se plantaron en campo de agricultor. Se evaluó allí el número de plantas plantadas versus número de plantas de cada sexo. A la fecha, las plantas hembras polinizadas con flores de plantas ambisexuales, producen solo descendencia hembra y hermafrodita, no observándose ningún macho. Esto genera una propuesta a partir de este estudio. Si los agricultores hacen una eliminación real de las plantas machos de su parcela y sólo tienen plantas hembras y ambisexuales, pueden hacer sus plantas con semillas provenientes de frutos hembras, resultantes de flores que sólo pueden haber sido polinizadas con plantas ambisexuales y que aseguran, al parecer, ausencia de población macho.

Seguimiento de Floración.

Se observó que las plantas femeninas permanecen como tales durante todas las estaciones del año, manteniendo una expresión de solo flores femeninas en sus inflorescencias. Mientras que las plantas bisexuales o “hermafroditas”, tienen inflorescencias con flores apicales femeninas, flores masculinas y raramente presentan flores bisexuales imperfectas. Las variaciones sexuales estarían asociadas a la época de año y a la temperatura (Figura 20). Hay una gradualidad en la cantidad de flores hembras y masculinas (Figura 21), predominando estas últimas, especialmente con temperaturas medias de 12-15 °C. Las flores hermafroditas perfectas no se encontraron, raramente se encuentran flores con ambos sexos pero deformes.

PLANTAS	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
	INFLORESCENCIAS			
HEMBRA				
AMBISEXUAL (L1)				
AMBISEXUAL (L2)				
AMBISEXUAL (L1)				

L1 Altovalsol; L2 Algarrobito

Figura 20. Estacionalidad de expresión floral en plantas hembras y ambisexuales en dos localidades del Valle de Elqui.

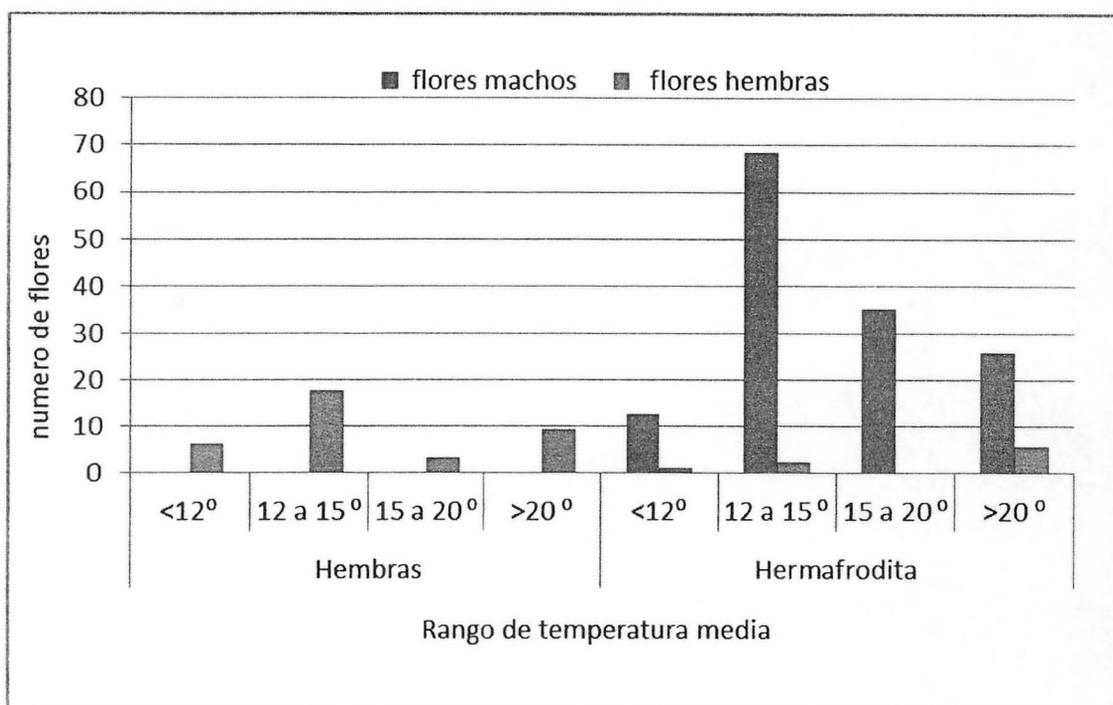


Figura 21. Presencia de flores en función de temperaturas medias.

Objetivo 3: Evaluar diferentes alternativas de técnicas de propagación de plantas de sexo determinado aplicando nuevas herramientas.

Multiplicación de semillas in vitro.

- a) Determinación de protocolo para desinfección de semillas

Resultados de estudio de desinfección permitieron determinar que para propagación de semillas de *Vasconcellea*, los mejores resultados se obtienen cuando se elimina la testa de la semilla, como se observa en los Cuadros 12 y 13. Semillas sin testa no presentaron contaminación independiente del uso de hipoclorito de sodio. El inicio de la germinación en los tratamientos sin testa se realizó a contar del 4° día aproximadamente, con la aparición de la radícula y posterior desarrollo del hipocotilo y epicotilo.

Cuadro 12. Plantas contaminadas, muertas, con signos de enfermedades y germinadas de semillas sin testa de *Vasconcellea* para multiplicación in vitro.

Tratamiento	Contaminación (%)	Semillas muertas	Semillas sin signos de contaminación	N° semillas germinadas
T1	0	0	30	23
T3	0	0	30	21

Cuadro 13. N° plantas contaminadas, muertas, con signos de enfermedades y germinadas de semillas con testa de *Vasconcellea* para multiplicación in vitro.

Tratamiento	Contaminación (%)	Semillas muertas	Semillas sin signos de contaminación	N° semillas germinadas
T2	6	0	24	0
T4	22	0	8	2

De acuerdo a los resultados obtenidos a los 30 días de cultivo, el mejor porcentaje de sobrevivencia y menor porcentaje de contaminación se observó en el tratamiento T0 o control (solo inmersión en alcohol al 70%) con una tasa de sobrevivencia de 90% de las semillas (Cuadro 14)

Cuadro 14. Porcentaje de contaminación y sobrevivencia a los 10, 20 y 30 días de semillas de *Vasconcellea* bajo diferentes tratamientos de desinfección.

Tratamientos	contaminación		sobrevivencia		contaminación		sobrevivencia		contaminación		sobrevivencia	
	10 días				20 días				30 días			
T0	0	a	1	a	0,1	a	0,9	a	0,1	a	0,9	a
T1	0,1	a	0,9	a	0,2	ab	0,8	ab	0,2	ab	0,8	ab
T2	0,05	a	0,95	a	0,4	b	0,55	b	0,4	b	0,6	b

b) Validación de medio de cultivo para germinación de semillas y ajuste hormonal

Posterior a la desinfección, la germinación de semillas en los diferentes tratamientos fue rápida y a partir del 5° día (Figura 22), salvo para el tratamiento 6, que no presentó germinación.

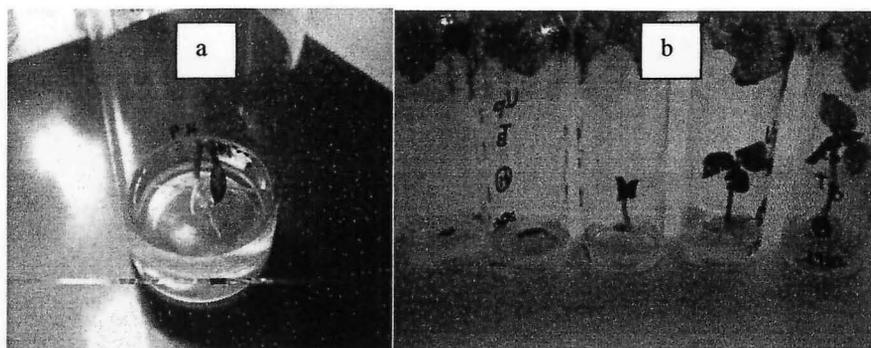


Figura 22. a). Semilla de *Vasconcellea pubescens* germinada in vitro, de dos semanas de establecimiento b) Secuencia del proceso de germinación in vitro en semillas de *Vasconcellea* hasta obtener una plántula completa.

Si bien hubo variación en los tratamientos en el porcentaje de germinación, no hubo diferencias estadísticas con el control con un 60% de germinación (Cuadro 15) sin adición de

reguladores de crecimiento. La contaminación presente en el ensayo fue baja y principalmente producida por bacterias, el mayor porcentaje de contaminación se presentó en el tratamiento T6 que alcanzo un 40% al finalizar el periodo de evaluación.

Cuadro 15. Contaminación y germinación (%) a los 10, 20 y 30 días de sembradas in vitro, semillas de *Vasconcellea* en medio MS.

Tratamientos (mg/l)	Contaminación 10 días	Germinación 10 días	Contaminación 20 días	Germinación 20 días	Contaminación 30 días	Germinación 30 días
T0 (0ANA+0BAP)	0 a	0,15 ab	0,1 a	0,6 bc	0,1 a	0,6 cde
T1(0ANA+0,1 BAP)	0 a	0,1 ab	0 a	0,3 ab	0 a	0,5 bcd
T2(0ANA+0,2 BAP)	0 a	0,25 ab	0 a	0,6 bc	0 a	0,65 cde
T3(0,1ANA+0 BAP)	0,05 ab	0 a	0,05 a	0,15 a	0,05 a	0,45 bc
T4(0,1ANA+0, 1BAP)	0 a	0,25 ab	0 a	0,55 bc	0 a	0,75 de
T5(0,1ANA+0, 2BAP)	0,1 ab	0,35 bc	0,1 a	0,55 bc	0,1 a	0,7 cde
T6(0,2ANA+0 BAP)	0,15 b	0 a	0,3 b	0 a	0,4 b	0 a
T7(0,2ANA+0, 1BAP)	0,1 ab	0,1 ab	0,3 b	0,3 ab	0,35 b	0,3 b
T8(0,2ANA+0, 2BAP)	0 a	0,55 c	0 a	0,7 c	0 a	0,8 e
C.V.	19,51	30,8	25,14	31,78	11,39	15,42

No hubo diferencias estadísticas en variables del epicotilo (Cuadro 16), ni se observaron diferencias entre las plantas (Figura 23).

Cuadro 16. Variables de epicotilo medidas en plántulas de *Vasconcellea* germinadas in vitro sobre medio MS.

Tratamientos	Altura de plantas		Diámetro del tallo		Longitud de epicotilo	
T0	19,32	abc	1,73	a	0,94	a
T1	15,29	c	1,89	a	0,47	a
T2	17,85	bc	1,74	a	0,09	a
T3	15,52	c	1,74	a	0,11	a
T4	27,92	a	1,72	a	0,45	a
T5	23,98	abc	1,72	a	0,98	a
T7	23,48	abc	1,80	a	1,26	a
T8	25,76	ab	2,74	a	1,37	a

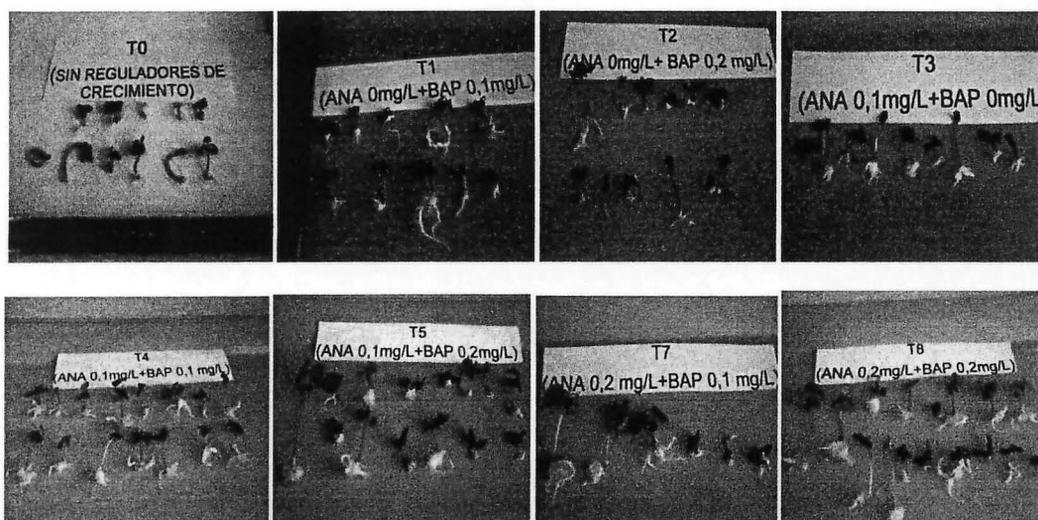


Figura 23. Plántulas de *Vasconcellea* obtenidas en tratamientos de germinación in vitro.

En relación al análisis de folíolos en plántulas, los tratamientos, 4 al 8 presentaron hojas de mayor tamaño (Cuadro 17) y se observó diferenciación en forma pudiendo distinguir entre hojas cordadas y levemente lobuladas. En la mayoría de los tratamientos las primeras hojas se presentaron como cordadas y se modificaron al segundo o tercer par de hojas verdaderas o en otros casos la diferenciación de estas se manifiesta desde el primer momento en su desarrollo (Figura 24).

Cuadro 17. Variables foliares de plántulas de *Vasconcellea* germinadas in vitro en medio MS.

Tratamientos	N° hojas		Ancho hojas mm.		Largo hojas mm.		Forma hojas	
T0	0,83	d	1,90	a	2,44	de	0,50	ab
T1	1,70	abc	3,41	a	4,02	bcde	1,70	ab
T2	1,46	bcd	8,91	a	4,10	cde	1,70	bc
T3	0,89	cd	0,82	a	1,18	e	0,89	bc
T4	2,33	a	5,34	a	7,34	abc	1,07	c
T5	2,00	ab	4,84	a	6,20	abcd	1,36	ab
T7	2,17	ab	6,68	a	8,95	a	2,00	ab
T8	2,31	a	5,86	a	8,64	ab	2,13	a

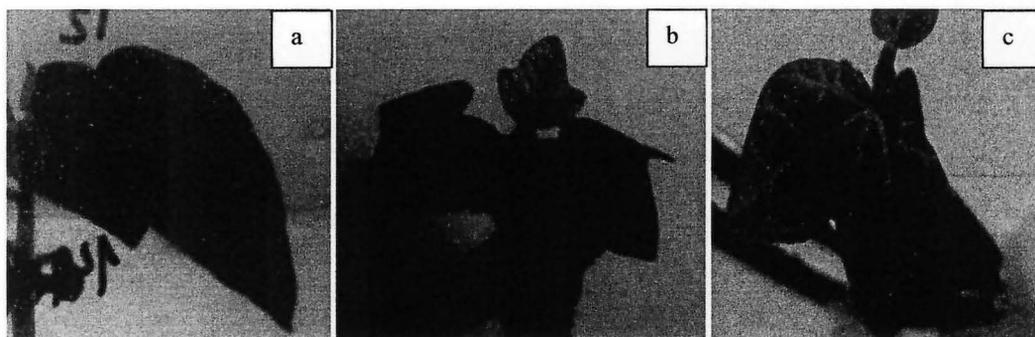


Figura 24. Tipos de hojas en plántulas in vitro de *Vasconcellea pubescens*. De izquierda a derecha a) hoja de forma cordada. b) plántulas primer y segundo par de hojas con pequeños lóbulos c) hoja lobulada.

Se observó que el enraizamiento de comienza con el desarrollo de la radícula y anclaje. Posteriormente desarrolla raíces laterales de menor longitud en algunos casos lo que le permite estabilizar a la planta en el medio de cultivo para así desarrollar la parte aérea posteriormente (Figura 25).

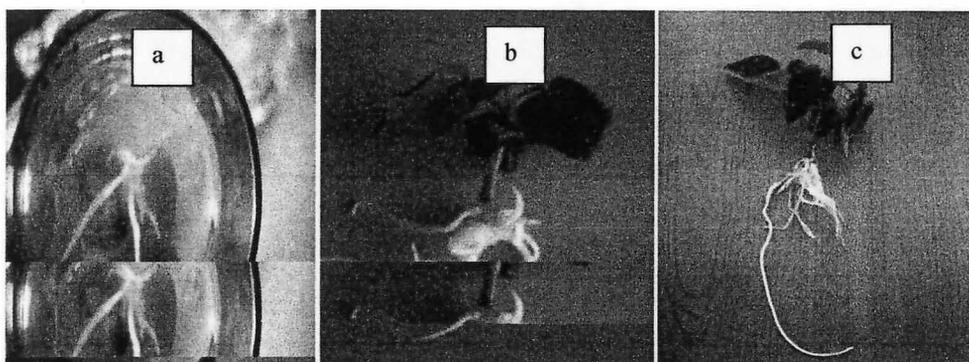


Figura 25. a) Inicio de germinación y enraizamiento de semillas, b) raíces de plántula in vitro de 1 mes de cultivo c) desarrollo radicular in vitro a partir de semilla de dos meses de cultivo.

El mayor número promedio de raíces y mayor longitud de raíces por plántula correspondió al tratamiento T4 (Cuadro 18)

Cuadro 18. Variables de la raíz evaluadas en plántulas de *Vasconcellea* germinadas in vitro en medio MS.

Tratamientos	Presencia de raíces		N° de raíces promedio por plántula		Suma longitud de raíces total	
T0(sin reguladores)	1,17	a	1,33	c	24,90	abc
T1(0,1BAP)	1,00	a	2,60	ab	28,62	ab
T2(0,2 BAP)	1,15	a	1,23	c	6,90	c
T3(0,1 ANA)	1,11	a	2,89	ab	19,30	bc
T4(0,1ANA +0,1BAP)	1,00	a	3,33	a	40,28	a
T5(0,1ANA+0,2BAP)	1,21	a	1,86	bc	12,08	bc
T7(0,2ANA+0,1 BAP)	1,17	a	2,00	bc	28,07	abc
T8(0,2ANA+0,2BAP)	1,19	a	2,00	bc	20,62	bc

De acuerdo a los resultados, el tratamiento T4 con adición de 0,1 mg/L de BAP y ANA representó el mejor tratamiento para la germinación y obtención de plántulas de *Vasconcellea* en condiciones in vitro. Plantas del tratamiento T0 sin reguladores obtuvo altos porcentajes de germinación (80%),

Propagación a partir de meristemas.

Desinfección de los explantes.

Los resultados de desinfección se presentan en el Cuadro 19 y 20. De acuerdo a esto se concluyó que el mejor tratamiento de desinfección de explantes fue con Captan (1g/L) + povidona yodada X 10 minutos + alcohol 70% (1 minuto)+ Hipoclorito de sodio 1% (10 minutos), lo que logra desinfección del 90%, con material vegetal de verano.

Cuadro 19. Porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia de explantes de Vasconcellea en diferentes tratamientos de desinfección.

Establecimiento	Tratamientos	Descripción	Porcentaje		
			Contaminación	Mortalidad	Sobrevida
Primavera	T0	alcohol al 70% por 1 minuto	100	0	0
Invierno	T1	previo inmersión en Captam x 10 minutos alcohol 70% x 1 minuto + hipoclorito al 1% x 5 minutos	80	13.33	6.66
Invierno	T2	previo inmersión en Captam x 10 minutos alcohol 70% x 1 minuto + hipoclorito al 1% x 10 minutos	80	0	20
Invierno	T3	previo inmersión en Captam x 10 minutos alcohol 70% x 1 minuto + hipoclorito al 2% x 5 minutos	75	0	25
Invierno	T5	previo inmersión en Captam x 10 minutos alcohol 70% x 1 minuto + hipoclorito al 2% x 10 minutos	100	0	0
Invierno	T6	previo inmersión en Captam x 10 minutos alcohol 70% x 1 minuto + hipoclorito al 2% x 20 minutos	66.66	0	33.33
Primavera	T7	alcohol 70% x 1 minuto + hipoclorito al 1% x 12 minutos	75	0	25
Primavera	T8	alcohol 70% x 1 minuto + hipoclorito al 2% x 12 minutos	80	0	20
Primavera	T9	alcohol 70% x 1 minuto + hipoclorito al 4% x 12 minutos	0	50	50
Primavera	T10	previo Captam + 10 gotas de yodo + alcohol 70% x 1 minuto + hipoclorito de sodio al 1% x 10 minutos	40	0	60
Primavera	T11	previo Captam + 10 gotas de yodo + alcohol 70% x 1 minuto + hipoclorito de sodio al 1% x 10 minutos + peróxido de hidrogeno x 10 minutos	50	20	30
Primavera	T12	previo Captam + 10 gotas de yodo + alcohol 70% x 1 minuto + hipoclorito de sodio al 2% x 10 minutos	30	30	40
Primavera	T13	previo Captam + 10 gotas de yodo + alcohol 70% x 1 minuto + hipoclorito de sodio al 2% x 10 minutos + peróxido de hidrogeno x 10 minutos	40	20	40

Cuadro 20. Porcentaje de contaminación y sobrevivencia de explantes de diferente época de recolección.

Época de colecta	% de contaminación a 20 días	% de sobrevivencia a 20 días
Invierno	80	20
Primavera	40	60
Verano	9,38	90,62

Multiplicación de los explantes.

Los resultados de la evaluación del medio de multiplicación generaron brotes a partir de la tercera semana. A los 30 días se obtuvo un promedio de 4 brotes por explantes, brotes laterales aún muy pequeños para establecimiento en medio de crecimiento. A los 50 días un 90 a 100 % de brotación (Cuadro 21), hay incremento en la longitud del brote principal y desarrollo brotes laterales y basales. La tasa de multiplicación de los 7 a 20 brotes por explante, con longitudes entre 3 a 8mm.

Cuadro 21. Porcentaje de explantes brotados de Vasconcellea y número promedio de brotes por explantes en medio de multiplicación.

Tratamientos	Explantes brotados (%)	N° promedio de brotes por explante
1° evaluación 30 días	75	5
2° evaluación 50 días	100	15
3° evaluación 50 días	94	12

Enraizamiento y aclimatación.

Los resultados de las pruebas definidas por el asesor para esta etapa de la propagación in vitro, permitieron definir dos medios de enraizamiento según el grado de diferenciación de la base del explante. Un medio base MS + 2 ppm de AIB para brotes con diferenciación y un medio MS + 0,5 ppm de ANA para aquellos sin inducción de diferenciación en la base del explante. Posteriormente a los 25 días la plántula in vitro se traspa a un medio MS sin reguladores para formación y elongación de raíces. A los 30 a 40 días la planta tiene raíces de 7 a 30 mm.

Posteriormente las plántulas enraizadas se lavan para eliminar el agar, se llevan a una solución con fungicida y se trasplantan a medio con turba, bajo condiciones de invernadero con luz y temperatura. Después de un mes de desarrollo pueden ser llevadas a campo.

Propagación vegetativa: Enraizamiento de estacas.

Para *Vasconcellea*, la información existente indica que estacas con brote terminal tienen facilidad de enraizamiento, en cambio las estacas distales del ápice requieren ciertas condiciones ambientales para su enraizamiento (Cuellar y Villalobos, 1974).

Si bien esta técnica existe, no existe un protocolo descrito que involucre desde la producción de material madre hasta el enraizamiento de él. Esto es importante ya que los papayos tienen una marcada dominancia apical la cual se inhibe al eliminar el ápice y/o usar reguladores de crecimiento para poder generar brotes basales en abundancia que sirvan de material madre.

Las condiciones ambientales de los ensayos: aire libre e invernadero difieren en las temperaturas especialmente en las máximas, las cuales bajo invernadero se acercaba a 35° C durante los meses de evaluación de los tratamientos realizados con estacas colectadas en primavera (Figuras 26 y 27) Esta condición puede haber contribuido a que las estacas más herbáceas se deshidrataran con mayor rapidez. A diferencia de las estacas colectadas en invierno, que coincidió con una primavera más fría. Igualmente, que el ensayo anterior las estacas herbáceas (apicales) sufrieron deshidratación independiente de la temperatura.

La literatura indica que el enraizamiento de estacas de mayor diámetro, para la especie *Carica papaya*, se produce a los dos meses (Allan, 1995) mientras que estacas más delgadas demoran alrededor de tres semanas. En este caso, las plantas de *Vasconcellea* fueron evaluadas a los tres meses de iniciado el ensayo.

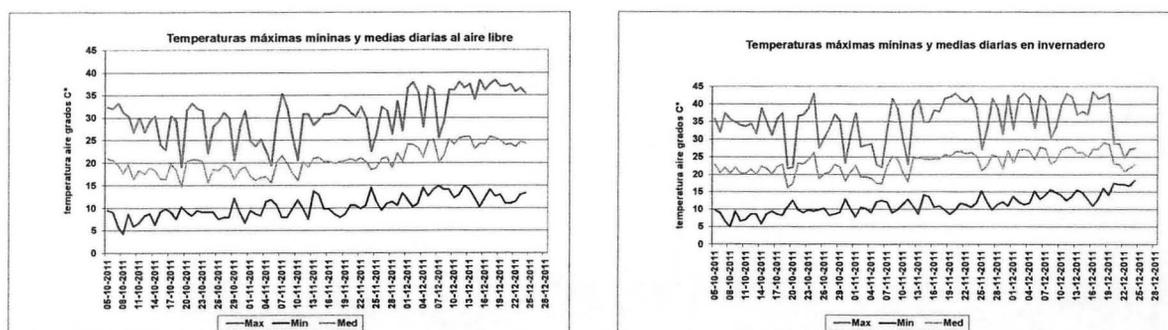


Figura 26. Temperaturas registradas en el período de enraizamiento el invernadero y al aire libre. 2011.

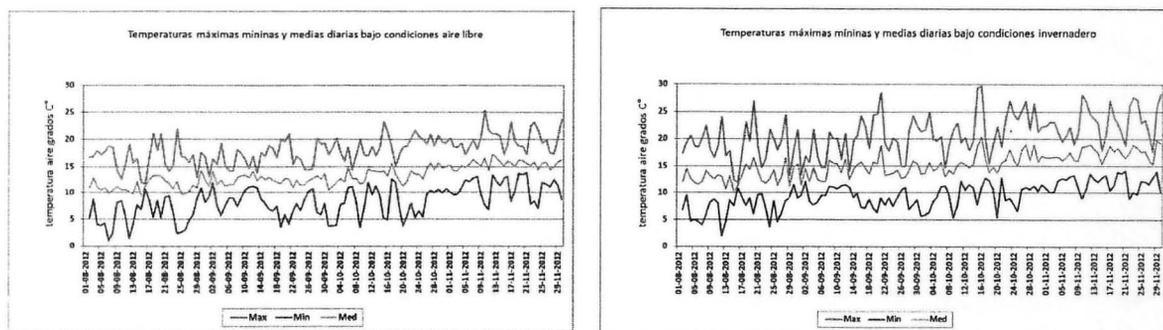


Figura 27. Temperaturas registradas en el período de enraizamiento el invernadero y al aire libre. 2012.

Ensayo de plantas ambisexuales.

Ambos ensayos realizados, el 2011 y 2012, presentaron una sobrevivencia dependiente del tipo de estaca, apical y basal, las cuales diferían en su tejido, herbáceo o leñoso, respectivamente. Las estacas apicales muestran un mayor grado de deshidratación, sobreviviendo en un 50 %, valor significativamente inferior al de estaca basal (70 %).

Variable de Enraizamiento.

El porcentaje de plantas con algún grado de enraizamiento fue dependiente del tipo de estaca, independiente de la condición. El porcentaje de plantas enraizadas siempre fue mayor en las estacas basales. Mientras que la ausencia de hormona influye en forma positiva sobre el porcentaje de enraizamiento, en las estacas sometidas a las dos condiciones de aire libre e invernadero para el 2011 y en el 2012 para la condición aire libre (cuadro 22).

Cuadro 22. Tasa de Enraizamiento (%) de plantas ambisexuales bajo dos condiciones ambientales, sometidas a los tratamientos de enraizamiento 2011 y 2012.

Tipo de estaca	2011		2012	
	Aire libre	Invernadero	Aire libre	Invernadero
	Enraizamiento (%)			
apical	18.75b	21.85b	28.1 b	25.0 b
basal	84.37a	75 a	81.5 a	78.1 a
Hormona				
Con hormona	37.5 b	34.37b	40.0 b	50 a
Sin hormona	65.62a	62.47a	68.8 a	53 a
CV (%)	47	46	13.6	14.7

Bajo cada condición, letras distintas entre filas indican diferencias significativas para tipo de estaca y hormona, según Test de Duncan $p \leq 0.05$

Durante el ensayo del 2012, se incluyó como variable la categoría de raíces según tabla presentada en metodología. Las estacas basales presentaron una mejor categoría, para aire libre e invernadero, especialmente en ausencia de hormonas (cuadro 23).

Cuadro 23. Calidad de enraizamiento de plantas ambisexuales, expresada en categorías de acuerdo a tipo de estacas y aplicación de hormona. 2012.

	Apical	Basal
Invernadero		
Con hormona	1.0 aB	2.5 bA
Sin hormona	1.0 aB	3.5 aA
Aire Libre		
Con hormona	0.12 bB	1.81 aA
Sin hormona	0.87 aB	2.87 a A

Las categorías (0-4) fueron transformadas a puntuaciones y se aplicó la prueba de Chi-cuadrado. Letras minúsculas (filas) Letras mayúsculas (columnas), iguales indican que tratamientos son similares.

Las épocas de colecta, ensayo del 2011 colecta en Octubre y del 2012, colecta en agosto, y las hormonas usadas (NAA e IBA) mostraron resultados similares en las variables evaluadas para las estacas basales.

En definitiva, el tipo de estaca es consistentemente influyente tanto en la sobrevivencia como en el enraizamiento en ambas condiciones evaluadas.

Ensayo de plantas hembras.

En las plantas hembras, el porcentaje de sobrevivencia también es dependiente del tipo de estaca y de hormona (presencia o ausencia de IBA), tanto en invernadero como al aire libre. El % de sobrevivencia está sobre el 80 % en las estacas basales con o sin hormona.

Variable de enraizamiento.

El enraizamiento, al igual que la sobrevivencia es dependiente del tipo de estaca y hormona (presencia o ausencia), tanto al aire libre como en invernadero. Las estacas basales en general tienen un mayor porcentaje de plantas enraizadas que las estacas apicales y, al igual que las plantas ambisexuales las estacas en ausencia de hormonas enraízan en mayor porcentaje que

las con hormona, a excepción de estacas basales al aire libre, las cuales enraízan en igual magnitud en presencia o ausencia de Hormonas.

Cuadro 24. Tasa de Enraizamiento (%) de plantas hembras bajo dos condiciones ambientales, sometidas a los tratamientos de enraizamiento.2011

	Aire libre		Invernadero	
	Con Hormona	Sin hormona	Con Hormona	Sin hormona
apical	0 bB	37.5aA	0 bB	62.5bA
basal	62.5aA	56.2aA	68.75aB	87.5aA
CV(%)	52.2		13.0	

Letras Minúsculas y Mayúsculas distintas indican diferencia significativa ($p < 0,05$) para tipo de estaca y hormona respectivamente.

Cuadro 25. Porcentaje de enraizamiento de estacas de plantas hembras bajo condiciones de aire libre e invernadero.2012

Tipo de estaca	Invernadero	Aire libre
apical	21.9 b	31.25 b
basal	81.2 a	71.8 a
Hormona		
Con hormona	34.4 b	40.6 b
Sin hormona	68.8 a	62.5 a
CV (%)	12.6	15.25

El enraizamiento de ellas también fue mayor en las estacas basales tanto bajo al aire libre como en el invernadero. La presencia de hormona no favoreció un mayor porcentaje de estacas enraizadas.

En el ensayo de la temporada 2012, la categoría de raíces fue mayor en las estacas basales sin hormona, siendo la condición de invernadero donde se promueve una mejor calidad de raíces (cuadro 26 y 27).

Cuadro 26. Calidad de enraizamiento expresada en categorías de acuerdo a tipo de estacas. 2012.

	Apical	Basal
Invernadero		
Con hormona	0.18 b	2.18 b
Sin hormona	1.18 a	3.56 a
Aire Libre		
Con hormona	0.06 b	0.5 b
Sin hormona	1.5 a	1.37 a

Cuadro 27. Calidad de enraizamiento expresada en categorías de acuerdo a aplicación de hormona estimulante. 2012.

	Con hormona	Sin hormona
Invernadero		
Apical	0.18 b	1.18 b
Basal	2.18 a	3.56 a
Aire Libre		
Apical	0.06 b	0.5 b
Basal	1.5 a	1.37 a

Las categorías (0-4) fueron transformadas a puntuaciones y se aplicó la prueba de Chi-cuadrado. Letras iguales entre filas indican que son similares.

Respuesta de estacas enraizadas en campo

Las estacas seleccionadas tenían un diámetro promedio aproximado de 26 mm en el momento de inicio de los ensayos. Luego de enraizadas y plantadas, a los 6 meses, las plantas se encontraban totalmente arraigadas, con un diámetro de tronco promedio de 35 mm y una altura de planta 75 cm. Luego del despunte, realizado en septiembre del 2013, las plantas tenían en promedio 2.8 tallos por planta (Figura 28).



Figura 28. Plantas de papayo originadas a partir de estacas enraizadas. Altovalsol, noviembre de 2013.

Esta unidad se desarrolló con el fin de ofrecer una alternativa al agricultor, en el caso que no se diera con una identificación precoz de los sexos de las plantas. De esta manera se pueden producir esquejes desde una planta madre con características sobresalientes y de sexo definido.

Para *Carica papaya* existen protocolos de propagación vegetativa tanto de estacas como de injertos. Ambas técnicas permiten tener plantas uniformes e incluso con una producción más temprana, menor altura de producción y con mejor producción (Drew, 1988; Chan y Theo, 2002). Uno de los obstáculos para aplicar esta técnica es la fuerte dominancia apical que impide una brotación lateral, lo que concuerda con la dificultad encontrada en este ensayo. Para esto, estudio en *Carica* propone solución con aplicación de hormonas, una mezcla de citoquininas y giberelinas (Allan 1995 y Ono et al.2004).

El protocolo de enraizamiento desarrollado en el proyecto tuvo una duración de 9 meses, desde el inicio de enraizamiento (Agosto 2012) hasta la plantación (mayo de 2013). El periodo, desde la plantación al inicio de floración (60 % de las plantas), fue de 6 meses más.

Durante el ensayo no se presentaron mayores problemas aunque algunas plantas, presentaron hojas con ciertas deformidades que pueden estar asociadas a problemas de virus u otro microorganismo. Esto es de especial relevancia si la forma de propagación de plantas se hace por estacas. Antes de usar la metodología propuesta se debería seleccionar material para realizar un análisis de la sanidad de éste.

En general a la luz de los resultados de este ensayo se puede decir que:

Las estacas basales presentan un mayor porcentaje de enraizamiento con un volumen radicular bueno (cercano a categoría 4). Esta se produce de mejor forma en ausencia de hormonas y para las plantas hembras bajo condiciones de invernadero. Estos resultados son similares a los obtenidos en estacas colectadas en primavera.

El proceso de rizogénesis es dependiente de varios factores siendo algunos de ellos las sustancias de reserva y las hormonas. La relación HC/ N es importante para un buen enraizamiento, siendo mejor en aquellos tejidos donde la presencia de carbohidratos es mayor. Es posible que las estacas basales esta proporción sea mejor que en las estacas apicales, lo que puede explicar al mejor tasa de enraizamiento.

Por otra parte, la no respuesta a la aplicación de hormona puede deberse al nivel endógeno de auxina presente en el material vegetativo.

Las estacas apicales muestran un grado de deshidratación importante.

Ensayo de injertación convencional.

El sellamiento, después de 30 días de injertación, podía verse reflejado por el callo visible entre ambas partes de la unión.

El grado de sellamiento fue comprobado a los dos meses de realizado el injerto a través de la observación vía microscopio de la zona de unión del injerto y comprobar la conexión de los tejidos conductores.

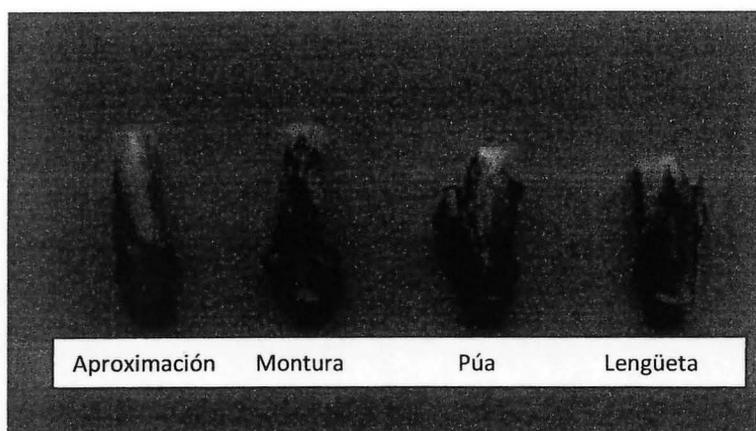


Figura 29. Injerto de aproximación, montura, cuña e hendidura y lengüeta (de izquierda a derecha).

El prendimiento se relaciona con el sellamiento de las partes de un injerto. Los porcentajes de prendimiento dentro de cada tratamiento fueron bastante variables entre las repeticiones para la temporada 2011, no así para el 2012. Los porcentajes de prendimiento son reconocidos como satisfactorios por el viverista, no mostrando diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, el injerto de montura presenta un mayor rango de prendimiento, lo que llevado a una escala más alta, puede ser menos eficaz. Los resultados de las dos temporadas de injertación se presentan en el cuadro siguiente:

Cuadro 28. Porcentaje de prendimiento a los tres meses de la injertación. 2011 y 2012.

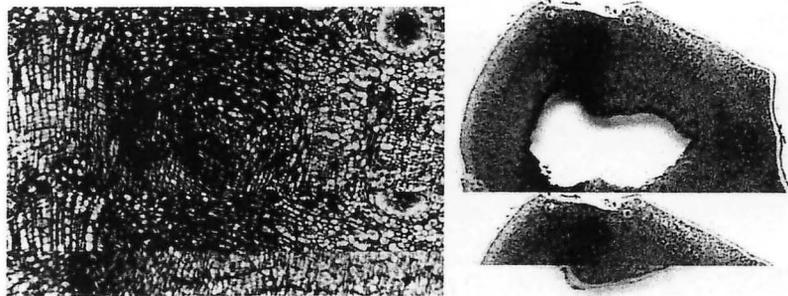
Tratamientos	Rango de % prendimiento de las repeticiones	Porcentaje de prendimiento (%)	Rango de % prendimiento de las repeticiones	Porcentaje de prendimiento (%)
	2011		2012	
T1 aproximación	25-100	62.5a	83-100	91
T2 montura	25-75	43.7a	33-83	62
T3 cuña o hendidura	50-75	68.7a	66-100	83.3
T4 lengüeta	25-75	43.7a	66-100	79.1
Valor F				2.47
p>0.05				0.1119
C.V %		12		5.08

Los porcentajes fueron transformados a $\sqrt{x/100} + 1$. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos.

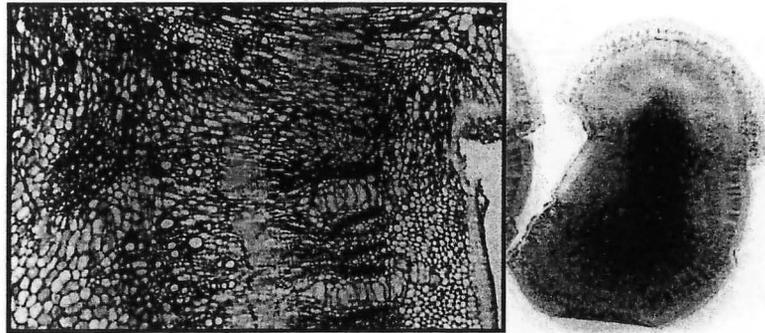
Lo anteriormente mencionado se puede verificar a través de la observación histológica. Las diferentes técnicas de injertación presentaron uniones sólidas en cuanto a la proliferación de callo en las zonas de uniones de los tejidos.

La zona de unión en todos los injertos presenta una visible proliferación de nuevo tejidos que unió ambas partes, como se observa en la Figura 31. Este tejido, bajo el microscopio de luz, se traduce en la unión de patrón injerto con buena cicatrización y sin zonas necrosadas en todos los tipos de injerto realizados, después de tres meses.

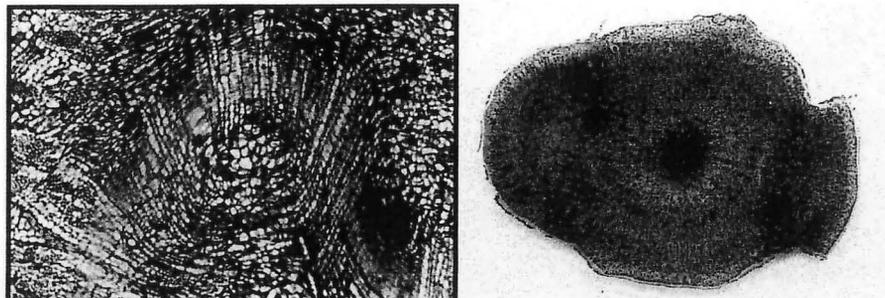
Injerto aproximación.



Injerto de montura



Injerto de púa



Injerto de lengüeta

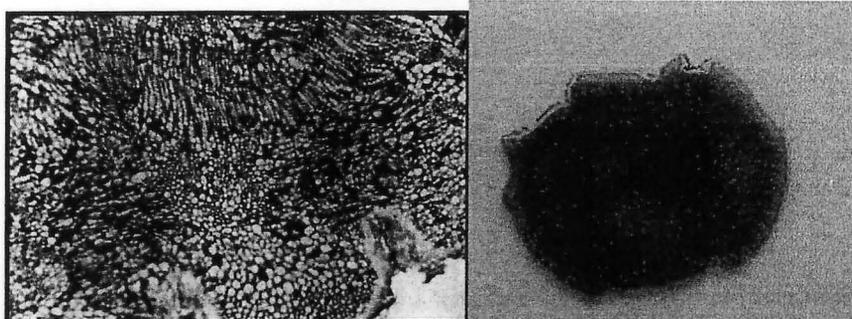


Figura 30. Observaciones histológicas bajo microscopio de luz. Detalle de los tejidos en la zona de unión donde se observa callo y proliferación de tejidos conductores.

Comportamiento de plantas injertadas en campo.

La duda frente a las técnicas de injertación es si los injertos de menor superficie de contacto entre partes, como el de aproximación, pueden ser más débiles frente a condiciones de campo (viento) que otro como un injerto de lengüeta o de cuña e hendidura.

Después de 6 meses de plantación, las plantas se ven bien establecidas y las zonas de injerto se encuentran bien selladas y sin malformaciones, excepto para el injerto de lengüeta como se muestra en las figuras siguientes.

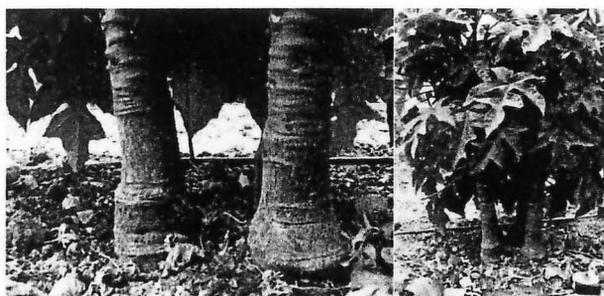


Figura 31. Injerto de aproximación.



Figura 32. Injerto de Montura.

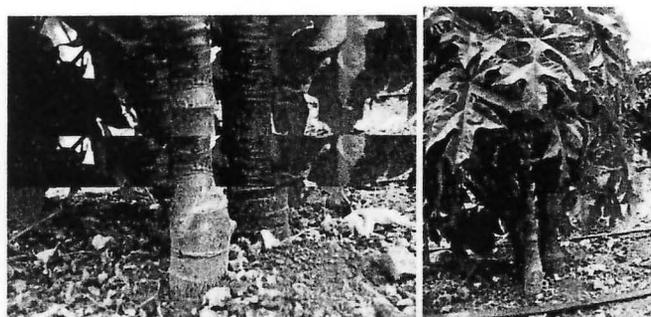


Figura 33. Injerto de cuña e hendidura.



Figura 34. Injerto de lengüeta.

En cuanto al crecimiento, las plantas de los distintos tratamientos de injerto, 6 meses después de plantación, presentan un patrón similar.

Cuadro 29: Variables de crecimiento de los tratamientos de injerto, 6 meses después de plantación.

Injerto	Diámetro promedio de patrón (*)	Diámetro de injerto(*)	Altura de planta(*)	% de plantas con floración
Aproximación	62.4±4.8	48.6±4.4	88.8±4.6	41.6
Montura	61.1±4.8	44.8±4.4	83.0±4.6	53.8
Cuña e Hendidura	65.6±5.3	50.0±4.6	89.2±5.1	70.0
Lengüeta	64.3±4.8	48.5±4.4	92.0±4.6	58.0

(*)No hay diferencias significativas $p \leq 0.05$. Valores promedios \pm E.S, n=12 plantas

Dado los resultados a la fecha, esta práctica podría ser recomendada para realizarse en el momento en que se ralean las plantas machos, injertándolas con estacas de plantas hembras o ambisexuales.

Objetivo 4. Capacitar a nivel de viveristas y agricultores sobre el reconocimiento de caracteres morfológicos asociados al sexo en plantas a temprana edad y sobre técnicas de propagación.

Antecedentes y resultados en IV. Informe de difusión.

Objetivo 5. Comparar en términos productivos y económicos el sistema productivo actual con un nuevo sistema que incorpore las innovaciones desarrolladas por el proyecto (objetivo incorporado).

Resultados en Anexo IV.

4.1 Resultados Alcanzados.

Las discrepancias entre los resultados esperados y obtenidos se debieron a que los marcadores con muestras de ADN macho (100%), muestras ambisexuales y muestras hembras en plantas de *Vasconcellea*, NO presentaron diferencias en la obtención de amplicones diferenciales para algunos de ellos, no permitiendo la identificación de marcadores que amplificaran diferencialmente e imposibilitando el sexaje molecular en estadios tempranos. Esto último, fue considerado como un riesgo tecnológico en la propuesta, para lo cual se propuso generar protocolos de propagación vegetativa convencional e in vitro, además de proponer una polinización dirigida de manera de disminuir la probabilidad de plantas machos.

El periodo de maduración del fruto, de aproximadamente 8 meses, impidió la validación del carácter morfológico con el sexo de las plantas, dado también por la duración del proyecto. Por otra parte, el retraso en la maduración del fruto, implicó la obtención de plantas en una época inadecuada (noviembre –diciembre) para el establecimiento en terreno.

Cuadro 30. Resultados esperados en la propuesta de proyecto y los alcanzados finalmente.

Nº OE	Resultado Esperado (RE)	Resultado Alcanzado
1	Marcador molecular específico para <i>V. pubescens</i> asociado a sexo de plantas	No se encontró un marcador molecular.
2	Carácter morfológico asociado a sexo de plantas	Se encontraron caracteres asociados a hojas, plántulas y semillas
1 y 2	Protocolo de detección temprana de sexo de plantas	No se consigue el Protocolo de detección temprana de sexo definido. Se define un protocolo de polinización dirigida para mejorar probabilidad de plantas productivas de sexo determinada.
3	Protocolo de propagación agámica	Protocolo de propagación asexual: injertación y enraizamiento de estacas. Protocolo de propagación in vitro
4	Agricultores y viveristas capacitados	No se capacitó. Sólo se capacitan a los asociados al proyecto.
4	Agricultores y viveristas capacitados	No se realizan folletos
4	Análisis de costo de tecnología propuesta versus la tecnología convencional	Análisis de costo de tecnología convencional

4.2 Fichas Técnicas y Análisis Económico.

En anexo IV, en CD o en informe 3, se encuentra el detalle del análisis técnico económico del cultivo del papayo, bajo el sistema agronómico convencional.

- Fichas de costo de establecimiento del cultivo.

JH=Jornada por persona
JM=Jornada maquina

Establecimiento de cultivo/Ha.

Preparación del suelo o terreno	Unidad	#	Cantidad o Coef Tecnico(JH/ha ó JM/ha)	\$/Unidad	Costos \$/ha
Análisis de suelo					\$ 25.000
Maquinaria					
Desmante/despedadura	JM	4	0,16	\$ 87.500	\$ 56.000
Retro-excavadora	JM	1	0,5	\$ 400.000	\$ 200.000
Niveladora.	JM	4	0,44	\$ 71.100	\$ 125.136
Subsolación	JM	2	0,5	\$ 73.500	\$ 73.500
Arreglo y estructura	JH	2	2	\$ 11.250	\$ 45.000
Aplicación de huano (tractor)	JM	1	0,31	\$ 74.100	\$ 22.971
Temporales	JH	2	2	\$ 11.250	\$ 45.000
Riego					\$ 300.000
Plantación			Unidad	Costo/Unidad(\$)	Costo/plantas
Propagación de plantas			2220	600,00	\$ 1.332.000
Plantación (Transplante a terreno)	JH	1	3	11.250,00	\$ 33.750
Replante			Unidad	Costo/Unidad(\$)	Costo/plantas
Propagación de plantas (10% del total)			222	600,00	\$ 133.200
Replantación (Transplante a terreno)	JH	1	2	11.250,00	\$ 22.500
Implementación de cultivo			Número/JP	Valor/JP	Costos/ha
Hoyadura	JH	3	2	\$ 11.250	\$ 22.500
Plantación	JH	2	2	\$ 11.250	\$ 22.500
Cuidado del cultivo	JH	1	2	\$ 11.250	\$ 22.500
Imprevistos y otros Gastos					\$ 150.000
Costo total establecimiento del cultivo /ha					\$ 2.681.537

- Flujo de cajas para vivero.

Flujo de caja, Viveristas.

Años	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ingresos		9.000.000	9.225.000	9.455.625	9.692.016	9.934.316	10.182.674	10.437.241	10.698.172	10.965.626	11.239.767
Costos											
Costos directos											
Mano de obra		-3.200.000	-3.248.000	-3.296.720	-3.346.171	-3.396.363	-3.447.309	-3.499.018	-3.551.504	-3.604.776	-3.658.848
Insumos			0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bolsas plasticas		-300.000	-304.500	-309.068	-313.704	-318.409	-323.185	-328.033	-332.953	-337.948	-343.017
Sustrato		-800.000	-812.000	-824.180	-836.543	-849.091	-861.827	-874.755	-887.876	-901.194	-914.712
Fertilizantes		-100.000	-101.500	-103.023	-104.568	-106.136	-107.728	-109.344	-110.984	-112.649	-114.339
Pesticida		-200.000	-203.000	-206.045	-209.136	-212.273	-215.457	-218.689	-221.969	-225.299	-228.678
Semillas		-100.000	-101.500	-103.023	-104.568	-106.136	-107.728	-109.344	-110.984	-112.649	-114.339
Imprevistos		-180.000	-182.700	-185.441	-188.222	-191.045	-193.911	-196.820	-199.772	-202.769	-205.810
Costos indirectos		-1.960.000	-1.989.400	-2.019.241	-2.049.530	-2.080.273	-2.111.477	-2.143.149	-2.175.296	-2.207.925	-2.241.044
Depreciación invernadero (10 años)		-688.480	-688.480	-688.480	-688.480	-688.480	-688.480	-688.480	-688.480	-688.480	-688.480
Depreciación Plástico UV (3 años)		-368.000	-368.000	-368.000	-368.000	-368.000	-368.000	-368.000	-368.000	-368.000	-368.000
Utilidad antes de impuesto (UAI)		1.103.520	1.225.920	1.352.406	1.483.095	1.618.109	1.757.571	1.901.609	2.050.352	2.203.936	2.362.499
Impuesto		-204.151	-226.795	-250.195	-274.373	-299.350	-325.151	-351.798	-379.315	-407.728	-437.062
Utilidad despues de impuesto (UDI)		899.369	999.125	1.102.211	1.208.723	1.318.759	1.432.420	1.549.811	1.671.037	1.796.208	1.925.437
Depreciación invernadero (10 años)		688.480	688.480	688.480	688.480	688.480	688.480	688.480	688.480	688.480	688.480
Depreciación Plástico UV (3 años)		368.000	368.000	368.000	368.000	368.000	368.000	368.000	368.000	368.000	368.000
Capital de trabajo	-4.560.000										
Recuperación del capital de trabajo											4.560.000
Valor de desecho											736.000
Inversión invernadero	-4.158.403										
Reinversión plástico UV (cada 3 años)				-1104000			-1104000			-1104000	
Reinversión en plastificación				-576000			-576000			-576000	
Flujo de caja neto	-8.718.403	1.955.849	2.055.605	478.691	2.265.203	2.375.239	808.901	2.606.291	2.777.517	1.172.689	8.277.917
VAN (12%)	3.573.198										
TIR	19,60%										

Tasa de descuento	12%
-------------------	-----

• Flujo de caja anual para sistema productivo de la Región de Coquimbo.

Flujo de caja, sin proyecto.										
Año	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
INGRESOS										
COSTOS										
Costos Directos										
Mano de obra										
Limpia a mano	-\$45.000	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Despunte (poda) (2 a tres pasadas en 40 días)	\$0	-\$33.750	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Aplicaciones (herbicidas)	-\$45.000	-\$135.000	-\$202.500	-\$202.500	-\$202.500	-\$202.500	-\$202.500	-\$202.500	-\$202.500	-\$45.000
Cosecha	\$0	\$0	-\$1.770.000	-\$2.340.000	-\$2.612.500	-\$2.115.000	-\$1.586.250	-\$1.248.750	-\$585.000	-\$585.000
Riego	-\$67.000	-\$200.000	-\$250.000	-\$250.000	-\$250.000	-\$250.000	-\$250.000	-\$250.000	-\$250.000	-\$83.333
Aplicación de Pesticidas (fungicidas) sin tractor	-\$22.500	\$0	\$0	-\$67.500	-\$67.500	-\$67.500	-\$67.500	-\$67.500	-\$67.500	-\$45.000
Eliminación de plantas macho	\$0	-\$45.000	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Mantenión y labores generales	-\$11.250	-\$22.500	-\$45.000	-\$67.500	-\$67.500	-\$67.500	-\$67.500	-\$67.500	-\$67.500	-\$45.000
Servicio de maquinaria										
Aplicación de Pesticidas	\$0	-\$74.865	-\$74.865	-\$74.865	-\$74.865	-\$74.865	-\$74.865	-\$74.865	-\$74.865	-\$49.910
Cosecha	\$0	\$0	-\$48.295	-\$48.295	-\$48.295	-\$48.295	-\$48.295	-\$48.295	-\$48.295	-\$29.977
Tractor (Transporte insumos y labores generales)	-\$29.800	-\$68.400	-\$44.700	-\$44.700	-\$44.700	-\$44.700	-\$44.700	-\$44.700	-\$44.700	-\$29.800
Insumos										
Fertilizantes	-\$177.648	-\$532.945	-\$532.945	-\$532.945	-\$532.945	-\$532.945	-\$532.945	-\$532.945	-\$532.945	-\$355.297
Programa fitosanitario										
Control de plagas y enfermedades	-\$4.000	-\$50.000	-\$100.000	-\$100.000	-\$100.000	-\$100.000	-\$100.000	-\$100.000	-\$100.000	-\$66.667
Control de malezas	-\$24.000	-\$72.000	-\$72.000	-\$72.000	-\$72.000	-\$72.000	-\$72.000	-\$72.000	-\$72.000	-\$48.000
Imprevistos (10% de los costos Directos)	-\$42.620	-\$125.546	-\$308.031	-\$380.031	-\$427.281	-\$357.531	-\$304.656	-\$270.906	-\$138.198	
Costos Indirectos										
Contribuciones	-\$55.000	-\$65.000	-\$65.000	-\$65.000	-\$65.000	-\$65.000	-\$65.000	-\$65.000	-\$65.000	-\$10.000
Agua de riego	-\$7.000	-\$21.000	-\$21.000	-\$21.000	-\$21.000	-\$21.000	-\$21.000	-\$21.000	-\$21.000	-\$14.000
Asesoramiento externo	-\$25.000	-\$105.000	-\$105.000	-\$105.000	-\$105.000	-\$105.000	-\$105.000	-\$105.000	-\$105.000	-\$70.000
Combustibles y lubricantes movilización	-\$10.000	-\$30.000	-\$30.000	-\$30.000	-\$30.000	-\$30.000	-\$30.000	-\$30.000	-\$30.000	-\$20.000
Gastos en administración (No se contabiliza, lo administra el dueño)	-\$30.000	-\$90.000	-\$90.000	-\$90.000	-\$90.000	-\$90.000	-\$90.000	-\$90.000	-\$90.000	-\$50.000
Gastos generales	-\$28.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$56.000
Mantenimiento de Activos (Reparación y mantenimiento de equipos)	-\$28.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$84.000	-\$56.000
Depreciación	-\$97.036	-\$84.836	-\$65.804	-\$65.804	-\$60.924	-\$93.132	-\$80.932	-\$61.900	-\$24.400	-\$24.400
Porcentaje de pérdida 4% del ingreso	\$0	\$0	-\$290.306	-\$441.052	-\$522.618	-\$416.174	-\$313.769	-\$236.553	-\$116.750	
Utilidad antes de impuesto (UAI)	-\$758.854	-\$2.044.842	\$2.934.216	\$5.760.106	\$7.202.817	\$5.383.214	\$3.519.307	\$2.056.415	\$857.027	
Impuesto a las utilidades (18,5%)	\$0	\$0	\$542.830	\$1.065.620	\$1.332.521	\$995.895	\$651.072	\$380.437	\$158.550	
Utilidad después de impuesto	-\$758.854	-\$2.044.842	\$2.391.386	\$4.694.486	\$5.870.296	\$4.387.319	\$2.868.235	\$1.675.978	\$698.477	
Depreciación		\$97.036	\$84.836	\$65.804	\$65.804	\$60.924	\$93.132	\$80.932	\$61.900	\$24.400
Capital de trabajo	-\$2.952.435									
Recuperación del capital de trabajo										\$2.952.435
Valor de desecho										\$9.520
Inversión en establecimiento del cultivo	-\$2.631.557									
Inversión instrumentos de producción	-\$485.904									
FLUJO DE CAJA /ha	-\$6.070.895	-\$661.818	-\$1.960.006	\$2.457.190	\$4.760.290	\$5.763.895	\$4.480.451	\$2.949.167	\$1.737.878	\$3.634.888
VAN	\$5.458.758									
TIR	24%									

• Flujo de caja anual para sistema productivo de la Región de Valparaíso.

Flujo de caja, sin proyecto, sin implementación de invernadero, QUINTA REGIÓN

Año	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
INGRESOS		\$ 0	\$ 0	\$ 9.393.683	\$ 11.843.208	\$ 16.009.383	\$ 16.991.771	\$ 15.262.210	\$ 12.572.369	\$ 11.651.627	\$ 10.141.004	\$ 8.783.045	\$ 7.270.957	\$ 3.741.097
COSTOS														
Costos Operacionales														
Mano de obra														
Limpia a mano														
Despunte (poda) (2 a tres pasadas en 40 días)														
Aplicaciones (herbicidas)														
Cosecha														
Flaga														
Aplicación de Pesticidas (fungicidas) sin tractor														
Eliminación de plantas macho														
Arreglo de estructura y mantenimiento														
Manejo post cosecha														
Servicio de maquinaria														
Aplicación de Pesticidas														
Cosecha														
Tractor (Transporte insumos y labores generales)														
Insumos														
Fertilizantes														
Programa fitosanitario														
Control de plagas y enfermedades														
Control de malezas														
Imprevistos (10% de los costos operacionales)														
Costos Indirectos														
Contribuciones														
Agua de riego														
Asesoramiento externo														
Combustibles y lubricantes														
Gastos en administración														
Gastos generales														
Honorarios														
Mantenimiento de Activos (Reparación y mantenimiento de equipos)														
Depreciación														
Capital de trabajo														
Recuperación del capital de trabajo														
Valor de desecho														
Inversión en establecimiento del cultivo														
Inversión instrumentos de producción														
HERRAMIENTA / IVA														
IVA														
IR														
Utilidad antes de impuesto (UAI)														
Impuesto a las utilidades (10,5%)														
Utilidad despues de impuesto														
Depreciación														
Capital de trabajo														
Recuperación del capital de trabajo														
Valor de desecho														
Inversión en establecimiento del cultivo														
Inversión instrumentos de producción														
HERRAMIENTA / IVA														
IVA														
IR														
Tasa de descuento pertinente														
12%														

- **Análisis de las perspectivas del rubro.**

Dentro de las actividades de proyecto se realizó un estudio sobre las causas de disminución de la superficie del papayo a nivel nacional. Dicho estudio plantea en las conclusiones, que la superficie es dependiente de la rentabilidad del cultivo, la cual se ve afectada por precios y expectativas de exportación, enmarcada por condiciones climáticas a veces adversa (heladas y sequías).

En torno a las proyecciones de las plantaciones de papayo, de acuerdo a las encuestas como a partir de la información secundaria no hay señales de que la superficie vaya a disminuir a lo que existe hoy o exista o vaya a existir un aumento significativo de la superficie de cultivo para los próximos 5 años, manteniéndose la superficie actual en torno a las 220 - 230 hectáreas a nivel nacional, ocurriendo sólo plantaciones para mantener la superficie que actual que poseen. Esto puede modificarse en el caso que la sequía siga presente en las principales áreas de producción Coquimbo y Valparaíso.

Después de analizar tendencias positivas y negativas del cultivo, se propone una serie de acciones tendientes a mejorar la competitividad de cultivo, detalladas en anexo V.

4.3 Impactos y Logros del Proyecto.

Los impactos de este proyecto se relacionan con la generación de un protocolo de propagación in vitro, el cual es nuevo para Vasconcellea. Considerando esta técnica se basa la propagación de accesiones elite, que se realizará en un proyecto de continuidad.

Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Proceso		1	1 1	Protocolo de propagación in vitro Protocolo de enraizamiento de estacas Protocolo de injertación

Logro	Número	Detalle
Generación nuevos proyectos	1	Proyecto FIA a iniciarse el 2014 que tiene como objetivo mejorar la productividad de huertos de Vasconcellea a través de selecciones clonales libres de virus junto con un protocolo agronómico para el establecimiento y replante.

Impactos Científicos.

Logro	Número	Detalle (Citas, título, descripción)
Publicaciones	3	<ul style="list-style-type: none"> • Formas de evadir el polimorfismo sexual de plantas de papayo. Tierra Adentro en elaboración). • Propagación in vitro. Chilean Journal of agricultural research en elaboración) • Expresión floral de papayos bajos condiciones climáticas diferentes. Nota científica en Chilean Journal of agricultural research (en elaboración)
<i>(Por Ranking)</i>		
Eventos de divulgación científica	2	<ul style="list-style-type: none"> • Roxana Gutiérrez, Angélica Salvatierra G., Constanza Jana A., Lucía Martínez G 2012.Determinación de un protocolo de desinfección de semillas in vitro de <i>Vasconcellea pubescens</i>. Phil." 63 Congreso Agronómico de Chile. Temuco. Poster • R. Gutiérrez, A. Salvatierra, C. Jana, L. Martínez.2012. Evaluación de dos concentraciones de ácido naftalen acético y Bencil amino purina para favorecer la germinación y desarrollo in vitro de <i>Vasconcellea pubescens</i>. Phil.". 63° Congreso Agronómico de Chile. Temuco. Poster

		<ul style="list-style-type: none"> • Angélica Salvatierra G., Constanza Jana A., Roxana Gutiérrez, Lucía Martínez G. 2012. Propagación vegetativa de papayos (<i>Vasconcellea pubescens</i>) como alternativa de evasión para el polimorfismo sexual de las plantas. 63° Congreso Agronómico de Chile. Temuco. Oral • Constanza Jana, Angélica Salvatierra, Roxana Gutiérrez, Andrés Zurita, Marisol Herrera, Lucía Martínez..2012. Caracterización morfológica y molecular de plantas de papayo (<i>Vasconcellea pubescens</i>) en la región de Coquimbo. Resultados preliminares. 63° Congreso Agronómico. Temuco. Oral • Jana, C., A. Salvatierra, A. Zurita, R. Gutiérrez, L. Martínez, A. Morales y M. Herrera. 2013. Caracterización morfológica y molecular de plantas de papayo (<i>Vasconcellea pubescens</i>) de sexo diferente. 64° Congreso Sociedad Agronómica de Chile. Viña del Mar Chile, Septiembre 2013. Libro de Resúmenes pág 82.
--	--	--

5 Problemas Enfrentados Durante el Proyecto.

- Técnicos.

Demora en la obtención de frutos, provenientes de polinizaciones dirigidas, por duración de 8 meses de la maduración de frutos.

Expresión floral de plantas hermafroditas dependiente de temperaturas, lo que llevó a incluir plantas de ese sexo como plantas machos.

- Gestión.

En principio los asociados al proyecto fueron 7 agricultores de la zona dedicados al rubro del papayo. Sin embargo, hacia el final del proyecto, 3 de ellos se fueron retirando, esto se reflejó en no hacer efectivo su aporte comprometido y no participar de las actividades del proyecto.

Algunos de ellos, no continuaron con el rubro debido a problemas de sequía. Aparentemente también habría problemas económicos.

Por otra parte, los 4 agricultores restantes, si bien fueron partícipes de la mayor parte de las actividades del proyecto y conforman los asociados del proyecto de continuidad del papayo, hubo diferencias en los aportes pecuniarios, no completando algunos de ellos el total de aporte comprometido. Dos de ellos, ubicados en la zona de Petorca, se han visto seriamente afectados por la sequía.

Se hizo intentos para hacer efectivo su aporte pero esto no fue posible, siendo además innecesario dado los costos del proyecto.

6 Otros Aspectos de Interés

No hay otros aspectos.

7 Conclusiones y Recomendaciones:

- Técnico

Los resultados obtenidos en este proyecto permitirían evadir el polimorfismo sexual a través de la propagación in vitro de plantas que presenten características promisorias.

Este protocolo permitirá avanzar hacia material homogéneo, pero aún debe hacerse el estudio de costos para ver si esta técnica es posible de usarse en esta especie, bajo la actual rentabilidad.

Aunque esta técnica no estaría disponible para los agricultores en forma directa, se puede disminuir las probabilidades de plantas improductivas en el campo a través de injertación, enraizamiento de estacas y/o selección de semillas provenientes de plantas hembras polinizadas por flores hermafroditas.

Todas estas técnicas, ya descritas para Carica papaya, son posibles de adoptar, pero en una menor escala, dado que aún hay limitaciones para su masividad. Estas limitaciones se refieren a que aún no se conoce el grado de resistencia de las plantas injertadas a una carga mayor de fruta. Dado el sellamiento observado a la fecha, se puede dar un buen pronóstico pero sin duda esto se debe evaluar en campo.

También el enraizamiento de estacas, choca con la fuerte dominancia apical de las plantas, lo que puede ser solucionado con la aplicación de hormonas, a plantas seleccionadas. Esta práctica debería ser usada por viveristas, quienes podrían tener plantas madres seleccionadas de donde obtener material vegetal.

La polinización dirigida también puede ser una estrategia para disminuir la probabilidad de plantas machos, de acuerdo a la pauta que se entrega, es decir seleccionar semillas provenientes de plantas hembras que hayan sido polinizadas por flores de plantas ambisexuales. Sin embargo, esto implica mantener el sistema de propagación por semilla que genera variabilidad entre los materiales en huerto.

IV. INFORME DE DIFUSIÓN.

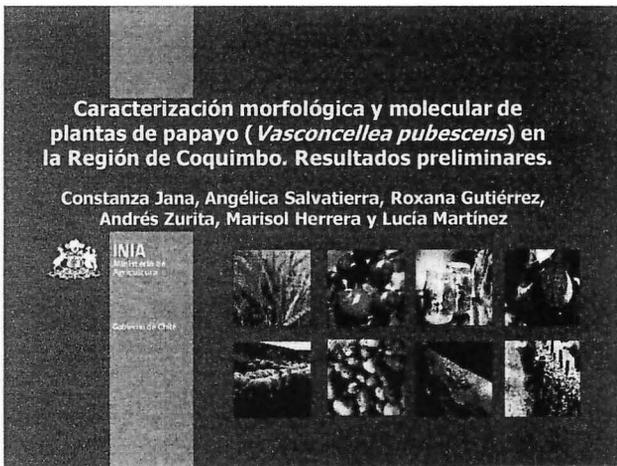
Para el seminario final del proyecto se convirtió en una instancia de dar a conocer las diferentes iniciativas empresariales e investigación que se han hecho en el país y en Brasil. Para ello se invita a exponer a profesionales de distintas instituciones y empresa privadas.

Actividad	Número	Detalles
Presentaciones en congresos agronómicos.	5	Congreso Agronómico 2012. 4 trabajos. Congreso Agronómico 2013 1 trabajo.
Reunión Comité de seguimiento.	4	Reunión con comité de seguimiento conformado por los asociados al proyecto.
Organización de seminarios.	1	Seminario Final en La Serena, en diciembre de 2013.
Días de campo.	1	Organizado por FIA Diego Basly.

Se realiza actividad de difusión del proyecto mediante el apoyo de FIA y su equipo de difusión en particular el Sr. Diego Basly. Esta actividad tuvo amplia cobertura regional tal como se indica en el siguiente cuadro.

Fecha	Medio		Nota	
23-01-13	TVN	Angélica Salvatierra Investigadora de INIA Intihuasi	“estamos avanzando, lo que hemos logrado es establecer diferencias a nivel de semilla. Ahora, si esas diferencias morfológicas que tu puedes ver visualmente, están relacionadas con el sexo, eso lo vamos a poder saber en poco tiempo”.	Noticiero de medio día, en titulares, tercer bloque. 2 minutos
23-01-13	TVN	Angélica Salvatierra Investigadora de INIA Intihuasi	“estamos avanzando, lo que hemos logrado es establecer diferencias a nivel de semilla. Ahora, si esas diferencias morfológicas que tu puedes ver visualmente, están relacionadas con el sexo, eso lo vamos a poder saber en poco tiempo”.	Noticiero central, en titulares, segundo bloque, 2:30 minutos.
23-01-13	Radio San Bartolomé	Daniela Norambuena Seremi de Agricultura	“Como Ministerio de Agricultura nos comprometemos para hacer todas las gestiones posibles para obtener la Denominación de Origen de Papaya de La Serena”	
23-01-13	Portal de Noticias	Angélica Salvatierra, Investigadora de INIA Intihuasi.	“Lo que haremos es determinar a temprana edad el sexo de la planta, de manera que el viverista pueda ofrecer una planta de sexo determinado, permitiendo al agricultor definir la estructura de su huerto y mejorar la producción”	http://www.pdn.cl/proyecto-buscara-mejorar-productividad-de-papayos-al-conocer-tempranamente-el-sexo-de-las-plantas/
23-01-13	Portal del Campo	Angélica Salvatierra, Investigadora de INIA Intihuasi.	“Lo que haremos es determinar a temprana edad el sexo de la planta, de manera que el viverista pueda ofrecer una planta de sexo determinado, permitiendo al agricultor definir la estructura de su huerto y mejorar la producción”	http://www.portaldelcampo.cl/noticias/verNoticia/32013/proyecto-buscara-mejorar-productividad-de-papayos-al-conocer-tempranamente-el-sexo-de-las-plantas-.html

23-01-13	Radio X	Locutor	“Resolver el polimorfismo sexual de los papayos, desarrollando un protocolo de detección temprana del sexo en plantas y semillas, es el objetivo de un proyecto cofinanciado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), del Ministerio de Agricultura, y ejecutado por el Instituto de Investigación Agropecuaria (INIA) Intihuasi, en la Región de Coquimbo”.	
24-01-13	El Día	Angélica Salvatierra, Investigadora de INIA Intihuasi.	“Buscamos que el viverista pueda diferenciar las semillas. Si es así, se pueden seleccionar las plantas más productivas. De este modo, cuando el agricultor vaya a comprar, ya se sabrá el sexo, y podrá saltarse el proceso de limpiar las plantas que no sirven cuando éstas ya han crecido”	Sección Negocios, página 15
24-01-13	La Región	Angélica Salvatierra, Investigadora de INIA Intihuasi.	“Lo que haremos es determinar a temprana edad el sexo de la planta, de manera que el viverista pueda ofrecer una planta de sexo determinado, permitiendo al agricultor definir la estructura de su huerto y mejorar la producción”	Sección Actualidad, página 14



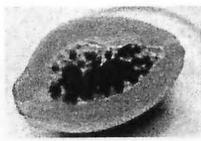
"Obtención de plantas de papayos (*V. pubescens*) con sexo definido mediante un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual usando herramientas biotecnológicas y caracteres morfológicos asociados e identificables por los usuarios y a través del perfeccionamiento de la propagación agámica". FIA PYT 11-0060.

INTRODUCCIÓN

Vasconcellea pubescens o *V. cundimarcensis* - *Carica papaya* (Badillo 1993-2001)



Frutal símbolo de la región de Coquimbo



INTRODUCCIÓN

Falencias en la cadena productiva por polimorfismo sexual



INTRODUCCIÓN

Forma sexual	Tipo de flor	Árbol
I	femenina	Plantas ginoicas
II	Flor hermafrodita con la parte femenina bien desarrollada	Plantas andromonoicas
III	Flor hermafrodita con la parte femenina irregular	Plantas andromonoicas
IV	Flor hermafrodita con la parte femenina elongada	Plantas andromonoicas
IV+	Flor masculina pero que puede variar a hermafrodita de acuerdo a condición climática	Planta estaminada funcional, también andromonoica
V	Flor masculina	Planta estaminada o androica

Storey, 1941

5

INTRODUCCIÓN

OBJETIVO GENERAL

Caracterización morfológica y molecular de plantas de papayo para desarrollar un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual en plántulas y/o semillas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Seguimiento floración en dos localidades y dos estaciones
- Determinar marcadores moleculares en *V. pubescens* que se asocien al sexo de plantas.
- Establecer caracteres morfológicos de plantas jóvenes y semillas ligados al sexo de plantas.

6

MATERIALES Y METODOS

Seguimiento de floración



7

MATERIALES Y METODOS

Determinar marcadores moleculares en *V. pubescens* que se asocien al sexo de plantas.

- Protocolo de extracción de ADN: extracción ADN CTAB (Rogers & Bendlich, 1988) y Doyle & Doyle (1990)
- Cantidad de tejido, tiempo de implementación, eficiencia
- Utilización de marcadores moleculares de *Carica*
 - Diseño de partidores sexo específicos



8

MATERIALES Y METODOS

Establecer caracteres morfológicos de plantas jóvenes y semillas ligados al sexo de plantas.
Definición de caracteres morfológicos

- Normas UPOV (2010) para *Carica papaya*
- Caracterización morfológica de caricáceas en altura de Cadavid et al. (2002)
- Parte de los descriptores utilizados por Kyndt et al. (2005) en caracterización morfológica de *Vasconcellea*
- Plantas adultas
- Semillas
- Plántulas

MATERIALES Y METODOS

Caracteres del tallo	Medición	Observaciones
Color del tallo	Munsell	
Altura inserción primera inflorescencia	cm	
Ramificación	Ausente o presente	Observación al comienzo de la floración
Diámetro del tallo	mm	A la mitad de la altura del tallo y comienzo de la floración
Nº de nudos del tallo	Número	Desde el suelo hasta la primera flor
Longitud de entrenudos	cm	Entre suelo y primera inflorescencia

MATERIALES Y METODOS

Caracteres de la hoja

Sexo	Nº Hoja	Limbo (cm)	Pecíolo	Lámina	Margen de la hoja	Base del Lóbulo 1º con 2º
	Longitud (cm)					
	Ancho					
	Pigmentación antocianica Ausente/ Presente					
	Altura Omblación					
	Simetría (r/ de lóbulos)					
	Apice					
	Base de la Hoja					
	Longitud de la base (vena primaria) cm)					
	Pinnas					
	Ceja pinnas					
	Fuertemente resplandeciente					
	Margen (ondulado, liso, girado, ciro)					
	No se estrecha sobre la unión					
	Se estrecha sobre la unión (lóbulo apical)					

Ante de la Hoja



Tras de la Hoja



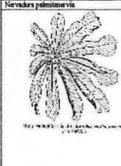


MATERIALES Y METODOS

Caracteres de la hoja

Sexo	Nº Hoja	No se superponen	Se superponen	No aplicable	Lóbulos basales		Categorías de las venas 1º		Categorías de las venas 2º		Categorías de las venas 3º		Nervadura central prolongada	
					Palmiterenia	Retorcida	Palmiterenia	Retorcida	Palmiterenia	Retorcida	Ausente	Presente		

Nervadura palmiterenia



Nervadura Pinnas



Nervadura retorcida



MATERIALES Y METODOS

Caracteres de la hoja

Sexo	Número	Conexión entre las venas primarias y secundarias	Conexión entre las venas secundarias y terciarias	Pubescencia de la hoja (haz)	Pubescencia de la hoja (envés)	Estipulas espinosas
Nº Hoja						
Basales Primarias						
Basales secundarias						
Basales terciarias						
Indefinito						
Distinta						
Indefinito						
Distinta						
Abundante						
Mediana						
Poca						
Abundante						
Mediana						
Poca						
Ausente						
Sin espinas						
Con espinas						

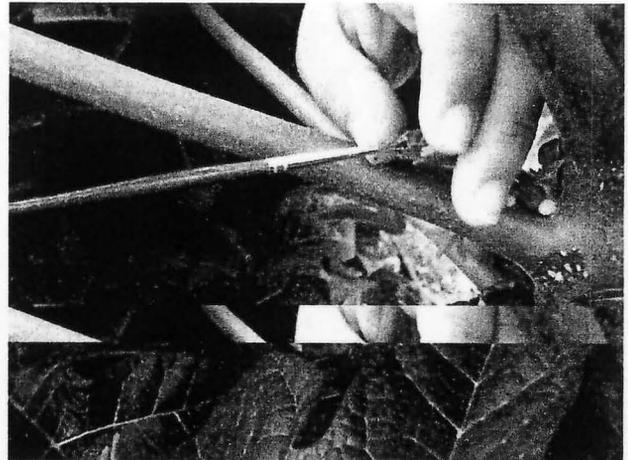
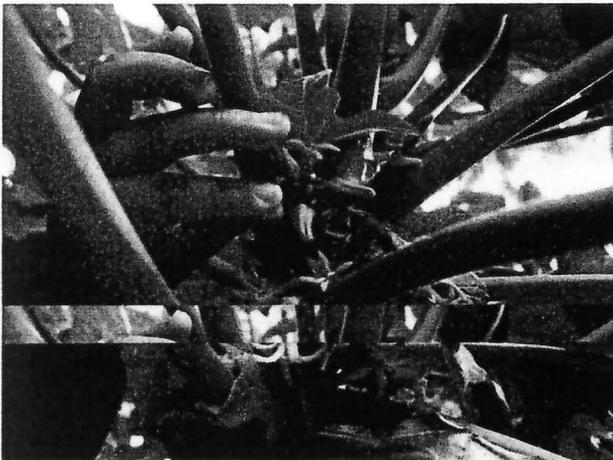
13

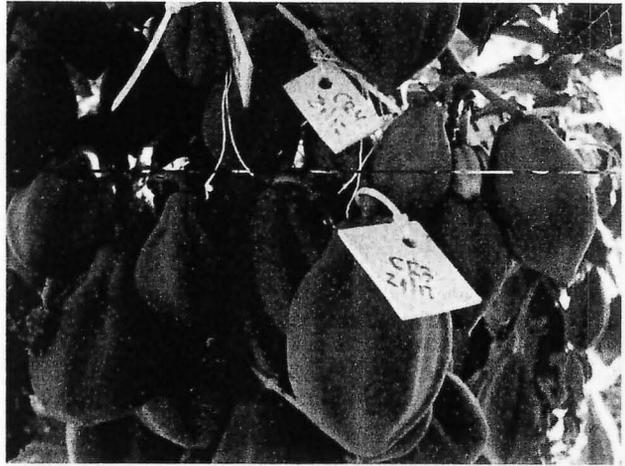
Cruzamientos dirigidos

En *Carica* hay 3 genes involucrados en la expresión sexual
 MM = machos; Mm1 ó Mm2 = hermafroditas; m1m2= hembra
 m1m1 ó m2m2 = letales

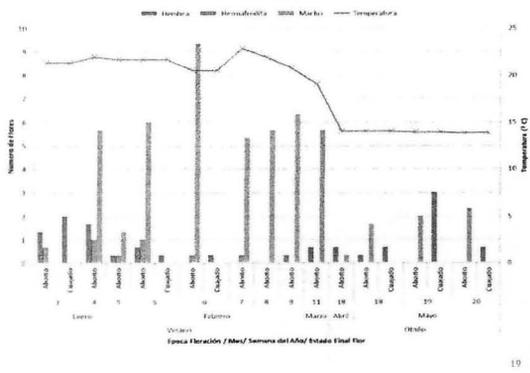
Cuadro 3. Proporción de descendencia esperada de *Vasconcellea* de acuerdo a cruzamientos dirigidos. A) flor hembra de planta hembra, con flor macho de planta macho; b) flor hembra de planta hembra con flor macho de planta hermafrodita; c) flor hembra de planta hermafrodita con flor macho de planta macho d) flor hembra de planta hermafrodita con flor macho de planta hermafrodita e) flor hermafrodita autopolinizada

	M	M'		M	m1		M	M'
m1	Mm1	Mm1	m1	Mm1	m1m1	M	MM	MM
m2	Mm2	Mm2	m2	Mm2	m1m2	m1	Mm1	Mm1
Todas hermafroditas			2/4 hermafroditas: ¼ hembra: 1/4 letal			½ macho: ½ hermafrodita		
	M	m1		M	m1			
M	MM	MM	M	MM	MM			
m1	Mm1	Mm1	m1	Mm1	Mm1			
1/2 macho: 1/2 hermafrodita			1/2 macho: 1/2 hermafrodita					

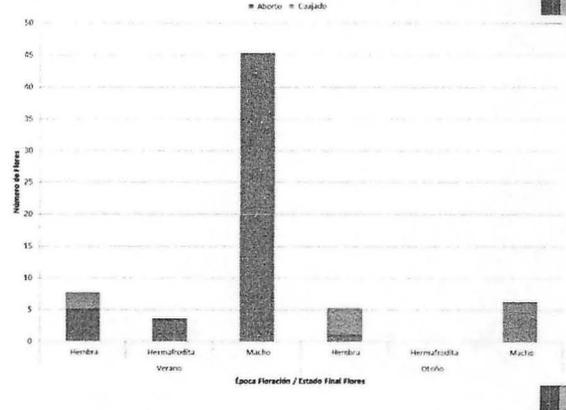




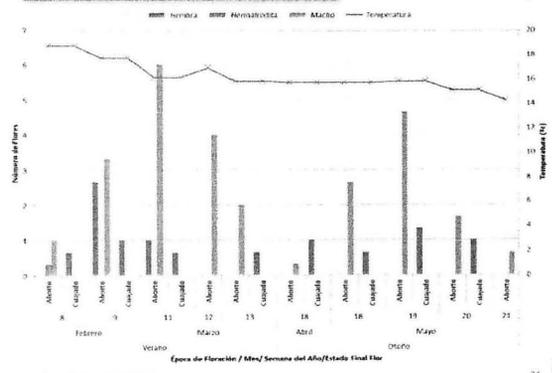
RESULTADOS PRELIMINARES



Resultados seguimiento floración (Altovalsol)



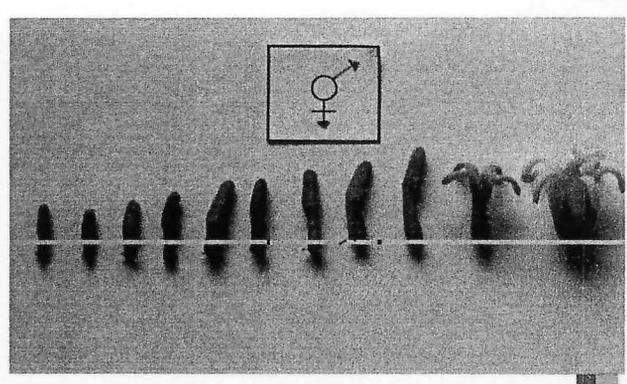
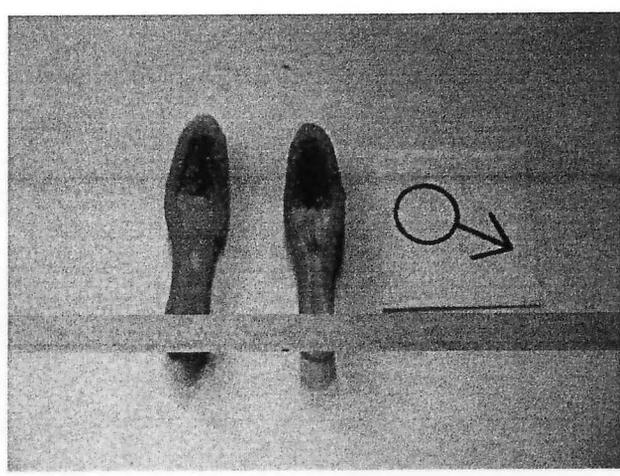
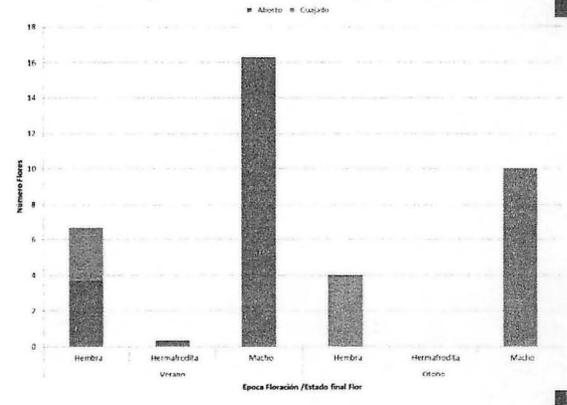
RESULTADOS PRELIMINARES

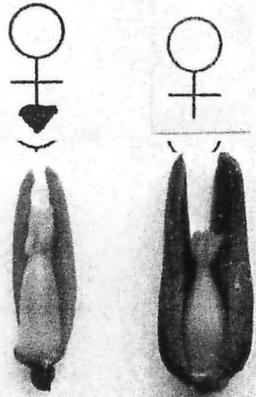


Gobierno de Orizaba | Ministerio del Interior

21

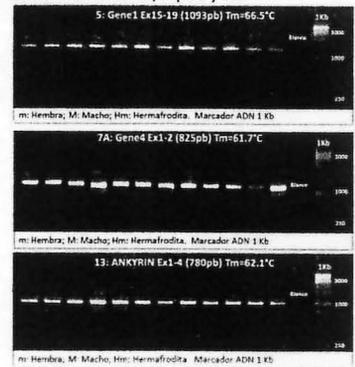
Resultados seguimiento floración (Algarrobito)



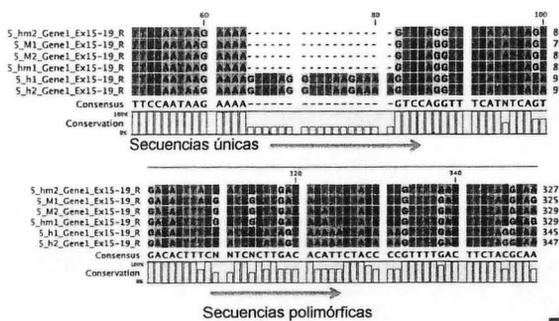


RESULTADOS PRELIMINARES

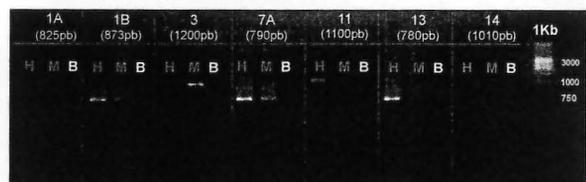
1. Rogers & Bendlich, resultó ser el método más eficiente, rápido y sin mercaptoetanol
2. Se pudo identificar un set de partidores que amplificaron el ADN de las muestras analizadas.
- Estos resultados no permitieron la diferenciación entre muestras de sexos diferentes.
- 3 Marcadores mostraron diferencias de tamaño
- Amplicones fueron secuenciados por sexo y análisis de secuencias mostró diferencias por sexo
- Con esto se podrán diseñar nuevos partidores sexo-específicos.



RESULTADOS PRELIMINARES



RESULTADOS PRELIMINARES



RESULTADOS PRELIMINARES

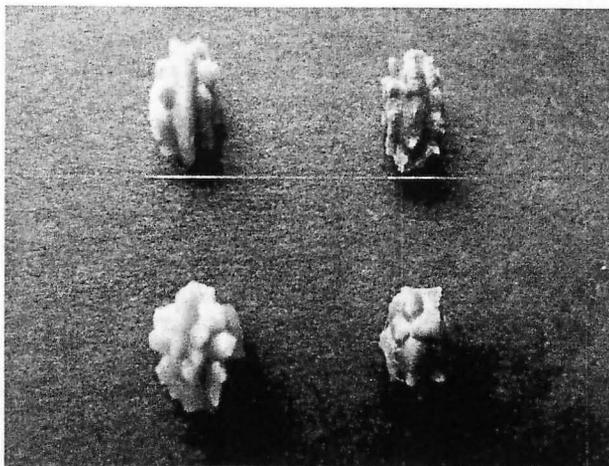
Caracterización de tallo de plantas adultas de *Vasconcellea* (3 sexos definidos por el agricultor)

	Altura inserción inflorescencia (cm)	Díámetro fello (mm)	N° nudos del tallo	Longitud del entrenudo (cm)
Macho	58,38 a	65,79 a	16,8 a	3,03 a
Hembra	50,6 a	65,79 a	16,8 a	2,71 a
Hermafrodita	64,5 a	65,79 a	16,8 a	2,47 a

Caracterización de hojas de plantas adultas de *Vasconcellea* (3 sexos definidos por el agricultor)

Sexo	Largo limbo	Ancho limbo	Longitud peciolo	Altura ondulación lámina	Forma ápice	Largo base (vena 1°)	Ancho unión vena 1°	Grosor vena 2°	N° nervaduras basales 2°	N° nervaduras basales 3°
Macho	20,33a	31,33a	22,65a	2,53a	1a	20a	7a	3,4a	22,5a	17a
Hembra	25,34a	42,7a	30,2a	3,78a	2,5a	25,06a	9,38a	5,01a	25,4a	22,6a
Hermafrodita	23,95a	41,92a	27,02a	3,22a	1,6a	23,96a	9,38a	4,58a	25,4a	25,2a

29



Caracterización semillas provenientes de los cruzamientos

Cruzamiento	Ancho de semillas			Largo de semillas			Radio Largo/ancho		
	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx
1	3,91	3,39	4,44	6,25	5,66	6,90	1,60	1,33	1,95
2	3,77	3,33	4,03	6,52	5,98	7,23	1,74	1,54	2,10
Total	3,84	3,33	4,44	6,39	5,66	7,23	1,67	1,33	2,10

Cruzamiento	Forma		Textura		Color semillas según Munsell		
	alargada	globosa	rugosa	Rugosa-lisa	5 YR 3/4	5 YR 4/6	7,5 YR 2,5/3
1	3,33%	96,67%	23,33%	76,67%	0%	0%	100%
2	63,33%	36,67%	53,33%	46,67%	10,00%	90,00%	0,00%

CR1: flor hembra de árbol hembra con flor macho de árbol macho; CR2: flor hembra de planta hembra, con flor macho de planta hermafrodita

C1=7,5yR 5/6 ; C2=7,5yR 2,5/3 ; C3= 7,5yR 2,5/2

CONCLUSIONES PRELIMINARES

Seguimiento floración

- Las plantas hembras, siempre tienen solo flores hembras
- La planta macho tiene flores machos con rudimentos femeninos independiente de las condiciones climáticas
- Las plantas hermafroditas tienen flores de los 3 sexos, las flores machos son muchas y abortan, las hermafroditas son pocas, de variadas formas y al parecer siempre abortan y algunas hembras llegan a fruto

Diferencias detectables entre hembras y hermafroditas y entre machos y hembras a nivel molecular

Las diferencias entre caracteres morfológicos de semillas provenientes de cruzamientos dirigidos, podrían asociarse a caracteres ligados al sexo

32

Gracias.



Gobierno de Chile

www.gob.cl

MATERIALES Y METODOS

Carácter

Característica



Gobierno de Chile

www.gob.cl

Cantidad de mucilago



1
en el medio



2
ligramente hacia la base



3
claramente hacia la base

MATERIALES Y METODOS

Diagrama de prueba en células vacuolas y plastidos

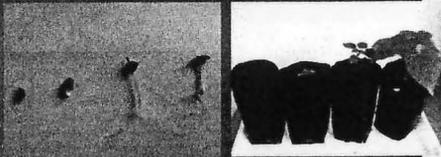
Caracteres	Características



Gobierno de Chile

www.gob.cl

Caracteres	Características



"Evaluación de dos concentraciones de ácido naftalen acético y Bencil amino purina para favorecer la germinación y desarrollo in vitro de *Vasconcellea pubescens*. Phil."

R. Gutiérrez¹, A. Salvatierra, C. Jana¹, L. Martínez¹.
1 INIA-Intihuasi,

Introducción

El polimorfismo sexual presente en papayo con individuos machos, hembras y hermafroditas, puede ser detectado tempranamente en la planta hasta que entra floración a partir de los 6 meses de establecida en campo, provocando huertos desuniformes y que se inviertan recursos sobrestimados para el desarrollo y producción de este cultivo.

La detección temprana del sexo en semilla o en plántulas a través del cultivo in vitro puede ser una herramienta para evaluar tempranamente posibles indicadores del dimorfismo sexual en papayo.

Objetivo: "Evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento ANA y BAP en la germinación in vitro de semillas y desarrollo de plántulas de *Vasconcellea pubescens*."

Materiales y métodos

Semillas sin testa de un fruto maduro de papaya colectado en Diciembre del 2012, fueron establecidas en medio de cultivo MS al 100% de sus sales, con 30 gr de sacarosa y pH 5,7 al que se le adicionó 0,1 y 0,2 mg/L de ANA Y BAP en combinación y por separado, estableciendo 9 tratamientos con 20 repeticiones, incluyendo un control sin hormonas. Estos tratamientos se mantuvieron durante 30 días a 25°C y fotoperíodo de 16 horas luz. Se realizaron observaciones a los 10,20 y 30 días evaluando; porcentaje de germinación, días de entrada en germinación, longitud y número de raíces, largo y diámetro de tallo y longitud de hojas.

Tabla1: Tratamientos ANA y BAP para germinación in vitro de semillas de *Vasconcellea*.

Tratamientos	ANA (mg/L)	BAP (mg/L)
T0	0	0
T1	0	0,1
T2	0	0,2
T3	0,1	0
T4	0,1	0,1
T5	0,1	0,2
T6	0,2	0
T7	0,2	0,1
T8	0,2	0,2

Resultados

El inicio de la germinación en la mayoría de los tratamientos comenzó a partir del 5° día de establecimiento de las semillas, observándose un aumento desde el día 15 en adelante para la mayoría de los tratamientos con valores entre 40 a 80%, con excepción del tratamiento T6 donde no hubo germinación.

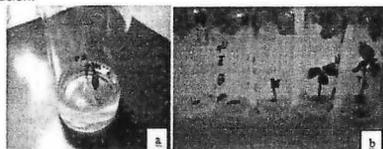


Figura1: a. Semilla de *Vasconcellea pubescens* germinada in vitro, a dos semanas de establecida. b. Secuencia del proceso de germinación in vitro en semillas de *Vasconcellea* hasta obtener una plántula completa.

El porcentaje de germinación más alto se registró en el tratamiento T8 con un 80% al terminar el ensayo, no presentando diferencias con los tratamientos T4, T5, T2 y T0 con valores entre los 60 y 75%.

Tabla2: Porcentajes de germinación y contaminación in vitro a los 30 días de establecidas las semillas de *Vasconcellea*.

Tratamientos (mg/l)	Contaminación %	Germinación %
T0 (0ANA+0BAP)	0,1a	0,6 cde
T1(0ANA+0,1BAP)	0a	0,5bcd
T2(0ANA+0,2BAP)	0a	0,65cde
T3(0,1ANA+0BAP)	0,05a	0,45bc
T4(0,1ANA+0,1BAP)	0a	0,75de
T5(0,1ANA+0,2BAP)	0,1a	0,7cde
T6(0,2ANA+0BAP)	0,4b	0a
T7(0,2ANA+0,1BAP)	0,35b	0,3b
T8(0,2ANA+0,2BAP)	0a	0,8e
Cv	11,39	15,42

Plántulas: El Tratamiento T4 presentó la mayor altura de plántulas con un promedio 27,9 mm. en relación a los tratamientos T0,T5,T7 y T8 (figura2) no existiendo diferencias entre ellos. En diámetro de tallo y longitud de epicótilo no hay diferencias entre tratamientos.

Tabla3: Caracterización de plántulas obtenidas por tratamiento en relación a la altura, diámetro y longitud de epicótilo.

Tratamientos	Altura de plantas (mm)	Diámetro del tallo (mm)	Longitud de epicótilo (mm)
T0	19,32 abc	1,73 a	0,94 a
T1	15,29 c	1,89 a	0,47 a
T2	17,85 bc	1,74 a	0,09 a
T3	15,52 c	1,74 a	0,11 a
T4	27,92 a	1,72 a	0,45 a
T5	23,98 abc	1,72 a	0,98 a
T7	23,48 abc	1,80 a	1,26 a
T8	25,76 ab	2,74 a	1,37 a

Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos según test de LSD $p \leq 0,05$



Figura2: Plántulas de *Vasconcellea* obtenidas en tratamientos de germinación in vitro.

Hojas: La aparición de las primeras hojas comenzó a partir de la cuarta semana. Los tratamientos T4, T5, T7 y T8 (con presencia de ambos reguladores) presentaron valores más alto del número de hojas. Los resultados del ancho de hojas fue similar para todos los tratamientos, en el largo de las hojas se registraron variaciones relacionadas con una diferenciación en su forma, distinguiendo entre hojas cordadas y levemente lobuladas (figura 3). En la mayoría de los tratamientos las primeras hojas se presenta como cordadas, las que se modifican al segundo o tercer par de hojas, o en algunos casos persiste esta forma.

Tabla4: Resultados en número y características de primeras hojas en plántulas de *Vasconcellea* en condición in vitro.

Tratamientos	N° hojas	Ancho de hojas mm.	Largo de hojas mm.	Forma de la hoja (*)
T0	0,83 d	1,90 a	2,44 de	0,50 ab
T1	1,70 abc	3,41 a	4,02 bcde	1,70 ab
T2	1,46 bcd	8,91 a	4,10 cde	1,70 bc
T3	0,89 cd	0,82 a	1,18 e	0,89 bc
T4	2,33 a	5,34 a	7,34 abc	1,07 c
T5	2,00 ab	4,84 a	6,20 abcd	1,36 ab
T7	2,17 ab	6,68 a	8,95 a	2,00 ab
T8	2,31 a	5,86 a	8,64 ab	2,13 a

(*) Test de Kruskal- Wallis, formas asociadas a una clasificación numérica.

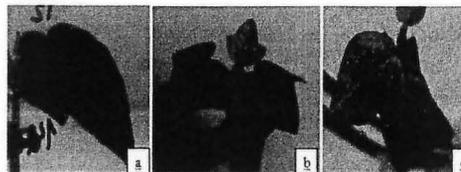


Figura 3: Tipos de hojas en plántulas in vitro de *Vasconcellea pubescens*. a. Hoja de forma cordada. b. Primer y segundo par de hojas con pequeños lóbulos. c. Hoja lobulada.

Raíz: El proceso de germinación comienza con la aparición de la radícula a los 5 días de establecida la semilla y luego desarrolla raíces laterales que le permiten estabilizar a la planta en el medio de cultivo para posteriormente desarrollar la parte aérea.

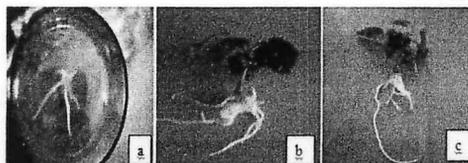


Figura 4: a. Inicio de germinación y enraizamiento de semillas. b. Raíces de plántula in vitro de un mes de cultivo. c. Desarrollo radicular in vitro a partir de semilla de dos meses de cultivo.

En todos los tratamientos se observó presencia de raíz en las plántulas, presentando un mayor desarrollo en número y longitud en los tratamientos T1 y T4.

Tabla 5: Caracterización del desarrollo de raíces en tratamientos para germinación in vitro de *Vasconcellea*.

Tratamientos	Presencia de raíces (*)	N° de raíces promedio por plántula (**)	Suma longitud de raíces total (mm). (**)
T0 (sin reguladores)	1,17 a	1,33 c	24,90 abc
T1(0,1BAP)	1,00 a	2,60 ab	28,62 ab
T2(0,2 BAP)	1,15 a	1,23 c	6,90 c
T3(0,1 ANA)	1,11 a	2,89 ab	19,30 bc
T4(0,1ANA +0,1BAP)	1,00 a	3,33 a	40,28 a
T5(0,1ANA+0,2BAP)	1,21 a	1,86 bc	12,08 bc
T7(0,2ANA+0,1 BAP)	1,17 a	2,00 bc	28,07 abc
T8(0,2ANA+0,2BAP)	1,19 a	2,00 bc	20,62 bc

(*) Test de Kruskal- Wallis, parámetro asociado a una clasificación numérica .
(**) Test de Duncan .

Conclusiones

Aunque no se presentaron diferencias significativas entre la mayoría de los tratamientos con los mayores porcentajes de germinación, la incorporación al medio de cultivo de 0,1 mg/L de BAP y ANA para cada regulador (Tratamiento 4), con germinación del 75% favoreció a la obtención de plántulas con características aéreo y radicular bastante uniformes entre las repeticiones, con altura promedio de 27mm y desarrollo radicular de 40mm. Observando además en sus primeras hojas algunas formas diferentes del limbo, lo que podría inducir alguna diferenciación de las plantas. Por lo que estos resultados constituyen la base para estudios posteriores a partir de un protocolo de germinación in vitro de semillas de polinización dirigida, para la evaluación de estos caracteres a nivel de plántulas, generando más antecedentes para trabajos de propagación y mejoramiento genético en *Vasconcellea*.

Proyecto: "Obtención de plantas de papayo con sexo definido mediante un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual". FIA PYT 11-0060.

"Determinación de un protocolo de desinfección de semillas in vitro de *Vasconcellea pubescens*. Phil."

R. Gutiérrez, A. Salvatierra, C. Jana, L. Martínez.
INIA-Intihuasi,

Introducción

Introducir material vegetal de campo a condiciones de cultivo in vitro tiene como principal problema la gran cantidad de agentes patógenos asociados, por lo que es importante realizar una adecuada desinfección con ayuda de agentes químicos. Dependiendo de la naturaleza del material vegetal a introducir es necesario realizar variadas pruebas de desinfección para determinar el agente, la concentración a utilizar y los tiempos de acción adecuados para lograr la eliminación o disminución a niveles muy bajos de estos patógenos y que a la vez no provoque daños en los tejidos, ni en la capacidad de regeneración de las células vegetales.

Objetivo "Determinar el mejor tratamiento de desinfección en semillas de *Vasconcellea pubescens* para ser establecidas in vitro."

Metodología

A las semillas de un fruto maduro de papaya colectado en el mes de Noviembre del 2012, se les retiró el mucilago, se lavaron con detergente y enjuagaron con abundante agua destilada. Después de hidratarse por 15 horas fueron llevadas a cámara de flujo laminar para someterlas a 2 tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio al 1%, durante 5 y 10 minutos y a un tratamiento control en alcohol al 70% por 2 minutos. A las semillas se les extrajo la testa y se establecieron en un medio de cultivo Murashige y Skoog al 100% de sus sales sin adición de hormonas, manteniéndolas 30 días en cámara de crecimiento a 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas y 3.000 lux. Se evaluaron a los 10, 20 y 30 días; %sobrevivencia, %mortalidad y %contaminación. El diseño estadístico fue completamente al azar, realizando un ANDEVA y como separación de medias el test de Duncan.

Tratamientos desinfección semillas de papayo:

T0 (testigo): Sólo alcohol al 70%, por 2 minutos, sin hipoclorito de sodio.

T1: alcohol al 70% 2 minutos + Hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos.

T2: alcohol al 70% 2 minutos + hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos

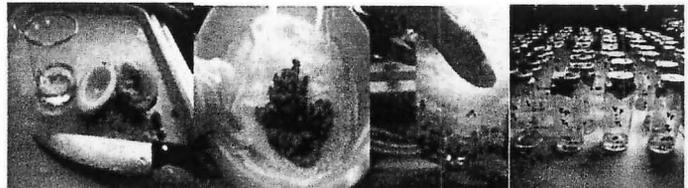


Figura 1. Proceso de desinfección semillas de *Vasconcellea*.

Resultados

Después de 30 días de establecidas las semillas, el mejor porcentaje de sobrevivencia y menor porcentaje de contaminación se registró en el tratamiento T0 (solo inmersión en alcohol al 70%) con una tasa de sobrevivencia de 90% de las semillas a diferencia de los otros dos tratamientos que presentaron una tasa de contaminación más alta (cuadro 1).

El mayor porcentaje de contaminación se registró en el tratamiento T2 (inmersión en alcohol al 70% por 2 minutos + inmersión en hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos) con un 40% de contaminación.

Cuadro 1. Análisis estadístico tratamientos de desinfección para establecimiento in vitro en semillas de *Vasconcellea*.

Evaluaciones	10 días		20 días		30 días	
	contaminación	sobrevivencia	contaminación	sobrevivencia	contaminación	sobrevivencia
T0	1 a	1a	0,1 a	0,9 a	0,1a	0,9 a
T1	0,1 a	0,9 a	0,2ab	0,8 ab	0,2ab	0,8 ab
T2	0,05 a	0,95 a	0,4b	0,55 b	0,4b	0,6 b

Letras distintas en una misma columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), según test de Duncan

La contaminación asociada a este estudio fue de un 10 a 40 %, contaminación principalmente de tipo bacteriano, observándose como un exudado blanco alrededor de la semilla, apareciendo en aquellos tratamientos en que se utilizó hipoclorito de sodio como desinfectante (figura 2).

La mayor parte de las semillas sin contaminación comenzaron a germinar pasada la primera semana de establecidas en el medio de cultivo, al contrario de las semillas contaminadas, que no germinaron.

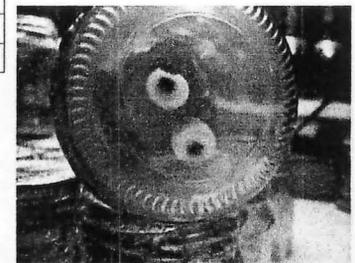


Figura 2. contaminación en semillas in vitro

Conclusión

El mejor tratamiento para la desinfección de las semillas, es aquel que utiliza alcohol al 70 % un par de minutos, para la disminución de agentes patógenos. En los protocolos establecidos para propagación in vitro, la acción del alcohol en esta concentración se utiliza para romper la tensión superficial de las células y facilitar la acción del agente desinfectante. La posterior eliminación de la testa también contribuyó a eliminar posibles factores de contaminación asociada a las semillas.

Bibliografía

Nava R., Vegas A., Marín C., y Villegas Z. 2011. Propagación clonal de plantas Elite de *Carica papaya*, usando microinjertación in vivo e in vitro. Interciencia. 36:518-523.

Proyecto :Obtención de plantas de papayo con sexo definido mediante un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual. FIA -PYT 11-0060.

Propagación vegetativa de papayos (*V. pubescens*) como alternativa de evasión para el polimorfismo sexual de las plantas.

Angélica Salvatierra G., Constanza Jana A., Roxana Gutiérrez, Lucía Martínez G.



Introducción



Propagación vegetativa

- La propagación vegetativa puede ser una opción para la masificación de plantas madres de sexo definido, seleccionadas con buenos atributos.

- ✓ Enraizamiento de estacas.
- ✓ Injertación.

Materiales y Métodos

- Ensayo de enraizamiento de estacas
 - Época de corta: Primavera
 - Tipo de estaca : basal y apical
 - Uso de ácido naftalen acético (ANA)
 - Plantas hembras y hermafroditas bajo invernadero y al aire libre.

Materiales y Métodos

• Injertación

- Injertos: montura, cuña e hendidura, aproximación y empalme inglés.
- Época: Octubre
- Patrón: plantas propagadas de semillas, de aproximadamente 20 cm de altura.
- A 3 meses de injerto, se tomaron muestras de unión injerto y se hicieron cortes histológicos en dicha zona.
- Fijación Parafina, tinción toluideno 0.05 % en agua, observaciones en microscopio de luz.

Resultados

Propagación enraizamiento de estacas



Enraizamiento (%) de plantas hermafroditas (estacas colectadas en primavera)

Tipo de estaca	Condición	
	Aire libre	Invernadero
	Enraizamiento (%)	
apical	18.75 ^b	21.85 ^b
basal	84.37 ^a	75 ^a
Hormona*		
Con	37.5 ^b	34.37 ^b
Sin	65.62 ^a	62.47 ^a
CV (%)	47	46

* Acido 1 naftil acetico 0.4 %
Letras distintas entre filas implica diferencias

Estaca basal sin hormona al aire libre o invernadero

Enraizamiento (%) de plantas hembras

	Aire libre		Invernadero	
	Con Hormona	Sin hormona	Con Hormona	Sin hormona
apical	0 ^{bB}	37.5 ^A	0 ^{bB}	62.5 ^{bA}
basal	62.5 ^{aA}	56.2 ^A	68.75 ^{aB}	87.5 ^{aA}
CV(%)	52.2		13.0	

Letras minúsculas entre filas y mayúsculas entre columnas

Estaca Basal sin hormona bajo condiciones de invernadero

Calidad de enraizamiento



Resultados Ensayo técnicas injertación

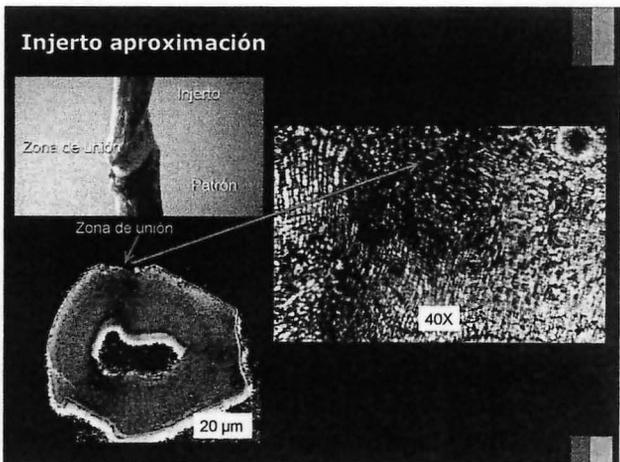


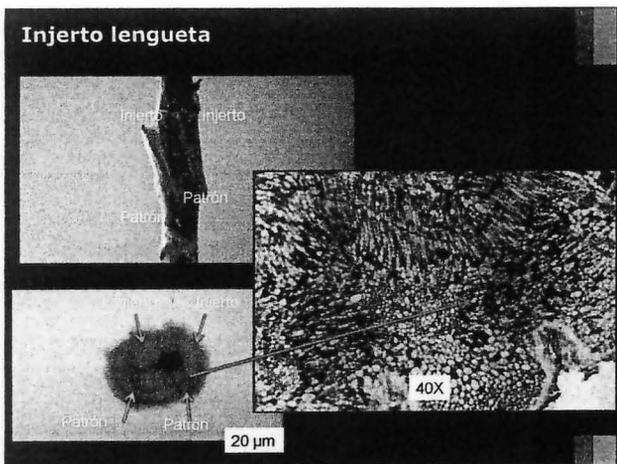
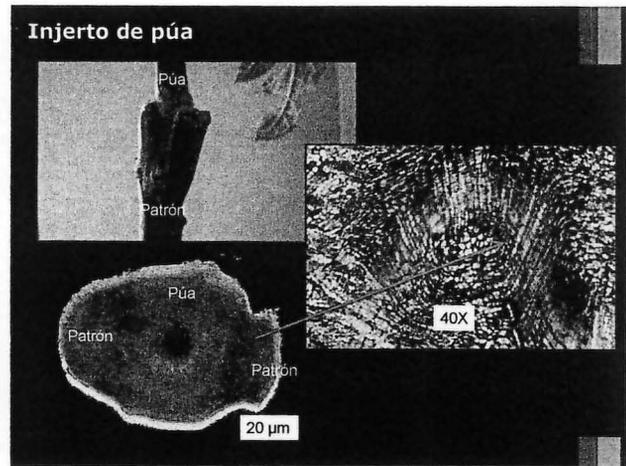
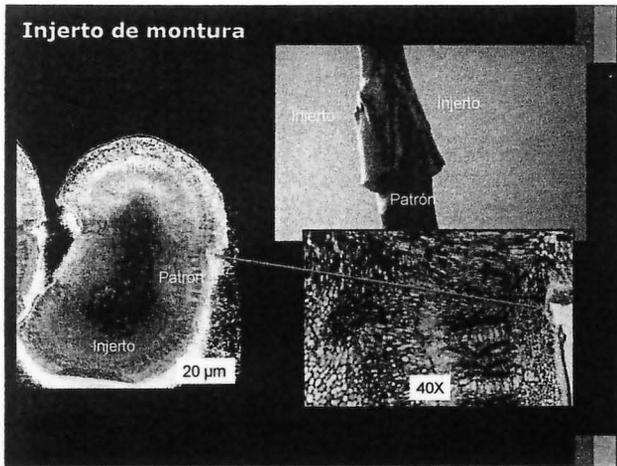
Porcentaje de prendimiento de injertos en plantas propagadas por semillas (3 meses después)

Tratamientos	Rango prendimiento de repeticiones (%)	Porcentaje de prendimiento (%)
Aproximación	25-100	62.5a
Montura	25-75	43.7a
Cuña o hendidura	50-75	68.7a
Lengüeta	25-75	43.7a

Valores de porcentaje transformados a $\sqrt{n} + 1$ Test de Duncan $p < 0.05$ N= 16 plantas por repetición

Injerto aproximación





Conclusiones

- La propagación de estacas y la injertación son posibles de aplicar, pero se debe establecer un protocolo para la obtención y mantención de plantas madres, así como también determinar los factores que influyen en la calidad de raíces.
- El comportamiento de las plantas en campo originadas a partir de estacas enraizadas como las plantas injertadas debe ser evaluado.

Gracias

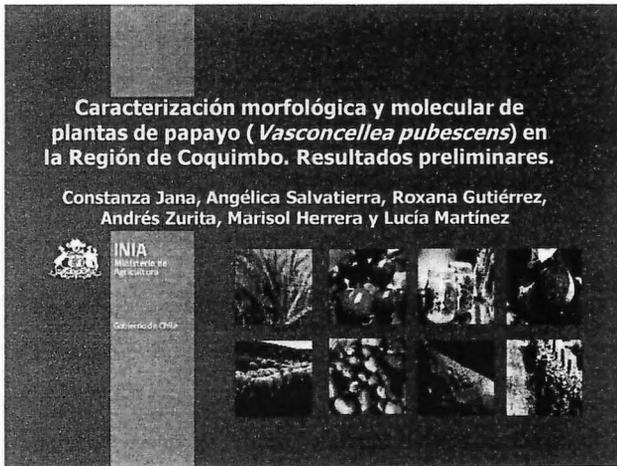


Gobierno
de Chile

www.gob.cl

Obtención de plantas de *V. pubescens* con sexo definido mediante un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual y perfeccionamiento de la propagación agámica.

PYT-2011-0060, FIA.



"Obtención de plantas de papayos (*V. pubescens*) con sexo definido mediante un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual usando herramientas biotecnológicas y caracteres morfológicos asociados e identificables por los usuarios y a través del perfeccionamiento de la propagación agámica". FIA PYT 11-0060.

2

INTRODUCCIÓN

Vasconcellea pubescens o *V. cundimarcensis* - *Carica papaya* (Badillo 1993-2001)



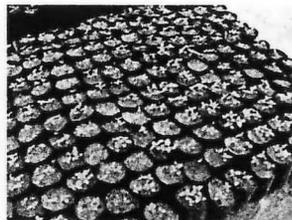
Frutal símbolo de la región de Coquimbo



3

INTRODUCCIÓN

Falencias en la cadena productiva por polimorfismo sexual



4

INTRODUCCIÓN

Forma sexual	Tipo de flor	Árbol
I	femenina	Plantas ginoicas
II	Flor hermafrodita con la parte femenina bien desarrollada	Plantas andromonoicas
III	Flor hermafrodita con la parte femenina irregular	Plantas andromonoicas
IV	Flor hermafrodita con la parte femenina elongada	Plantas andromonoicas
IV+	Flor masculina pero que puede variar a hermafrodita de acuerdo a condición climática	Planta estaminada funcional, también andromonoica
V	Flor masculina	Planta estaminada o androica

Storey, 1941

INTRODUCCIÓN

OBJETIVO GENERAL

Caracterización morfológica y molecular de plantas de papayo para desarrollar un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual en plántulas y/o semillas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Seguimiento floración en dos localidades y dos estaciones
- Determinar marcadores moleculares en *V. pubescens* que se asocien al sexo de plantas.
- Establecer caracteres morfológicos de plantas jóvenes y semillas ligados al sexo de plantas.

MATERIALES Y METODOS

Seguimiento de floración



MATERIALES Y METODOS

Determinar marcadores moleculares en *V. pubescens* que se asocien al sexo de plantas.

- Protocolo de extracción de ADN: extracción ADN CTAB (Rogers & Bendlich, 1988) y Doyle & Doyle (1990)
- Cantidad de tejido, tiempo de implementación, eficiencia
- Utilización de marcadores moleculares de *Carica*
- Diseño de partidores sexo específicos



MATERIALES Y METODOS

Establecer caracteres morfológicos de plantas jóvenes y semillas ligados al sexo de plantas.
Definición de caracteres morfológicos

- Normas UPOV (2010) para *Carica papaya*
- Caracterización morfológica de caricáceas en altura de Cadavid et al. (2002)
- Parte de los descriptores utilizados por Kyndt et al. (2005) en caracterización morfológica de *Vasconcellea*
- Plantas adultas
- Semillas
- Plántulas

MATERIALES Y METODOS

Caracteres del tallo	Medición	Observaciones
Color del tallo	Munsell	
Altura inserción primera inflorescencia	cm	
Ramificación	Ausente o presente	Observación al comienzo de la floración
Diámetro del tallo	mm	A la mitad de la altura del tallo y comienzo de la floración
Nº de nudos del tallo	Número	Desde el suelo hasta la primera flor
Longitud de entrenudos	cm	Entre suelo y primera inflorescencia

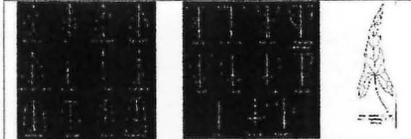
MATERIALES Y METODOS

Caracteres de la hoja

Sexo	Nº hoja	Limbo (cm)	Pecíolo	Lámina	Margen de la hoja	Base del Lóbulo 1º con 2º
		Largo				
		Ancho				
		Longitud (cm)				
		Pigmentación anatómica Ausente Presente				
		Altura Ondulación				
		Simetría (nº de lóbulos)				
		Apice				
		Base de la hoja				
		Longitud de la base (venas primarias cm)				
		Planas				
		Casi planas				
		Fortemente resoblada				
		Margen (ondulado, liso, girado, otro)				
		No se estrecha sobre la uña				
		Se estrecha sobre la uña				
		Se estrecha sobre la uña (lóbulo apical)				

Apice de línea

Base de línea



MATERIALES Y METODOS

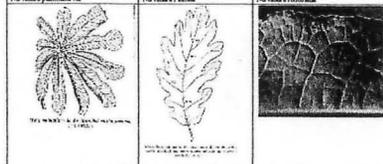
Caracteres de la hoja

Sexo	Nº hoja	Lóbulos basales	Categorías de las venas 1º	Categorías de las venas 2º	Categorías de las venas 3º	Nervadura central prolongada	Presencia	Grupos relativos de venas secundarias
		No se superponen						
		Se superponen						
		No aplicable						
		Palmitiforme						
		Pinata						
		Reticulada						
		Palmitiforme						
		Pinata						
		Reticulada						
		Palmitiforme						
		Pinata						
		Reticulada						
		Acodo en unión de venas primarias						
		Ausente						
		Presente						

Nervadura palmitiforme

Nervadura Pinata

Nervadura reticulada



MATERIALES Y METODOS

Caracteres de la hoja

		Número	Conexión entre las venas primarias y secundarias	Conexión entre las venas secundarias y terciarias	Pubescencia de la hoja (haz)	Pubescencia de la hoja (envés)	Estipulas espinosas
Seno							
Nº Hoja							
Basales Primarias							
Basales secundarias							
Basales terciarias							
Indicible							
Directa							
Indicible							
Distinta							
Abundante							
Mediana							
Poca							
Abundante							
Mediana							
Poca							
Ausente							
Sin espinas							
Con espinas							

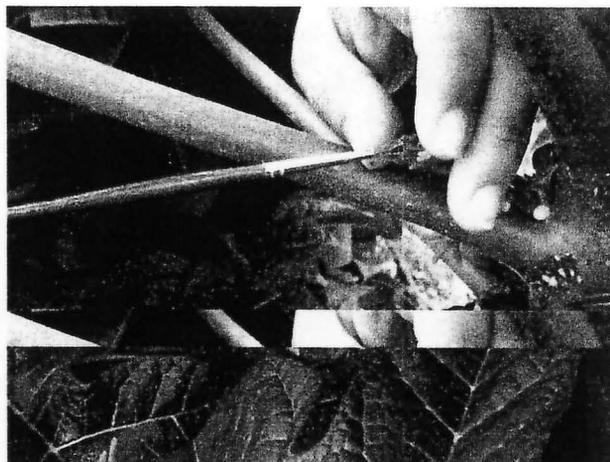
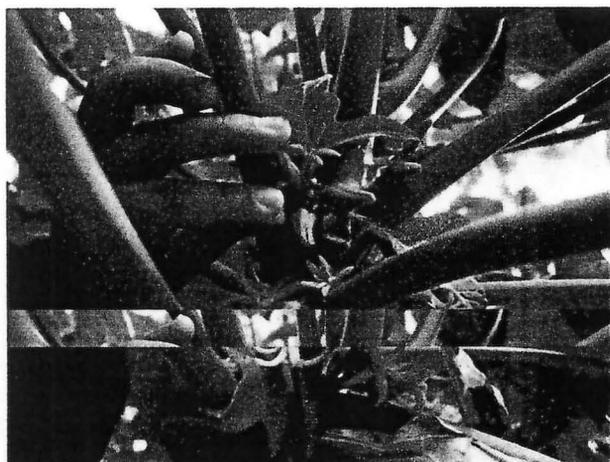
13

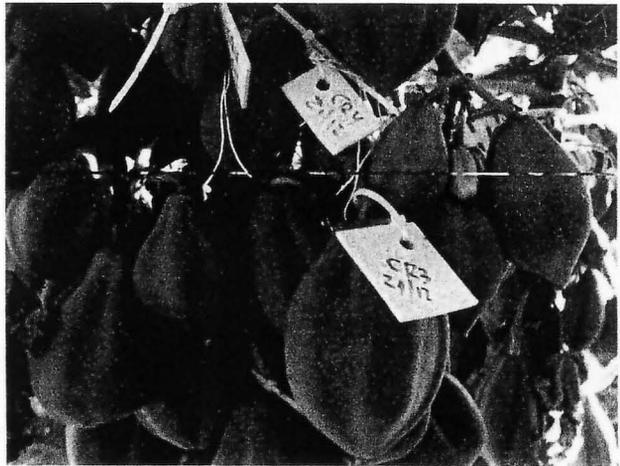
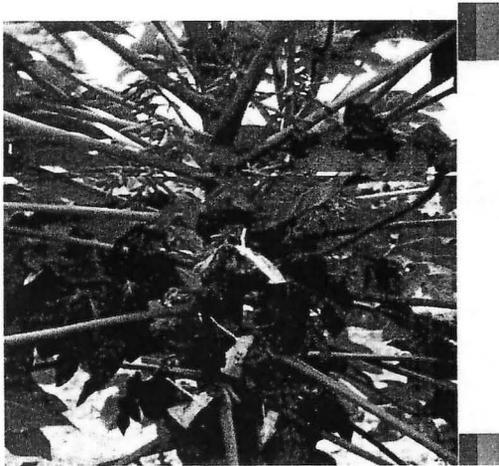
Cruzamientos dirigidos

En *Carica* hay 3 genes involucrados en la expresión sexual
 MM = machos; Mm1 ó Mm2 = hermafroditas; m1m2= hembra
 m1m1 ó m2m2 = letales

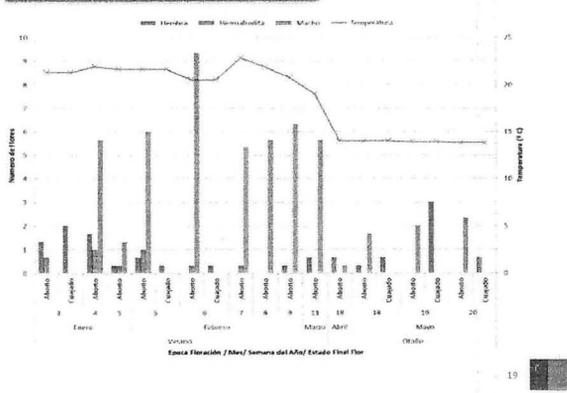
Cuadro 3. Proporción de descendencia esperada de *Vasconcellea* de acuerdo a cruzamientos dirigidos. A) flor hembra de planta hembra, con flor macho de planta macho; b) flor hembra de planta hembra con flor macho de planta hermafrodita; c) flor hembra de planta hermafrodita con flor macho de planta macho d) flor hembra de planta hermafrodita con flor macho de planta hermafrodita e) flor hermafrodita autopolinizada

	M	M		M	m1		M	M
m1	Mm1	Mm1	m1	Mm1	m1m1	M	MM	MM
m2	Mm2	Mm2	m2	Mm2	m1m2	m1	Mm1	Mm1
Todas hermafroditas			2/4 hermafroditas: 1/4 hembra: 1/4 letal			1/2 macho: 1/2 hermafrodita		
	M	m1		M	m1			
M	MM	MM	M	MM	MM			
m1	Mm1	Mm1	m1	Mm1	Mm1			
1/2 macho: 1/2 hermafrodita			1/2 macho: 1/2 hermafrodita					

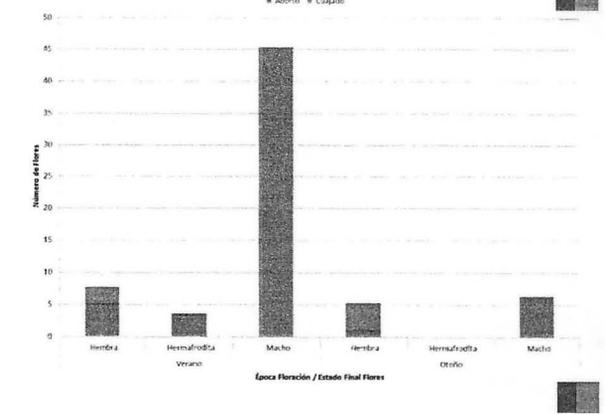




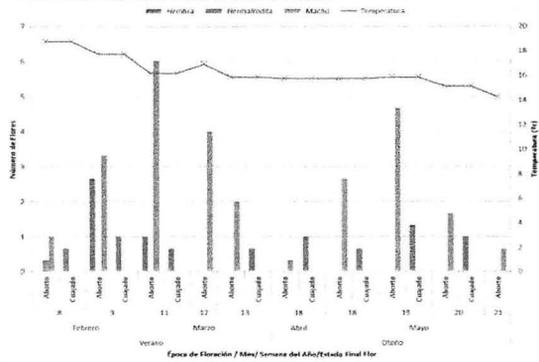
RESULTADOS PRELIMINARES



Resultados seguimiento floración (Altovalsol)



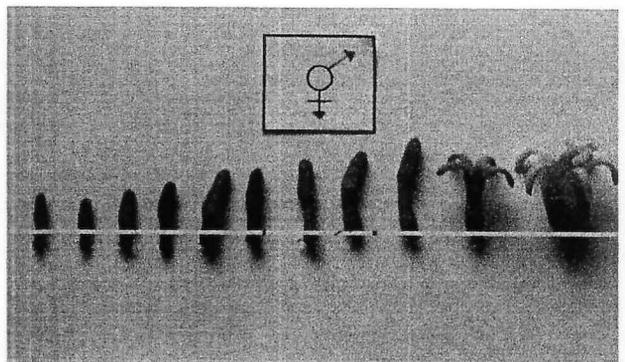
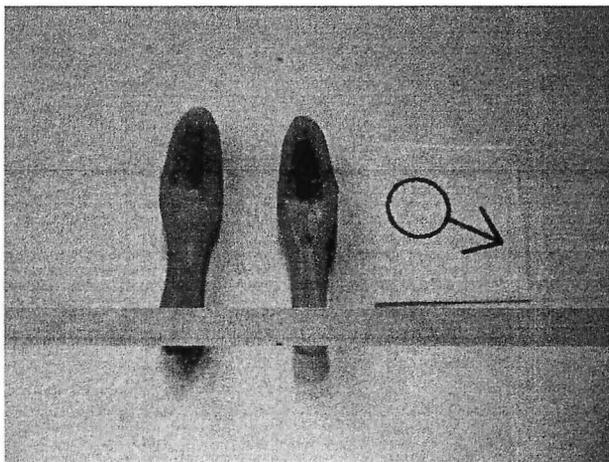
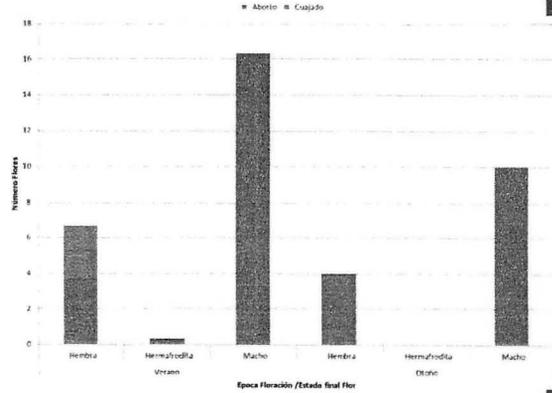
RESULTADOS PRELIMINARES

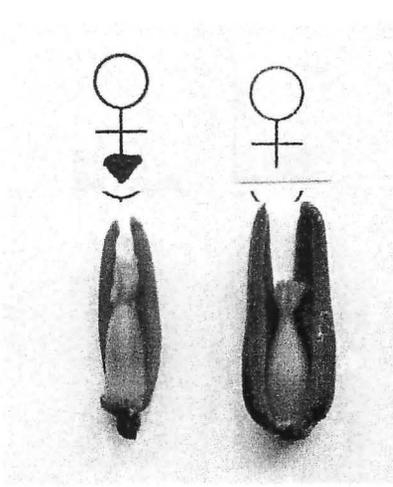


Gobierno de Chile | Ministerio del Interior

21

Resultados seguimiento floración (Algarrobito)



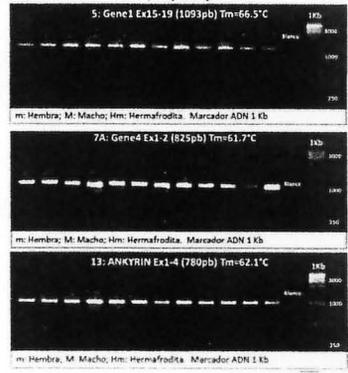


RESULTADOS PRELIMINARES

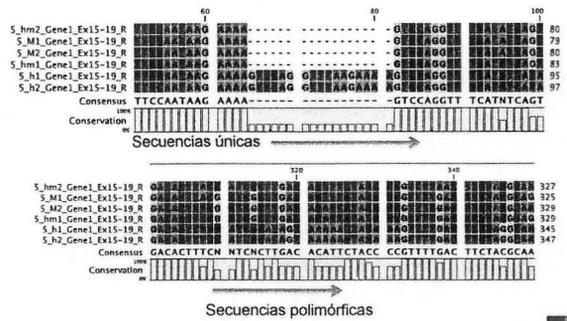
1. Rogers & Bendlich, resultó ser el método más eficiente, rápido y sin mercaptoetanol

2. Se pudo identificar un set de partidores que amplificaron el ADN de las muestras analizadas.

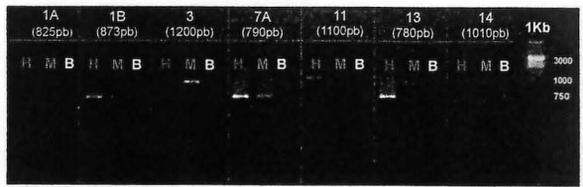
- Estos resultados no permitieron la diferenciación entre muestras de sexos diferentes.
- 3 Marcadores mostraron diferencias de tamaño
- Amplicones fueron secuenciados por sexo y análisis de secuencias mostró diferencias por sexo
- Con esto se podrán diseñar nuevos partidores sexo-especificos.



RESULTADOS PRELIMINARES



RESULTADOS PRELIMINARES



RESULTADOS PRELIMINARES

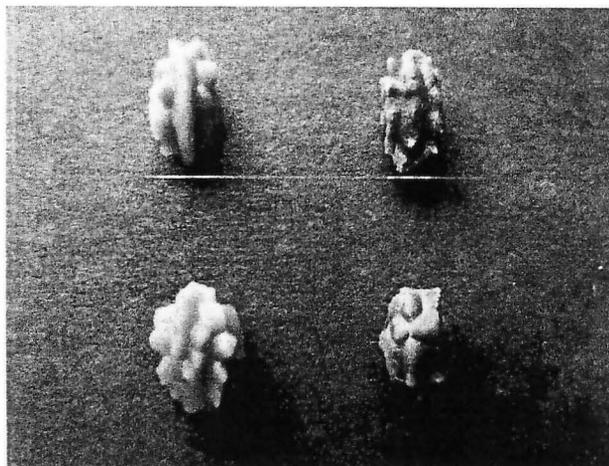
Caracterización de tallo de plantas adultas de *Vasconcellea* (3 sexos definidos por el agricultor)

	Altura inserción inflorescencia (cm)	Díámetro tallo (mm)	N° nudos del tallo	Longitud del entrenudo (cm)
Macho	58,38 a	65,79 a	16,8 a	3,03 a
Hembra	50,6 a	65,79 a	16,8 a	2,71 a
Hermafrodita	64,5 a	65,79 a	16,8 a	2,47 a

Caracterización de hojas de plantas adultas de *Vasconcellea* (3 sexos definidos por el agricultor)

Sexo	Largo limbo	Ancho limbo	Longitud pecíolo	Altura ondulación lámina	Forma ápice	Largo base (vena 1)	Ancho unión vena 1'	Grosor vena 2'	N° nervaduras basales 2'	N° nervaduras basales 3'
Macho	20,33a	31,33a	22,65a	2,53a	1a	20a	7a	3,4a	22,5a	17a
Hembra	25,34a	42,7a	30,2a	3,78a	2,5a	25,06a	9,38a	5,01a	25,4a	22,6a
Hermafrodita	23,96a	41,92a	27,02a	3,22a	1,6a	23,96a	9,38a	4,96a	25,4a	25,2a

29



Caracterización semillas provenientes de los cruzamientos

Cruzamiento	Ancho de semillas			Largo de semillas			Radio Largo/ancho		
	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx
1	3,91	3,39	4,44	6,25	5,66	6,90	1,60	1,33	1,95
2	3,77	3,33	4,03	6,52	5,98	7,23	1,74	1,54	2,10
Total	3,84	3,33	4,44	6,39	5,66	7,23	1,67	1,33	2,10

Cruzamiento	Forma		Textura		Color semillas según Munsell		
	alargada	globosa	rugosa	Rugosa-lisa	5 YR 3/4	5 YR 4/6	7,5 YR 2,5/3
1	3,33%	96,67%	23,33%	76,67%	0%	0%	100%
2	63,33%	36,67%	53,33%	46,67%	10,00%	90,00%	0,00%

CR1: flor hembra de árbol hembra con flor macho de árbol macho; CR2: flor hembra de planta hembra, con flor macho de planta hermafrodita

C1=7,5YR 5/6 ; C2=7,5YR 2,5/3 ; C3= 7,5YR 2,5/2

CONCLUSIONES PRELIMINARES

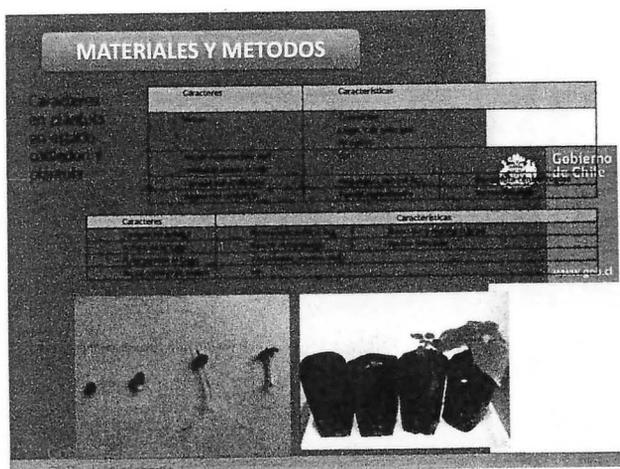
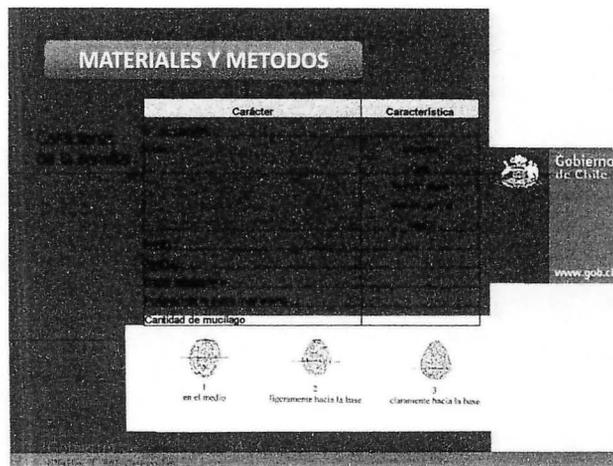
Seguimiento floración

- Las plantas hembras, siempre tienen solo flores hembras
- La planta macho tiene flores machos con rudimentos femeninos independiente de las condiciones climáticas
- Las plantas hermafroditas tienen flores de los 3 sexos, las flores machos son muchas y abortan, las hermafroditas son pocas, de variadas formas y al parecer siempre abortan y algunas hembras llegan a fruto

Diferencias detectables entre hembras y hermafroditas y entre machos y hembras a nivel molecular

Las diferencias entre caracteres morfológicos de semillas provenientes de cruzamientos dirigidos, podrían asociarse a caracteres ligados al sexo

32



INIA

Obtención de plantas de papayos (*V. pubescens*) con sexo definido mediante un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual usando herramientas biotecnológicas y caracteres morfológicos asociados e identificables por los usuarios y a través del perfeccionamiento de la propagación agámica.



T ABLA Reunión ejecutivo FIA 3 de Mayo de 2012

- ✓ Mañana
 - ❖ Avances de actividades comprometidas en el proyecto resultados a la fecha y limitantes en las unidades propuestas.
 - ❖ Discusión de los resultados del estudio presentado en el informe, profundizar en aspectos críticos de intervención productiva.
 - ❖ Discusión de resultados del estudio de la disminución de la superficie.
- ✓ Tarde
 - ❖ Laboratorio in vitro- resultados de germinación de semillas
 - ❖ Visita a Altovalsol, seguimiento de floraciones y polinización dirigida.

Equipo de trabajo

- ❖ Roxana Gutiérrez - Propagación in vitro
- ❖ Constanza Jana A.- Caracterización morfológica y cruzamientos
- ❖ Lucía Martínez G.- Técnico terreno
- ❖ René Pacheco – Análisis económico
- ❖ Romina Ferrera – Administración
- ❖ Angélica Salvatierra G. - Propagación vegetativa

Objetivo

- Desarrollar un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual en plantas y semillas mediante herramientas biotecnológicas y caracteres morfológicos asociados, identificables por los usuarios.
- Perfeccionar la propagación vegetativa de plantas de sexo definido por medio de técnicas nuevas y convencionales.

**Actividades y resultados parciales
obtenidos en el período Agosto-Diciembre**



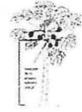
Objetivo 2: Establecer caracteres morfológicos de plantas jóvenes antes de la floración

1. Marcado de plantas adultas en parcela de agricultores (Altovalso)

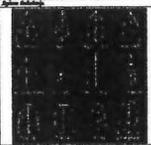
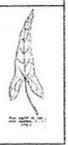


2. Definición de caracteres morfológicos

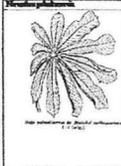
- Normas UPOV (2010) para *Carica papaya*
- Caracterización morfológica de caricáceas en altura de Cadavid *et al.* (2002)
- Parte de los descriptores utilizados por Kyndt *et al.* (2005) en caracterización morfológica de *Vasconcellea*

Caracteres del tallo	Medición	Observaciones
Color del tallo	Solo verde, verde amarillento, marrón, verde púrpura, solo púrpura	
Altura inserción primera inflorescencia	cm	
Ramificación	Ausente o presente	Observación al comienzo de la floración
Diámetro del tallo	mm	Deberá observarse a la mitad de la altura del tallo y comienzo de la floración
Nº de nudos del tallo	Número	Desde el suelo hasta la primera flor
Longitud de entrenudos	cm	A mitad de camino entre suelo y primera inflorescencia

Sexo	Nº Hoja	Limbo (cm)	Pecíolo	Lamina	Margen de la Hoja	Base del Lóbulo 1º con 2º
	Largo					
	Ancho	Longitud (cm)				
		Alargamiento				
		ángulo de venas primarias				
		ángulo de venas secundarias				
		Altura Ondulación				
		Simetría (º de rotación)				
		Apíca				
		Base de la Hoja				
		Largo de la base (vena primaria cm)				
		Pinas				
		Casi planas				
		Entramame				
		resiliata				
		Margen (ondulado, serrado, etc)				
		No se estrecha sobre la unión				
		Se estrecha sobre la unión				
		Se estrecha sobre la unión (lóbulo apical)				

		
---	---	---

Sexo	Nº Hoja	Lóbulos basales	Categorías de las venas 1º	Categorías de las venas 2º	Categorías de las venas 3º	Nervadura central prolongada
		No se superponen				
		Se superponen				
		No aplicable				
		Palmitaveña				
		Pinata				
		Reticulada				
		Palmitaveña				
		Pinata				
		Reticulada				
		Palmitaveña				
		Pinata				
		Reticulada				
		Ancho en unión de venas primarias				
		Ausente				
		Presente				
		Gracur relativo de venas secundarias				

		
--	---	---

Sexo	Nº Hoja	Número	Conexión entre las venas primarias y secundarias	Conexión entre las venas secundarias y terciarias	Pubescencia de la hoja (haz)	Pubescencia de la hoja (envés)	Estípulas espinosas
		Basales Primarias					
		Basales secundarias					
		Basales terciarias					
		Indistinto					
		Dipinta					
		Indefinido					
		Dipinta					
		Abundante					
		Mediana					
		Poca					
		Abundante					
		Mediana					
		Poca					
		Ausente					
		Sin espinas					
		Con espinas					

3. Resultados caracterización tallo

Número Planta	Color del tallo				Altura Ins. inflorescencia	Ramificación	Diam. tallo		Nº nudos tallo	Long. entrenudo
	Verde	v. amar.	Marrón	Púrpura			Mediano	Grueso		
macho 1	x				42	p.3	97,9	13	7	
macho 2			x		42	p.2	76,24	8	7,5	
macho 3	x				76,5	x	44,37	29	6	
macho 4	x				73	x	44,16	20	6	
hembra 1	x				53	p.2	73,35	25	8	
hembra 2	x				41	x	84,96	18	6,5	
hembra 3		x			51	p.2	80,89	16	5	
hembra 4		x			58	p.1	88,25	11	8	
hembra 6	x				50	p.2	61,58	14	6	
hermafrodita 1	x				62	p.1	62,24	19	9	
hermafrodita 2		x			81	x	62,06	27	7,5	
hermafrodita 3		x			45	p.1	76,83	17	5	
hermafrodita 4	x				77	p.1	56,47	18	8	
hermafrodita 5	x				68	p.1	73,81	21	6,5	
hermafrodita 6		x			67	x	77,14	25	5	

Cruzamientos dirigidos

En *carica*, hay 3 genes involucrados en la expresión sexual

Gen M = machos
 Mm1 ó Mm2 = hermafroditas
 m1m2 = hembra
 m1m1 ó m2m2 = letales

1. MM x Mm1 ó Mm2 = 1♂ : 1♀
2. Mm1 ó Mm2 X m1m2 = 2♀ : 1♂ : 1 letal
3. Mm1 ó Mm2 X Mm1 ó Mm2 = 1♂ : 2♀ : 1♂ ó 1♂ : 2♀ : 1 letal

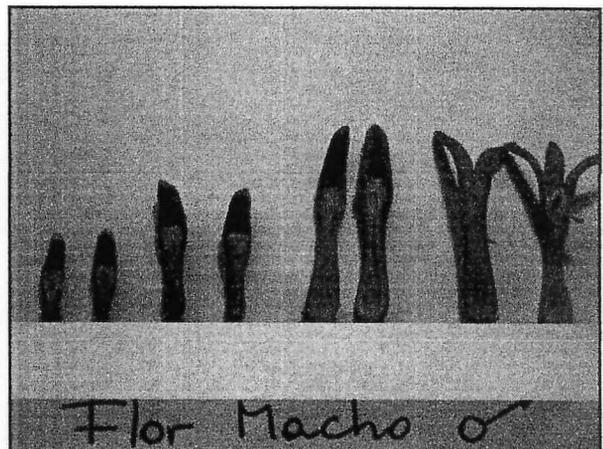
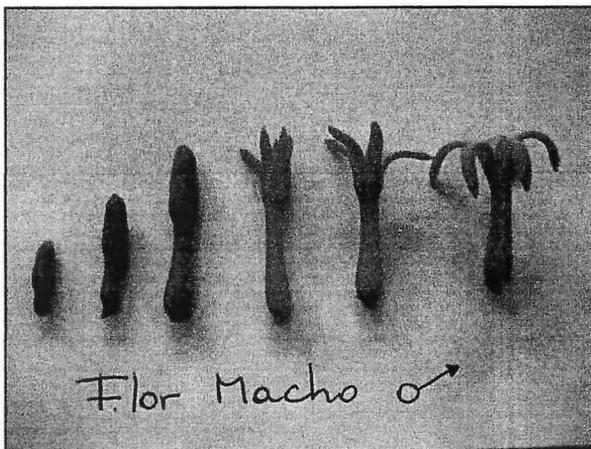
Cruzamientos dirigidos entre flores de diferente condición sexual en *Vasconcellea*

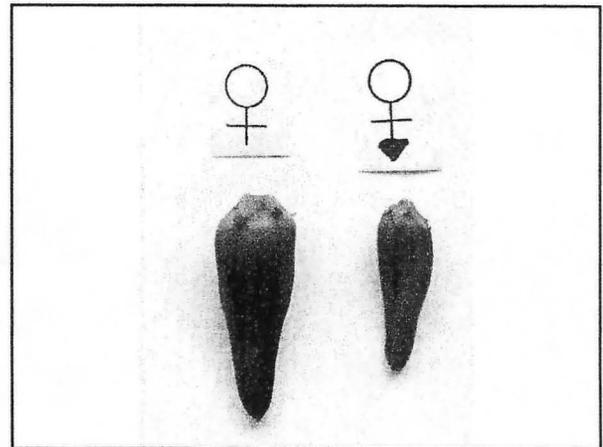
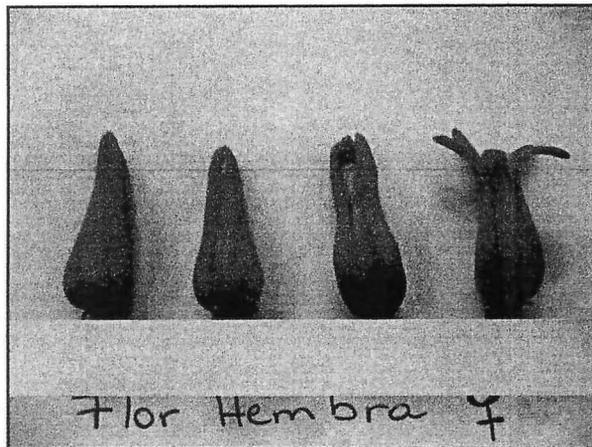
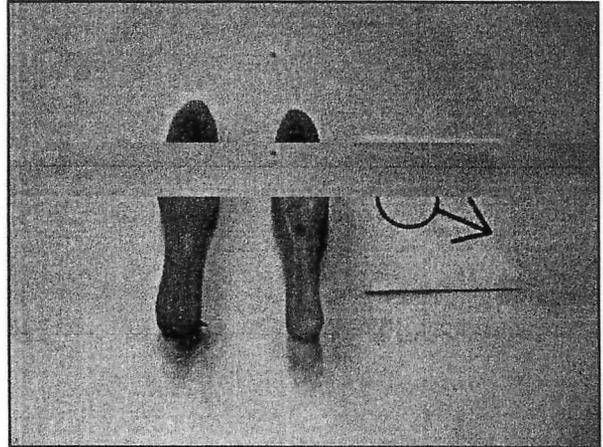
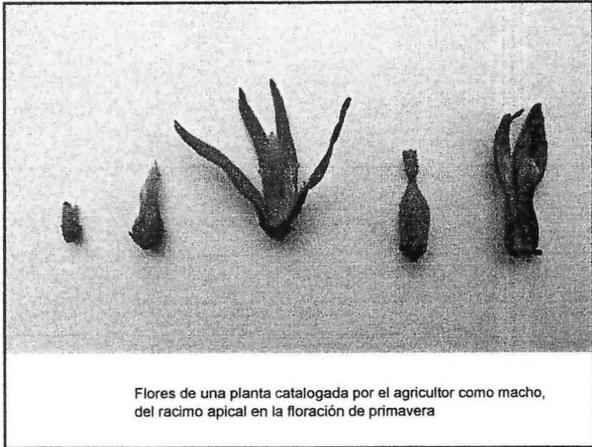
- Tres cruzamientos

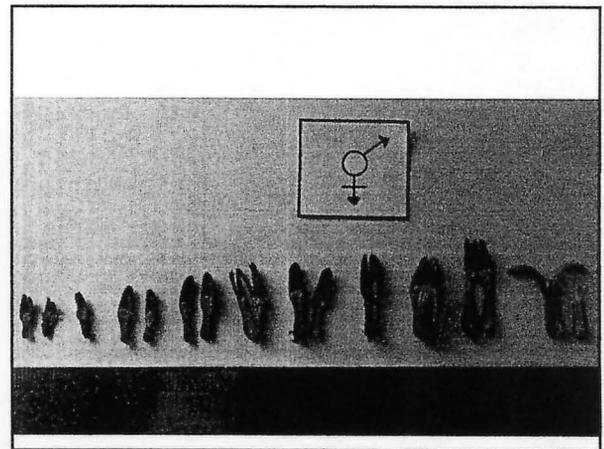
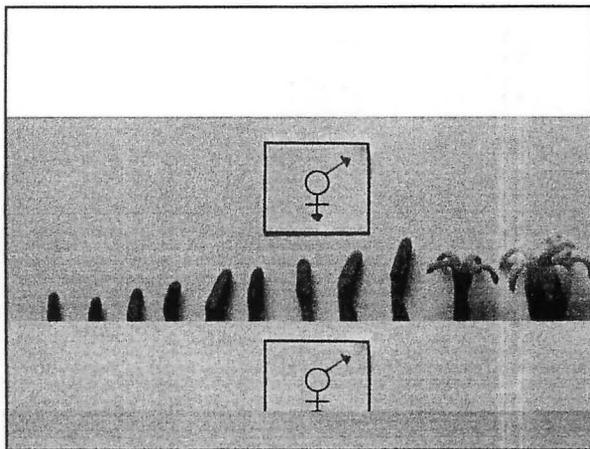
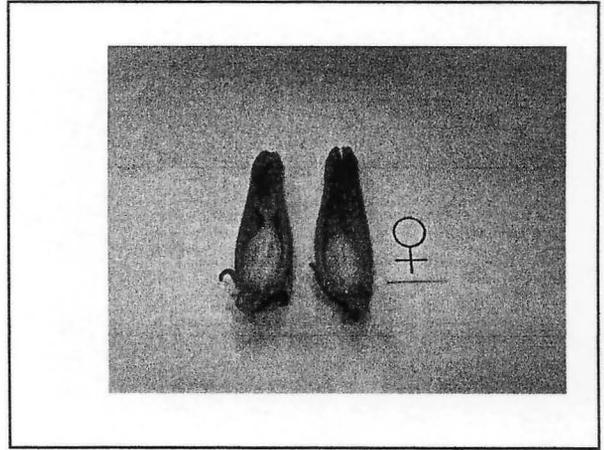
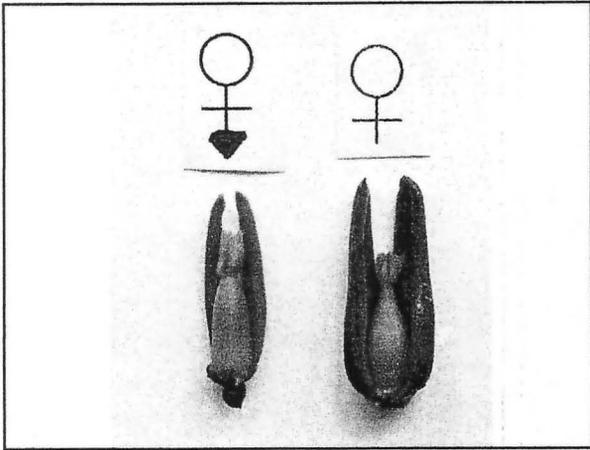
- Flor hembra de planta hembra polinizada con flor macho de planta macho
- Flor hembra de planta hembra polinizada con flor macho de planta hermafrodita.
- Flor hermafrodita de planta hermafrodita polinizada con flor masculina de planta hermafrodita.

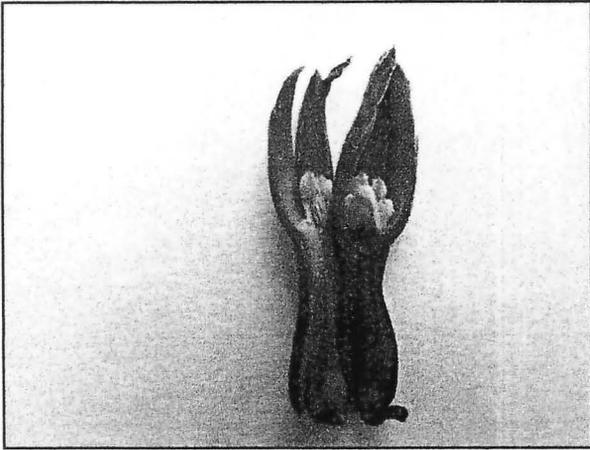
Sin embargo

- No se ha logrado hasta ahora visualizar flores machos absolutas
- Dudas sobre la polinización de las hembras
- Y gran variación entre flores hermafroditas





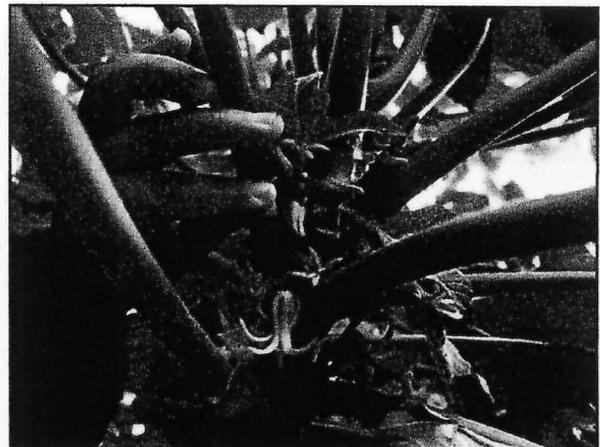


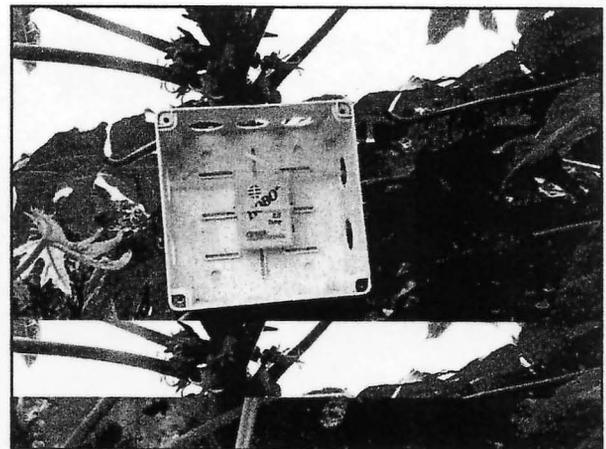
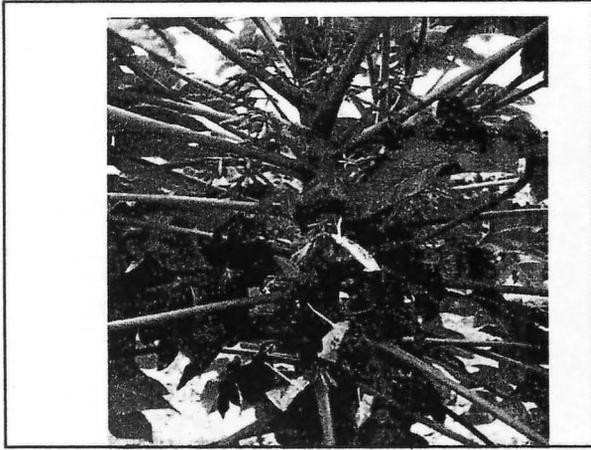


Forma sexual	Tipo de flor	Árbol
I	femenina	Plantas ginoicas
II	Flor hermafrodita con la parte femenina bien desarrollada	Plantas andromonoicas
III	Flor hermafrodita con la parte femenina irregular	Plantas andromonoicas
IV	Flor hermafrodita con la parte femenina elongada	Plantas andromonoicas
IV+	Flor masculina pero que puede variar a hermafrodita de acuerdo a condición climática	Planta estaminada funcional, también andromonoica
V	Flor masculina	Planta estaminada o androica

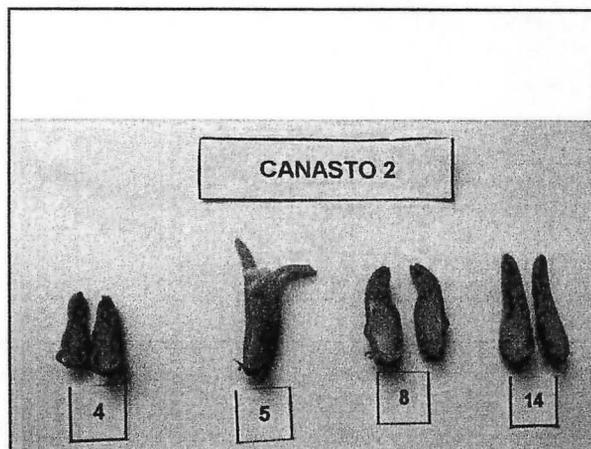
Tres cruzamientos → Siete cruzamientos

	Flor macho de árbol macho	Flor macho de árbol hermafrodita	Autopolinización
Flor ♀ árbol ♀	CR1	CR2	CR6
Flor ♀ árbol hermafrodita	CR3	CR4	CR7
Flor hermafrodita árbol hermafrodita	-	-	CR5





Canasto 2		marcado	
		18-01-2012	20-01-2012
Primer eje			
Numero	Observación		
1	Flor hembra cerrada		
2	Fruto cuajado hembra		
3	Flor macho cerrado		
4	Flor macho abierta		
5	Flor hembra iniciando apertura		
6	Flor macho cerrado		
7	Flor macho cerrado		
8	Flor macho cerrado		
9	Flor posible hermafrodita		
10	Flor macho cerrado		
Segundo eje			
11	Flor hembra cuajada		
12	Flor hembra cuajada		
13	Flor macho cerrado		
14	Flor macho cerrado		
20-01-2012 anotada			
15	Flor macho cerrado		



Objetivo : Determinar un protocolo para la germinación in vitro de semillas de *Vasconcellea pubescens*

Etapas:

1-Esterilización del material vegetal: Determinar tiempo y concentración de agente desinfectante en semillas de papaya

Tratamientos:

- T0 (testigo): Sólo alcohol al 70%, por 2 minutos, sin hipoclorito de sodio.
- T1: alcohol al 70% 2 minutos + Hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos
- T2: alcohol al 70% 2 minutos + hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos

Proceso de desinfección y siembra in vitro de semillas de Vasconcellea

Condiciones de cultivo: En cámara de crecimiento a 25 ± 1 °C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 3.000 lux de luminosidad.

Evaluaciones: 10, 20 y 30 días contaminación y sobrevivencia de semillas.

Resultados finales :

Tratamientos	Sobrevivencia	Contaminación
T0	90%	10%
T1	80%	20%
T2	60%	40%

2. Germinación de semillas :

Determinar concentración y tipo de regulador de crecimiento en medio de cultivo para la germinación de semillas in vitro de Vasconcellea

Hormonas: Acido Naftalen acético(ANA) y Bencil amino purina (BAP)

Tratamientos	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
ANA(mg/L)	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
BAP(mg/L)	0	0,1	0,2	0	0,1	0,2	0	0,1	0,2



Condiciones de cultivo: En cámara de crecimiento a 25 ± 1 °C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 3.000 lux de luminosidad.

Evaluaciones: Porcentaje de germinación a los 10,20 y 30 días, días a germinación y desarrollo de las nuevas plántulas (longitud de tallo, largo de raíz, ancho de hojas)

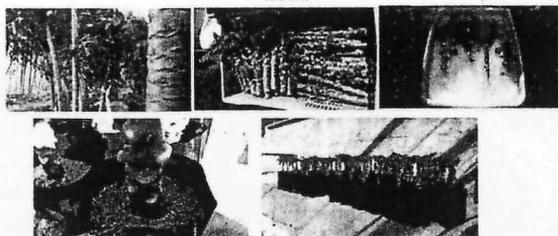
Resultados

tratamientos	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
%germinación	60%	30%	60%	15%	55%	55%	0%	30%	70%



Propagación agámica: enraizamiento de estacas

- Enraizamiento de estacas colectadas en Octubre de 2011

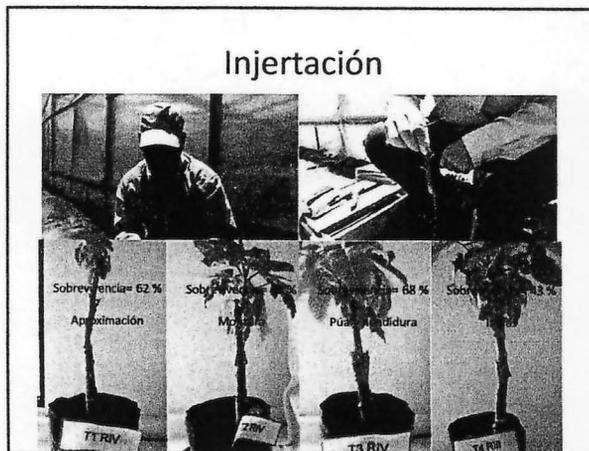
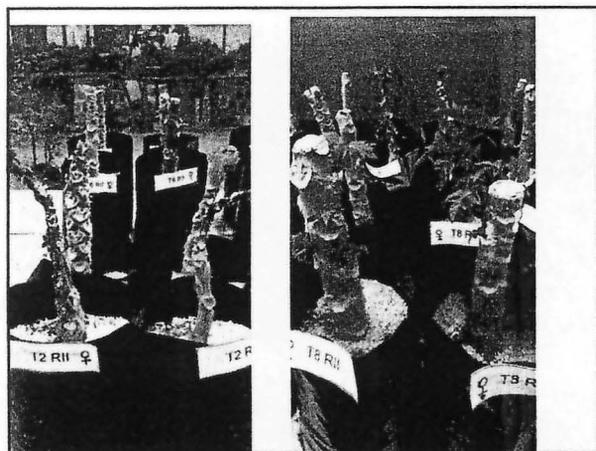


Uso de enraizante comercial IBA 4000 ppm

Porcentaje de enraizamiento de estacas colectadas en primavera

Condición	Tipo de estaca	con o sin hormona	% sobrevivencia	% enraizamiento
HERMAFRODITAS	INVERNADERO	apical con	31,25	40,0
		apical sin	62,5	30,0
		basal con	100	56,3
	AIRE LIBRE	apical con	31,25	20,0
		apical sin	68,75	54,5
		basal con	93,75	80,0
HEMBRAS	INVERNADERO	apical con	18,75	0,0
		apical sin	81,25	84,6
		basal con	100	68,8
	AIRE LIBRE	apical con	25	0,0
		apical sin	68,75	54,5
		basal con	87,5	71,4
		sin	87,5	71,4



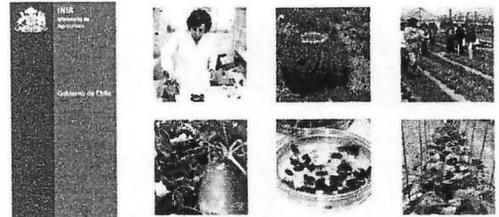


Necesidad de reitemización

Cuenta	Identificación	PRESUPUESTO	GASTOS	SALDO
EQUIPAMIENTO	EQUIPAMIENTO	972.000	302.340	669.660
MATERIALES E INSUMOS	MATERIALES E INSUMOS	402.272	695.741	293.499
SERVICIOS DE TERCEROS	SERVICIOS DE TERCEROS	8.870.490	181.475	8.689.015
GASTOS GENERALES	GASTOS GENERALES	848.183	289.916	558.267
GASTOS DE ADMINISTRACION	GASTOS DE ADMINISTRACION	2.559.830	1.734.078	825.752
IMPREVISTOS	IMPREVISTOS	347.935		347.935
VIATICOS Y MOVILIZACION	VIATICOS Y MOVILIZACION	396.598	166.838	229.760
Total general		14.397.308	3.170.288	11.227.020


INIA

Obtención de plantas de papayos (*V. pubescens*) con sexo definido mediante un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual usando herramientas biotecnológicas y caracteres morfológicos asociados e identificables por los usuarios y a través del perfeccionamiento de la propagación agámica.



**T ABLA 1^{era} Reunión Comité de Seguimiento
31 de Enero de 2012**

- ❖ Presentación proyecto
- ❖ Resultados obtenidos en el período Agosto-Diciembre de 2011.
- ❖ Propuestas y discusión de los resultados
- ❖ Modalidad de aportes al proyecto e insumos necesarios para proyecto
- ❖ Conclusiones

Equipo de trabajo

- ❖ Romina Ferrera - Administración
- ❖ Roxana Gutiérrez - Propagación in vitro
- ❖ Constanza Jana A.- Caracterización morfológica y cruzamientos
- ❖ Lucía Martínez G.- Técnico terreno
- ❖ René Pacheco – Análisis económico
- ❖ Angélica Salvatierra G. - Propagación vegetativa

Objetivo

- Desarrollar un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual en plantas y semillas mediante herramientas biotecnológicas y caracteres morfológicos asociados, identificables por los usuarios.
- Perfeccionar la propagación vegetativa de plantas de sexo definido por medio de técnicas nuevas y convencionales.

Actividades y resultados parciales obtenidos en el período Agosto-Diciembre



Objetivo 2: Establecer caracteres morfológicos de plantas jóvenes antes de la floración

1. Marcado de plantas adultas en parcela de agricultores (Altovalsol)



2. Definición de caracteres morfológicos

- Normas UPOV (2010) para *Carica papaya*
- Caracterización morfológica de caricáceas en altura de Cadavid *et al.* (2002)
- Parte de los descriptores utilizados por Kyndt *et al.* (2005) en caracterización morfológica de *Vasconcellea*

Caracteres del tallo	Medición	Observaciones
Color del tallo	Solo verde, verde amarillento, marrón, verde púrpura, solo púrpura	
Altura inserción primera inflorescencia	cm	
Ramificación	Ausente o presente	Observación al comienzo de la floración
Diámetro del tallo	mm	Deberá observarse a la mitad de la altura del tallo y comienzo de la floración
Nº de nudos del tallo	Número	Desde el suelo hasta la primera flor
Longitud de entrenudos	cm	A mitad de camino entre suelo y primera inflorescencia

Cruzamientos dirigidos

En *carica*, hay 3 genes involucrados en la expresión sexual

Gen *M* = machos
Mm1 ó *Mm2* = hermafroditas
m1m2 = hembra
m1m1 ó *m2m2* = letales

1. $MM \times Mm1 \text{ ó } Mm2 = 1\sigma^+ : 1\blacksquare$
2. $Mm1 \text{ ó } Mm2 \times m1m2 = 2\blacksquare : 1\sigma^- : 1 \text{ letal}$
3. $Mm1 \text{ ó } Mm2 \times Mm1 \text{ ó } Mm2 = 1\sigma^+ : 2\blacksquare : 1\sigma^- \text{ ó } 1\sigma^+ : 2\blacksquare : 1 \text{ letal}$

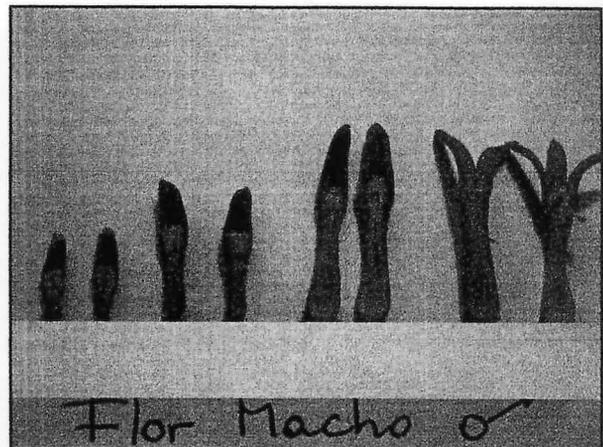
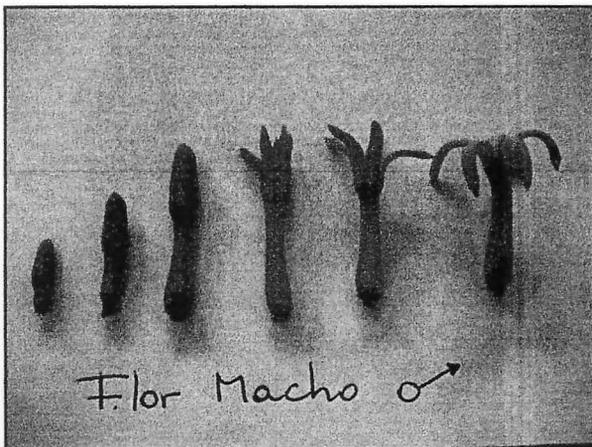
Cruzamientos dirigidos entre flores de diferente condición sexual en *Vasconcellea*

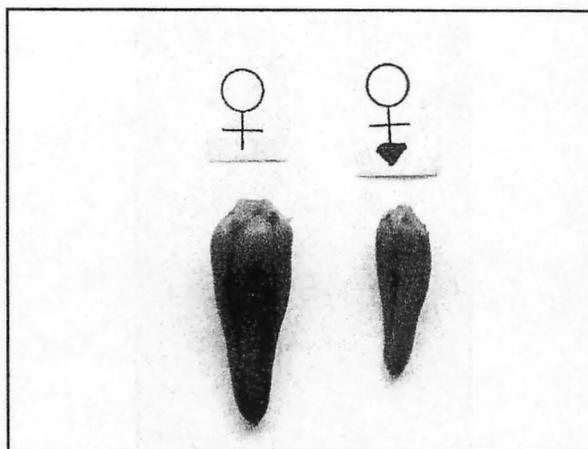
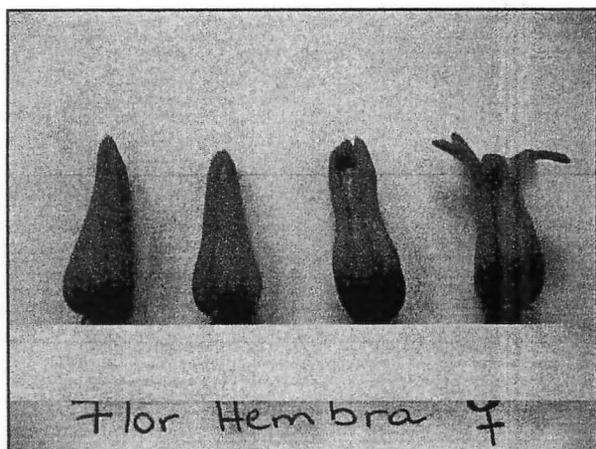
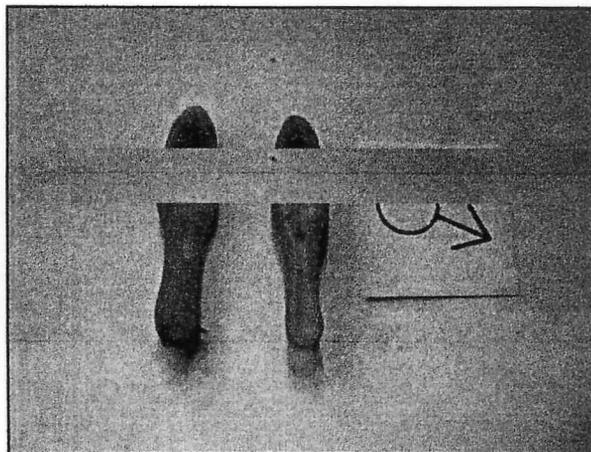
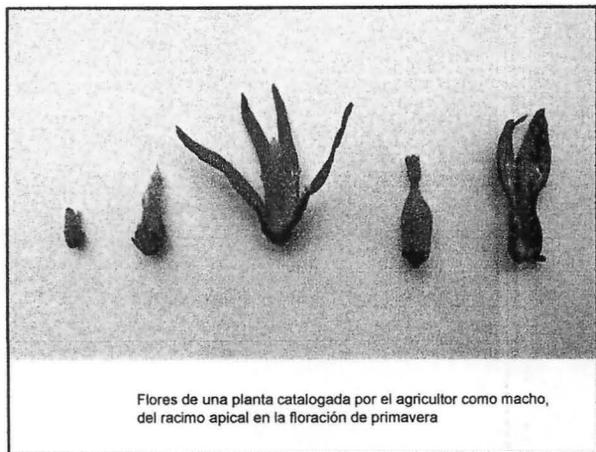
- Tres cruzamientos

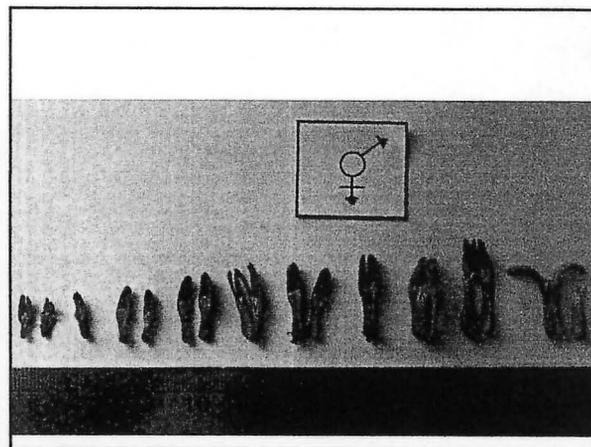
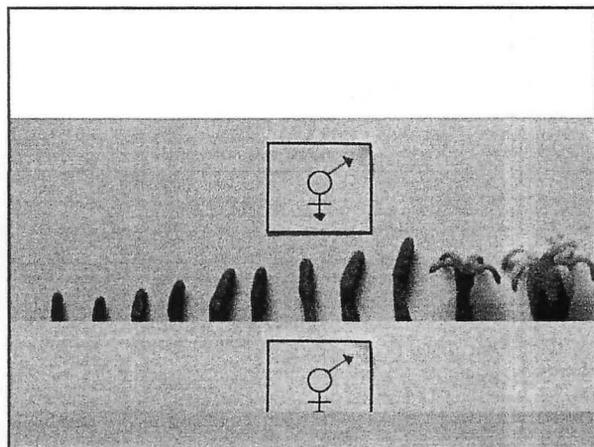
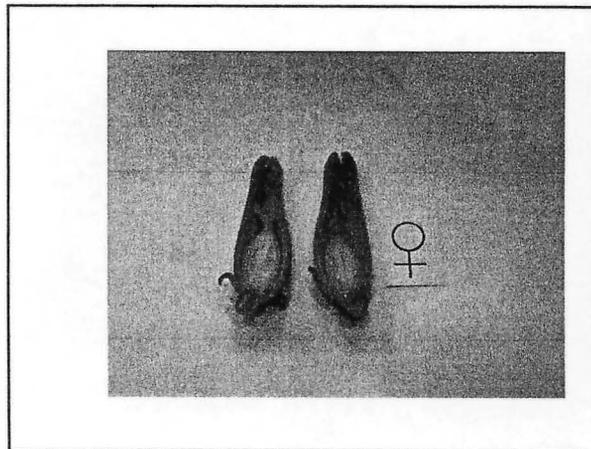
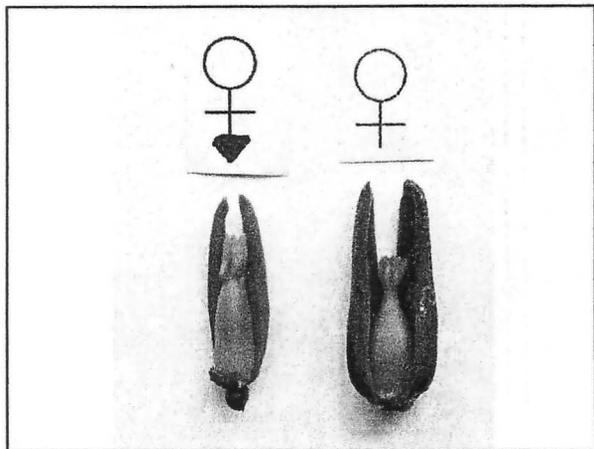
- Flor hembra de planta hembra polinizada con flor macho de planta macho
- Flor hembra de planta hembra polinizada con flor macho de planta hermafrodita.
- Flor hermafrodita de planta hermafrodita polinizada con flor masculina de planta hermafrodita.

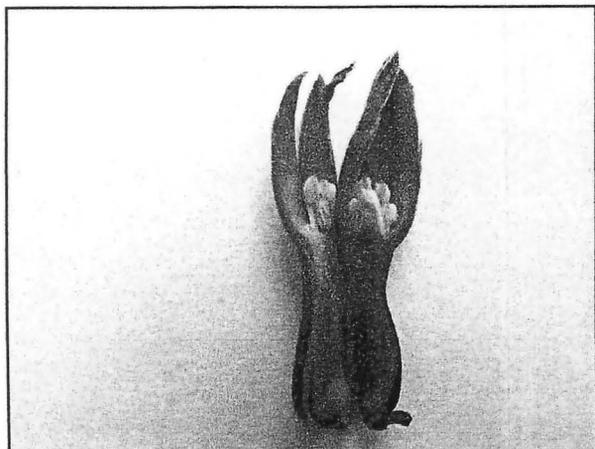
Sin embargo

- No se ha logrado hasta ahora visualizar flores machos absolutas
- Dudas sobre la polinización de las hembras
- Y gran variación entre flores hermafroditas





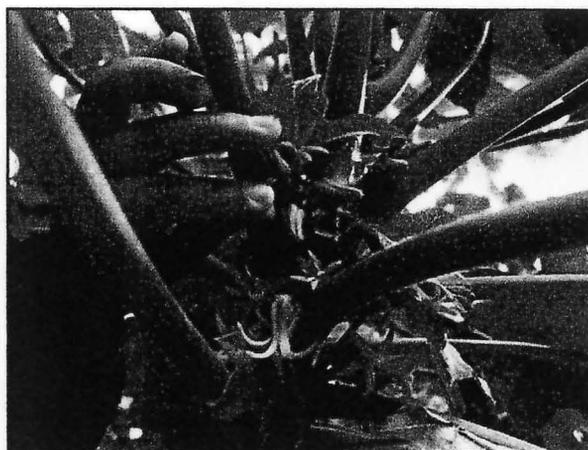


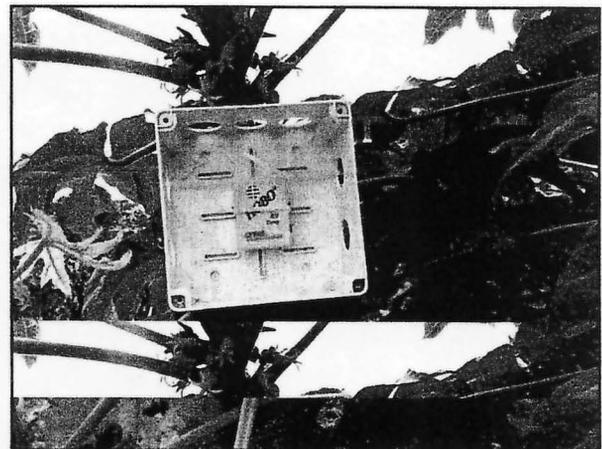
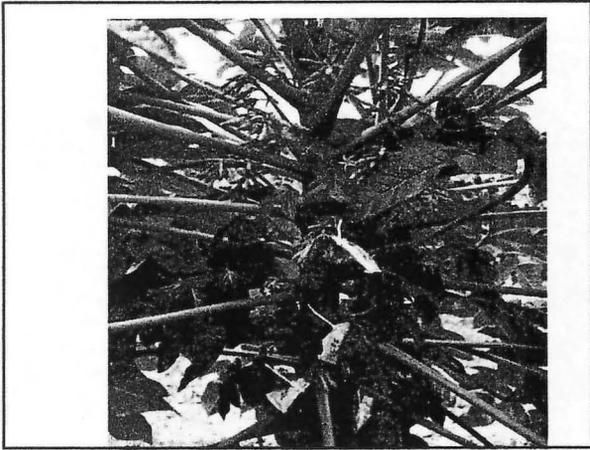


Forma sexual	Tipo de flor	Árbol
I	femenina	Plantas ginoicas
II	Flor hermafrodita con la parte femenina bien desarrollada	Plantas andromonoicas
III	Flor hermafrodita con la parte femenina irregular	Plantas andromonoicas
IV	Flor hermafrodita con la parte femenina elongada	Plantas andromonoicas
IV+	Flor masculina pero que puede variar a hermafrodita de acuerdo a condición climática	Planta estaminada funcional, también andromonoica
V	Flor masculina	Planta estaminada o androica

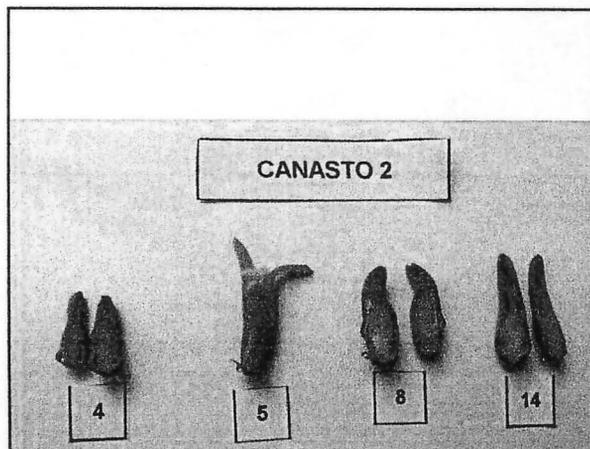
Tres cruzamientos → Siete cruzamientos

	Flor macho de árbol macho	Flor macho de árbol hermafrodita	Autopolinización
Flor ♀ árbol ♀	CR1	CR2	CR6
Flor ♀ árbol hermafrodita	CR3	CR4	CR7
Flor hermafrodita árbol hermafrodita	-	-	CR5





Canasto 2		marcado	
		18-01-2012	20-01-2012
Primer eje			
Numero	Observación		
1	Flor hembra cerrada		
2	Fruto cuajado hembra		
3	Flor macho cerrado		
4	Flor macho abierta		
5	Flor hembra iniciando apertura		
6	Flor macho cerrado		
7	Flor macho cerrado		
8	Flor macho cerrado		
9	Flor posible hermafrodita		
10	Flor macho cerrado		
Segundo eje			
11	Flor hembra cuajada		
12	Flor hembra cuajada		
13	Flor macho cerrado		
14	Flor macho cerrado		
20-01-2012 anotada			
15	Flor macho cerrado		



Objetivo : Determinar un protocolo para la germinación in vitro de semillas de *Vasconcellea pubescens*

Etapas:
1-Esterilización del material vegetal: Determinar tiempo y concentración de agente desinfectante en semillas de papaya

Tratamientos:

- T0 (testigo): Sólo alcohol al 70%, por 2 minutos, sin hipoclorito de sodio.
- T1: alcohol al 70% 2 minutos + Hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos
- T2: alcohol al 70% 2 minutos + hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos

Proceso de desinfección y siembra in vitro de semillas de Vasconcellea

Condiciones de cultivo: En cámara de crecimiento a 25 ± 1 °C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 3.000 lux de luminosidad.

Evaluaciones: 10,20 y 30 días contaminación y sobrevivencia de semillas.

Resultados finales :

Tratamientos	Sobrevivencia	Contaminación
T0	90%	10%
T1	80%	20%
T2	60%	40%

2. Germinación de semillas :

Determinar concentración y tipo de regulador de crecimiento en medio de cultivo para la germinación de semillas in vitro de Vasconcellea

Hormonas: Acido Naftalen acético(ANA) y Bencil amino purina (BAP)

Tratamientos	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
ANA(mg/L)	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
BAP(mg/L)	0	0,1	0,2	0	0,1	0,2	0	0,1	0,2



Condiciones de cultivo: En cámara de crecimiento a 25 ± 1 °C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 3.000 lux de luminosidad.

Evaluaciones: Porcentaje de germinación a los 10,20 y 30 días, días a germinación y desarrollo de las nuevas plántulas (longitud de tallo, largo de raíz, ancho de hojas)

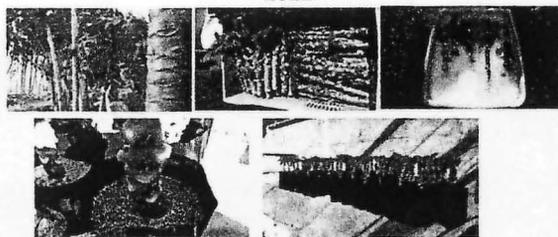
Resultados

tratamientos	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
%germinación	60%	30%	60%	15%	55%	55%	0%	30%	70%

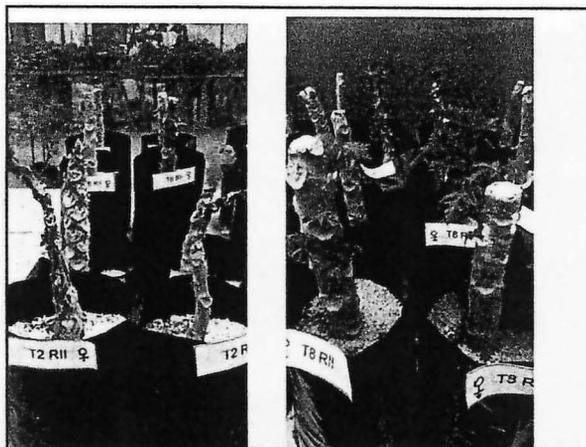


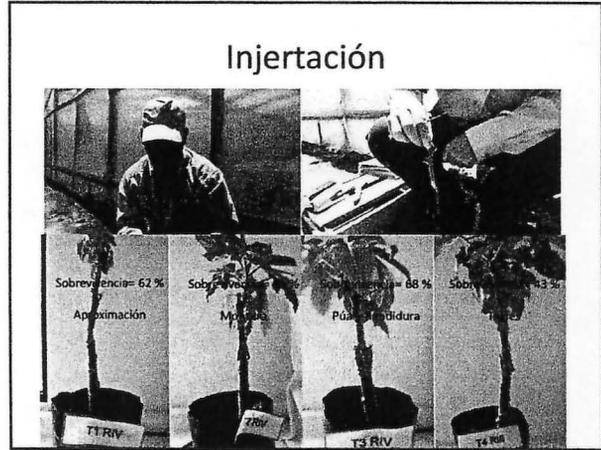
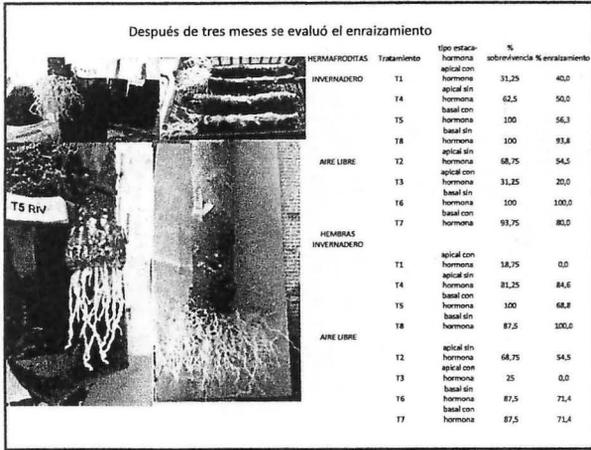
Propagación agámica: enraizamiento de estacas

- Enraizamiento de estacas colectadas en Octubre de 2011

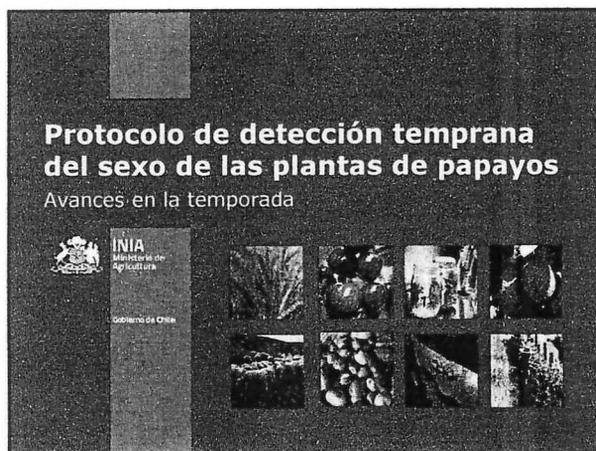


Uso de enraizante comercial IBA 4000 ppm





- Aportes comprometidos al 2011 mínimo
- Posibles aportes de asociados**
- Iluminación de plantas in vitro
9 Unidades de 8 BARRAS LED WATERPROOF
DRIVER PARA BARRAS 12 VOLTS 60 WATTS
 - Tabla Munsell para caracterización
 - Agar
 - Murashige (250 g)

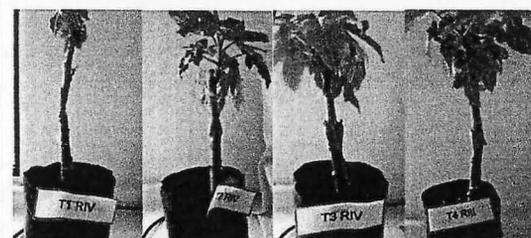


Programa reunión Comité de seguimiento Agosto 2012

1. Estudio de situación actual del papayo . Sr. Pedro Hernández.
2. Avance en propagación convencional. Angélica Salvierra G.
3. Avances en la caracterización morfológica y molecular de plantas de distinto sexo. Constanza Jana A.
4. Avances en protocolos de propagación in vitro. Roxana Gutiérrez L.
5. Término de proyecto: Julio de 2013

AlternativaPropagación vegetativa

- Injertación
- Enraizamiento de estacas



Porcentaje de prendimiento de injertos en plantas propagadas por semillas (3 meses después)

Tratamientos	Rango prendimiento de repeticiones (%)	Porcentaje de prendimiento (%)
Aproximación	25-100	62.5a
Montura	25-75	43.7a
Cuña o hendidura	50-75	68.7a
Lengüeta	25-75	43.7a

N= 16 plantas por repetición

Lo que viene..... Segunda temporada

- Injertar estacas de sexo conocido en plantas de semillas en vivero (Octubre 2012)
- Plantar en terreno (marzo 2013)
- Evaluación de establecimiento en campo hasta Julio 2013.....
- *Propuesta*
- Aplicación de otros métodos???

Propagación enraizamiento de estacas



Enraizamiento (%) de plantas hermafroditas (estacas colectadas en primavera)

Tipo de estaca	Condición	
	Aire libre	Invernadero
apical	18.75b	21.85b
basal	84.37a	75 a
Hormona*		
Con	37.5 b	34.37b
Sin	65.62a	62.47a
CV (%)	47	46

Acido 1 naftil acetico 4000 ppm

Estaca basal sin hormona al aire libre o invernadero

Enraizamiento (%) de plantas hembras

	Aire libre		Invernadero	
	Con Hormona	Sin hormona	Con Hormona	Sin hormona
apical	0 bB	37.5aA	0 bB	62.5bA
basal	62.5aA	56.2aA	68.75aB	87.5aA
CV(%)	52.2		13.0	

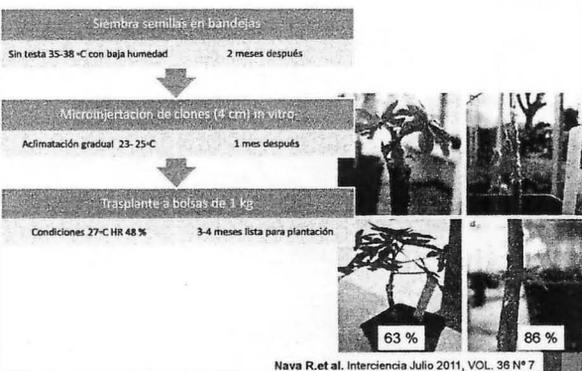
Letras minúsculas entre filas y mayúsculas entre columnas

Estaca Basal sin hormona bajo condiciones de invernadero

Calidad de enraizamiento



Lo que viene... Microinjertación Tecnología desarrollada para papaya lechosa....



Nava R. et al. Interciencia Julio 2011, VOL. 36 N° 7

Establecer caracteres morfológicos de plantas jóvenes antes de la floración



Caracterización de tallo de plantas adultas de *Vasconcellea* (3 sexos definidos por el agricultor)

	Altura inserción inflorescencia (cm)	Diámetro tallo (mm)	N° nudos del tallo	Longitud del entrenudo (cm)
Macho	58,38 a	65,79 a	16,8 a	3,03 a
Hembra	50,6 a	65,79 a	16,8 a	2,71 a
Hermatrodita	64,5 a	65,78 a	16,8 a	2,47 a

Caracterización de hojas de plantas adultas de *Vasconcellea* (3 sexos definidos por el agricultor)

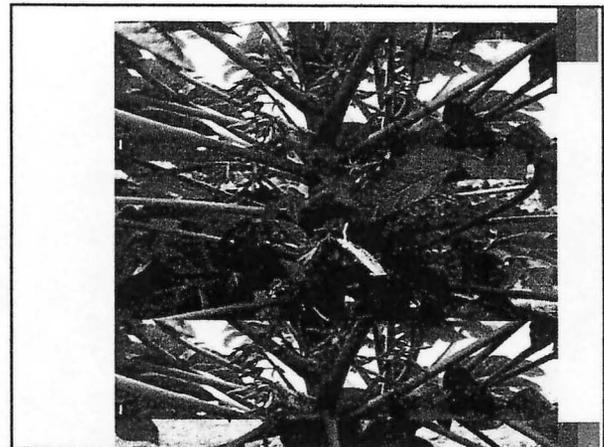
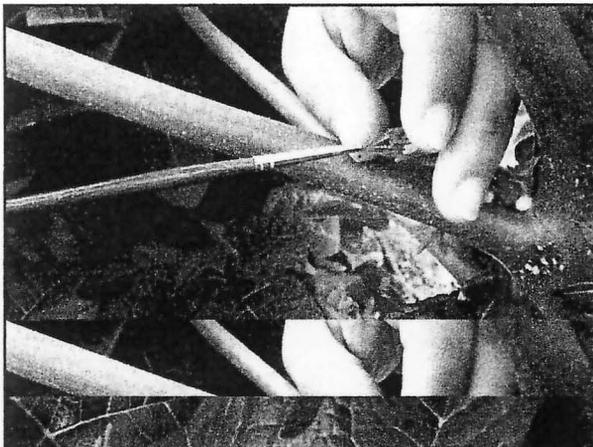
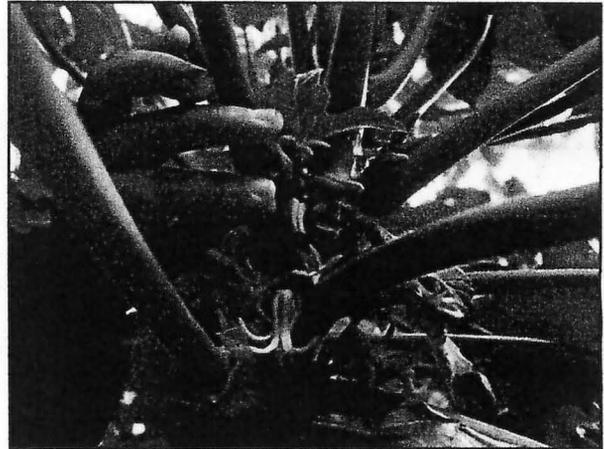
Sexo	Largo limbo	Ancho limbo	Longitud peciolo	Altura ondulación lámina	Forma ápice	Largo base (vena 1')	Ancho unión vena 1"	Grosor vena 2"	N° nervaduras basales 2"	N° nervaduras basales 3"
Macho	20,33 a	31,33 a	22,85 a	2,53 a	1 a	20 a	7 a	3,4 a	22,5 a	17 a
Hembra	25,34 a	42,7 a	30,2 a	3,78 a	2,5 a	25,06 a	9,38 a	5,01 a	25,4 a	22,6 a
Hermatrodita	23,95 a	41,92 a	27,02 a	3,22 a	1,6 a	23,98 a	9,38 a	4,58 a	25,4 a	25,2 a

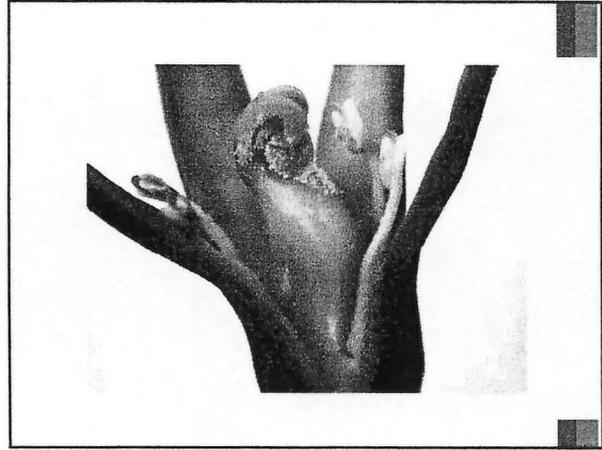
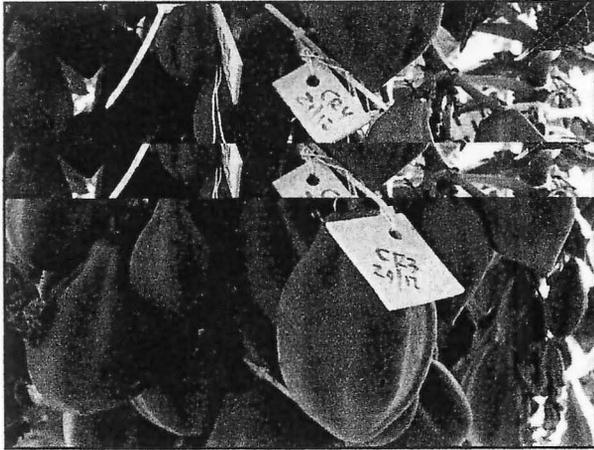
Cruzamientos dirigidos asociados a caracterización molecular

En *Carica* hay 3 genes involucrados en la expresión sexual
 MM = machos; Mm1 ó Mm2 = hermafroditas; m1m2= hembra
 m1m1 ó m2m2 = letales

Cuadro 3. Proporción de descendencia esperada de *Vasconcellea* de acuerdo a cruzamientos dirigidos. A) flor hembra de planta hembra, con flor macho de planta macho; b) flor hembra de planta hembra con flor macho de planta hermafrodita; c) flor hembra de planta hermafrodita con flor macho de planta macho d) flor hembra de planta hermafrodita con flor macho de planta hermafrodita e) flor hermafrodita autopolinizada

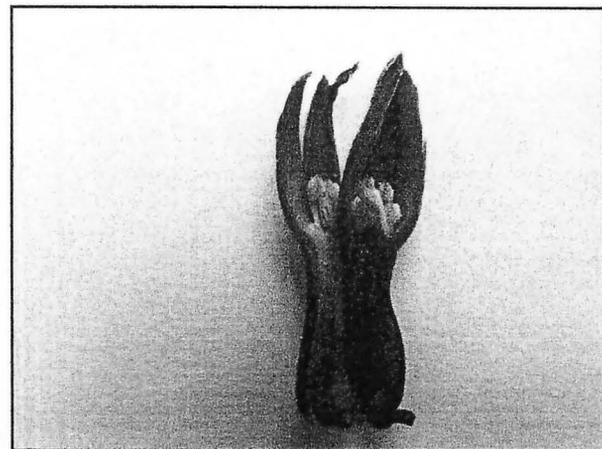
	M	M		M	m1		M	M
m1	Mm1	Mm1	m1	Mm1	m1m1	M	MM	MM
m2	Mm2	Mm2	m2	Mm2	m1m2	m1	Mm1	Mm1
Todas hermafroditas			2/4 hermafroditas: 1/4 hembra: 1/4 letal			1/2 macho: 1/2 hermafrodita		
	M	m1		M	m1		M	m1
M	MM	MM	M	MM	MM			
m1	Mm1	Mm1	m1	Mm1	Mm1			
1/2 macho: 1/2 hermafrodita			1/2 macho: 1/2 hermafrodita					

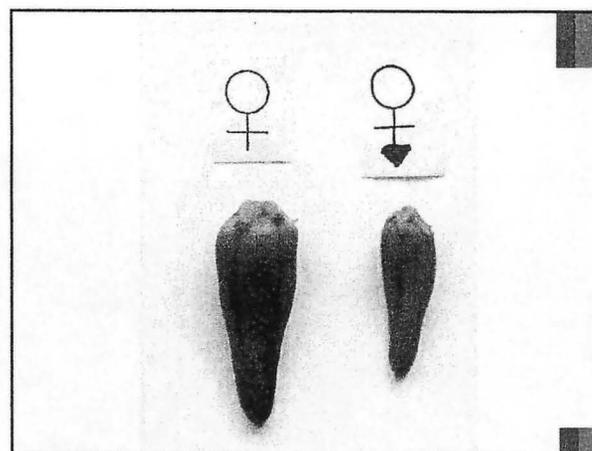
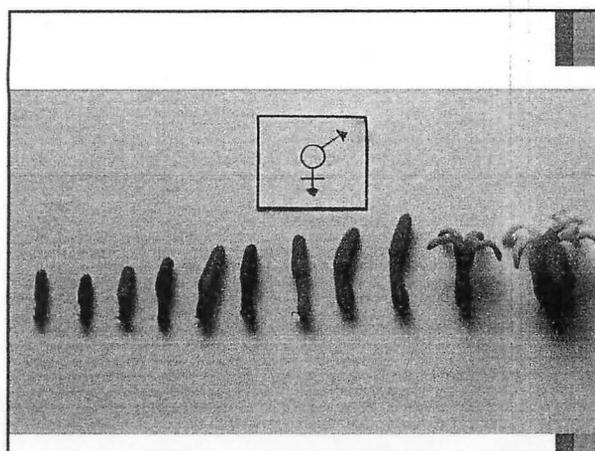
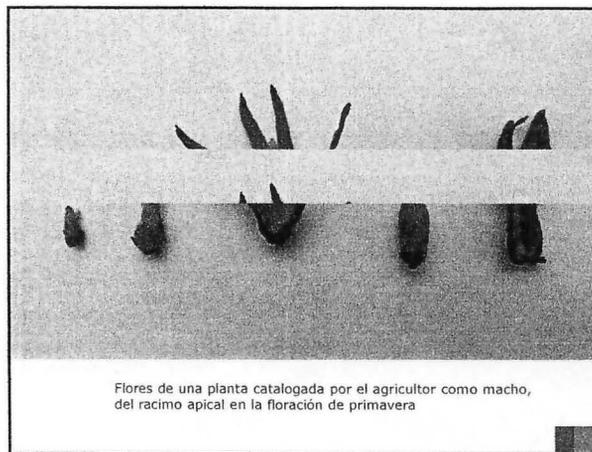
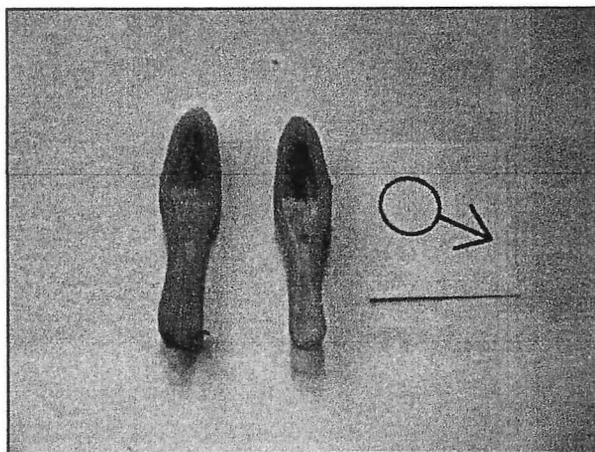


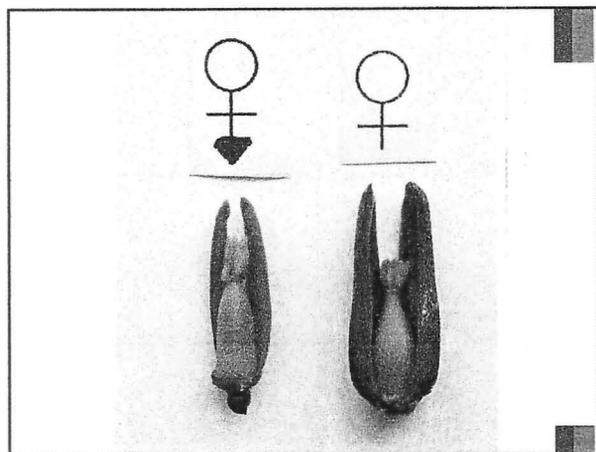


Observaciones a la floración

- Solo las plantas hembras, siempre tienen solo flores hembras
- Las plantas hermafroditas tienen flores de los 3 sexos, las flores machos son muchas y abortan, las hermafroditas son pocas, de variadas formas y al parecer siempre abortan.
- De las 4 plantas machos (definidas así por el agricultor), solo una ha sido siempre macho.
- **No se ha logrado hasta ahora visualizar flores machos absolutas.**



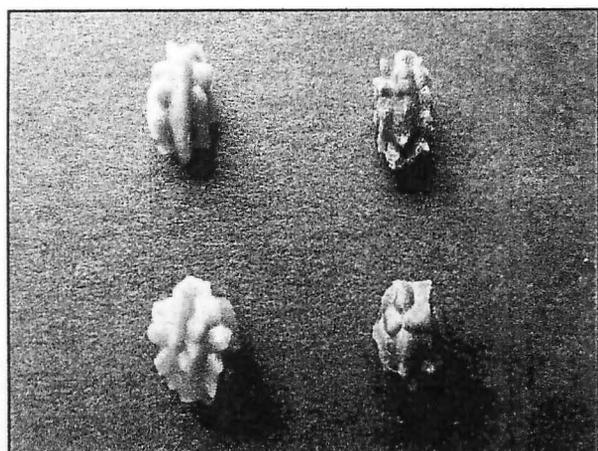




Caracterización semillas provenientes de los cruzamientos

Cruzamiento	Ancho de semillas			Largo de semillas			Radio Largo/ancho		
	Media	Min	Máx	Media	Min	Máx	Media	Min	Máx
1	3,91	3,39	4,44	6,25	5,66	6,90	1,60	1,33	1,95
2	3,77	3,33	4,03	6,52	5,98	7,23	1,74	1,54	2,10
Total	3,84	3,33	4,44	6,39	5,66	7,23	1,67	1,33	2,10

Cruzamiento	Forma		Textura		Color semillas según Hussel		
	alargada	globosa	rugosa	Rugosa-lisa	5 YR 3/4	5 YR 4/6	7,5 YR 2,5/3
1	3,33%	96,67%	23,33%	76,67%	10,00%	90,00%	0,00%
2	63,33%	36,67%	55,33%	44,67%	0,00%	0,00%	100,00%



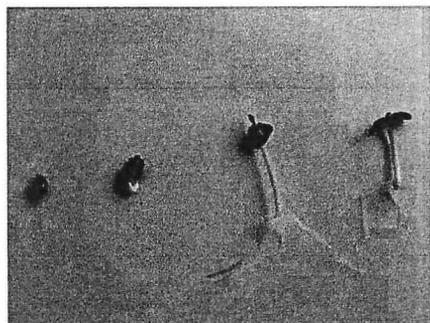
Caracterización semillas provenientes de cruzamientos

	CR1		CR2		CR3		Total	
	Fruto 1	Fruto 2	Fruto 1	Fruto 2	Fruto 1	Fruto 2	Fruto 1	Fruto 2
Forma								
Alergada	51	41,4653	36,0500	45,9268	41,7242	42,00304	41,70	
globoso	72	58,5494	63,95106	54,0895	58,2858	58,00425	58,30	
Total	123	100,00147	100,00196	100,00163	100,00100	100,00729	100,00	
Textura								
Liso + Rugoso	57	46,3496	58,5075	38,2779	48,471	1,00298	40,88	
Rugoso	66	53,6504	41,50121	61,7284	51,5299	99,00431	59,12	
Total	123	100,00147	100,00196	100,00163	100,00100	100,00729	100,00	
Color								
C1	122	99,18747	100,00196	100,00	0,00	0,00465	63,79	
C2		0,00	0,00	0,00163	100,00000	100,00263	36,00	
C3	1	0,81	0,00	0,00	0,00	0,001	0,14	
Total	123	100,00147	100,00196	100,00163	100,00100	100,00729	100,00	

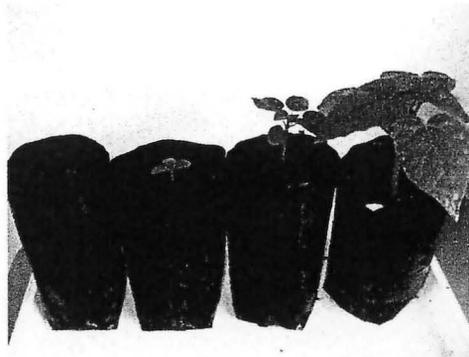
CR1: flor hembra de árbol hembra con flor macho de árbol macho; CR2: flor hembra de planta hembra, con flor macho de planta hermafrodita; CR3 flor hembra de planta hermafrodita con flor macho de planta macho

C1=7,5YR 5/6 ; C2=7,5YR 2,5/3 ; C3= 7,5YR 2,5/2

Evaluación de caracteres morfológicos en estado de plántulas

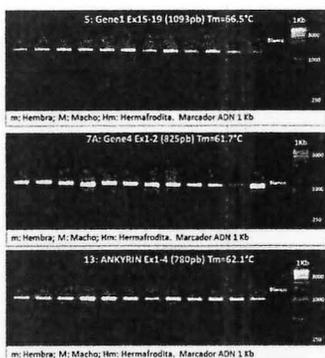


Evaluación de caracteres morfológicos en estado de planta juvenil

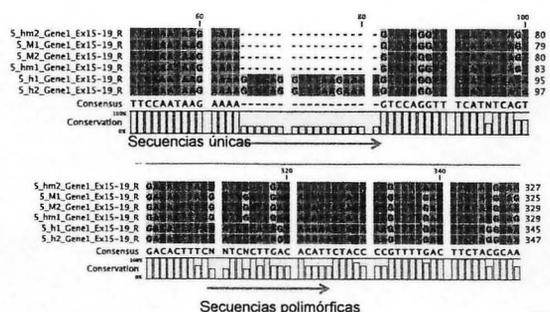


Avances de caracterización molecular

- 26 pares de Marcadores utilizados en *Carica*
- Se pudo identificar un set de partidores que amplificaron el ADN de las muestras analizadas.
- Estos resultados no permitieron la diferenciación entre muestras de sexos diferentes.
- 3 Marcadores mostraron diferencias de tamaño
- Amplicones fueron secuenciados por sexo y análisis de secuencias mostró diferencias por sexo
- Con esto se podrán diseñar nuevos partidores sexo-específicos.



Secuencias sexo específicas encontradas en *Vasconcellea*



Germinación de semillas en cámara húmeda

A las semillas de un fruto maduro se le retiró el saco mucilaginoso, se lavaron con agua y detergente, se desinfectaron en solución de hipoclorito al 2% por 5 minutos y se establecieron en cámaras húmedas diferenciadas de acuerdo a clasificación realizada por forma, textura y color de estas.



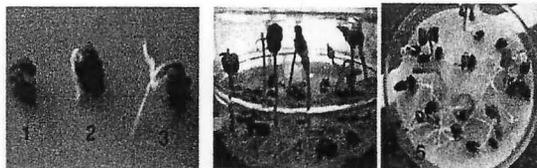
Condiciones ambientales:

Humedad : 70-100%

Temperatura: 25° C

Fotoperiodo: 16 horas luz y 8 de oscuridad

Ciclo germinativo: 20-35 días



1. Apertura de testa : 12º días
2. Aparición de radícula: 13º-15º días
3. Elongación radícula y raíces laterales: 16º-18º días
4. Alargamiento de tallo: 17º-19º
5. Eliminación de testa y apertura de cotiledones: 20º-30º días (estado de plántula)

Propagación in vitro

Actividades comprometidas realizadas:

Protocolo de obtención de plantas in vitro a partir de semillas Vasconcellea.

- Medio de cultivo : MS al 100% sin adición de reguladores de crecimiento.
- Condiciones de cultivo: 25 °C, 16 horas luz, 3000 lux.

1. Protocolo de desinfección de semillas:

- Desinfección 90% y contaminación 10% de las semillas.
- Agente desinfectante alcohol al 70% X 2 minutos de inmersión.
- Semillas de fruto maduro sin testa.

2. Protocolo de germinación in vitro de semillas:

- Porcentaje: 70% -80% de germinación.
- Tiempo de germinación :7º al 20º días
- Tiempo de elongación y enraizamiento: 45º día (primer par de hojas).



3. Siembra de semillas obtenidas por cruzamiento en medios de cultivo in vitro.

- Cruzamiento 1 : 145 semillas
- Cruzamiento 2 : 140 semillas

Actividad por realizar:

1. Continuar con siembra in vitro de semillas provenientes de cruzamientos 3, 4 y 7.
2. Evaluar como posibles descriptores de diferenciación:

a) Número, longitud y color de raíces.



b) Cotiledones y forma del primer par de hojas.



Avance de actividades:

4. Protocolo de propagación in vitro de material vegetal de sexo conocido.

- Medio de cultivo: MS
- Condiciones de cultivo: 25° C, fotoperiodo 16 horas, 3000 lux.
- Tipo de material vegetal: Brotes axilares sobre 2 cms. provenientes de planta adulta de sexo conocido. (colectadas entre Septiembre y Octubre 2011 (material de otoño)

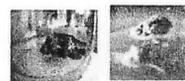


Desinfección de explantes

- Se realizaron pruebas preliminares de desinfección con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio en distintos tiempos.

Resultados :

Contaminación 60-70% de los explantes.



Se propone:

Continuar con ensayos de desinfección:

- Probar con otros agentes desinfectantes y
- Considerar colecta de material vegetal a fines de Noviembre 2012. (material de primavera).

Protocolo de multiplicación de brotes de Vasconcellea.

- Medio de cultivo (MS +BAP 1ppm)
- Porcentaje de brotación : 60 a 100%
- Tasa de multiplicación 7 a 15 brotes por explantes a los 45 días.
- Longitud de brotes promedio : 8,9 mm



5. Protocolo de elongación de brotes:

- Se realizaron pruebas preliminares con brotes obtenidos de multiplicación y trasplantados a 3 medios de cultivo distinto:
- T1 : 0,5 BAP*+0,5 ANA*(mg/L)
- T2: 0,5 BAP+0,5 ANA +0,3 AG3 *(mg/L)
- T0 o control sin reguladores de crecimiento
- .Bap:encil amino purina; ANA:ácido naftalen acetico; AG3 :acido giberelino.

A realizar:

- Evaluar resultados de elongación de brotes por tratamientos.
- Determinar realizar otros tratamientos de elongación .
- Protocolo de enraizamiento de brotes: (actividad por realizar)
- Determinar medio de cultivo y utilización de concentración y tipo (s) de reguladores de crecimiento para inducir enraizamiento en brotes o plantas de Vasconcellea de sexo conocido, a partir de propagación in vitro.

Traspaso a suelo y aclimatación a condiciones ambientales. (Actividad por realizar)

Objetivo: Proporcionar a la planta en un primer periodo condiciones similares a las de in vitro para ir adaptándose paulatinamente a condiciones ambientales naturales.

Duración: 20-30 días dependiendo del vigor de plantas y condición de las raíces.

Condición de cultivo: 10 a 15 días , similares a las in vitro .Temperatura sobre los 20°C, humedad atmosférica sobre 60 %.

- Coloca sobre las plantas una cubierta de plástico sellado que se va abriendo cada 5 días hasta observar principalmente en las hojas que están más firmes, gruesas y por consiguiente no se deshidratan y se mantienen firmes.

- 15º día en adelante pasan a condición de vivero.

A determinar:

1. Resultados de diferenciación de raíces y de hojas por cruzamiento.
2. Protocolo de desinfección para material de sexo conocido.
3. Medio de cultivo para elongación de brotes.
4. Protocolo de enraizamiento.



Objetivo

- Desarrollar un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual en plantas y semillas mediante herramientas biotecnológicas y caracteres morfológicos asociados, identificables por los usuarios.

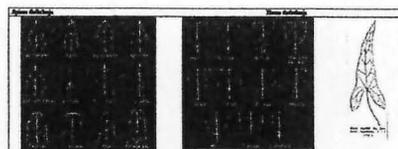
ACTIVIDAD 1

Definición de caracteres morfológicos

- Normas UPOV (2010) para *Carica papaya*
- Caracterización morfológica de caricáceas en altura de Cadavid et al. (2002)
- Parte de los descriptores utilizados por Kyndt et al. (2005) en caracterización morfológica de *Vasconcellea*

Caracteres del tallo	Medición	Observaciones
Color del tallo	Solo verde, verde amarillento, marrón, verde púrpura, solo púrpura	
Altura inserción primera inflorescencia	cm	
Ramificación	Ausente o presente	Observación al comienzo de la floración
Diámetro del tallo	mm	Deberá observarse a la mitad de la altura del tallo y comienzo de la floración
Nº de nudos del tallo	Número	Desde el suelo hasta la primera flor
Longitud de entrenudos	cm	A mitad de camino entre suelo y primera inflorescencia

Seno	Limbo (cm)	Pecíolo	Lámina	Margen de la hoja	Base del Lóbulo 1º con 2º
Nº hoja					
Longitud (cm)					
Ancho					
Pigmentación antocianina Ausente (Estrazala)					
Altura Ondulación					
Simetría (nº de lóbulos)					
Apícte					
Base de la Hoja					
Longitud de la base (Vena principal cm)					
Planas					
Casi planas					
Fuertemente onduladas					
Margen (ondulado, liso, grueso, otro)					
No se entrecruza sobre el tallo					
Se entrecruza sobre la unión (lóbulo apical)					



Sexo	Lóbulos basales	Categorías de las venas 1ª	Categorías de las venas 2ª	Categorías de las venas 3ª	Nervadura central prolongada
Nº Hoja	No se superponen	Pinata	Pinata	Pinata	Ausente
Si se superponen	No aplicable	Reticulada	Reticulada	Reticulada	Presente
Si se superponen	Pinna	Pinna	Pinna	Pinna	Grosor relativo de venas secundarias
Si se superponen	Pinna	Pinna	Pinna	Pinna	
Si se superponen	Pinna	Pinna	Pinna	Pinna	
Si se superponen	Pinna	Pinna	Pinna	Pinna	
Si se superponen	Pinna	Pinna	Pinna	Pinna	
Si se superponen	Pinna	Pinna	Pinna	Pinna	
Si se superponen	Pinna	Pinna	Pinna	Pinna	
Si se superponen	Pinna	Pinna	Pinna	Pinna	

Hermafrodita	Hermafrodita	Hermafrodita

Sexo	Nº Hoja	Basales Primarias	Basales secundarias	Basales terciarias	Indistinto	Definito	Indistinto	Definito	Abundante	Mediana	Poca	Abundante	Mediana	Poca	Ausente	Sin espinas	Con espinas

RESULTADOS

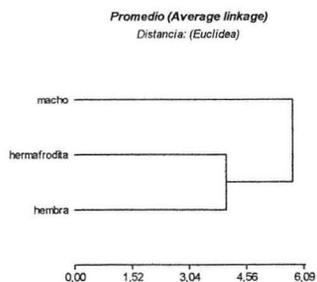
VARIABLES	e1	e2
Largo limbo (cm)	-0,3	-0,16
Ancho limbo (cm)	-0,29	0,16
Longitud peciolo (cm)	-0,25	-0,32
Altura Ondulación lámina	-0,31	0,06
Largo de la base (vena primaria).	-0,3	-0,13
Ancho en union de venas primarias	0,31	-0,05
Grosor relativo de venas secundarias	-0,31	-0,03
Nº venas basales secundarias	0,31	-0,07
Nº venas basales terciarias	-0,31	0,04
Forma ápice (Valor transformado)	0,3	-0,15
Altura inserción inflorescencia..	-0,06	0,52
Diámetro del tallo	0,31	0,03
Nº de nudos	-0,08	0,52
Longitud de nudo (cm)	-0,1	-0,51

RESULTADOS

Caracteres significativos en plantas adultas			
Sexo	Grosor relativo de venas 2º (mm)	Nº venas basales 2º de un solo lado (mm)	Forma del apice
hermafrodita	1,07 a	26,2 a	cuspidado b
hembra	1,17 ab	24,87 a	cuspidado b
macho	1,37 b	17,9 b	acuminado a

 Acuminado	 Cuspidado
---------------	---------------

RESULTADOS



Cruzamientos dirigidos asociados a caracterización morfológica

En Carica hay 3 genes involucrados en la expresión sexual
MM = machos; Mm1 ó Mm2 = hermafroditas; m1m2= hembra
m1m1 ó m2m2 = letales

Cuadro 3. Proporción de descendencia esperada de Vasconcellea de acuerdo a cruzamientos dirigidos. CR1) flor hembra de planta hembra, con flor macho de planta macho; CR2) flor hembra de planta hembra con flor macho de planta hermafrodita; CR3) flor hembra de planta hermafrodita con flor macho de planta macho CR4) flor hembra de planta hermafrodita con flor macho de planta hermafrodita.

CR	M	M	CR	M	m1	CR	M	M
m1	Mm1	Mm1	m1	Mm1	m1m1	M	MM	MM
m2	Mm2	Mm2	m2	Mm2	m1m2	m1	Mm1	Mm1

Todas hermafroditas 2/4 hermafroditas: ¼ hembra: ½ macho: ½ hermafrodita
1 letal

CR	M	m1
M	MM	Mm1
m1	Mm1	m1m1

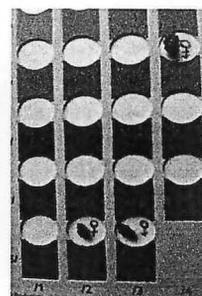
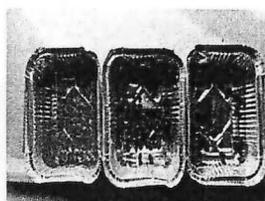
1/2 macho: 1/2 hermafrodita

CARACTERES

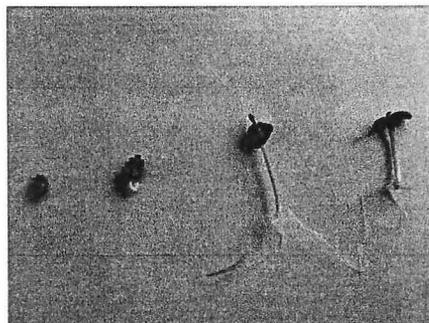
Carácter	Característica
N° de semillas	
Color	Amarillo Gris marrón claro marrón oscuro negro
Largo	
Ancho	
Radio largo/ancho	
Posición de la parte más ancha	
Cantidad de mucilago	



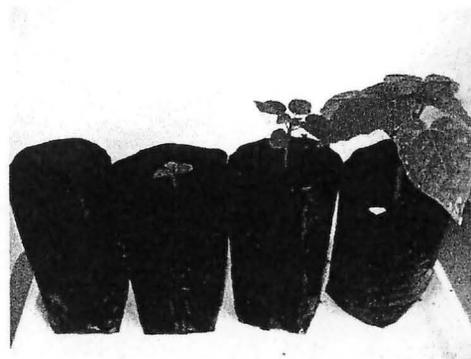
COLOR SEMILLAS



Evaluación de caracteres morfológicos en estado de plántulas



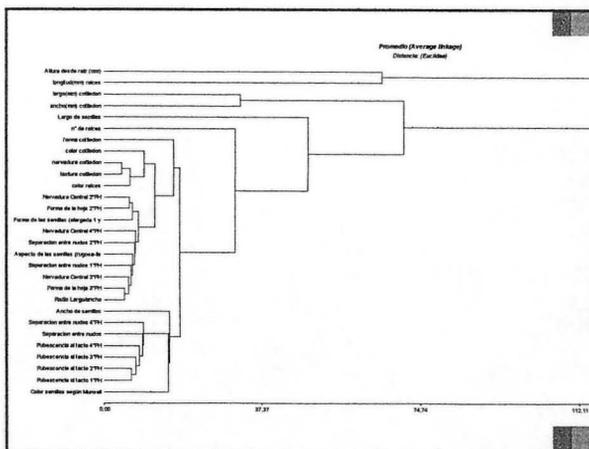
Evaluación de caracteres morfológicos en estado de plántulas



RESULTADOS

Caracteres con ds	Largo de las semillas	Textura	N° raíces	Longitud raíces	Ancho cotiledón (mm)	Largo cotiledón (mm)
CR1-2	6,39 a	rugosa	2,25 b	8,06 b	3,71 b	4,64 b
CR3-4	6,05 b	lisa	4,73 a	16,72 a	7,95 a	9,77 a

Caracteres con ds	Textura cotiledón	Tipo de nervadura cotiledón	Largo desde la raíz cotiledón	Separación entre nudos 1* PH	Separación entre nudos 2* PH	Color semillas		
CR1-2	lisa	b	Liso	6,56 b	1,36 b	1,61 b	C1	a
CR3-4	rugosa	a	Pronunciado	16,18 a	1,58 a	2,06 a	C2	b



RESULTADOS

	Forma		Apariencia		Color	
	Alargadas	Globosas	Rugosa/lisa	Rugosa	C1	C2
CR1	30,86	69,14	34,57	65,43	100,00	0,00
CR1	52,48	46,53	85,15	13,86	99,01	0,00
CR2	53,30	46,70	46,70	53,30	100,00	0,00
CR2	41,72	58,28	47,85	51,53	100,00	0,00
CR3	43,00	58,00	1,00	99,00	0,00	100,00
CR4	44,55	55,45	58,18	41,82	0,00	100,00
CR4	40,32	59,68	14,52	85,48	0,00	100,00

C1 = amarillo rojizo
C2= café muy oscuro

Propagación in vitro

Protocolo de germinación in vitro de semillas de *Vasconcellea pubescens*.

- Objetivo: Establecer un protocolo de germinación in vitro para la obtención de plantas de papaya a partir de semillas.

1-Desinfección de material vegetal:

Determinar tiempo y concentración de agente desinfectante en semillas de papaya

Tratamientos:

- T0 (testigo): Sólo alcohol al 70%, por 2 minutos, sin hipoclorito de sodio.
- T1: alcohol al 70% 2 minutos + Hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos
- T2: alcohol al 70% 2 minutos + hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos



- Condiciones de cultivo: En Cámara de crecimiento a 25 ± 1 °C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 3.000 lux de luminosidad.
- Evaluaciones: % de contaminación y sobrevivencia de semillas.

Resultados:

Tratamiento	%Contaminación 30 días	%Sobrevivencia 20 días
T0 sin hipoclorito	0,1 a	0,9 a
T1 Hipoclorito de sodio 1% x 5 minutos.	0,2ab	0,8 ab
T2 hipoclorito de sodio 1% x10 minutos.	0,4b	0,6 b

Conclusión :

Mejor tratamiento que reduce contaminación a un 10% en establecimiento de semillas in vitro : Alcohol 70% x 2 minutos .

2. Germinación in vitro de semillas:

Determinar tipo y concentración de BAP y ANA en medio de cultivo MS que favorezca la germinación in vitro de semillas de papayo.

- Se establecieron 7 tratamientos más un control y se evaluo resultados a los 30 días.

Tratamiento (mg/l)	%Germinación 30 días
T0 (0ANA-0BAP)	0,6 cde
T1(0ANA-0,1BAP)	0,3bcd
T2(0ANA-0,2BAP)	0,65cde
T3(0,1ANA-0BAP)	0,45bc
T4(0,1ANA-0,1BAP)	0,75de
T5(0,1ANA-0,2BAP)	0,75de
T6(0,2ANA-0BAP)	0a
T7(0,2ANA-0,1BAP)	0,3b
T8(0,2ANA-0,2BAP)	0,3c
Cv	15,42



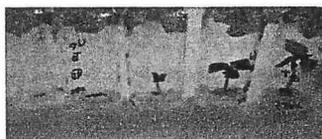
Conclusión:

- A pesar que en tabla no aparecen diferencias significativas entre tratamientos con altos porcentajes, también se evaluó otros parámetros como uniformidad de las plantas en el tratamiento, resultados en informe 2 .
- Mejor tratamiento el que incorpora al medio de cultivo 0,1 mg/l de BAP y ANA
- Porcentaje: 70% -80% de germinación.
- Tiempo de germinación :7º al 20º día.
- Tiempo de elongación y enraizamiento: 30 día (primer par de hojas).



Resumen final Protocolo de Germinación in vitro

1. Material vegetal: Semillas de fruto maduro de papayo, si mucilago lavadas con agua y detergente, hidratadas por 15 horas.
2. Medio de cultivo: Murashige y Skoog 100%,+ sacarosa 30 g/l+pH 5,7+6,5 g/l agar.
3. Desinfección: en cámara de flujo laminar inmersión en alcohol al 70% por 2 minutos y enjuague agua destilada.
4. Establecimiento: Retiro de la testa .
5. Condición de cultivo: 30 días camara de crecimiento a 23 a 25°C, fotoperiodo 16 hora luz y 3000 lux.



Determinación de un Protocolo de propagación in vitro de Papayo con material vegetal de sexo conocido.

Objetivo: Desarrollar un protocolo de propagación in vitro de plantas de papayos a partir de yemas de plantas adultas de sexo conocido.

1. Desinfección : Determinar agente y tiempo de desinfección sobrevida de explantes.



- Material vegetal: Brotes axilares sobre 2 cm de planta adulta de sexo conocido.
- Medio de cultivo: MS 100% + sacarosa 0,3%+ pH5,7+ agar 6,5 gr/l +0,1mmg/l BAP y ANA.
- Condiciones de cultivo: 23 a 25C, 16 horas de luz, y 3000 lux.
- Evaluaciones cada 10 días por un mes.



•Inicialmente se realizo un total de 13 ensayos , probando diferentes concentraciones, productos de desinfección y material vegetal de épocas diferentes de colecta (otoño y primavera).

Iniciantes	Tratamiento	Descripción	porcentaje %	
			contaminación	sobrevivencia
primavera	T0	alcohol al 70% por 1 minuto	100	0
invierno	T1	peróxido de hidrógeno al 3% por 10 minutos	80	6,96
invierno	T2	peróxido de hidrógeno al 3% y 10 minutos	80	0
invierno	T3	peróxido de hidrógeno al 3% y 10 minutos	75	0
invierno	T4	peróxido de hidrógeno al 3% y 10 minutos	100	0
invierno	T5	peróxido de hidrógeno al 3% y 10 minutos	88,88	0
primavera	T6	alcohol 70% a 1 minuto y peróxido de sodio al 1% a 10 minutos	75	0
primavera	T8	alcohol 70% a 1 minuto y peróxido de sodio al 1% a 10 minutos	80	0
primavera	T9	alcohol al 70% por 1 minuto + hipoclorito de sodio al 1% a 10 minutos	0	90
primavera	T10	peróxido de hidrógeno al 3% y 10 minutos	40	0
primavera	T11	peróxido de hidrógeno al 3% y 10 minutos	10	30
primavera	T12	peróxido de hidrógeno al 3% y 10 minutos	10	30
primavera	T13	peróxido de hidrógeno al 3% y 10 minutos	40	30

Se integro un nuevo tratamiento considerando los tratamientos con mejores resultados de desinfección y sobrevida y se aplico a material de sexo conocido colectado en verano.

Resultados :

Epoca de colecta	% de contaminación a 20 días	% de sobrevivencia a 20 días
Invierno	80	20
Primavera	40	60
Verano	9,38	90,62

Conclusión:

Mejor tratamiento: Captam (1g/L) + povidona yodada X 10 minutos + alcohol 70% (1 minuto)+ Hipoclorito de sodio 1% (10 minutos)

Desinfección 90% , con material vegetal de verano .



3) Multiplicación:

• **Antecedentes para Carica y otras especies**, que utilizan entre 0,1 a 1mg/l de Bencil amino purina (BAP) en combinación con otros reguladores, con tasas de multiplicación entre 4 a 9 brotes por explante (Olivera 2009), y considerando pruebas preliminares en vasconcella obteniendo de 5 a 14 brotes por explante.

• Se realizaron tres pruebas de validación de resultados por separado .

• **Medio de cultivo 100%** con 30 gr de sacarosa a pH 5,7 y 6,5 gr de agar, se aplico de 1mg/l de BAP.

• Se establecieron en forma individual cada uno de estos brotes en el medio de cultivo, se incubaron por 50 días en condiciones de 25°C, con fotoperiodo de 16 horas de luz y 3000 lux de luminosidad.

• Se realizaron evaluaciones cada 10 días hasta el día 50 para determinar el periodo óptimo de brotación. Se evaluó número de explantes brotados por cada prueba y número de brotes por explantes. Se realizaron 17 repeticiones por ensayo.

• Resultados:

resultados pruebas de validación multiplicación papayos con 1mg/l de BAP

Pruebas	% explantes brotados	Número	promedio de brotes por explantes
1 (evaluación 30 días)	75	5	
2 (evaluación 50 días)	100	15	
3 (evaluación 50 días)	93,75	12	

• Primeros brotes a partir de la tercera semana.

• A los 30 días con un promedio de 4 brotes por explantes , brotes laterales muy pequeños para establecimiento en medio de crecimiento.

• A los 50 días un 90 a 100 % de brotación, hay incremento en la longitud del brote principal y desarrollo brotes laterales y basales. La tasa de multiplicación de los 7 a 20 brotes por explante, con longitudes entre 3 a 8mm.



• Conclusión:

• Traspaso de brotes desde 2 cm longitud con desarrollo de callo basal.

• Medio de cultivo MS 100% mismas condiciones de sacarosa, agar, pH + 1ppm de BAP.

• 30 a 40 días de cultivo

• Porcentaje de brotación: 60 a 100%

• Tasa de multiplicación 7 a 15 brotes por explante.

• Longitud de brotes 8 mm promedio.

2) Crecimiento de brotes :

• Traspaso a medio MS 100% sin hormonas cada 10 días, eliminando material seca o proliferación de callo.

• Duración (30 a 40 Días) para pasar a multiplicación o enraizamiento.

• Pérdida por vitrificación y otros (contaminación) de 10 a 30% de los brotes.

4) Elongación de brotes:

• Se realizaron pruebas con brotes obtenidos de multiplicación en 3 medios de cultivo:

Tratamientos elongación de brotes	Incremento promedio longitud de brotes mm.
T0 control	3,25 a
T1 0,5mg/l BAP+0,5mg/l ANA	3,69 a
T2 0,5mg/l BAP+0,5mg/l ANA+AG3	4,69 a
PnF	0,465
C.V. (%)	85,78%

*Sin diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, se considero T0 como medio apropiado para elongación o crecimiento ya que los explantes no desarrollan formación excesiva de tejido calloso que dificulta la formación de hojas .

Protocolo:



• Establecimiento en medio MS sin hormonas.

• Repique o cambio de medio cada 10 días hasta obtener brote sobre 2,5 cm con desarrollo callo basal para traspaso a multiplicación o enraizamiento.

5) Enraizamiento:

- Se establecieron 2 tratamientos iniciales traspasando brotes de 2cm de longitud con callo basal en medio MS 50% manteniendo condiciones de sacarosa 3% ,pH 5,7, agar . Se realizaron evaluaciones a 20 30 40 y 50 días.

Resultados

Tratamiento	Nº Brotes	Nº Brotes enraizados a 30 días
T1 MS 50% + AIB 0ppm	17	0
T2 MS 50% + AIB 2ppm	17	29,41



- La formación y aparición de raíces fue entre los 25 a 30 días.
- Pasado el tiempo de evaluación aparecieron nuevos brotes enraizados pero en desventaja de la parte aérea.

Resultados preliminares otros tratamientos:

Tratamiento	Nº Brotes	Nº Brotes enraizados a 30 días
T1 MS 50% + AIB 0ppm	19	5,26
T2 MS 50% + AIB 2ppm	19	10%



Conclusión:

- El enraizamiento en brotes de vasconcellea en condición in vitro es bastante lento, a pesar de que el enraizamiento a partir de semilla no presenta mayor dificultad ya que no necesita estímulo hormonal adicional , en material adulto presenta dificultad, por lo que hay que continuar estableciendo pruebas de ajuste hormonal el medio de cultivo.

Resumen Protocolo de propagación in vitro a partir de yemas (material adulto)

- Material vegetal: Brotes laterales de papayos adultos sanos sin presencia de contaminación o enfermedad aparente. (huerto o vivero)
- Medio de cultivo MS 100% de sales , sacarosa 30 g/l, pH5,7 y agar 6,0 g/l.
- Desinfección: Lavado previo brotes con detergente y agua corriente , cepillando con ayuda de hisopo, y varios enjuagues con agua destilada. Sumergir en solución de Captan 1 g/l + 10 gotas povidona yodada+ inmersión en alcohol x 1 minuto +inmersión en hipoclorito de sodio al 1% x 10 minutos. Enjuagar + 3 veces en agua destilada estéril.
- Establecimiento en medio de cultivo MS 100% , sacarosa 30 g/l, pH5,7 y agar 6,0 g/l.+ 0,1 mg/l BAP + 0,1mg/l ANA. Retirando estos de corteza, dejando 1 o 2 pares de primordios foliares u hojas.
- A partir del 10º día Repique y traspaso a medio MS sin hormonas, cada 10 días hasta que el brote alcance 2 cm para traspaso a multiplicación o enraizamiento.

- Multiplicación : Traspaso de brotes de 2 cm y con callo basal a medio MS + 100% con 1ppm de Bap por 40 a 50 días en iguales condiciones de cultivo en cámara de crecimiento.
- Traspaso de a medio de crecimiento MS sin hormonas con repiques cada 10 días hasta alcanzar tamaño para nuevo ciclo de multiplicación o pasar a enraizamiento.

6) Traspaso a suelo y aclimatación a condiciones ambientales.

Pruebas preliminares con plantas de papayo obtenida a partir de semilla:

- Lavado de raíces con agua corriente retirando restos de agar.
- Establecimiento en bolsas individuales de 15X12cm con turba esterilizada y fertilizada.
- En bandejas selladas con film plástico en invernadero en ambiente controlado a 20°C y 12 a 14 horas de luz.
- A partir del 10° día se va perforando el film cada 5 días, hasta observar un endurecimiento en las hojas, con aspecto firme, sin deshidratación, indicadores que las plantas están listas para mantenerse en condición de vivero.
- 70 a 100% de plantas aclimatadas.

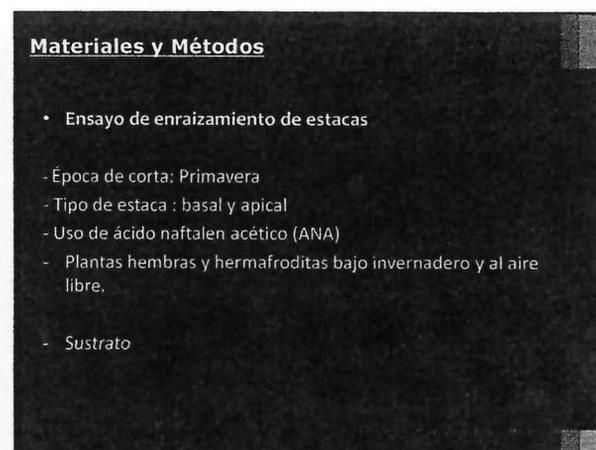
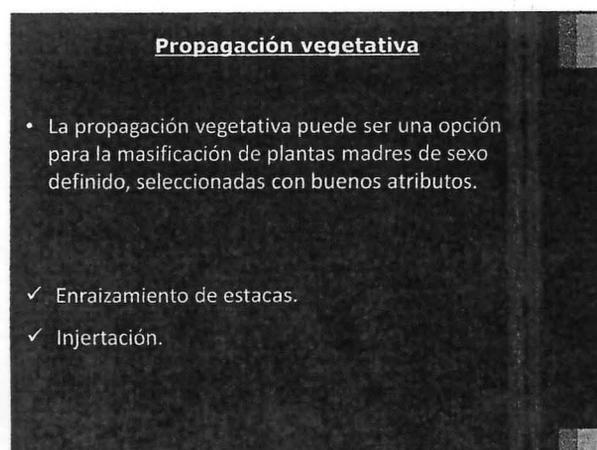
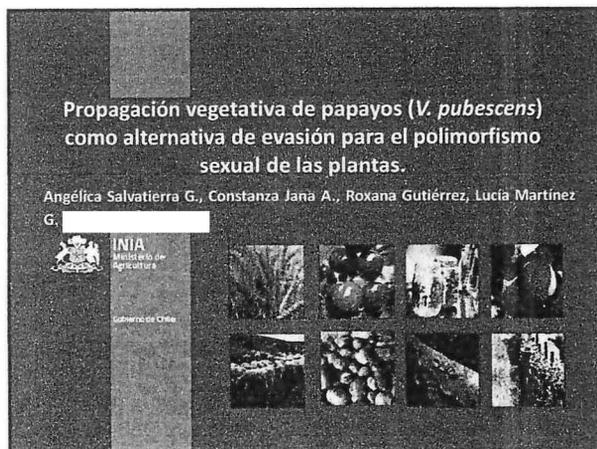
Microinjertación: (antecedentes.)

- Pruebas preliminares de material obtenido de multiplicación de papayos de material sin sexo conocido.
- Porta injerto : plántulas de papayo germinadas in vitro a las que se corta parte aérea desde el epicotilo
- Injerto: Brotes de papayo de 10 mm de longitud y 5 a 7 mm de diámetro.
- Injerto de hendidura.



Resultados:

- De 21 microinjertos realizados, 85,71 % brotaron en 30 días.
- De 18 injertos sometidos pruebas de enraizamiento. El 75 % enraizó en medio MS con 1 ppm de ácido indol butírico (AIB) a los 35 días de cultivo.
- De 6 injertos enraizados en aclimatación el 16 % adaptó a nuevas condiciones.



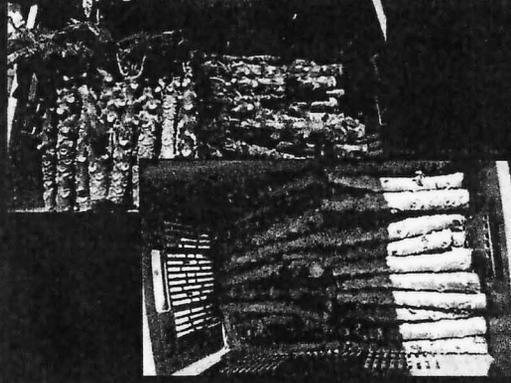
Materiales y Métodos

• Injertación

- Injertos: montura, cuña e hendidura, aproximación y empalme inglés.
- Época: Octubre
- Patrón: plantas propagadas de semillas, de aproximadamente 20 cm de altura.
- A 3 meses de injerto, se tomaron muestras de unión injerto y se hicieron cortes histológicos en dicha zona.
- Fijación Parafina, tinción toluideno 0.05 % en agua, observaciones en microscopio de luz.

Resultados

Propagación enraizamiento de estacas



Enraizamiento (%) de plantas hermafroditas (estacas colectadas en primavera)

Tipo de estaca	Condición	
	Aire libre	Invernadero
	Enraizamiento (%)	
apical	18.75b	21.85b
basal	84.37a	75 a
Hormona¹		
Con	37.5 b	34.37b
Sin	65.62a	62.47a
CV (%)	47	46

¹ Acción 1: metilalcapilol: 0.4%
Letras distintas entre filas indican diferencias

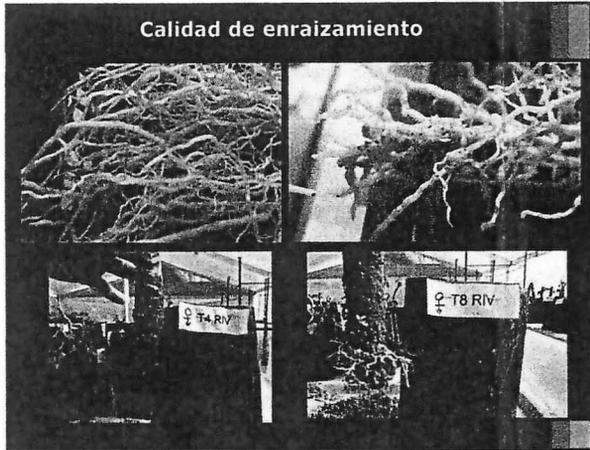
Estaca basal sin hormona al aire libre o invernadero

Enraizamiento (%) de plantas hembras

Tipo de estaca	Aire libre		Invernadero	
	Con Hormona	Sin hormona	Con Hormona	Sin hormona
apical	0 bB	37.5 A	0 bB	62.5bA
basal	62.5aA	56.2 A	68.75aB	87.5aA
CV(%)	52.2		13.0	

Letras distintas entre filas y en cursivas entre columnas

Estaca Basal sin hormona bajo condiciones de invernadero



Enraizamiento de estacas de plantas hembras bajo condiciones de aire libre e invernadero.

Tipo de estaca	Invernadero	Aire libre
apical	21.9 b	31.25 b
basal	81.2 a	71.8 a
Hormona		
Con hormona	34.4 b	40.6
Sin hormona	68.8 a	62.5
CV (%)	12.6	15.25

Calidad de enraizamiento de estacas de plantas hembras

	Apical	Basal
Invernadero		
Con hormona	0.18 b	2.18 b
Sin hormona	1.18 a	3.56 a
Aire Libre		
Con hormona	0.06 b	0.5 b
Sin hormona	1.5 a	1.37 a
Invernadero	Con hormona	Sin hormona
Apical	0.18 b	1.18 b
Basal	2.18 a	3.56 a
Aire Libre		
Apical	0.06 b	0.5 b
Basal	1.5 a	1.37 a

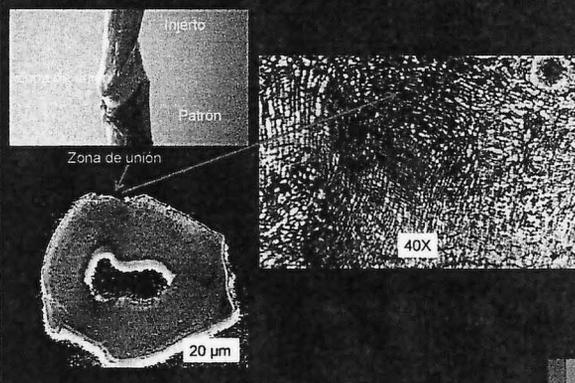


Porcentaje de prendimiento de injertos en plantas propagadas por semillas (3 meses después)

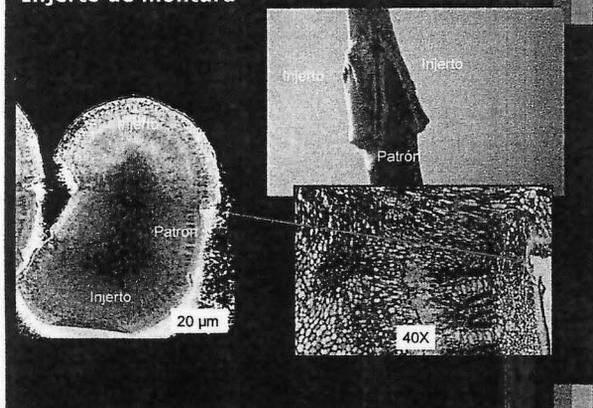
Tratamientos	Rango prendimiento de repeticiones (%)	Porcentaje de prendimiento (%)
Aproximación	25-100	62.5a
Montura	25-75	43.7a
Cuña o hendidura	50-75	68.7a
Lengüeta	25-75	43.7a

Valores de porcentaje transformados a χ^2 - 1 test de Duncan $p < 0.05$ N= 16 plantas por repetición

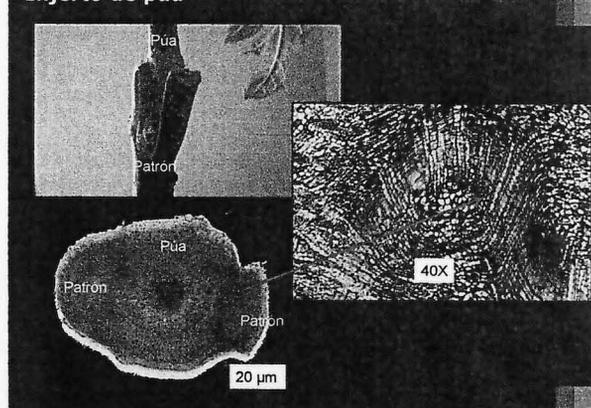
Injerto aproximación

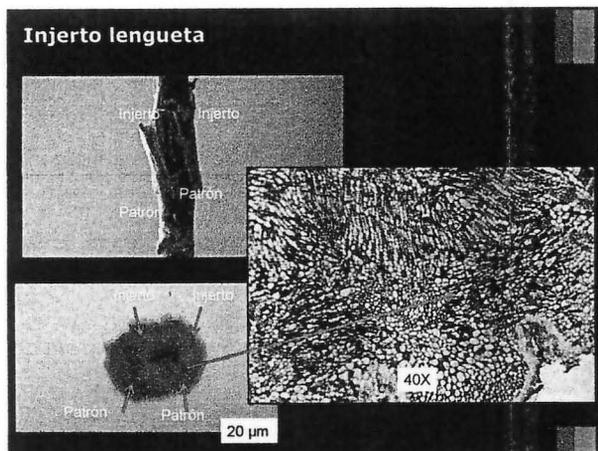


Injerto de montura



Injerto de púa





	Tipo de Injerto			
	Aproximación	Montura	Hendidura	Empalme Inglés
Normales	23	18	19	20
sin injerto	-	3	2	1
Patrón Muerto	-	2	3	3
Injerto Necrosado	1	1	-	-
% prendimiento	95,83	75	79,17	83,33

Conclusiones

- La propagación de estacas y la injertación son posibles de aplicar, pero se debe establecer un protocolo para la obtención y mantención de plantas madres, así como también determinar los factores que influyen en la calidad de raíces.
- El comportamiento de las plantas en campo originadas a partir de estacas enraizadas como las plantas injertadas debe ser evaluado.

Gracias

Obtención de plantas de *V. pubescens* con sexo definido mediante un protocolo de detección temprana del polimorfismo sexual y perfeccionamiento de la propagación agámica.

PYT-2011-0060, FIA.

Gobierno de Chile
www.gob.cl

**REUNIÓN ASOCIADOS
PROYECTO PAPAYOS**

INIA INTIHUASI

La Serena, 29 de Agosto de 2012

N°	NOMBRE	INSTITUCION	FIRMA
1	DANIELA CANESSA	VIVERO LINNETTE	
2	Pablo CANESSA	VIVERO Linnette	
3	Bernadita Leal de	Ag. El Roble Ude	
4	Carlos COTRONEO	Ag. El Roble	
5	Élicio Moraga	Vivero El Bosque	
6	Julius Pizarro	Ag. El Roble	
7	MARINO Ruiz	AGRO SATURNO	
8	Bárbara Guzmán	INIA	
9	Lecho Herrera	PHD	
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			



LISTA DE ASISTENCIA

SEMINARIO FINAL ACTUALIZACIÓN DE ANTECEDENTES AGRONÓMICOS, PROYECTO "OBTENCIÓN DE PLANTAS DE PAPAYOS (*VASCONCELLEA PUBESCENS*) USANDO TÉCNICAS DE PROPAGACIÓN".

FECHA

11	12	2013
----	----	------

 LUGAR

SALÓN CHAÑAR, EDIFICIO MARÍA ELENA, LA SERENA.
--

ALMUERZO SI/NO	Nº	NOMBRE	INSTITUCIÓN EMPRESA	E-MAIL	TELEFONO	FIRMA
SI	1	RENE MARTORELL	FIA			
SI	2	Rodrigo Quij	Agrícola San Carlos Italo			
NO	3	Emilio V. F. J.	TARAPACA			
SI	4	Raúl Riboll	AGRICOLA LONCHAS			
SI	5	Francisco Meza	INIA			
NO	6	Diego Lastarria E.	SAG			
SI	7	Luis Morales Q.	UNIVERSIDAD DE TALEA			



LISTA DE ASISTENCIA

SEMINARIO FINAL ACTUALIZACIÓN DE ANTECEDENTES AGRONÓMICOS, PROYECTO "OBTENCIÓN DE PLANTAS DE PAPAYOS (*VASCONCELLEA PUBESCENS*) USANDO TÉCNICAS DE PROPAGACIÓN".

FECHA

11 12 2013

LUGAR

SALÓN CHAÑAR, EDIFICIO MARÍA ELENA, LA SERENA.

ALMUERZO SI/NO	Nº	NOMBRE	INSTITUCIÓN EMPRESA	E-MAIL	TELEFONO	FIRMA
Si	8	Claudia Barrios O	Sec Agrícola H. Hda			
Si	9	Rosana Taboada	INIA			
NO	10	Égualdo Urbina	Hda. Huérfanos			
SI	11	Constanza Jara	INIA			
SI	12	ANDRES FRANCE	INIA QUILAMAPU			
Si	13	Jorge Díaz L.	Consorcio RUTKE			
NO	14	Alfonso Quiroga	INIA			



LISTA DE ASISTENCIA

SEMINARIO FINAL ACTUALIZACIÓN DE ANTECEDENTES AGRONÓMICOS, PROYECTO "OBTENCIÓN DE PLANTAS DE PAPAYOS (*VASCONCELLEA PUBESCENS*) USANDO TÉCNICAS DE PROPAGACIÓN".

FECHA

11 12 2013

LUGAR

SALÓN CHAÑAR, EDIFICIO MARÍA ELENA, LA SERENA.

ALMUERZO SI/NO	Nº	NOMBRE	INSTITUCIÓN EMPRESA	E-MAIL	TELEFONO	FIRMA
SI	15	ANDRÉS ZURITA	INIA			
SV	16	Catalina Sierra B	Aseador			
SV	17	Elicio Moraga	Caminos del Sol			
NO	18	Harold Pardo	Seminio de Agricultores			
NO	19	Karenna Palto	Asociación de Agricultores			
NO	20	Daniela Novembuena	Seminio de Agricultores			
SI	21	Pietro CARRERA F	Director Técnico			



LISTA DE ASISTENCIA

SEMINARIO FINAL ACTUALIZACIÓN DE ANTECEDENTES AGRONÓMICOS, PROYECTO "OBTENCIÓN DE PLANTAS DE PAPAYOS (*VASCONCELLEA PUBESCENS*) USANDO TÉCNICAS DE PROPAGACIÓN".

FECHA

11	12	2013
----	----	------

 LUGAR

SALÓN CHAÑAR, EDIFICIO MARÍA ELENA, LA SERENA.
--

ALMUERZO SI/NO	Nº	NOMBRE	INSTITUCIÓN EMPRESA	E-MAIL	TELEFONO	FIRMA
NO	22	NICHOLAS MARTIN	TAMAYA GOURMET SA			
SI	23	Franco Jimenez	CONFO			
NO	24	Osvaldo Zebora				
SI	25	CARLOS COTRONEO	GUALLAMAUCO			
NO	26	Roberto Parón	INDAP			
SI	27	Herman Carlos Zandona				
SI	28	Herman Carlos Zandona				



LISTA DE ASISTENCIA

SEMINARIO FINAL ACTUALIZACIÓN DE ANTECEDENTES AGRONÓMICOS, PROYECTO "OBTENCIÓN DE PLANTAS DE PAPAYOS (*VASCONCELLEA PUBESCENS*) USANDO TÉCNICAS DE PROPAGACIÓN".

FECHA

11	12	2013
----	----	------

LUGAR

SALÓN CHAÑAR, EDIFICIO MARÍA ELENA, LA SERENA.
--

ALMUERZO SI/NO	Nº	NOMBRE	INSTITUCIÓN EMPRESA	E-MAIL	TELEFONO	FIRMA
SI	29	Carlos Jara	U. de La Serena			
No	30	Patricio Guzmán	Proensa			
SI	31	Pedro Henríquez P	consultora PAP.			
SI	32	PAMELA ROSAS	Practicante U. SANTIAGO			

V. ANEXOS

Como fue indicado para los informes de avance técnico, pero en este caso la información no corresponde sólo a la actualización sino a la histórica. Por ejemplo, cambios en el equipo técnico, se debe adjuntar la ficha de todos los participantes que participaron en alguna de las etapas del proyecto aunque hayan sido reemplazados.

- I. Informe caracterización molecular CEAZA. Sr. Andrés Zurita
- II. Protocolos y métodos utilizados in vitro
- III. Informe Asesoría en multiplicación in vitro. Sr. Julio Olivera
- IV. Informe Técnico- económico del cultivo del papayo
- V. Estudio de causas de disminución de superficie de papayos



Informe final: Evaluación de Marcadores moleculares para la determinación del sexo en plantas de papaya (*Vasconcellea pubescens*).

1. Extracción ADN de papaya *Vasconcellea pubescens*

Como primera etapa, y con objeto de determinar una metodología de extracción de ADN que entregue resultados consistentes en tejidos de *Vasconcellea*, se probaron dos protocolos de extracción: la modificación del protocolo basado en CTAB de Rogers & Bendlich (1988) por Saalau-Rojas et al. (2009), y el de Doyle & Doyle (1990).

A continuación se describen los protocolos utilizados, con los resultados correspondientes:

1.1 Extracción ADN CTAB (Rogers & Bendlich, 1988)

El protocolo utilizado se describe a continuación:

- 1.- Macerar en mortero 1 cm² de tejido congelado en nitrógeno líquido.
- 2.- Agregar 300 uL de buffer de extracción CTAB.
- 3.- Incubar a 65°C por 30 minutos.
- 4.- Agregar 300 uL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y mezclar suavemente por inversión.
- 5.- Centrifugar a 12.000 rpm por 15 minutos.
- 6.- Transferir fase acuosa a nuevo tubo Eppendorf.
- 7.- Repetir paso 4, 5 y 6.
- 8.- A la fase acuosa recuperada, agregar 20 uL de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 300 uL de isopropanol frío, para precipitar el ADN.
- 9.- Dejar precipitar toda la noche a -20°C.
- 10.- Centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm y eliminar sobrenadante.
- 11.- Lavar el precipitado con 70 uL de etanol 70% frío y centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm. Repetir ese paso.
- 12.- Secar el precipitado final a RT (cámara de flujo laminar).
- 13.- Rehidratar con 40 uL de agua destilada-desionizada estéril.
- 14.- Preparar una dilución 1:10 en agua DD para su uso en PCR.

Buffer Extracción CTAB:

CTAB 2%

Tris HCl 0,2M

EDTA 0,05M

NaCl 2M

Para ensayar el protocolo se utilizaron hojas nuevas de papaya provenientes de plantas de distinto sexo de la localidad de Altovalsol, las cuales se encontraban almacenadas a -80°C . Se determinaron 6 muestras, de acuerdo al material entregado por INIA:

Mh1 y Mh2: Hermafroditas.

M1 y M2: Machos

m1 y m2: Hembras

Las concentraciones de ADN obtenidas en el espectrofotómetro (Nanodrop) fueron las siguientes:

Cuadro 1. Concentraciones de ADN y relaciones de pureza de cada una de las muestras analizadas.

Muestra	ng/uL	268/280	260/230
Mh1	956.8	2.15	2.12
Mh2	1642.6	2.11	2.08
M1	1063.7	2.12	2.08
M2	183.1	2.04	2.11
m1	20.7	1.89	1.63
m2	290.4	2.05	2.05

Las variaciones en el rendimiento de ADN obtenido normalmente corresponden a la calidad de la molienda (debe quedar tejido completamente molido sin presentar tejido verde visible, solamente polvo), y a variaciones en la madurez del tejido, recomendándose utilizar el tejido más joven posible (yemas u hojas en expansión).

Se verificó la pureza de las muestras mediante un gel de agarosa al 0.8%.

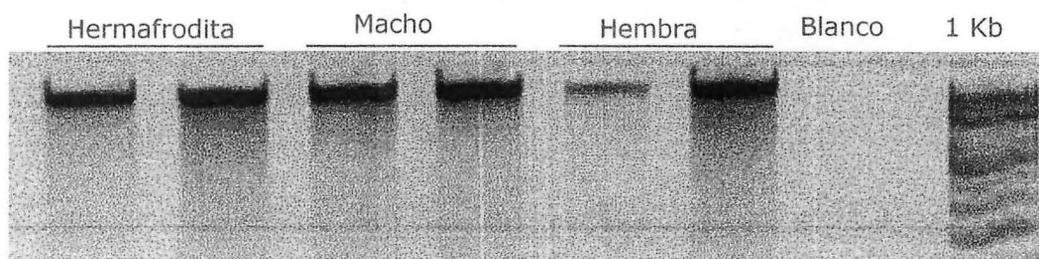


Figura 1. Gel Agarosa al 0.8% de muestras de ADN extraídas de papaya.

Se puede observar las bandas resueltas por electroforesis en gel de agarosa, correspondientes a ADN, en donde se cargaron 500 ng salvo en la muestra m1 debido a que la concentración obtenida fue mucho menor que en el resto de las muestras, por lo que se logró cargar solamente 100 ng. Opcionalmente las muestras pueden ser tratadas con 1-2 uL de RNAsa, y ser incubadas a 37°C durante 30 minutos, para eliminar el RNA que pudiera quedar en la muestra.

1.2 Extracción ADN método Doyle & Doyle (1990)

- 1.- Moler 0.1 g de tejido en mortero usando nitrógeno líquido.
 - 2.- Agregar 1mL de buffer de extracción, pre-calentado a 60°C y 10mg de PVP y homogenizar con el pistilo.
 - 3.- Transferir el homogenizado a un tubo Eppendorf e incubar a 60°C por una hora.
 - 4.- Dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar 1ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente.
 - 5.- Centrifugar 15 minutos a 14000rpm.
 - 6.- Transferir sobrenadante a un nuevo tubo y repetir pasos 4 y 5.
 - 7.- Al sobrenadante recuperado agregar 0.5 volúmenes de NaCl 5M y 2 volúmenes de isopropanol frío (-20°C).
 - 8.- Dejar precipitar toda la noche a -20°C.
 - 9.- Centrifugar 5 minutos a 8000 rpm y 5 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente.
 - 10.- Eliminar sobrenadante.
 - 11.- Lavar el pellet con etanol 70% frío y centrifugar 5 minutos a 13000 rpm. Repetir este paso.
 - 12.- Secar el precipitado a RT (cámara de flujo laminar).
 - 13.- Rehidratar en 50-70 uL de agua destilada-desionizada estéril.
- * Si es necesario después de verificar la pureza en gel de agarosa (0.8%) tratar con RNAsa durante 15-30 minutos a 37°C.

Buffer Extracción

EDTA 0.5M
NaCl 5M
Tris-HCl 1M
0.2% β -mercaptoetanol.

Para ensayar este protocolo se utilizaron hojas nuevas de 4 plantas distintas provenientes de los invernaderos de CEAZA, se denominó a cada muestra como P1, P2, P3 y P4.

Cuadro 2. Concentraciones obtenidas en espectrofotómetro (Nanodrop) en las diversas muestras.

MUESTRA	ng/uL	260/280	260/230
P1	84.7	2.06	2.15
P2	200.2	2.12	2.17
P3	221.1	2.14	2.25
P4	130.7	2.15	2.25

Se verificó la pureza del ADN en un gel de agarosa al 0.8%. Se cargaron 500 ng de ADN.

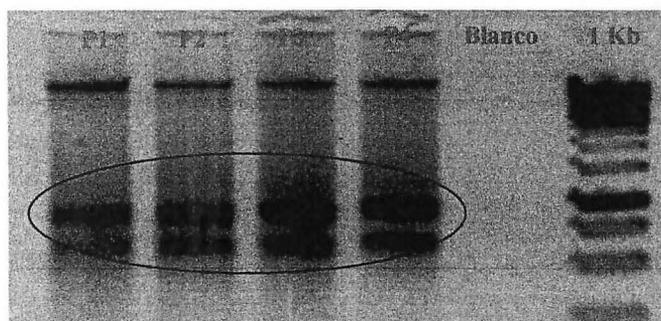


Figura 2. Muestras de ADN extraídas desde tejido de plantas de papaya, resueltas en gel de Agarosa 0.8%.

Se observa la banda simple que corresponde a ADN, pero también se pudo apreciar la presencia de una doble banda que corresponde a las subunidades del ARN ribosomal, por lo que fue necesario tratar las muestras con RNAsa.

A continuación se muestra el gel de agarosa de las muestras ya tratadas con RNAsa.

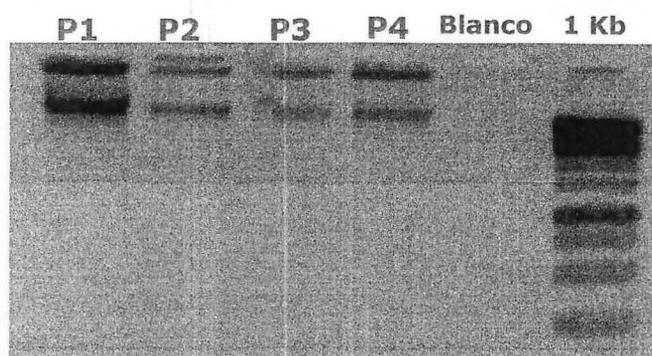


Figura 3. Muestras de ADN extraídas desde tejido de plantas de papaya, resueltas en gel de Agarosa 0.8%, posterior al tratamiento con RNAsa.

Las bandas de ARN fueron eliminadas con el tratamiento de acuerdo a lo esperado, no obstante se observó que la concentración de ADN disminuyó, cuyas bandas se observan más tenues con respecto al gel anterior.

De acuerdo a los resultados obtenidos, y considerando factores como cantidad de tejido, tiempo de implementación y eficiencia, el protocolo de extracción con mejor resultado para obtener ADN, fue el protocolo basado en buffer CTAB (Rogers & Bendlich, 1988), ya que con cantidades pequeñas de hojas (1 cm²) se pudo obtener concentraciones desde 200 ng/uL, el tiempo total de protocolo fue de dos días máximo (ya que se debe precipitar con isopropanol durante la noche), y la calidad de la extracción del ADN fue de mayor pureza, no siendo necesario tratar con RNAsa aunque este paso sea optativo. Posteriormente se realizó una extracción de ADN con el método de CTAB utilizando hojas de plantas sexadas provenientes de Altovalsol. A continuación se muestran los resultados de extracción y gel de agarosa.

Cuadro 3. Concentración de ADN y relaciones de pureza medidas en el Nanodrop de cada una de las muestras analizadas.

MUESTRA	ng/uL	260/280	260/230
M1	139	1.90	1.30
M2	103	1.59	0.85
M3	180.6	1.91	1.60
M4	622.6	2.06	1.93
H1	240	1.84	1.36
H2	302.1	2.02	1.74
H3	254.4	2.01	1.79
H4	241.1	2.00	1.50
Mh1	540.2	1.91	1.63
Mh2	400.1	1.84	1.40
Mh3	255.3	2.02	1.69
Mh4	466.6	2.00	1.78

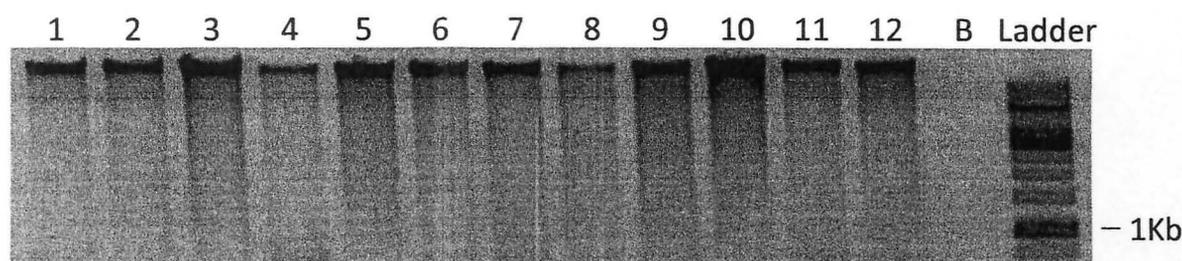


Figura 4. Muestras de ADN extraídas desde tejido de plantas de papaya de diferente sexo con buffer CTAB, resueltas en gel de Agarosa 0.8%. Se cargaron 500 ng de ADN. Carril 1 a 4 correspondientes a hojas macho M1 a M4. Carril 5 a 8 correspondientes a hojas hembra F1 a F4. Carril 9 a 12 correspondientes a hojas ambisexual Mh1 a Mh4. B: Blanco y Ladder marcador de peso molecular 1 Kb.

Se obtuvieron concentraciones de ADN variables sin un patrón dependiente del origen del tejido, lo que pudo deberse a molienda parcial o incompleta del tejido tratado, del estado de

desarrollo del mismo, y/o pérdidas que pudieron haber ocurrido durante el proceso de lavado y precipitado con etanol.

Finalmente, para determinar una cantidad mínima de tejido, lo cual resulta útil cuando se trata de muestras escasas o tejidos poco abundantes (por ejemplo trozos de embriones, meristemos, etc.), se realizó una extracción usando tres cantidades de tejido por triplicado: A1, A2 y A3 (0.03 g de hoja nueva); B1, B2 y B3 (0.06 g de hoja nueva); C1, C2 y C3 (0.1 g de hoja nueva).

Cuadro 4. Concentraciones de ADN obtenidas luego de la extracción con protocolo CTAB.

MUESTRA	ng/uL	260/280	260/230
A1	541.5	2.06	2.14
A2	875.2	2.08	2.02
A3	385.9	2.09	2.17
B1	555.5	2.01	2.00
B2	685	2.05	1.86
B3	178.2	1.95	1.55
C1	168.1	1.90	1.60
C2	583.9	1.92	1.79
C3	999.6	1.98	1.88

Si bien el promedio de concentración de ADN obtenido varió en relación al tejido procesado, y con la menor cantidad de tejido (0.06 g) se obtuvo menor concentración de ADN (470 ng/uL promedio vs 600 y 584 ng/uL), esta cantidad resulta suficiente para realizar reacciones de PCR, ya que las concentraciones medidas en espectrofotómetro son de 1 microlitro ($\mu\text{L} = 1 \times 10^{-6} \text{ L}$) y el pellet de ADN obtenido se resuspende en 20 μL . Asimismo, la variabilidad obtenida entre las distintas extracciones normalmente ocurre por una molienda insuficiente, no rompiéndose los tejidos de manera homogénea, y algunas pérdidas ocurridas en el desarrollo del protocolo. Cabe destacar que para una reacción de PCR se requiere una concentración menor a 10 ng de ADN, cantidad que se obtiene largamente con el protocolo utilizado. El nivel de detección de una reacción de PCR es del orden de los picogramos de ADN (un orden de magnitud menor al nanogramo).

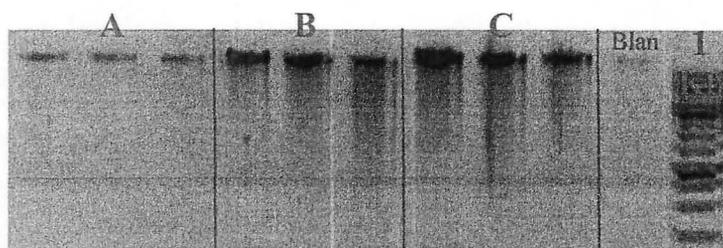


Figura 5. Muestras de ADN extraídas desde tejido de plantas de papayo, resueltas en gel de Agarosa 0.8%. Muestras A: 0.03 g de tejido, B: 0.06 g de tejido y C: 0.1 g de tejido.

En la Figura 5 se pudo observar que la cantidad de ADN fue variable con la cantidad de tejido, pero la calidad de éste cambió levemente. En las muestras A las bandas fueron más débiles pero no se observa ADN degradado ni con presencia de ARN, cosa que sí se puede observar de manera tenue en las muestras B y C, en las cuales si bien se ven bandas de ADN más definidas se podría realizar un paso adicional dentro del protocolo al incluir un tratamiento de las muestras con RNAsa.

Por tanto, se sugiere utilizar hasta 0.03 g de tejido nuevo para la extracción, sin disminuir de manera significativa la cantidad de ADN obtenido (cercano a 600 ng/uL) en relación a la cantidad mayor procesada.

En las siguientes extracciones se ha utilizado el protocolo de extracción de ADN basado en CTAB, dadas sus ventajas respecto a manejo, uso de reactivos de baja toxicidad, y facilidad de implementación en laboratorio. Algunas extracciones se presentan a continuación, tanto para muestras con sexo definido, como otras provenientes de cruzamientos dirigidos.

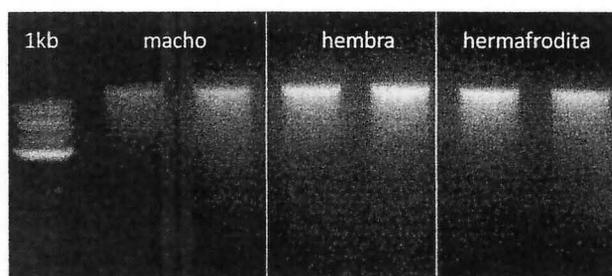


Figura 6. ADN genómico extraído de plantas macho, hembra y hermafrodita, se cargaron 500 ng del marcador de peso molecular en el carril 1, así como para cada uno de los ADN, y se observa en el gel el producto de la extracción de ADN óptimo y de alto peso molecular.



Figura 7. ADN genómico extraído de plantas provenientes de cruzamientos dirigidos, se cargaron 500 ng del marcador de peso molecular en el carril 1 Kb, así como para cada uno de los ADN, y se observa la obtención de ADN de alto peso molecular.

2. Diseño de marcadores moleculares determinantes del sexo en *Vasconcellea pubescens*.

Una vez definido un método de extracción de ADN con CTAB, y mediante el uso de secuencias públicas disponibles y revisión de literatura, se encontró información genómica en la especie *Carica papaya*, cuyo genoma se encuentra secuenciado y es de disponibilidad pública, lo cual permitió una estrategia de utilización de genes **ortólogos** en *Vasconcellea pubescens*, especie para la cual no existe información asociada a secuencias relacionadas con el sexo. Según el reporte de Liu et al. (2004) se determinó la ubicación del locus del sexo en *C. papaya*, como se presenta en el siguiente esquema.

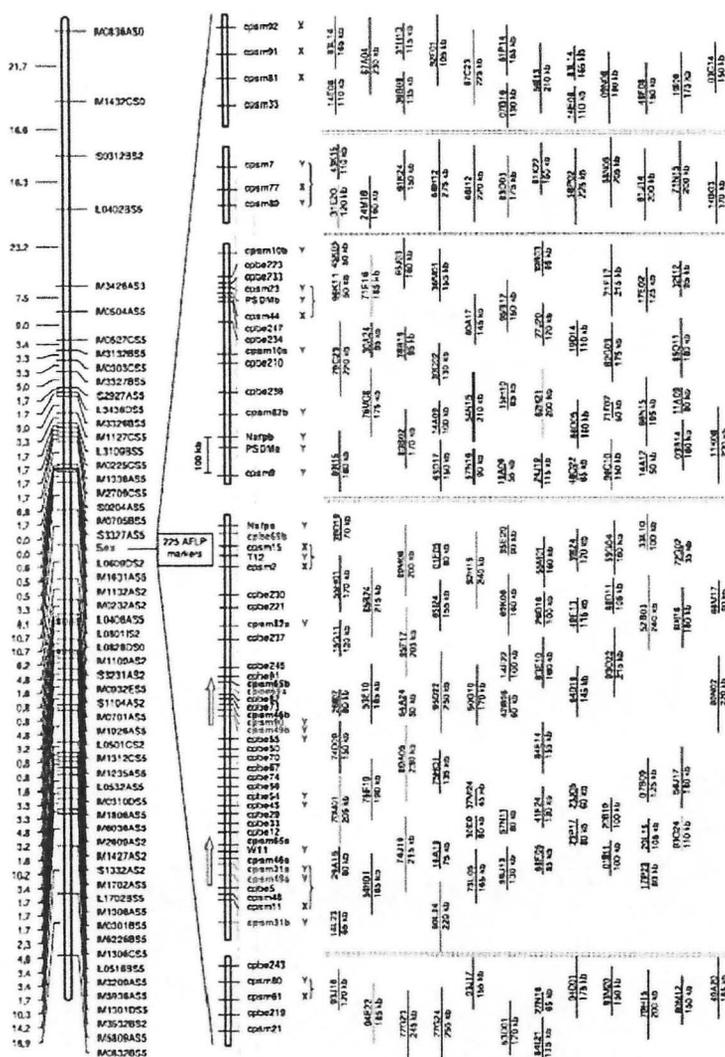


Figura 8. Mapas físico (BACs) y de AFLP en *C. papaya* en la región MSY (male-specific).

De acuerdo a la figura anterior, se seleccionó el marcador **cpsm7** por ser específico para la región MSY (male-specific), y del cual se pudo obtener la secuencia desde la base de datos pública del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), entregando dos secuencias, una

para macho (AY428884.1) y otra para hermafrodita (AY428883.1) que se describen a continuación:

gi|37992817|gb|AY428884.1| *Carica papaya* isolate cpm7-Male sex male chromosome Y male specific sequence:

```
TCACAGAGACAATGATACTCATAGCAATTGTCATCAAAGTTGAGAATGCAAGCACGCACATGTCTTCCAACATTT
AGATCGTATGTTCAAACCTACCATCTGTCTAGGGATGATAAGTAGTGCTGAAGCACAACTAGACCCTTGTGCTT
CTAGCAAGCTATCCATAAGTGAAAAGTGAATCGGGGATCATGGTAAGACACAATGGATGAGGGAACTCAATGA
AGTCGAATAATTTTCATCAACATATAGGCGAGTTA
```

>gi|37992816|gb|AY428883.1| *Carica papaya* isolate cpm7 sex hermaphrodite chromosome Y male specific sequence:

```
GAATTCACAGAGACAATGATACTCATAGCAATTGTCATCAAAGTTGAGAATGCAAGCACGCACATGTCTTCCAAC
ATTTAGATCGTATGTTCAAACCTACCATCTGTCTAGGGATGATAAGTAGTGCTGAAGCACAGCCTAGACCCTTGT
GCTTCTAGCAAGCTGTCCATAAGTGAAAAGTGAATCGGGGATCATGGTAAGACACAATGGATGAGGGAACTCA
ATGAAGTCGAATAATTTTCATCAACATATAGGCGAGTTAA
```

Se realizó una comparación basada en herramientas bioinformáticas, del tipo BLAST Align, para alinear estas dos secuencias usando BLAST (bl2seq), para determinar las diferencias de secuencias nucleotídicas específicas entre las secuencias correspondientes a macho y a hermafrodita. Para ello se ingresan las secuencias a comparar en dicho programa, y mediante algoritmos bioinformáticos se alinean y determinan las regiones con secuencias idénticas (y/o diferentes). Se encontraron 3 nucleótidos (pb) de diferencia al inicio de la secuencia, ya en el cuarto par de bases hubo alineamiento, a esta región se le realizó otro BLAST contra las bases de datos para verificar y encontrar en qué especies se encontraba presente (al menos en *Carica* e idealmente en alguna especie de *Vasconcellea*), y contenían las secuencias de los marcadores generados. El resultado esperado al usar esta información en un marcador diseñado es que si la secuencia alineaba y tenía las 3 pb iniciales idénticas se considerará hermafrodita. Si no tenía las 3 pb del inicio pero alinea con el resto de la secuencia se considera como macho y si no hay alineamiento se consideraría hembra.

Luego de realizar varias búsquedas y alineamientos se encontraron BAC's (Bacterial Artificial Chromosomes) correspondientes a *Carica papaya* en donde hizo alineamiento positivo (match) a la región macho, otra hembra y otra hermafrodita, respectivamente.

Macho: ID AC238627.1

Hembra: ID AC238768.1

Hermafrodita: ID AC238761.2

Dentro de la secuencia de cada uno de los BAC's indicados, se seleccionó un segmento de 1000 pb que contuviera la secuencia del marcador. Con estas 3 secuencias se hizo un alineamiento múltiple en la página del EBI (European Bioinformatics Institute) utilizando el software ClustalW2 para buscar un segmento en que sólo la secuencia de la hembra presentara alta homología de secuencias nucleotídicas. De este modo se llegó a la identificación de dos secuencias pequeñas que se encontraban en hembra y en hermafrodita y además se encontraban cerca del marcador:

TAGTTGT

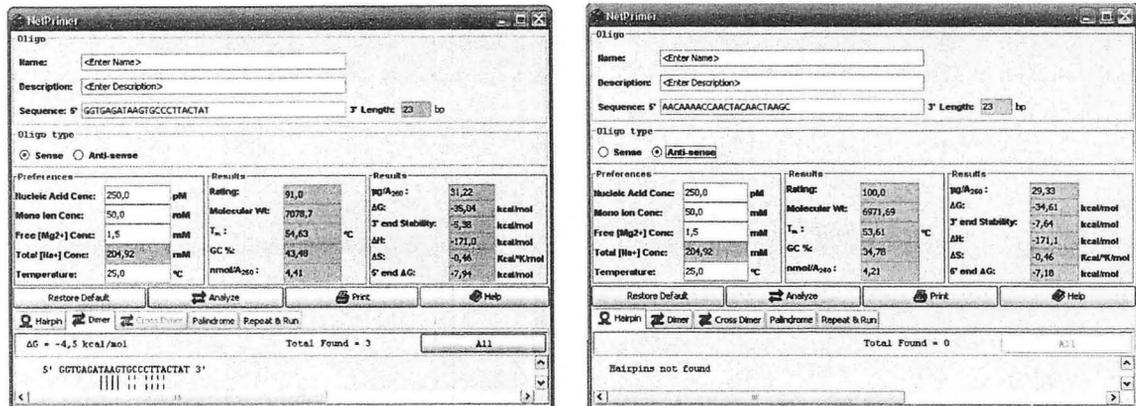
GAGATAAGTG

A cada una de estas secuencias se añadieron 5 nucleótidos (hacia adelante y hacia atrás) para aumentar su T_m (temperatura de fusión del ADN, en la cual las doble hebras de ADN se separan en solución en dos hebras completamente independientes), luego se obtuvo la secuencia complementaria y se invirtió dicha secuencia:

GGTGAGATAAGTGCCCTTACTAT → Forward

AACAAAACCAACTACAACCTAAGC → Reverse

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el programa Net Primer para determinar una eventual formación de dímeros, lo que impediría su uso, y parámetros tales como su T_m y T_a (temperatura de annealing o apareamiento entre secuencias complementarias):



Los marcadores para ambas secuencias, indican la ausencia de formación de dímeros (secuencia derecha), o formación de enlaces de hidrógeno muy débil (izquierda). Además se determinó el tamaño estimado del amplicón (producto de amplificación), el cual correspondería a un tamaño de 789 pares de bases (pb).

Una vez realizadas las reacciones de amplificación mediante termociclador en DNA de hojas provenientes de plantas adultas de sexo identificado, se obtuvieron los resultados siguientes que se presentan en la Figura 9. Dado que las plantas machos estaban dudosas, de hecho sólo una de ellas era macho, los resultados no fueron satisfactorios.

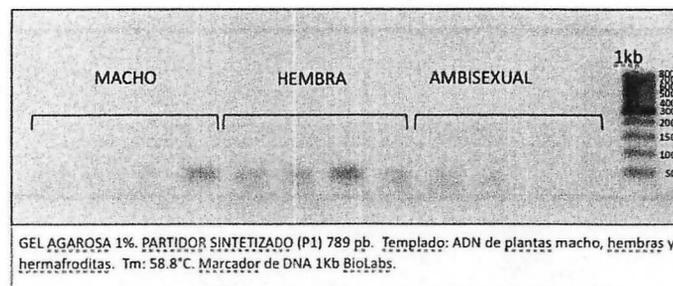


Figura 9. Amplificación del partidor P1, diseñado a partir de la región MSY (male-specific) de *Carica papaya*, sobre muestras de *Vasconcellea*. Se incluyen muestras hembras y hermafroditas, y muestras machos las cuales eran compuestas.

Como se observa en la Figura 9, la obtención de amplicones no fue positiva, y no estuvo asociada a un sexo en particular.

Un segundo marcador se obtuvo del Blast entre la secuencia masculina (258 pb) y hermafrodita (263 pb) del marcador **cpm7** descrito por Liu et al. (2004). Se buscó el sector más conservado de la secuencia, considerando 20 pb al inicio y 20 pb al final.

Forward: TCACAGAGACAATGATACTCATAG

Para el Reverse se buscó la cadena complementaria y luego se invirtió:

Secuencia Original: TGAAAAGTGAATCGGGGATC

Complementaria: ACTTTTCACTTAGCCCCTAG

Reversa: GATCCCGATTCACTTTTCA

Ambas secuencias fueron ingresadas al programa Net primer para determinar sus características de T_m y formación de dímeros, obteniéndose lo siguiente para un tamaño de amplicón esperado de 190 pb.

Forward

Parameter	Value	Unit	Parameter	Value	Unit	Parameter	Value	Unit
Sequence	TCACAGAGACAATGATACTCATAG		GC Content	50.0	%	GC Skew	0.0	
Length	20	bp	GC Skew	0.0		GC Skew	0.0	
GC Content	50.0	%	GC Skew	0.0		GC Skew	0.0	
GC Skew	0.0		GC Skew	0.0		GC Skew	0.0	
GC Skew	0.0		GC Skew	0.0		GC Skew	0.0	

Reverse

Parameter	Value	Unit	Parameter	Value	Unit	Parameter	Value	Unit
Sequence	GATCCCGATTCACTTTTCA		GC Content	50.0	%	GC Skew	0.0	
Length	20	bp	GC Skew	0.0		GC Skew	0.0	
GC Content	50.0	%	GC Skew	0.0		GC Skew	0.0	
GC Skew	0.0		GC Skew	0.0		GC Skew	0.0	
GC Skew	0.0		GC Skew	0.0		GC Skew	0.0	

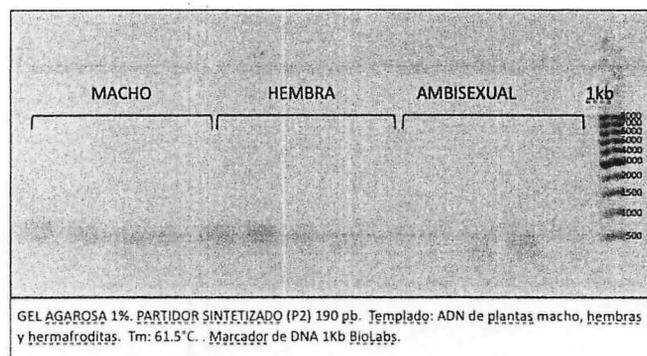


Figura 10. Amplificación del partidor P2, diseñado a partir del marcador **cpm7** de *Carica papaya* sobre muestras de *Vasconcellea*. Se incluyen muestras hembras y hermafroditas, y muestras machos las cuales eran compuestas.

Como se observa en la Figura 10, y al igual que el resultado obtenido con el otro marcador, la obtención de amplicones no fue positiva, y no estuvo asociada a un sexo en particular.

Estos resultados fueron verificados en experimentos independientes, es decir con otras muestras diferentes de ADN, provenientes de nuevas plantas sexadas positivamente en terreno, y el resultado fue similar, tal como se muestra en la Figura 11, lo que indica la gran variabilidad a nivel de secuencias nucleotídicas entre la especie de la cual se conoce y se utilizó su secuencia como *Carica papaya*, y la especie objeto de este estudio *Vasconcellea pubescens*, en la cual no existe información genómica que pudiera permitir la diferenciación sexual.

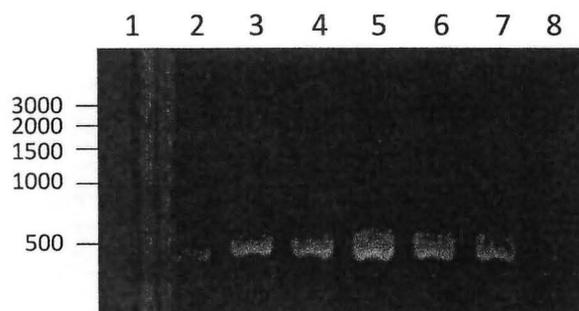


Figura 11. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **P1**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 789pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

3. Utilización de marcadores moleculares determinantes del sexo en especies de *Carica* y *Vasconcellea*.

Al igual que lo informado previamente, basados en antecedentes reportados en la publicación de Wu et al. (2010) para algunas especies de los géneros *Carica* y *Vasconcellea*, se probaron una serie de marcadores con el fin de determinar si los cromosomas sexuales son posibles de ser diferenciados y/o han evolucionado de manera diferente en *V. pubescens*, objeto del presente estudio. Estos marcadores fueron nuevamente evaluados, pero esta vez en muestras individualizadas de *Vasconcellea pubescens* cuyo sexo fue determinado previamente en terreno, dada su morfología floral, y se verificó si existían diferencias en la amplificación para cada uno de los sexos, de esta forma se determinó si dichos marcadores podrían establecer diferencias en los amplicones obtenidos dependiendo del tipo sexual de la planta de papaya, en estadios tempranos de desarrollo. Los marcadores utilizados, así como su secuencia y tamaño esperado se detallan en el Cuadro 5.

Cuadro 5: Listado de partidores evaluados, nombre asignado, secuencia y tamaño.

Código	Nombre partidior		Tm°	Secuencia	Tamaño pb
1A	Gene1 Ex1-2	F	70.3	ATGGAGCATGCGTCGGAGAA	825
		R	68.6	TCACATCTCTATGGATGTGCCCA	
1B	Gene1 Ex1-2	F	66.2	AAGATAYCCCGTTGATGCAGGA	873
		R	67.5	CAGGCTCTTCAAATCCTTCTGGA	
2	Gene1 Ex1-3	F	57	ATGGARCAYGCIWSIGARAA	1459
		R	63.8	CTTGAACGTTGTCTATCCCCA	
3	Gene1 Ex2-7	F	69.5	TTACTGCGGGAGGTCCTCACAG	1200
		R	61.4	AAGCCTTTCTGAAGTAGGACG	
4	Gene1 Ex3-7	F	54.7	GTIAGYGCITGYATGTTYGAYAC	750
		R	57.8	GCRTGYTTTRAARAAIGGRTGYTT	
5	Gene1 Ex15-19	F	66.1	GGACCTACAAACTGCACCTTCAA	1093
		R	66.7	CTGCAATTCCTCAATAAGGCTCC	
6A	Gene2 Ex6-7	F	74.6	TGACCTGGTGGATGGGGACGAG	506
		R	76.9	GCATCGCCGACGGCTTGATTGA	
6B	Gene2 Ex6-7	F	59.1	GAYYTIGTIGAYGGIGAYGARAT	506
		R	59.5	CGRTCICCIACIGCYTGRTTDTAT	

7	Gene4 Ex1-2	F	65.3	TGCTTTCTGTTTGCSGTCCAC	790
		R	64.2	TTGCCAGGTCTACGAGGATTAG	
8A	Gene4 Ex7-10	F	63.0	GGTGTGATGAGTCTCTTGCA	964
		R	69.5	TCCATGGCGAGGTCATAGCAG	
8B	Gene4 Ex7-10	F	63.7	TGGGTIGTIGARTAYCARGARAAYYTIAT	964
		R	60.7	YTCCATIGCIARRTCRTARCAICKIA	
9	Gene4 Ex11-12	F	59.5	AAYTTYGARGAYACITGYAARGGITT	1100
		R	60.3	YTCYTGIAICCCIGGRTCYTCRAADAT	
10	Gene4 Ex17-18	F	51.3	GARGTIGTIGARAARYTIGT	229
		R	57.2	GGRAAIACRAAICCGTYTTIGG	
11	Gene5 Ex9-11	F	64.0	TCAAACAACCATCTGTCTGGAG	1100
		R	68.7	TTTGGGTACACAGTGATCATGCA	
12	Gene6 Ex1-2	F	64.6	GTTCGATCATGTCGGTCCTC	678
		R	62.6	TACCCGAATACGAGCAGTTG	
13	ANKYRIN Ex1-4	F	65.4	GGTGGTCTCAACTCTCCTCTCC	780
		R	65.0	CCTCCCACTGAGATAATCAGCTC	
14	ANKYRIN Ex3-7	F	64.9	GGAGGTTGTGCAAACCTCTTCTG	1010
		R	67.1	TTGCACCTCTTGCAAGGAGAA	

Nota: Los partidores que tienen letra "A" y "B" significa que el partidor "A" tiene su partidor degenerado "B". Algunas veces se usan partidores degenerados. Estos en realidad son mezclas de partidores similares pero no idénticos. Por ello la secuencia de partidores que corresponde al aminoácido isoleucina podría ser "ATH", por A de adenina, T de timina y H de adenina, timina o citocina, según el código genético de cada codón. El uso de partidores degenerados puede reducir ampliamente la especificidad de la amplificación por PCR. En este caso se comenzó por probar el partidor "A", si éste no amplificaba se probó el partidor "B", aunque hubo casos en que no amplificó ninguno de los dos.

Cabe destacar que se trabajó, durante las primeras fases de determinación molecular, con material sexado provenientes de plantas de campo, dentro de las cuales se clasificaron plantas hermafroditas como machos, dado que en el momento de identificar el sexo de las plantas (agosto), las hermafroditas presentaban sólo flores machos. Esto llevó a la necesidad de repetir todos los experimentos con las nuevas muestras correctamente sexadas en terreno.

Este nuevo material vegetal utilizado fue colectado por INIA en el sector de San Ramón, seleccionando para el análisis molecular finalmente una muestra para cada uno de los sexos: macho, hembra y hermafrodita. Se amplificaron las muestras de ADN a partir de 50ng, con los partidores seleccionados. Los protocolos de amplificación utilizados consistieron en 5 min a

95°C para la denaturación inicial del ADN, seguido de 35 ciclos con denaturación a 95°C por 30 seg., alineamiento a diferentes temperaturas de acuerdo a lo óptimo para cada par de partidores por 30 seg. y extensión a 72°C por tiempos que dependían del tamaño del amplicón esperado. En el Cuadro 6 se describen las temperaturas de alineamiento y tiempos de extensión utilizados en cada par de partidores.

Cuadro 6. Temperaturas de alineamiento y tiempos de extensión para cada par de partidores utilizados.

Código	Fragmento de Gen a amplificar	T° de alineamiento °C	Tiempo de extensión seg.
1A	Gene1 Ex1-2 (kinase-like protein)	60,5	60
1B	Gene1 Ex1-2 (kinase-like protein)	62,1	60
2	Gene1 Ex1-3 (kinase-like protein)	51,2	90
3	Gene1 Ex2-7 (kinase-like protein)	51,2	60
4	Gene1 Ex3-7 (kinase-like protein)	60,5	60
5	Gene1 Ex15-19 (kinase-like protein)	65	90
6	Gene2 Ex6-7	50	60
7	Gene4 Ex1-2	62,1	60
8	Gene4 Ex7-10	50	60
9	Gene4 Ex11-12	51,5	60
10	Gene4 Ex17-18	53,1	30
11	Gene5 Ex9-11	51,2	90
12	Gene6 Ex1-2	50	60
13*	ANKYRIN Ex1-4	62,1	60
14*	ANKYRIN Ex3-7	60	60

* Amplificaciones utilizadas como control positivo (gen constitutivo).

A continuación se presentan algunas de las amplificaciones obtenidas en plantas de los tres sexos (macho, hembra y hermafrodita) para los genes analizados, los cuales fueron representativos de lo realizado en experimentos independientes (varias veces) a partir de muestras frescas, para confirmar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Figura 12. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **1A: Gen 1 Ex1-2**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 825pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita

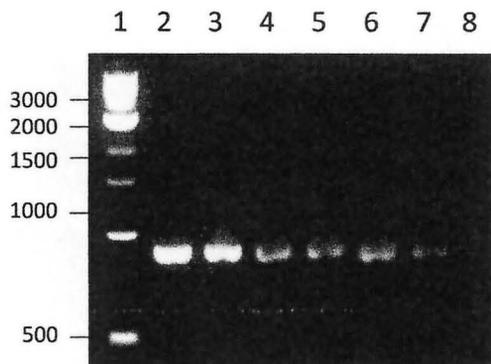


Figura 13. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **1B: Gen 1 Ex1-2**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 873pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

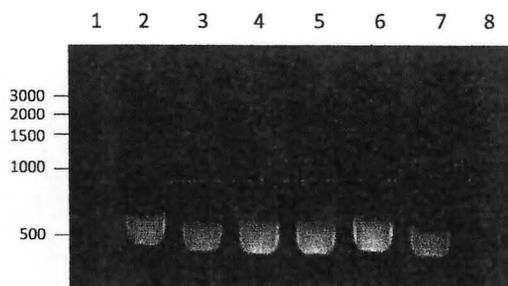


Figura 14. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **2: Gene1 Ex1-3 (kinase-like protein)**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 1459pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

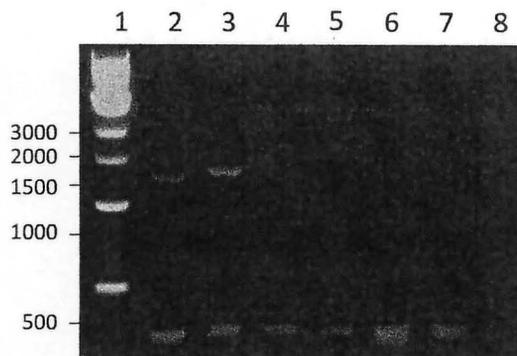


Figura 15. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **3: Gene1 Ex2-7 (kinase-like protein)**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 1200pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

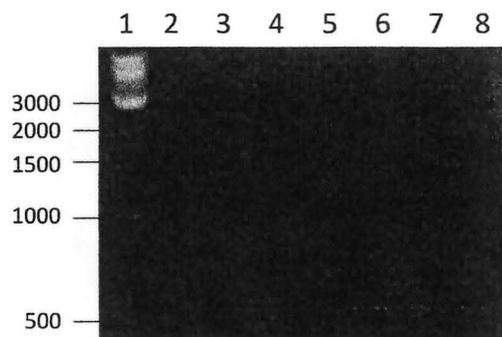


Figura 16. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **5: Gene1 Ex15-19 (kinase-like protein)**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. : Tamaño esperado 1093pb. Carril 1: marcador de peso molecular (pb). Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

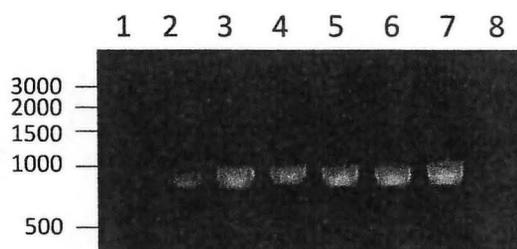


Figura 17. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **6: Gene2 Ex6-7**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 1093pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

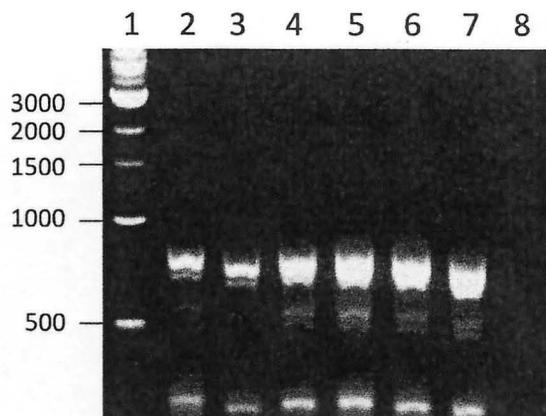


Figura 18. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **7: Gene4 Ex1-2**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 790pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

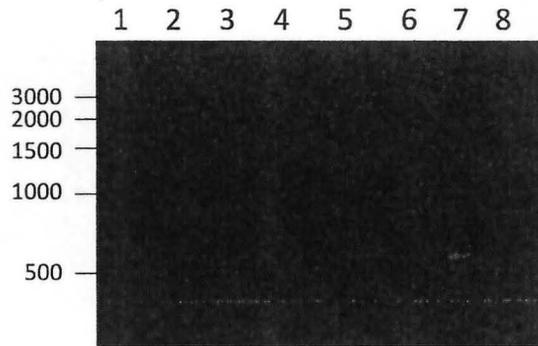


Figura 19. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **8: Gene4 Ex7-10**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 964pb. Carril 1: marcador de peso molecular (pb). Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

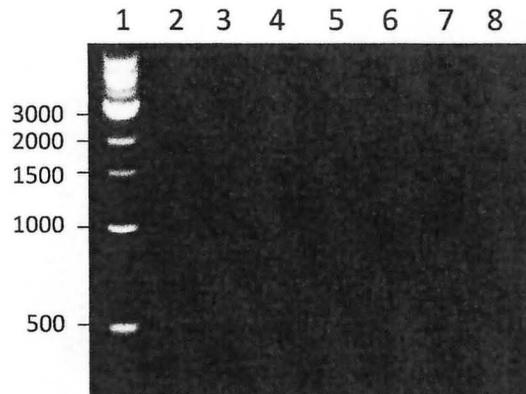


Figura 20. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **10: Gene4 Ex17-18**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 229 pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

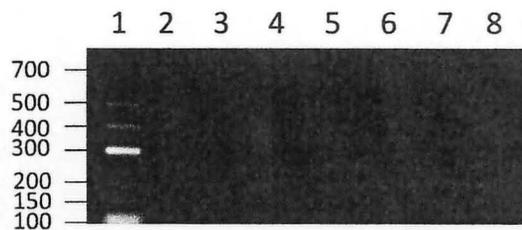


Figura 21. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **11: Gene5 Ex9-11**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 1100pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

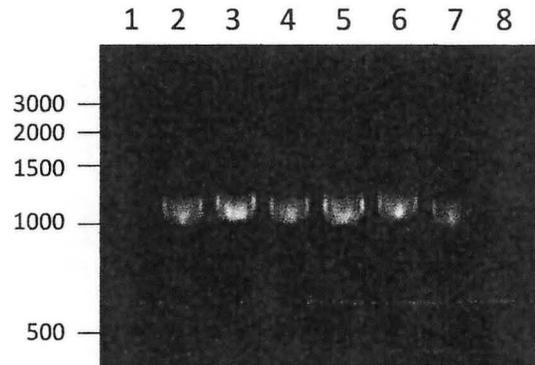


Figura 22. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **12: Gene6 Ex1-2**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 678 pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

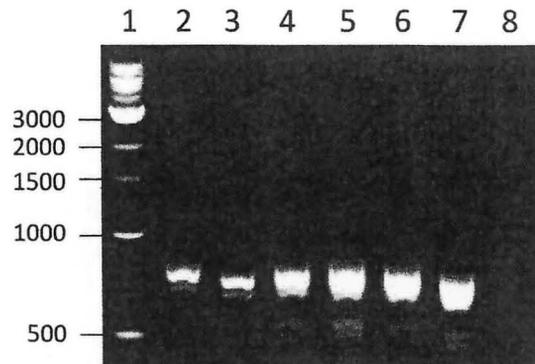
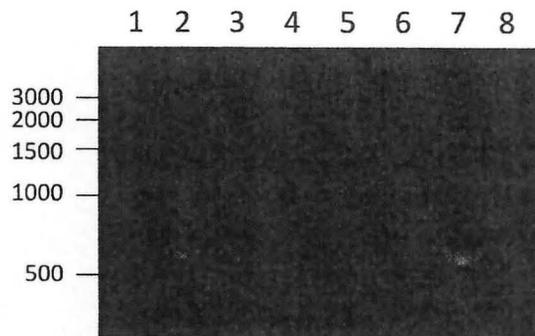


Figura 23. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **13: ANKYRIN Ex1-4**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 780pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita. Marcador utilizado como control positivo de la amplificación.



De los resultados presentados, se pudo constatar que los marcadores asociados al sexo para *Carica* y algunas especies de *Vasconcellea*, lo cual se puede atribuir a la variabilidad a nivel de secuencias nucleotídicas que si bien permiten amplificar productos de PCR en la mayoría de los casos, en ninguno fue posible verificar un amplicón asociado a un sexo específico. Aparte de los productos obtenidos para el marcador 2 Gene1 Ex1-3 (kinase-like protein), en donde se

observó un amplicón al tamaño esperado de 1459 pb, pero solamente en muestras de ADN de Macho. Este resultado no pudo ser reproducido, ya que amplificaron todas las muestras, si se considera un marcador asociado al sexo, para que fuese positivo tendría que estar presente tanto en muestras machos como en muestras hermafroditas, por la presencia de la región macho específica MSY (male-specific) en los cromosomas.

Asimismo, la amplificación de dos marcadores utilizados como control positivo (Figura 23, marcador **13: ANKYRIN Ex1-4**), demostró que en todas las muestras hubo amplicón presente, lo cual confirma que la calidad del ADN fue la necesaria para una amplificación positiva y cumple con la concentración suficiente para obtener los amplicones del tamaño esperado. Con ello se descarta que las diferencias entre las aplicaciones obtenidas se deban a diferencias en calidad o concentración del ADN molde, lo que se buscó al ajustar las concentraciones de trabajo del ADN molde para las reacciones de PCR.

Las diferencias en la cantidad del producto obtenido podrían explicarse por una amplificación de menor eficiencia, lo que ocurre cuando un partidador tiene un "mismatch" con la secuencia blanco del ADN molde, es decir, cuando en un partidador no hay complementariedad absoluta de secuencia, con alguna base diferente, afectando la posterior amplificación.

Esto nos llevó a seguir ensayando nuevos marcadores los cuales se describen a continuación.

Deputi et al. (2002) reportaron y seleccionaron dos marcadores que pueden diferenciar entre sexos de *Carica papaya*, produciendo amplicones en planta macho y hermafrodita, pero no en hembras. La secuencia de estos partidores, tamaño esperado del amplificado, temperatura de alineamiento y tiempo de extensión se muestran en el Cuadro 7. Estos partidores se probaron en *Vasconcellea pubescens*, obteniendo los resultados que se muestran a continuación.

Cuadro 7. Partidores descritos por Deputi et al. (2002), utilizados para amplificar a partir de plantas de *Vasconcellea pubescens*.

Marcador		SECUENCIA	Tamaño esperado pb	Temperatura de alineamiento °C	Tiempo de extensión (seg)
T12	F	GGGTGTGTAGGCACTCTCCTT	800	45	90
	R	GGGTGTGTAGCATGCATGATA			
W11	F	CTGATGCGTGTGTGGCTCTA	800	45	90
	R	CTGATGCGTGATCATCTACT			

Figura 24. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador T12, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

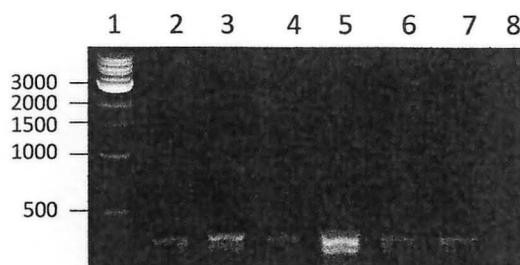
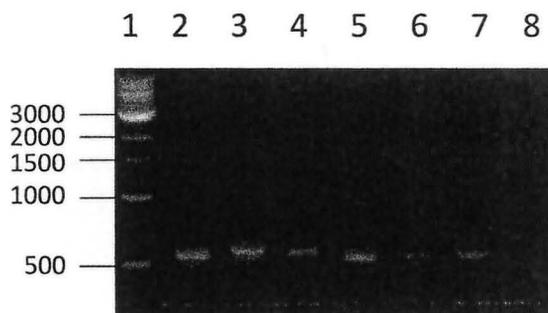


Figura 25. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador W11, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.



De acuerdo a los resultados obtenidos para estos marcadores, solamente el marcador W11 amplificó de acuerdo al tamaño esperado (800 pb), no obstante en todas las muestras analizadas se observó presencia de amplicón, por lo que no fue posible determinar diferencias asociadas a algún sexo particular. En tanto, el marcador T12 no amplificó en el tamaño esperado, a pesar de observarse posibles bandas diferenciales, éstas corresponderían a artefactos, ya que al menos debería existir coincidencia en las bandas presentes en muestras macho y hermafrodita.

Dado lo negativo de los resultados previos, se incorporó la opción de incorporar otros marcadores, y para ello se seleccionaron de la literatura los reportados por Parasnis et al. (2000), quienes ensayaron pares de partidores para amplificar secuencias de microsatelites de tipo (GATA)⁴, que diferenciarían entre plantas de papayos de diferente sexo. Los partidores utilizados se indican en el Cuadro 8, además de los tamaños esperados, la temperatura de alineamiento y el tiempo de extensión utilizado.

Cuadro 8. Partidores descritos por Parasnis et al. (2000), utilizados para amplificar a partir de plantas de *Vasconcellea pubescens*.

Marcador		SECUENCIA	Tamaño esperado pb	Temperatura de alineamiento °C	Tiempo de extensión (seg)
Napf-76/77	F	GAGGATCCCTATTAGTGTAAG	831	45	90
	R	GAGGATCCCTTTTGCCTCTG			
Napf-70	F	GGATCCCTATTAG	831	45	90
	R	GAGGATCCCTTTTGC			
GN-C*	F	CGAAACGGTAGACGATACG	600	57	60
	R	GGGGATAGAGGGACTTGAAC			

* Marcador utilizado como control positivo (constitutivo, presente en todos los sexos).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos con plantas de *V. pubescens*:

Figura 26. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **Napf-76/77**, resueltas en gel de Agarosa al 1%.: Tamaño esperado 831pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

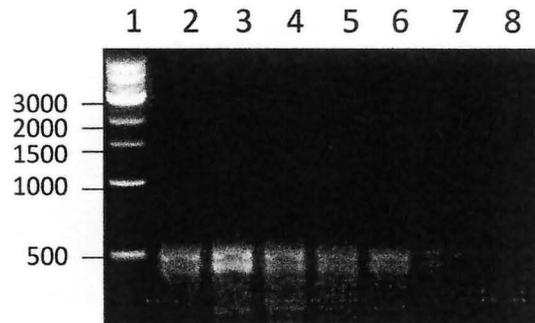


Figura 27. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **Napf-70/71**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 831 pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita.

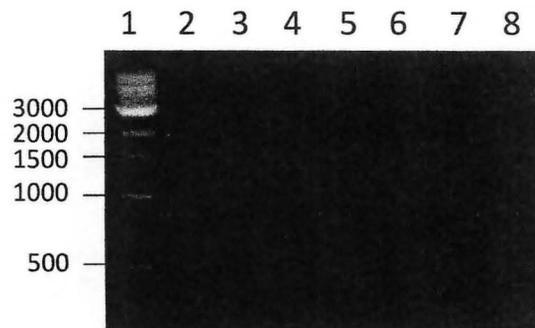
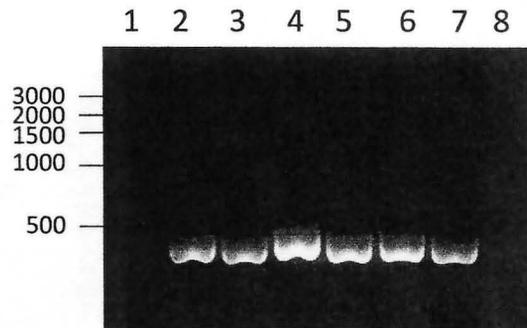


Figura 28. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **GN-C**, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Tamaño esperado 600pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de: carriles 2 y 3: Macho, carriles 4 y 5: hembra y carriles 6 y 7: hermafrodita. Marcador utilizado como control positivo de la amplificación



Los resultados obtenidos para el marcador **Napf-76/77** mostraron productos de amplificación significativamente diferentes del tamaño esperado de 831 pb para *Carica*, con amplicones de un tamaño aproximado a 500 pb, y sin diferencias notables entre los sexos. En cambio, el marcador **Napf-70/71** mostró la presencia de amplicones significativamente superiores al tamaño esperado de 831 pb para *Carica*, presentando amplicones de un tamaño aproximado a 1250 pb, y tampoco presentando diferencias notables entre sexos. En cuanto al marcador **GN-C**, utilizado como control positivo de la amplificación, éste también varió en relación al tamaño esperado de 600pb para *Carica*, mostrando amplicones notoriamente menores (< 400 pb).

Estas diferencias confirman la variabilidad existente entre ambas especies y confirman lo anteriormente obtenido en cuanto a que marcadores ortólogos de *Carica* no tendrían la capacidad de discriminar entre los sexos al ser utilizados en *Vasconcellea*.

Por ultimo, basados en la publicación de Urasaki et al. (2012) se utilizaron los nuevos primers Cp2671-F2 (5'-CAGATCGGGCACTTTAATGTTG-3') y Cp2671-R5 (5'-TCGGAGAATGTAGCGTCTGA-3'), que amplificaban una banda diferencial de 700 pb aproximadamente en *Carica papaya*. Dichos resultados diferenciales no se presentaron al amplificar ADN genómico de *Vasconcellea*, al no mostrar patrones diferenciales entre los diferentes sexos ensayados. Dichos resultados se presentan a continuación para materiales provenientes de ensayos de cruzamientos.

Dichos antecedentes en *Carica papaya* sugieren que sería posible diferenciar sexos con marcadores que distingan a machos o a hermafroditas como el Cp2671 F2.R5, pero no sería posible diseñar marcadores que se encuentren sólo en hembras.

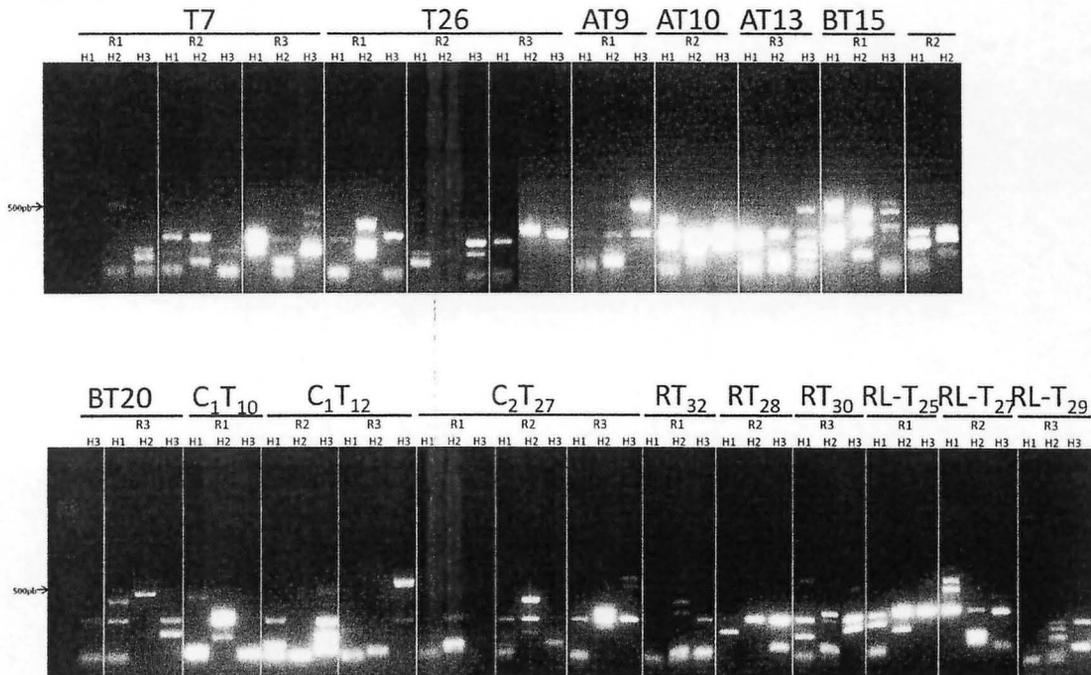


Figura 29. Amplificación de muestras de cruces de papayas utilizando partidores F2-R5, resueltas en gel de Agarosa al 1%. Material proveniente de diferentes cruzamientos, sin sexaje realizado por tratarse de plantas en fase juvenil.

Como se observa en la figura, no existen patrones definidos en la amplificación, por lo que no es posible relacionar los amplicones a una respuesta específica. Además, en la mayoría de los casos, las repeticiones (H1 a H3) no presentaron el mismo patrón de bandeado a pesar de tratarse de la misma muestra.

Para corroborar que todas las muestras de ADN genómico estaban en óptimas condiciones al amplificar fragmentos de cDNA, a partir de ellas se realizó un PCR con marcadores control, los cuales amplifican para todos los tejidos, sexos y condiciones, los que se muestran en la Figura 30.

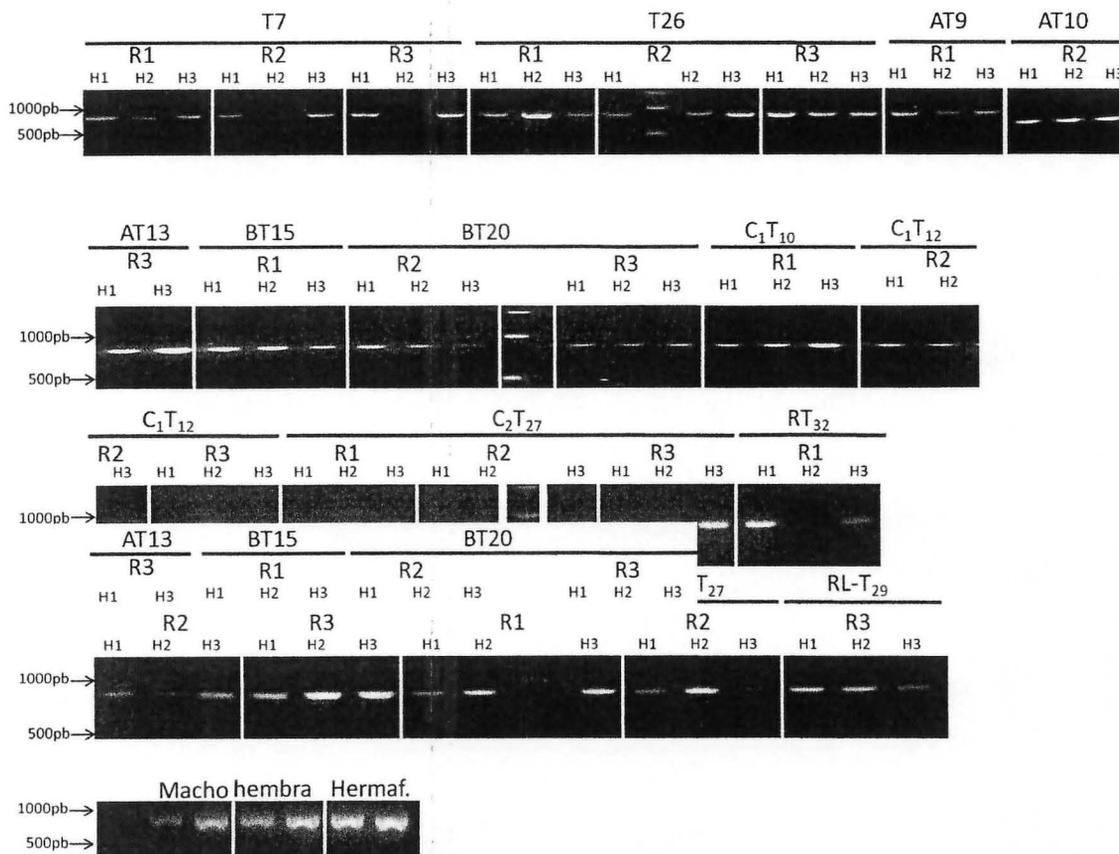


Figura 30. PCR para muestras de papayas (*Vasconcellea pubescens*) con partidores que amplifican un fragmento del gen Ankiryn, utilizado como control de la calidad del ADN extraído, resueltas en gel de Agarosa al 1%.

Se observa en la figura que todas las muestras amplificaron con este par de partidores, lo que indica que el ADN presenta la calidad necesaria para ser utilizado en la amplificación con diversos pares de partidores.

Como conclusión de los partidores empleados en el material proveniente de cruzamientos dirigidos, utilizando una batería de partidores reportados en la literatura para la determinación del sexo en *Carica papaya*, en *Vasconcellea pubescens* no fue posible el uso de estos partidores en la determinación del sexo, ya que amplificaron indistintamente macho o hembra, o en algunos casos no se obtienen amplificadas.

Adicionalmente, a los partidores ensayados, se sumó la evaluación de un nuevo marcador diseñado, a partir del resultado de la secuenciación de productos de PCR de los amplicones generados con los marcadores 5, 7A y 13, dado que estos marcadores presentaron leves diferencias de tamaño entre amplicones, y no de presencia o ausencia de amplicones por cada uno de los sexos en los ensayos previos.

Los amplicones obtenidos por PCR, fueron enviados para su posterior secuenciación (paired-end sequencing) a MACROGEN INC. (Korea del Sur). Los resultados de esta secuenciación fueron analizados y alineados por amplicón partidor y por sexo mediante el programa CLC Sequence Viewer 6. Al realizar las alineaciones se observó que para el marcador 5 existía una región en donde las secuencias para las muestras de distintos sexos variaron, como se observa en la Figura 31.

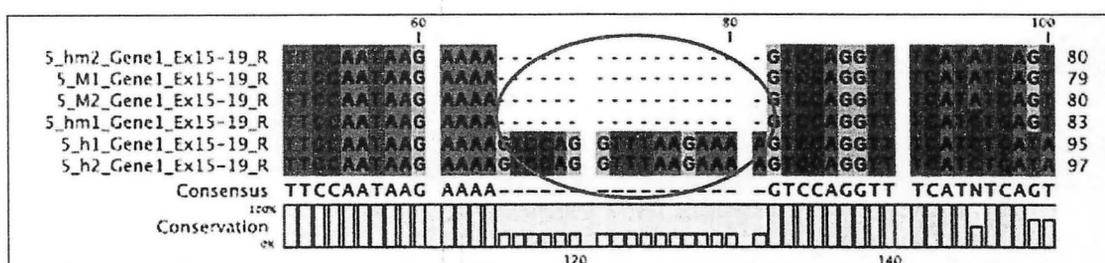


Figura 31. Alineamiento de secuencias correspondientes a la región 5' obtenidas desde amplicones provenientes de muestras de distinto sexo del marcador 5 (Gene1 Ex15-19).

Se pudo comprobar que en las muestras h1 y h2 (hembras) existió una secuencia no conservada y exclusiva correspondiente a una inserción de 18 pares de bases, respecto a las muestras M y hm (machos y hermafroditas). En base a dicha información se diseñaron partidores que buscaran discriminar a hembras de muestras machos (hipotéticos) y hermafroditas. El resultado buscado es que sólo exista amplificación diferencial en cuanto a tamaño para las muestras hembra. El nuevo partidor fue denominado **P212**, y su secuencia se presenta a continuación:

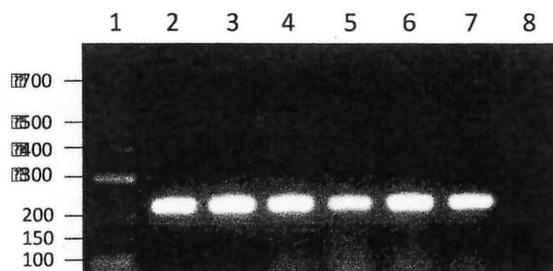
Forward: CTAGAATTATGCTTTGATTTTCTG Tm°: 62°C

Reverse: AGTCCAGGTTTAAGAAAAGT Tm°: 54°C

Tamaño de producto esperado: 212 pares de bases.

Al igual que con los marcadores moleculares evaluados previamente, el paso siguiente fue determinar la Tm° real de estos partidores. Para las pruebas de Tm° se utilizaron sólo muestras hembra ya que se espera que este marcador sólo amplifique en hembras. El mix utilizado fue el mismo que el de las reacciones anteriores así como también el programa de amplificación. Una vez determinadas dichas condiciones, los resultados de la amplificación del marcador P212 en muestras provenientes de distinto sexo se presentan a continuación.

Figura 32. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **P212**, resueltas en gel de Agarosa al 2%. Tamaño esperado 212 pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de carriles 2: macho 1; 3: macho 2; 4: hembra 1; 5: hembra 2; 6: hermafrodita 1; 7: hermafrodita 2; 8: control negativo.



El poder de resolución de los amplicones obtenidos por este marcador fue menor a lo esperado, dado el pequeño tamaño de éste, por lo cual se realizó una electroforesis específica (Poliacrilamida) para amplicones de pequeño tamaño, ampliamente utilizada en análisis de microsatélites, que se presenta en la siguiente figura:

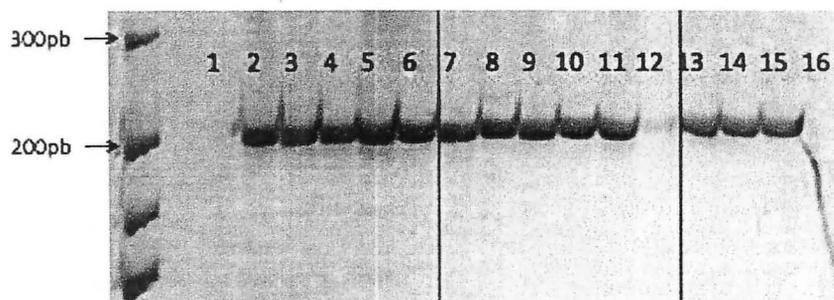


Figura 33. Amplificación en muestras de ADN de papayo con el marcador **P212**, resueltas en gel de Poliacrilamida al 6%. Tamaño esperado 212 pb. Carril 1: marcador de peso molecular. Amplificaciones a partir de muestras de ADN de carriles 1-6: hermafroditas; 7-12: hembras; 13-16: machos.

A pesar del uso de electroforesis de Poliacrilamida al 6%, que se caracteriza por permitir la resolución de diferencia por tamaño de hasta 3 bases en amplicones, los resultados indican que no fue posible obtener diferencias en cuanto al tamaño de los amplicones provenientes de sexo diferente en muestras de *Vasconcellea*. Considerando que existía una zona de bases nucleotídicas diferencial en hembras, contra la cual se diseñaron los partidores, es posible que dicha secuencia se presente parcialmente en otra zona, llevando a una amplificación lo suficientemente similar para impedir la síntesis de un amplicón de tamaño diferente. Una última posibilidad es que la secuencia obtenida sea un artefacto del producto PCR original y que exista en las muestras no hembra, pero no hayan sido secuenciadas completamente, enmascarando el análisis de alineamiento.

CONSIDERACIONES FINALES

La estrategia experimental para determinar el sexaje a través de herramientas moleculares utilizó marcadores ortólogos provenientes de investigaciones realizadas en *Carica* y otras especies del género *Vasconcellea*. Los resultados obtenidos no permitirían analizarse en combinación con los resultados fenotípicos, dada la ausencia de marcadores diferenciales que hayan sido consistentes y reproducibles en todas las etapas de este estudio. Esto releva la importancia de generar secuencias propias de *Vasconcellea pubescens* que permitieran diseñar partidores específicos para la especie, y aun mejor para los sexos presentes en dicha especie. El acercamiento a través de marcadores ortólogos representa una oportunidad de analizar a nivel molecular especies emparentadas, pero conlleva el riesgo de que dada la variabilidad existente entre los genomas, algunos de ellos no entreguen la información requerida, como fue en este caso.

Por lo mismo, los análisis de ADN de cruzamientos dirigidos, en plantas individuales de las progenies obtenidas, mostraron resultados poco concluyentes, lo que confirmó que el uso de marcadores ortólogos no fue suficiente para diferenciar entre plantas de diferente sexo, y sugiere que la variabilidad a nivel de secuencia entre las especies de *Carica* y *Vasconcellea* es bastante más amplia de lo esperado.

El mecanismo cromosomal o genético para el patrón de reproducción en *Vasconcellea* y en la especie relacionada *Carica papaya* no está totalmente dilucidado, pero estudios recientes indican que consistiría en la presencia de cromosomas sexuales X e Y. Donde plantas macho serían XY, hembras XX y las plantas hermafroditas presentarían un cromosoma Yh, siendo XYh (Urasaki et al. 2012).

Estos antecedentes sugieren que sería posible encontrar marcadores que distingan a machos, pero sería poco probable conseguir marcadores que se encuentren sólo en hembras. Pese a ello encontramos diferencias a nivel de secuencia en las muestras de hembras, en relación a los machos y a las hermafroditas y si bien eso no fue posible visualizarlo después, las secuencias están, indicando que se trataría de variabilidad intersexual, muy probablemente no asociada a genes de regiones macho específico.

Para el caso de las plantas hermafroditas, las diferencias entre los cromosomas Y e Yh son mínimas (Urasaki et al. 2012), por esto, sería necesario realizar un estudio específico para identificar hembras, por la reacción negativa a un marcador que sólo se encuentre en macho y hermafrodita.

De acuerdo a todos los resultados obtenidos se pudo determinar que:

1. De los dos métodos ensayados para la extracción de ADN, el que utilizó buffer CTAB (Rogers & Bendlich, 1988) resultó ser el mejor debido al menor tiempo de duración al implementar el protocolo completo, al menor grado de dificultad, y además al usar reactivos menos tóxicos, entregando concentraciones altas de ADN genómico, integro y con bajo contenido de ARN.
2. Las mejores muestras para la extracción de ADN correspondieron a hojas nuevas de la planta y en una cantidad no mayor a 1cm².

3. Las relaciones 260/280 y 260/230 indicaron calidad y pureza de cada una de las muestras obtenidas. La longitud de onda 260 corresponde a ADN, 280 corresponde a ARN y la longitud de onda 230 corresponde a proteínas. Por tanto un ratio de ~ 1.8 en la relación 260/280 se consideró como ADN "puro". Si el ratio fue apreciablemente más bajo, indicaría la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente a o cercano a 280 nm. Dicha relación se obtuvo en un porcentaje muy bajo de muestras, indicando la pureza del ADN obtenido en los protocolos ensayados.
4. La relación 260/230 fue utilizada como una medida secundaria de pureza de ácidos nucleicos. Los valores 260/230 para ácidos nucleicos "puros" fueron a menudo más altos que los respectivos valores 260/280. Los valores 260/230 esperados estuvieron en el rango de 2.0-2.2. Si la relación fuese apreciablemente más baja, podría indicar la presencia de contaminantes como EDTA, carbohidratos y fenol, los cuales absorben a 230 nm. Los valores obtenidos en las muestras indicarían presencia de restos de EDTA y carbohidratos, ya que ninguno de los protocolos utilizó fenol, lo cual no inhibiría las reacciones basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
5. De acuerdo a los resultados, con una muestra consistente en 1 cm² de tejido (preferentemente nuevo) o 0.03g aproximadamente, se obtuvieron concentraciones mayores a 200 ng/uL y de óptima pureza, que pudieron ser utilizadas en técnicas moleculares posteriores que incluyen uso de marcadores moleculares basados en PCR. Ello se comprobó con la amplificación en todas las muestras con el uso de marcadores moleculares utilizados como control positivo, tales como GN-C y Ankyrin.
6. La evaluación de los marcadores con muestras de ADN macho (100%), muestras hermafroditas y muestras hembras en plantas de *Vasconcellea*, NO presentaron diferencias en la obtención de amplicones diferenciales para algunos de ellos, no permitiendo la identificación de marcadores que amplificaran diferencialmente e imposibilitando el sexaje molecular en estadios tempranos.
7. Los marcadores diseñados a partir de secuencias específicas de *Vasconcellea*, como el marcador **P212**, no pudieron entregar resultados discriminantes, a pesar de resolver los amplicones generados para una mejor definición de tamaño en geles de poliacrilamida.
8. No hubo conservación entre los fragmentos de ADN asociados al sexo entre *Carica papaya* y *Vasconcellea pubescens*, por lo cual será necesario buscar una nueva estrategia de obtención de marcadores asociados al sexo para *V. pubescens*, por ejemplo el uso de técnicas específicas como diferenciación en la transcripción encontrada en flores de diferentes sexos, mediante secuenciación masiva del tipo RNA-Seq, lo que podría aislar transcritos específicos en tipos de flores provenientes de plantas con distinto sexo en *Vasconcellea*, y a partir de éstos generar nuevos

marcadores moleculares basados en PCR que permitan realizar el sexaje molecular temprano.

Referencias.

- Deputy et al. (2002) Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theor Appl Genet* (2002) 106:107-111.
- Doyle JJ & JL Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, vol. 12(1): 13-15.
- Liu et al. (2004) A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature* 427 (6972) pp. 348-52.
- Parasnis et al. (2000) A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. *Molecular Breeding* 6:337-344.
- Rogers SO, Bendich AJ (1988) Extraction of DNA from plant tissues. *Plant molecular Biology manual* a6:1-10.
- Saalau-Rojas E, Barrantes-Santamaría W, Loría-Quirós CL, Brenes-Angulo A, & Gómez-Alpizar L (2009) identificación mediante PCR del sexo de la papaya (*Carica papaya* L.), Híbrido "Pococi". *Agronomía Mesoamericana*, 20(2): 311-317.
- Urasaki N, Tarora K, Shudo A, Ueno H, Tamaki M, Miyagi N, et al. (2012) Digital Transcriptome Analysis of Putative Sex-Determination Genes in Papaya (*Carica papaya*). *PLoS ONE* 7(7):e40904.
- Wu et al. (2010) The origin of the non-recombining region of sex chromosomes in *Carica* and *Vasconcellea*. *Plant J* 63, 801–810.



Anexo II. Protocolos y métodos utilizados in vitro

Protocolo de propagación de semillas in vitro

De un fruto maduro de papaya, lavado con detergente y enjuagado con abundante agua corriente, se extraen semillas, que están cubiertas por sacos mucilaginosos, las que se lavan con detergente frotándolas en un tamiz varias veces hasta la eliminación del producto. Luego, se enjuagan tres veces con agua corriente y finalmente con agua destilada. Las semillas se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secas se comprueba que no queden restos de mucílago y se hidratan con agua destilada por 15 horas antes de la desinfección.

Posteriormente con ayuda de lupa estereoscópica, se retira la testa de las semillas y se realiza un tratamiento de desinfección solo en base a alcohol al 70%.

Se establecen en medio de cultivo M&S (1962) al 100% con sacarosa al 3% (30 g/L), pH ajustado a 5,8 y 7 g/L de agar. Se adiciona 0,1 mg/L de BAP y ANA al medio.

Las semillas sembradas in vitro se mantienen en cámara de crecimiento en condiciones de temperatura de 25 ± 1 °C, los 4 primeros días en oscuridad y paulatinamente pasan a un fotoperiodo de 16 horas luz y 3.000 lux de luminosidad.

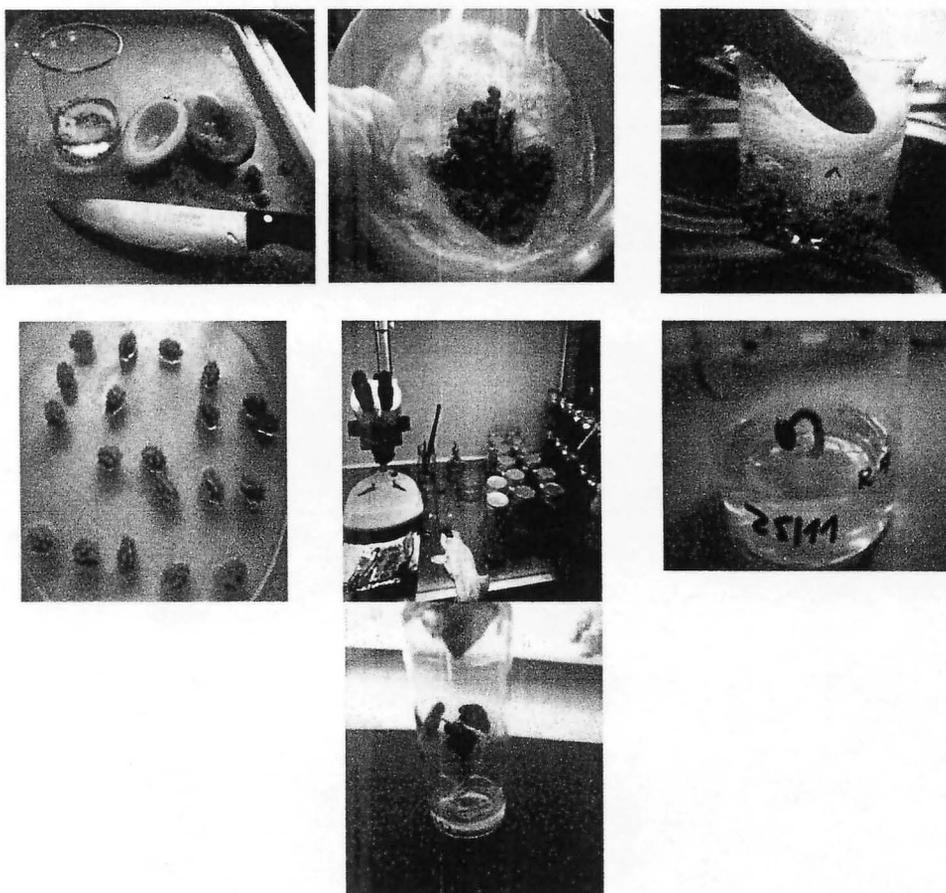


Figura 1. Etapas en la multiplicación de semillas in vitro de Vasconcellea

Protocolo de propagación in vitro de Vasconcellea a partir de meristemas

a) Obtención del material a propagar

Se extraen yemas obtenidas de estacas productivas enraizadas y mantenidas en condición de invernadero. Para ello previamente se retiran estacas de plantas productivas seleccionadas y colectadas desde diciembre a febrero. Se establecen con aplicación de un enraizante comercial (Ácido naftalen acético ANA) en turba (esterilizada y fertilizada) en condición de cama caliente y a partir del tercer mes se obtienen estacas enraizadas y brotadas

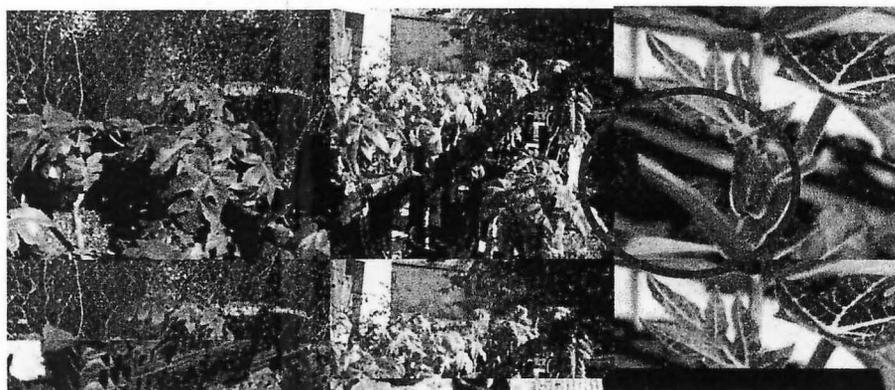


Figura 2. Obtención del material vegetal

b) Preparación del material vegetal

Los brotes colectados se lavan con agua corriente y detergente, con ayuda de un hisopo de pelos finos se cepillan para eliminar rastros de polvo y otros contaminantes. Luego se enjuagan con abundante agua y en cámara de crecimiento se sumergen en una solución con 1g/L de Captan + 10 gotas de Povidona yodada por 10 minutos.

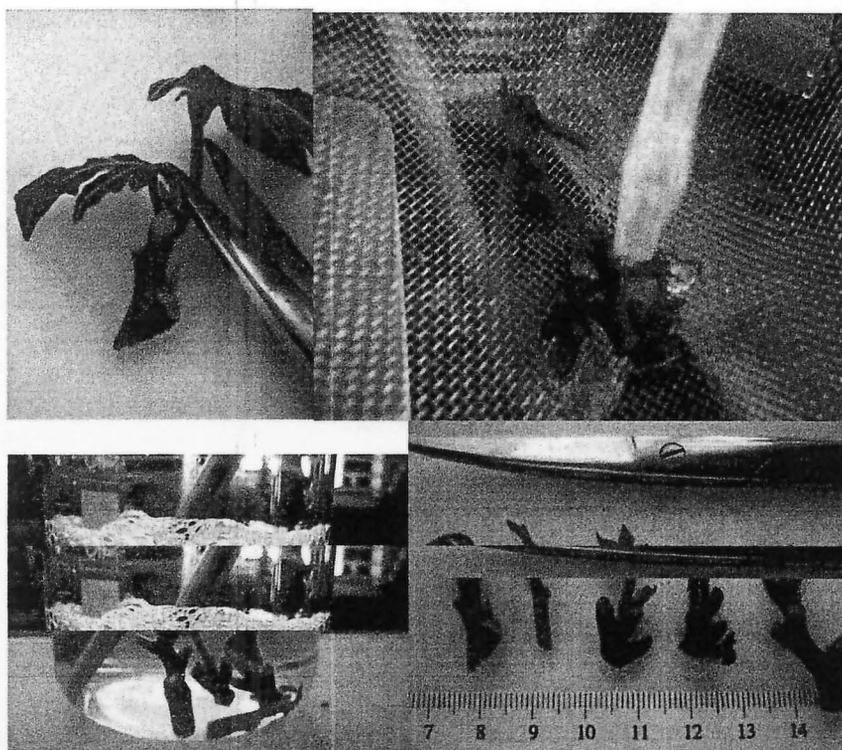


Figura 3. Procedimiento de preparación del material vegetal

c) Desinfección del material

Posteriormente pasan a una solución de alcohol al 70 % por 1 minuto, luego a una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos y finalmente se enjuagan con agua (Figura xxx)



Figura 4. Desinfección del material a propagar

d) Obtención del explante

Con ayuda de bisturí y pinzas y bajo lupa estereoscopia se elimina parte de la corteza, dejando solo tejido meristemático, cortando la base, separando la yema dejando 2 pares de primordios foliares. Se realiza un corte en bisel, obteniendo un explante entre 4 a 5 mm de longitud (Figura 5)

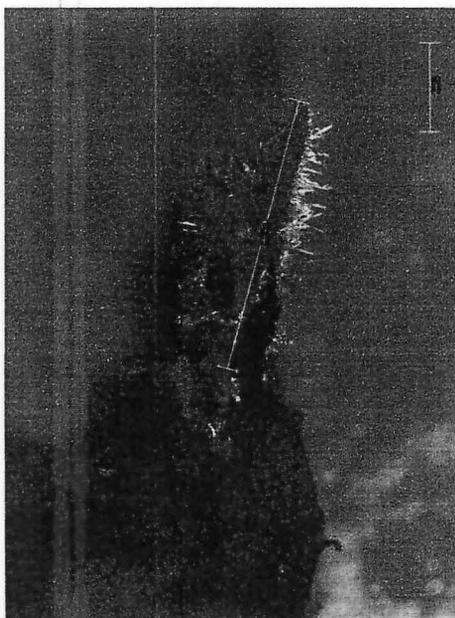


Figura 5. Explante de Vasconcellea para propagación in vitro

e) Establecimiento del explante

Establecimiento en medio de cultivo MS con 0,1mg/l de Bencilaminopurina (BAP) y Acido naftalen acético (ANA). Se mantienen en cámara de crecimiento en condiciones controladas: fotoperíodo de 16 horas luz, temperatura 23°C y 3000 lux de luminosidad (Figura 6).

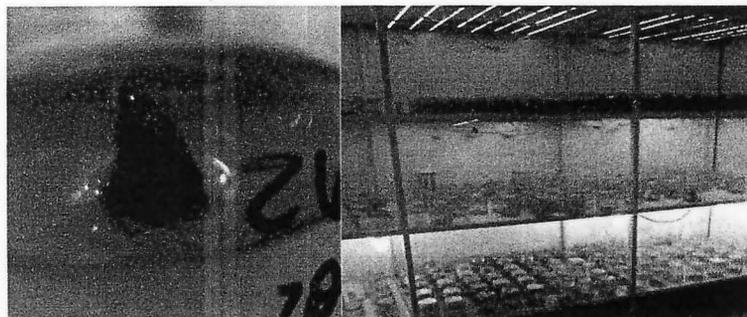


Figura 6. Establecimiento de explante en medio MS y condiciones de crecimiento.

f) Crecimiento del explante

A partir del explante el primer par de hojas se desarrolla a partir de los 10 días. Se realiza un traspaso a los 15 días a medio fresco hasta que esta alcance 12 a 15 mm de longitud y se observen en el tallo puntos de crecimiento (plántulas o microplantas). Esta etapa dura aproximadamente 30 a 50 días (Figura 7)



Figura 7. Crecimiento del explante en medio de crecimiento inicial

g) Multiplicación del explante

Cuándo los explantes tiene 12 a 15 mm de largo se llevan a medio de multiplicación MS adicionado con 1 ppm de BAP (6-bencil amino purina) y las mismas condiciones de cultivo en cámara de crecimiento. Este proceso dura hasta 60 días. La tasa de multiplicación varía

entre 5 a 15 brotes por plántulas por cada subcultivo. La Longitud promedio de los brotes es de 8-15 mm. Si los brotes alcanzan 15 mm pueden pasar a un nuevo medio de multiplicación para iniciar un nuevo subcultivo. La figura 8 muestra un explante con brotes en medio de multiplicación.



Figura 8. Explante de Vasconcellea en medio de multiplicación.

h) Enraizamiento y aclimatación

Se definen dos medios de enraizamiento según el grado de diferenciación de la base del explante. Un medio base MS + 2 ppm de AIB para brotes con diferenciación (Figura 9a) y un medio MS + 0,5 ppm de ANA para aquellos sin inducción de diferenciación en la base del explante (Figura 9b).

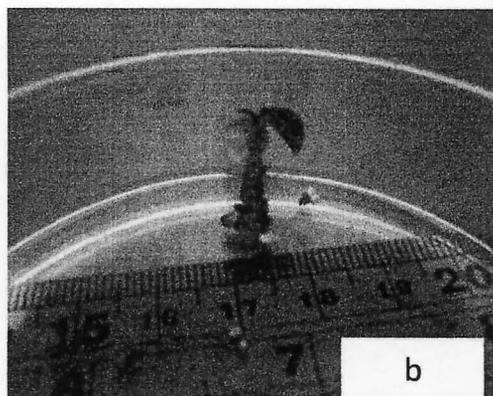


Figura 9. Planta in vitro con base inducida para la formación de raíces (a) sin inducción (b)

Posteriormente a los 25 días la plántula in vitro se traspa a un medio MS sin reguladores para formación y elongación de raíces. A los 30 a 40 días la planta tiene raíces de 7 a 30 mm (Figura 10)

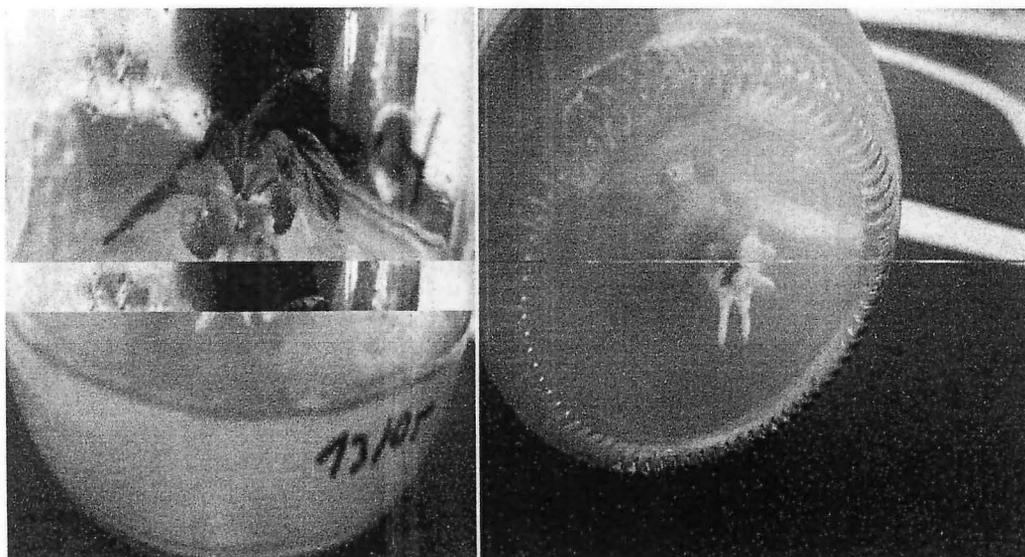


Figura 10. Planta in vitro de Vasconcellea con desarrollo radical

Para la fase de aclimatación, las plántulas enraizadas se lavan para eliminar el agar, se llevan a una solución con fungicida y se trasplantan a medio con turba, bajo condiciones de invernadero con luz y temperatura y bajo un sistema de protección con plástico que se va abriendo en forma paulatina para que la planta se aclimate lentamente (figura 11).



Figura 11. Sistema de aclimatación para plantas in vitro de Vasconcellea

El periodo de aclimatación dura aproximadamente 1 mes, luego del cual las plántulas pueden ser llevadas a campo (figura 12).

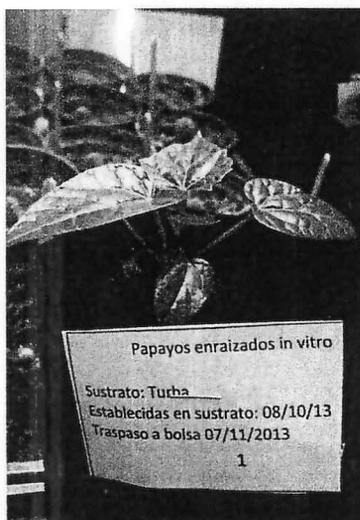


Figura 12. Planta de Vasconcellea in vitro lista para ser trasplantada en huerto

Anexo III. Informe Asesoría en multiplicación in vitro. Sr. Julio Olivera

INFORME DE TRABAJO

DIRIGIDO A : DRA. ANGÉLICA SALVATIERRA
PRESENTADO POR : ING. M.SC. JULIO OLIVERA SOTO
FECHA : 09 DE AGOSTO DE 2013

ANTECEDENTES

En el marco del Programa de investigación de papaya (*Carica pubescens* ó *V. pubescens*) se iniciaron las investigaciones para desarrollar un protocolo de micropropagación de plantas de papaya con sexo definido.

Se determinó dos puntos críticos en el proceso de micropropagación:

PROBLEMAS DETECTADOS EN EL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN

- a. Frecuente vitrificación de microplantas en la fase de inicio
- b. Bajo porcentaje de formación de raíces en la fase de enraizamiento
- c. Microplantas con poca elongación

VITRIFICACIÓN

Posibles motivos de la vitrificación en las microplantas de papaya en la fase de inicio:

1. Presencia de citoquinina: BAP
2. Concentración de agar
3. Aireación de los envases
4. Intervalo de repique
5. Concentración de amonio
6. Concentración de sacarosa

ENRAIZAMIENTO

Bajo porcentaje de formación de raíces en microplantas en la fase de enraizamiento.

PROPUESTAS PARA OPTIMIZAR EL PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE PAPAYA

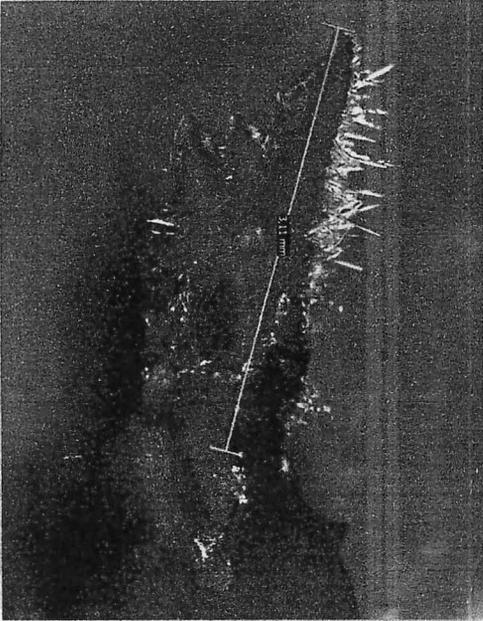
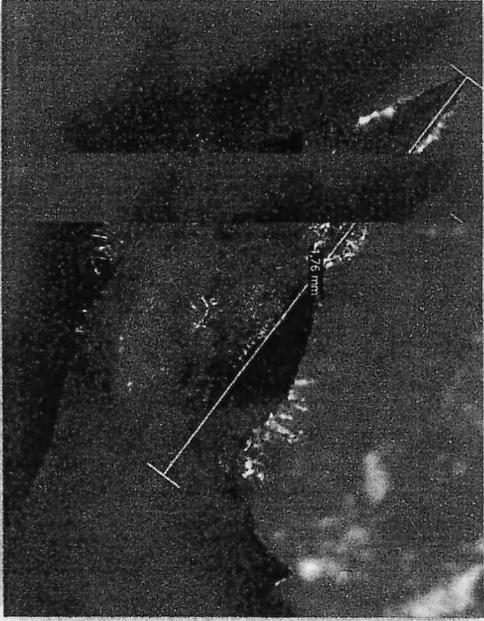
I. TRATAMIENTOS PROPUESTOS PARA ELIMINAR LA VITRIFICACIÓN EN LA FASE DE ESTABLECIMIENTO

En la fase de establecimiento se presenta la vitrificación de las microplantas. La vitrificación se produce por una absorción excesiva de agua de parte de la microplanta, que puede deberse a alto contenido de humedad dentro del contenedor, falta de solidificación del medio de cultivo, demasiada superficie que ha sido cortada de la microplanta en contacto con el medio de cultivo y falta de aireación.

Para esto se propone las siguientes estrategias:

1. Disminuir el área de corte de la microplanta
Al realizar el corte de las yemas en esta fase el área expuesta al medio de cultivo se debe hacer en bisel que facilite el ingreso de la micropanta en el medio de cultivo y permita introducir una porción menor de las microplantas al ser transferidas y cambiadas en cada subcultivo.
2. Incrementar el área de luminosidad de los envases cambiando las tapas de los mismos.
Como medidas para eliminar la vitrificación en esta fase se propuso el uso de tubos de vidrio con tapas de celofán o policarbonato, que permitan mayor paso de luz a los envases. Se utilizó tubos de vidrio de 100 x 20 mm con tapas de papel aluminio y celofán, con 10 repeticiones.
3. Cambio de concentración de agar, elevando la concentración. Otra medida tomada fue elevar la concentración de agar en el medio de cultivo de 6.5 g/l a 8.0 g/l. Así mismo realizar subcultivos después de 10 días de siembra de yemas.
4. Utilizar envases que permitan mayor intercambio gaseoso. El reemplazo de las tapas de papel aluminio ó celofán por tapas de polipropileno, permite mayor intercambio gaseoso en el interior de los tubos.

El tamaño promedio de las yemas sembradas es de 3 a 5 mm (ver fotos), según el desarrollo de las yemas.

	
<p>Yema de papaya de 3.11 mm de longitud, tamaño promedio Para corte y siembra en medio de cultivo.</p>	<p>Yema de papaya de 4,76 mm de longitud, rango óptimo para siembra en medio de cultivo</p>

Los tratamientos iniciales son:

T0: medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento, pH 5.7, sacarosa 3%, agar 0.65% con tapa de papel aluminio.

T1: medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento, pH 5.7, sacarosa 3%, agar 0.8% con tapa de celofán.

T2: medio de cultivo MS con AIB 0.5 ppm, pH 5.7, sacarosa 3%, agar 0.8% con tapa de papel aluminio.

EVALUACIONES A REALIZAR:

- Porcentaje de Prendimiento (a los 15 días)
- Altura de planta (30 días, al final de la fase de inicio)
- Porcentaje de vitrificación (a los 15 días)

II. TRATAMIENTOS PROPUESTOS PARA LA FASE DE ELONGACIÓN

Debido a que un porcentaje de microplantas no desarrolla lo suficiente en longitud, en comparación con las demás microplantas. Con el uso del ácido giberélico se pretende lograr mayor alargamiento de las microplantas. Para esto el ácido giberélico debe ser esterilizado por filtración para no disminuir su actividad. Se utilizó frascos de vidrio con 40 ml de medio de cultivo y 5 repeticiones con 4 microplantas por envase. Se propuso los siguientes tratamientos:

T0: Medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con AG₃ 2 ppm

T1: Medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con AG₃ 5 ppm

EVALUACIONES A REALIZAR:

- Altura de planta (a los 30 días)
- Número de hojas (a los 30 días)

III. TRATAMIENTOS PROPUESTOS PARA LA FASE DE ENRAIZAMIENTO

Se propuso la modificación de la composición del medio de cultivo MS en el contenido de vitaminas. Las vitaminas del medio de cultivo de Chee & Pool (1987), en adelante designado **C2d** fueron agregadas al medio de cultivo MS reemplazando a las propuestas en el medio inicial, ya que en el enraizamiento 'in vitro' de *C. papaya* dio buenos resultados elevando el porcentaje de microplantas con formación de sistema radicular.

También fue propuesto el uso de vermiculita en reemplazo del agar como agente de soporte para las microplantas durante su incubación ya que se utilizó medio de cultivo líquido.

En este medio líquido con vermiculita la base de las microplantas entran en contacto con una solución de AIB por unos segundos y luego se colocan en el frasco con vermiculita y medio de cultivo MS líquido. Se utilizó frascos de vidrio con 40 ml de medio de cultivo y 5 repeticiones con 1 microplanta por frasco.

IN VITRO:

1. Medio de cultivo MS semi-sólido modificado en el contenido de vitaminas con las del medio de cultivo C2d, adicionado con AIB (Ácido Indol Butírico) 1.0 ppm.
2. Medio de cultivo MS líquido modificado en el contenido de vitaminas con las del medio de cultivo C2d, con vermiculita como soporte y con inmersión previa de microplantas por algunos segundos en solución de AIB 0.5 ‰.
3. Medio de cultivo MS líquido modificado en el contenido de vitaminas con las del medio de cultivo C2d, con vermiculita como soporte y con inmersión previa de microplantas por algunos segundos en solución de AIB 1.0 ‰.

EX VITRO:

1. Sustrato compuesto de turba y con adición de vermiculita, previo contacto de la base de las microplantas en AIB 1.0 ‰.

EVALUACIONES A REALIZAR AL FINAL DE LA FASE DE ENRAIZAMIENTO:

- Porcentaje de plantas enraizadas (30 días)

- Número de raíces por planta (30 días),
- Longitud de raíces (30 días)

EVALUACIONES A REALIZAR DURANTE LA ACLIMATACIÓN:

- Porcentaje de prendimiento (a los 10 días)
- Vigor de planta (30 días) color de hoja, tamaño de hoja
- Altura de planta (curva de crecimiento) (cada 10 días)

DETALLE DE ACTIVIDADES REALIZADAS

DIA 05 DE AGOSTO

- Reunión de coordinación con los integrantes del Programa de Investigación para determinar las estrategias para resolver los problemas detectados.
- Preparación de medio de cultivo MS para introducción de yemas de papaya. Se preparó dos tratamientos en 20 tubos de vidrio con tapas de papel aluminio:
 - a. Medio de cultivo MS sin modificaciones en su composición y sin adición de reguladores de crecimiento
 - b. Medio de cultivo MS sin modificaciones en su composición adicionado con AIB 0.5 ppm.
- Se utilizó el producto comercial MS Basal Medium de *Phytotechnology Laboratories*, que contiene todos los macroelementos, microelementos y vitaminas según Murashige y Skoog, (1962) y se utiliza en concentración de 4.43 g / litro.

DIA 06 DE AGOSTO

- Preparación de 400 ml de medio de cultivo MS para elongación (MS Basal Medium de *Phytotechnology Laboratories*)
- Preparación de solución stock de AG_3 100 ppm para adicionar al medio de cultivo de elongación.
- Esterilización por autoclave de medio de cultivo para elongación.
- Esterilización por filtración (filtros de 0.20 μm) de solución de AG_3 en cabina de flujo laminar horizontal.
- Adición de solución de AG_3 a medio de cultivo esterilizado por autoclave en cabina de flujo laminar horizontal y dispensado en frascos de vidrio con tapas de celofán sujetadas con elástico.
- Preparación de solución stock de macroelementos para medio de cultivo MS y puesto en refrigeración.
- Preparación de solución stock de microelementos para medio de cultivo MS y puesto en refrigeración.
- Esterilización de tubos con medio MS de inicio con tapa de celofán.

DIA 07 DE AGOSTO

- Preparación de solución stock de vitaminas C2d y puesto en refrigeración.

Composición de vitaminas de dos medios de cultivo utilizados para micropropagación

Vitaminas	Murashige & Skoog (1962) (MS) ppm	Chee & Pool (1987) (C2d) ppm
Myo - Inositol	100.0	10.0
Tiamina	0.1	1.0
Piridoxina	0.5	1.0
Acido nicotínico	0.5	1.0
Glicina	2.0	----

- Siembra de microplantas de papaya en medio de cultivo de elongación en dos tratamientos formulados.
- Introducción de yemas en fase de inicio en tubos de vidrio con medio de cultivo MS y medio MS modificado con vitaminas C2d.

DIA 08 DE AGOSTO

- Preparación de medio de cultivo MS en frascos de vidrio con los tratamientos de enraizamiento 'in vitro'.
- Esterilización de medios de cultivo de enraizamiento.
- Preparación de solución stock de AIB para esterilización por filtración.
- Siembra de microplantas en tratamientos de enraizamiento, con inmersión previa en AIB.

DIA 09 DE AGOSTO

- Preparación y presentación del informe de trabajo de las actividades realizadas.
- Exposición de los trabajos realizados en el laboratorio de micropropagación.

RECOMENDACIONES

1. Aumentar los tratamientos 'in vitro' de enraizamiento con 0.5 ppm, 1.5 ppm y nuevos tratamientos con ANA (Ácido naftaleno acético) en concentraciones de 0.5 ppm y 1.0 ppm en medio de cultivo MS semi – sólido con modificación de vitaminas C2d y con vitaminas MS.
2. Continuar con los tratamientos 'ex vitro' de enraizamiento en turba con vermiculita, aumentando los tratamientos con otras concentraciones de AIB.

3. Realizar subcultivos de microplantas en la fase de introducción en tubos de mayor tamaño como 100 x 25 mm, 120 x 40 mm.
4. En el proceso de transferencia de microplantas se recomienda usar papel roneo cortado por la mitad. El papel deberá ser colocado en una bolsa de polipropileno y sellado con cinta adhesiva, luego puesto en la autoclave para esterilizarlo. Después se utilizará en la cabina de flujo laminar en condiciones asépticas, sobre todo en los procesos de multiplicación y enraizamiento. Con esto se previene la contaminación y absorbe la humedad excesiva de las microplantas y es descartable.
5. Usar pinzas sin ranuras en las puntas para sujetar las microplantas y de 12 a 15 cm de longitud, de preferencia de acero inoxidable. Contar con dos juegos de pinzas y bisturí para poder alternar al momento de cortar y transferir las microplantas.

TRATAMIENTOS PENDIENTES DE PREPARACIÓN

FASE DE ESTABLECIMIENTO

T3: medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento, pH 5.7, sacarosa 3%, agar 0.65% con tapa de celofán.

T4: medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento, pH 5.7, sacarosa 3%, agar 0.8% con tapa de papel aluminio.

T5: medio de cultivo MS con AIB 0.5 ppm, pH 5.7, sacarosa 3%, agar 0.8% con tapa de celofán.

FASE DE ELONGACIÓN

T0: Medio de cultivo MS semi-sólido sin reguladores de crecimiento

T2: Medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con AG₃ 0.5 ppm

T3: Medio de cultivo MS semi-sólido adicionado con AG₃ 1.0 ppm

FASE DE ENRAIZAMIENTO

IN VITRO:

T0: Medio de cultivo MS semi-sólido modificado en el contenido de vitaminas con las del medio de cultivo C2d, sin reguladores de crecimiento.

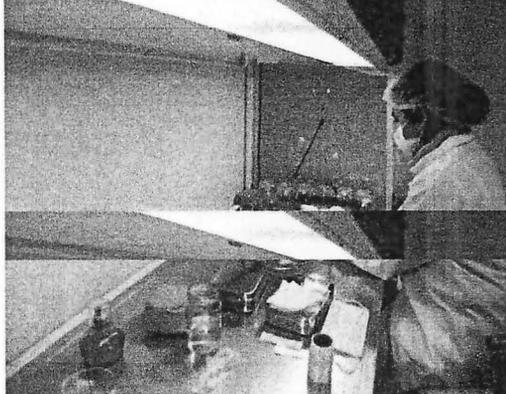
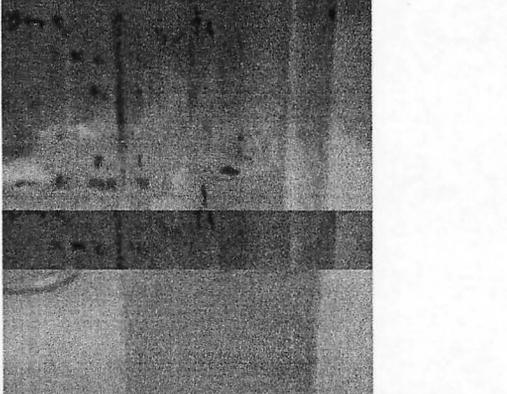
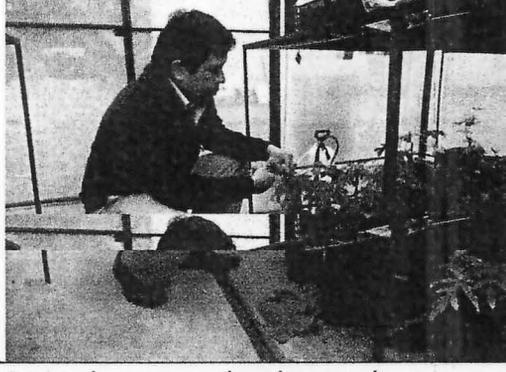
T3: Medio de cultivo MS semi-sólido modificado en el contenido de vitaminas con las del medio de cultivo C2d, adicionado con ANA (Ácido Naftalen Acético) 1.0 ppm.

T4: Medio de cultivo MS semi-sólido modificado en el contenido de vitaminas con las del medio de cultivo C2d, adicionado con ANA (Ácido Naftalen Acético) 0.5 ppm.

EX VITRO:

Sustrato compuesto de turba y con adición de vermiculita, previo contacto de la base de las microplantas en AIB 1.0 %.

ANEXOS DE FOTOS

	
<p>Tratamientos de enraizamiento de papaya con vermiculita y AIB en contacto previo.</p>	<p>Tratamiento de elongación en medio MS con adición de Ácido giberélico.</p>
	
<p>Trasplante de microplantas a medio de cultivo de enraizamiento.</p>	<p>Yema de papaya sembrada en tubos con medio de cultivo MS semi-sólido.</p>
	
<p>Corte de yemas de plantas de papaya de invernadero para introducción 'in vitro'</p>	<p>Acondicionamiento de microplantas en medio de cultivo De elongación en frascos con tapas de celofán</p>

Anexo V. Estudio de causas de disminución de superficie de papayos

Consultora Pedro Hernández

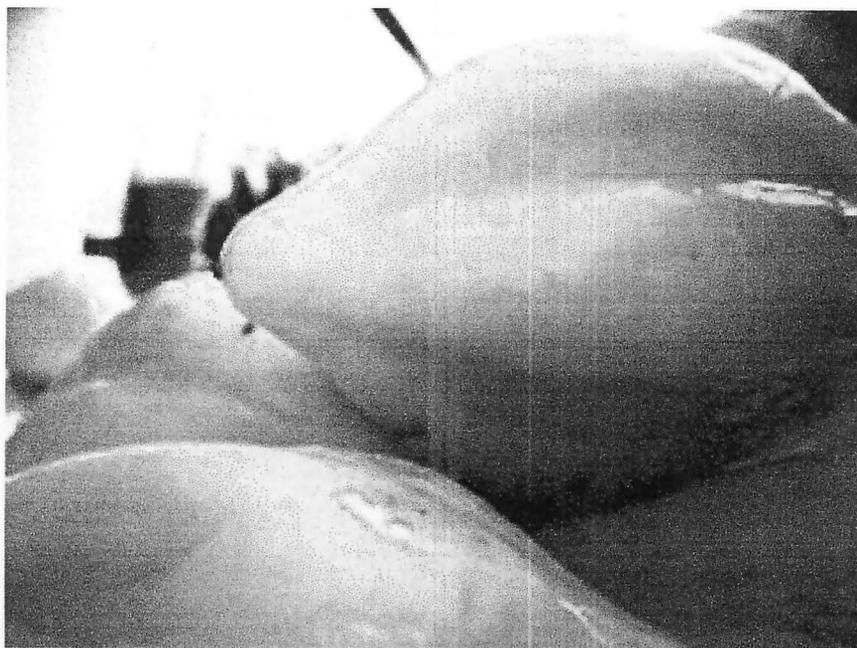


Tabla de contenidos

I.- INTRODUCCIÓN.....	117
II.- METODOLOGÍA	118
2.1 Levantamiento de información secundaria	118
2.2.- Levantamiento de información primaria	118
2.3.- Análisis de la información	118
III.- ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	119
3.1.- Análisis de fuentes información secundaria	119
3.1.2 .-Información censal.....	119
3.1.2 Información catastros frutícolas	122
3.1.3.- Análisis de la información del estudio “Propuesta de desarrollo para el área de influencia del embalse Puclaro, en el Valle de Elqui. CNR-Agraria 1997”.	127
3.1.4 Análisis de la información del estudio “Conformación de Clusters Agroindustriales para la Agricultura Familiar Campesina. Bursátil Asesorías e Inversiones S.A. 2005”	129
3.1.5 Análisis de la información de ODEPA	130
3.1.6 Análisis información exportación papaya. ProChile.....	132
3.1.6. Estudio económico del papayo. INIA.	133
3.2 Conclusiones de la información secundaria.....	133
IV.- Análisis de los resultados de la información primaria	137
4.1 Encuestas y entrevistas a productores y agroindustrias.....	137
4.1.1 Pequeños Productores	138
4.1.2 Productores Grandes	139
4.1.3 Micro Agroindustria	140
4.1.4 Pequeña agroindustria	141
4.1.5 Agroindustria mediana.....	142
4.1.6 Gran agroindustria	144
4.2 Entrevistas a actores públicos.....	145
4.2.1 Entrevista profesional INDAP	145
4.2.2 Entrevista profesional de Sercotec	145
4.2.3 Entrevista profesional ProChile.....	146

<u>4.3 Competitividad del rubro</u>	147
<u>V.- Conclusiones</u>	150
<u>VI.- Propuesta de acciones tendientes al mejoramiento de la competitividad del rubro</u>	152
<u>ANEXO 1</u>	
<u>ANEXO 2</u>	
<u>ANEXO 3</u>	

I.- INTRODUCCIÓN

El presente estudio entrega respuesta a la situación que ha enfrentado el cultivo de papayo a nivel nacional en estas dos últimas décadas, donde se observa una importante disminución de la superficie plantada, pasando de 410 hectáreas a 245, y de 89 a 85 productores, según información proporcionada en los censos agropecuarios de 1997 y 2007.

Para hacer esta tarea, en una primera etapa, se analizó las diversas fuentes de información de carácter secundario, asociadas a la ubicación de la superficie y los productores, como a su vez se indagaron posibles causas de la disminución de la superficie.

En una segunda etapa se procedió a realizar un levantamiento de información suministrada tanto por productores que actualmente desarrollan el cultivo, como por quienes dejaron la actividad en las principales regiones del país. De esta manera se obtuvo una muestra que en forma directa, explica las razones que los llevaron a abandonar el cultivo o a mantenerlo.

Adicionalmente se consultó a distintos integrantes de la cadena de valor de la papaya sobre las expectativas que tenían del mercado, para lo cual se entrevistó a diversas empresas procesadoras de diversos tamaños en el área de las conservas, mermeladas y jugos, entre otras.

Finalmente, se efectuaron entrevistas a actores públicos con el objeto de conocer y comprender la dinámica pasada y actual relativa al mercado de la papaya y los apoyos estatales para el rubro.

Con la información obtenida se procedió a establecer las causas que han llevado a la disminución de superficie y a determinar las expectativas futuras del rubro.

II.- METODOLOGÍA

2.1 Levantamiento de información secundaria

Con el objetivo de conocer la evolución de la superficie de papayo, se procedió a revisar información correspondiente a los censos agropecuarios de 1997 y 2007 y a los catastros frutícolas de las diversas regiones del país, desde la década de los '90 a la actualidad. De igual modo se revisaron los siguientes estudios:

- "Propuesta de Desarrollo para el Área de Influencia del Embalse Puclaro en el Valle de Elqui. Agraria-CNR 1997".
- "Programa de aplicación de tecnología en sistemas de riego y cultivos, Elqui-Puclaro 1era etapa. INIA-JVRE-CNR 2001".
- "Conformación de Clusters Agroindustriales para la Agricultura Familiar Campesina. Bursátil Asesorías e Inversiones S.A. 2005"
- "Evaluación económica del flujo productivo del papayo" INIA Intihuasi 2012.

También se analizó información de ODEPA relativa a precios y volúmenes recepcionados en mercado mayorista de Santiago y de ProChile asociada a las exportaciones de la papaya.

2.2.- Levantamiento de información primaria

A partir de la información de los censos agropecuarios 1997 y 2007 se seleccionó una muestra de productores tanto de quienes habían dejado el rubro como de quienes aún lo mantenían. En ambos casos se consideran empresas que sólo se dedican o dedicaban al cultivo de papaya y otras que realizan o realizaban una actividad combinada de cultivo y agroprocesamiento.

La metodología de la toma de muestras se presenta en anexo 1. Para la entrevista se utilizó una encuesta que abarca ámbitos productivos y de procesamiento de la papaya (anexo 2).

A partir de la información de las encuestas anteriormente mencionadas e información secundaria, se procedió a entrevistar a quienes realizan procesamiento de la papaya, con el objeto de rescatar las tendencias de mercado. En el anexo 3, se presenta un resumen de cada una de las encuestas y entrevistas realizadas.

Finalmente se procedió a entrevistar a profesionales de tres instituciones que tienen o han tenido injerencia en el desarrollo del rubro: ProChile, INDAP y Sercotec.

2.3.- Análisis de la información

En lo que respecta a las fuentes de información secundaria, se describe la información relevante para los fines y conclusiones de este informe. En el caso de la información primaria, para su análisis se procedió a clasificar a los tipos de encuestados, debido a que presentan características disímiles en cuanto a tamaño, niveles de procesamiento y otras características.

A partir del análisis de la información primaria como secundaria se procedió a concluir sobre el probable incremento o disminución de la superficie plantada de papayo este último tiempo.

III.- ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

3.1.- Análisis de fuentes información secundaria

A continuación se presenta la información recabada y el análisis preliminar respectivo proveniente de la revisión de las fuentes secundarias.

3.1.2.-Información censal

De acuerdo a la información de los dos últimos censos agropecuarios, se observa una importante disminución de la superficie de papayo a nivel nacional, con una baja del 40%, pasando de 410 a 245 hectáreas. En cuanto al número de explotaciones, se ha mantenido más o menos constante, con una pequeña disminución en torno al 4%, lo que se ha traducido en que la superficie destinada al cultivo por explotación baje de las 4,6 ha promedio, a las 2,9 (cuadro 1).

Cuadro 1.- Superficie cultivada de papayo a nivel nacional

Año	Hectáreas	Nº Explotaciones	Superficie promedio por explotación
1997	410	89	4,6
2007	245	85	2,9
Disminución	165	4	
% Cambio	- 40%	- 4%	

Fuente: INE 1997-2007

Al analizar en detalle la información de los censos, nos encontramos con que la IV región de Coquimbo es la que reúne la mayor proporción de superficie, aumentando su concentración del 75,2% en 1997 a 77,7% el 2007; le sigue en orden de importancia la V región de Valparaíso que mantiene el segundo lugar en ambos períodos. Las demás regiones presentan una escasa significancia.

En cuanto a los cambios intercensales, las disminuciones más importantes en superficie se produjeron en Coquimbo y Valparaíso, donde disminuyó la extensión del papayo en 117,6 y 60 hectáreas respectivamente, explicando estas dos regiones el mayor cambio entre 1997 y 2007 (cuadro 2).

Cuadro 2. Superficie total regional de papayo 1997 – 2007

Región	Superficie (ha)				Ha de diferencia	% Cambio
	1997	% 1997	2007	% 2007		
I-XV	0,93	0,2%	3,6	1,5%	2,67	287%
IV	307,8	75,2%	190,2	77,7%	-117,6	-38%
V	95,2	23,3%	34,9	14,3%	-60,3	-63%
VI	0	0,0%	0,6	0,2%	0,6	
VII	4,3	1,1%	14,2	5,8%	9,9	230%
VIII	2,1	0,5%	1,2	0,5%	-0,9	-43%
	409,4	100,0%	244,7	100,0%	-164,7	-40%

Fuente: INE 1997-2007

En relación al número de explotaciones, éstas se concentran en 1997 en la IV Región; en cambio en 2007 la mayor agrupación se produce en la VII región del Maule (33%). En cuanto a los cambios en el período intercensal, se observan dos situaciones: por un lado disminuye el número de explotaciones en las regiones donde mayoritariamente se concentra la superficie productiva (IV y V Región) y en cambio en las regiones donde hay escasa superficie en 1997, las explotaciones aumentan 10 años después (cuadro 3).

Cuadro 3.- Número de explotaciones con superficie de papayo según región

Región	Nº explotaciones				Nº Cambio	% Cambio
	1997	% 1997	2007	% 2007		
I-XV	3	3%	13	15%	10	333%
IV	49	55%	27	30%	-22	-45%
V	13	15%	10	11%	-3	-23%
VI	0	0%	3	3%	3	
VII	13	15%	29	33%	16	123%
VIII	11	12%	3	3%	-8	-73%
Total	89	100%	85	96%	-4	-4%

Fuente: INE 1997-2007

El tamaño promedio de las explotaciones en el período intercensal disminuye, pasando de las 4,6 a las 2,9 ha, debido básicamente a que la superficie a nivel nacional se redujo en un 40% ya que el número de productores sólo lo hizo en un 4%. Las explotaciones de mayor tamaño se concentran en la IV y V regiones. Además en la IV región creció el tamaño de las explotaciones, en cambio en la V Región el promedio se redujo a la mitad (cuadro 4).

Cuadro 4.- Superficie promedio por explotación con papayo según región

Región	Superficie promedio explotación de papayo		% Cambio
	1997	2007	
I-XV	0,31	0,28	-11%
IV	6,28	7,04	12%
V	7,32	3,49	-52%
VI	0,00	0,20	
VII	0,33	0,49	48%
VIII	0,19	0,40	110%
Promedio	4,60	2,88	-37%

Fuente: INE 1997-2007

A nivel comunal, en el año 1997 las tres principales comunas en cuanto a superficie eran: La Serena, Coquimbo y La Ligua, las que concentraban el 78% de la superficie. En tanto, las comunas de mayor número de explotaciones eran Coquimbo y la Serena, seguidas de las comunas de Cobquecura y Pelluhue. Para el 2007 las principales comunas en superficie eran La Serena, La Ligua y Ovalle, siendo La Serena y Vichuquén donde se concentraba el mayor grupo de productores. En cuanto a las diferencias comunales entre los censos agropecuarios 1997-2007, se observa que el mayor cambio en la superficie se produce en Coquimbo (-63,9 ha), La Serena (-60,9 ha) y La Ligua (-45,1 ha). Los mayores ascensos se producen en las comunas de Canela y Vichuquén (cuadro 5).

Cuadro 5.- Cambio de la superficie productiva de papayo según comuna 1997-2007.

Región	Comuna	Superficie (ha)		Cambio hA	% Cambio
		1997	2007(*)		
I	Arica	0,93	3,28	2,35	253%
	TOTAL	0,93	3,28	2,35	253%
IV	Canela	5,6	22	16,4	293%
	Coquimbo	89,6	25,7	-63,9	-71%
	La Serena	150,8	90,2	-60,6	-40%
	Ovalle	30,1	28	-2,1	-7%
	Vicuña	31,7	24,3	-7,4	-23%
	TOTAL	307,8	190,2	-117,6	-38%
V	Cabildo	10,8	0	-10,8	-100%
	Isla Pascua	0,4	0,52	0,12	30%
	La Ligua	77,4	32,3	-45,1	-58%
	Limache	0,1	0	-0,1	-100%
	Puchuncaví	6,3	0	-6,3	-100%
	Quillota	0,1	0,3	0,2	200%
	San Antonio	0,1	1	0,9	900%
	TOTAL	95,2	34,12	-61,08	-64%
VII	Chanco	0,2	0	-0,2	-100%
	Pelluhue	3,1	1	-2,1	-68%
	Vichuquén	1	8,6	7,6	760%
	Licátén		4,6	4,6	0%
	TOTAL	4,3	14,2	9,9	230%
VIII	Cobquecura	2,1	1,2	-0,9	-43%
	TOTAL	2,1	1,2	-0,9	-43%
Total general		410,33	243,0	-167,3	-41%

Fuente: INE 1997-2007 (*) Se produce diferencia con 2 ha con los resultados a nivel Nacional del Censo Agropecuario.

En relación al cambio de número de explotaciones, la mayor disminución se produce en La Serena (-11 explotaciones) y el mayor aumento en Vichuquén con 13 (cuadro 6).

Cuadro 6.- Cambio del N° de explotaciones dedicadas al papayo según comuna 1997-2007.

Región	Comuna	N° Explotaciones		N°	%
		1997	2007(*)		
I	Arica	3	11	8	267%
	TOTAL	3	11	8	267%
IV	Canela	3	3	0	0%
	Coquimbo	12	4	-8	-67%
	La Serena	27	16	-11	-41%
	Ovalle	2	1	-1	-50%
	Vicuña	5	3	-2	-40%
	TOTAL	49	27	-22	-45%
V	Cabildo	2		-2	-100%
	Isla Pascua	3	4	1	33%
	La Ligua	3	2	-1	-33%
	Limache	1		-1	-100%
	Puchuncaví	2		-2	-100%
	Quillota	1	2	1	100%
	San Antonio	1	1	0	0%
TOTAL	13	9	-4	-31%	
VII	Chanco	1	0	-1	-100%
	Pelluhue	10	5	-5	-50%
	Vichuquén	2	15	13	650%
	Licantén	0	9	9	
	TOTAL	13	29	16	123%
VIII	Cobquecura	11	3	-8	-73%
	TOTAL	11	3	-8	-73%
Total general		89	79	-10	-11%

Fuente: INE 1997-2007 (*) Se produce diferencia de 6 explotaciones con los resultados a nivel Nacional del Censo Agropecuario.

3.1.2 Información catastros frutícolas

Los catastros frutícolas presentan diferentes fechas de elaboración, de acuerdo a la región que corresponda, como se observa en el siguiente cuadro. A continuación se presenta un análisis de las principales regiones productoras de papayo (cuadro 7).

Cuadro 7.- Fechas de publicación de catastros frutícolas.

Año Catastro	REGIÓN				
	IV	V	VI	VII	VIII
1992	X				
1995		X			
1996			X		
1999	X				
2000					X
2001				X	
2002		X			
2003			X		
2005	X				
2006					X
2007				X	
2008		X			
2011	X				

Fuente: CIREN.

- **Región de Coquimbo**

- **Superficie**

El análisis realizado comprende a los catastros que van desde 1992 a 2011. A partir de esta información se observan ciclos distintos en cuanto a la superficie y número de explotaciones.

Es así que entre 1992 y 1999 aumenta la superficie de papayo en torno a un 72% (159 ha); en cambio entre 1999 y 2005 se observa un drástico descenso de la superficie en 212 hectáreas (-57%).

Finalmente entre 2005 y 2011 la superficie ha tendido estabilizarse con un pequeño ascenso en 2011 de 14 ha.

En cuanto al número de explotaciones, éstas descendieron entre 1992 y 2005 en un 70%, teniendo un pequeño repunte en 2011. En cuanto al tamaño promedio de la superficie destinada a papayo por explotación, en 1992 existían pequeñas superficies en tono a las 3 ha, en cambio, a partir de 1999 han tendido a centrarse en torno a las 7 ha de papayo por productor (cuadro 8).

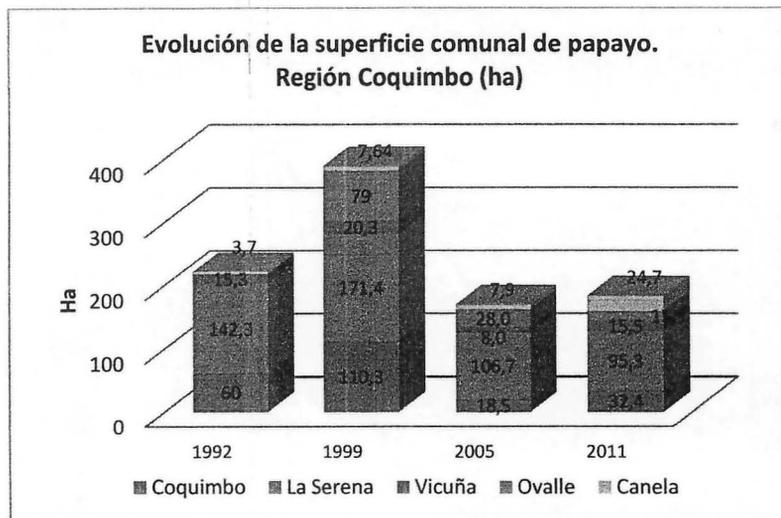
Cuadro 8.- Evolución de la superficie, Nº de explotaciones y tamaño promedio de la explotación dedicada a papayo. Región de Coquimbo.

Año	Superficie	Nº explotaciones	Tamaño promedio x productor/HA
1992	222	78	2,84
1999	381	51	7,47
2005	169	24	7,04
2011	183	28	6,54

Fuente: Catastros Frutícolas IV Región.

Al observar por comuna la evolución de la plantación de papayo en la región de Coquimbo, entre 1999 y el 2005 en todas las comunas desciende la superficie, a excepción de la comuna de Canela que se mantiene. De todas las comunas la que presentó mayor descenso es la comuna de Coquimbo que disminuyó en 90 hectáreas y La Serena que decreció en casi 60 hectáreas. Posteriormente en el 2011 se observan un ascenso en Coquimbo, Vicuña y Canela; La Serena continúa su disminución iniciada en 1999 llegando a 95 ha (gráfico 1).

Gráfico 1

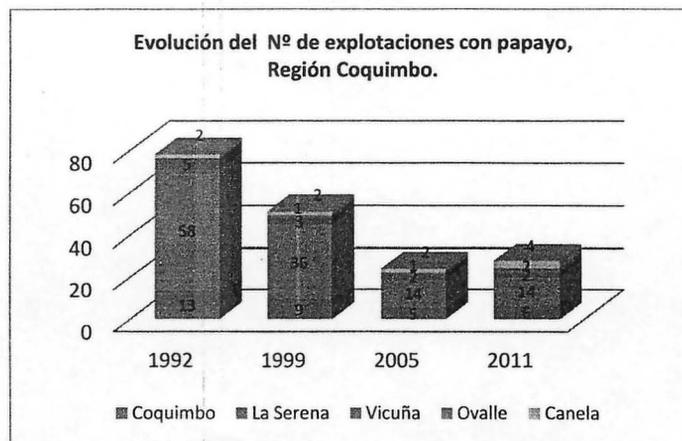


Fuente: Catastros Frutícolas IV Región CIREN.

○ **Nº de explotaciones**

En cuanto al número de explotaciones por comuna, La Serena es la que concentra mayor número en los distintos catastros, sin embargo, muestra una significativa disminución con una reducción de 44 explotaciones entre 1992 y 2005. En orden de importancia le sigue la comuna de Coquimbo, observándose también una reducción en el número de explotaciones, al igual que la comuna de Vicuña. La única que aumenta es la comuna de Canela (gráfico 2).

Gráfico 2



Fuente: Catastros Frutícolas IV Región CIREN.

○ **Tipo de Riego**

Es posible observar que mayoritariamente la superficie plantada de papayo en la región de Coquimbo utiliza sistemas de riego de alta eficiencia (microaspersión y goteo), observándose una escasa

superficie con sistemas como el surco, el cual ha ido descendiendo de las 45 ha en 1999 a 7 ha en 2011 (cuadro 9).

Cuadro 9.- Evolución de los sistema de riego de las plantaciones de papayo. Región Coquimbo.

HA	Goteo	Microaspersión	Surco	Otro	TOTAL
1999	333,44	1,75	45,04	0,72	380,95
2005	151,8		9,1		160,9
2011	165	11,4	7		183,4

Fuente: Catastros Frutícolas IV Región CIREN.

○ Producción

La disminución de la superficie ha provocado una baja significativa de la producción. Es así que en 1999 se producían 4.382 toneladas en la región de Coquimbo, en cambio en 2005 se redujo a casi 3.000 toneladas y en 2011 cayó a 2.353 ton. (cuadro 10).

Cuadro 10.- Evolución de la producción de papayas región de Coquimbo.

ITEM	1999	2005	2011
Superficie Total (ha)	381	169	183
Nº explotaciones	51	24	28
Superficie en producción	214	136,4	171
% Informó Producción	61,4%	75,7%	67,6%
Producción Informada (Ton)	2.461	2.407	2.199
Producción total estimada (Ton) (*)	4.382	2.982	2.353

Fuente: Catastros frutícolas IV Región, Ciren. (*) Se llevó a 100% la producción informada por los productores.

En cuanto al destino de la producción informada, para la región de Coquimbo, el mercado interno es el que tiene mayor significancia, con un escaso nivel de exportación y de carácter puntual, también se observa que la agroindustria tiene relevancia aunque empieza a perder importancia (cuadro 11).

Cuadro 11.- Evolución del destino de la producción informada de papayo Región Coquimbo.

ITEM	1999	2005	2011
Producción Informada (Ton)	2.461	2.407	2.199
Producción total estimada (Ton) (*)	4.382	2.982	2.353
Exportación (%)	0	0,6	0
Mercado Interno (%)	46,1	54,4	75,7
Agroindustria (%)	53,7	31,9	24,3
Deshecho (%)	0,3	13,1	0

Fuente: Catastros frutícolas IV Región, Ciren.

(*) Se llevó a 100% la producción informada por los productores.

○ **Rendimiento**

En torno al rendimiento promedio, se observa que ha ido descendiendo, la respuesta a esta situación puede deberse a que en 1999 se observa que un 56 % de la superficie plantada, estaba en producción; mientras que el resto estaba en formación o iniciando producción. En 2005, las plantaciones estaban en período de plena producción (6 años de plantación), pero existía una escasa superficie en formación. El menor rendimiento del 2011, se debería a la importante cantidad de superficie en producción decreciente, equivalente al 34% (cuadro 12).

Cuadro 12.- Evolución del rendimiento de papaya región Coquimbo.

Rendimiento	1999	2005	2011
Ton/ha	18,1	17,1	16,4

Fuente: Catastros frutícolas IV Región, Ciren.

● **Región de Valparaíso**

○ **Superficie y número de explotaciones**

En el período analizado que va desde 1995 a 2008, se observa un descenso de la superficie plantada, pasando de las 88,6 ha en 1995 a 33,8 en 2008 (-54,8 ha); también se destaca un descenso importante de las explotaciones pasando de 15 a 3, en el mismo período. Finalmente en cuanto a la superficie promedio por explotación ésta aumenta (cuadro 13).

Cuadro 13.- Evolución de la superficie, nº explotaciones y superficie promedio por explotación papayo región de Valparaíso.

Año	Ha	Nº Explotaciones	Promedio ha por explotación
1995	88,6	15	5,9
2002	43,7	2	21,9
2008	33,8	3	11,3

Fuente: Catastros frutícolas V Región, Ciren.

Finalmente, la comuna que concentra la totalidad de la superficie en los tres catastros, es La Ligua.

○ **Producción y rendimiento**

Aunque la superficie productiva ha tenido un descenso, la producción ha aumentado, pasando de las 1.107 ton a las 1.659 ton; se destaca el importante aumento del rendimiento, de 25 ton/ha a las 50 ton/ha¹.

Cuadro 14.- Producción y rendimiento de la superficie de Papayo, Región de Valparaíso.

Ítem	2002	2008
Superficie Total (ha)	43,7	33,8
Nº explotaciones	2	3
Superficie en producción	43,63	33,27
% informó producción	100%	77,70%
Producción informada	1.107	1.106
Producción total estimada (*)	1.107	1.659

Fuente: Catastros frutícolas V Región, Ciren. (*) Se llevó a 100% la producción informada por los productores.

¹ El rendimiento de 50 ton/ha está muy por sobre lo que muestra la literatura analizada, por lo cual presenta escasa validez.

Ambos catastros indican que el 100 % de la producción de papayas, se destina a la agroindustrias en el mercado nacional

o **Método de riego**

En 2008 se informa que 11,3 ha son regadas por microaspersión y 21,97 ha con riego por goteo.

3.1.3.- Análisis de la información del estudio “Propuesta de desarrollo para el área de influencia del embalse Puclaro, en el Valle de Elqui. CNR-Agraria 1997”.

Este estudio analizó el mercado de la papaya, estimando la superficie, producción, principales actores, entre otros, de la provincia del Elqui; principal zona productora del país del papayo. A continuación se analizan los principales antecedentes del estudio.

• **Superficie, producción, destino, procesadores y productores**

De acuerdo al análisis realizado en 1997, en la provincia de Elqui se producían 6.613 ton de papaya en aproximadamente 345 ha, con un rendimiento promedio de 19 ton/ha. Un 13% se destinaba a venta en fresco y el 87% restante a la agroindustria (cuadro 15).

Cuadro 15.- Producción, superficie, destino y principales actores procesadores de papaya, Provincia de Elqui Región Coquimbo.

Tipo	Producto	Empresa	Volumen procesado (ton)	Hectárea	% ha
Agroindustria	Empresas procesan productos artesanales: jugos, confites, miel, mermelada y otros.	Manuel Baeza Jopia.	2.700	135	39%
		Cruz Ossandon			
		Papayas Yáñez			
		Otras			
	Pulpa y cubitos para industria de helados y yogurts	Soprole y Nestlé	200	10	3%
	Pulpa para mermelada	Malloa y Wasil	200	10	3%
	Papaya al jugo (tarros)	Pentzke	450	25	7%
	Papayas al jugo y otros	Saturno (*)	2.200	40	12%
		Cobert (*)			
		La Serena (*)			
Olivier (*)					
Total		5.750	300	87%	
Venta en Fresco	Fresco		863	45	13%
TOTAL			6.613	345	100%

Fuente: Agraria – CNR 1997. (*) La superficie informada corresponde a producción propia.

Adicionalmente, el estudio establece que la agroindustria artesanal regional procesa el 39% de la superficie de papayo, seguida por la agroindustria regional de mayor tamaño que procesa el 36% : Saturno, Cobert, La Serena y Olivier; la diferencia es asumida por la agroindustria fuera de la región, la cual procesa helados, yogurts, papayas en tarro y mermeladas, que en total representan el 13% de la superficie.

En cuanto al número de productores en la provincia, establece que son aproximadamente 10 productores grandes con plantaciones de 10 a 60 ha y cerca de 100 productores con plantaciones de hasta 0,5 ha.

- **Mercado de la papaya**
 - **Mercado interno**

El estudio indica que el mercado de la papaya es principalmente nacional, siendo comercializada en un 87 % para la agroindustria y minoritariamente en fresco. La producción en fresco se realiza principalmente a comerciantes de supermercados y ferias locales, por lo general sin intermediarios. Los volúmenes transados en cada oportunidad son pequeños, normalmente inferiores a una tonelada.

El mercado en fresco se encuentra limitado pues la papaya tiene para el consumidor el carácter de fruta exótica que no es para consumo diario; además el fruto no puede ser consumido directamente sino que requiere un proceso de pelado y cocido. Finalmente este mercado presenta una gran inestabilidad en sus precios que desestimula a los productores. La explicación de esta situación se encuentra más bien en la inestabilidad de la oferta que en la demanda.

En cuanto a la comercialización de la papaya como insumo para la agroindustria, del total del volumen que se procesa, cerca del 39% se emplea en producción artesanal, en muchos casos con técnicas muy elementales e infraestructura rudimentaria, donde se elabora principalmente jugo o néctar, papayas confitadas, mermelada y miel. Le siguen las agroindustrias regionales de mayor tamaño, que procesan el 33% las que se dedican principalmente a las papayas al jugo. Finalmente la industria láctea como Soprole y Nestlé adquieren en las plantas agroindustriales locales pulpa y cubitos de papaya, para la elaboración de yogurt y helados, la pulpa también es adquirida para la elaboración de jugos y mermeladas por industrias como Watts y Malloa y la empresa Pentzke que compra anualmente 450 toneladas para la elaboración de papayas al jugo en tarro, el proceso de adquisición se realiza en operaciones de compra a mercado abierto, de acuerdo a su volumen de necesidades y estándares, en el momento que lo requiere.

- **Mercado externo**

En torno a las exportaciones se destaca que éstas se originaron en forma aislada en 1990 a través del envío de muestras; en 1996 se crea la sociedad exportadora Golden Fruit, con el apoyo de Corfo y ProChile, iniciando exportación a España y envío de muestras a Japón y USA.

- **Rentabilidad**

De acuerdo a los antecedentes de este estudio se observa muy atractivo el cultivo de papaya para las zonas bajas sin heladas de la provincia de Elqui, ya que el estudio muestra rentabilidades anuales promedios por hectárea en pesos de 1997, de \$ 2,14 millones para el papayo, versus, para las mismas zonas agroclimáticas, \$ 1,04 millones para el limón; hortalizas de invierno \$ 1,3 – 2,0 millones/ha y papa temprana 1,6 a 1,9 millones/ha.

3.1.4 Análisis de la información del estudio “Conformación de Clusters Agroindustriales para la Agricultura Familiar Campesina. Bursátil Asesorías e Inversiones S.A. 2005”

Este documento analiza la agroindustria regional y sus proyecciones con potenciales encadenamientos de productores procedentes de la agricultura familiar campesina, para lo cual a través de un trabajo de entrevistas analiza la producción y superficie de la agroindustria regional de papayo de tamaño medio.

- **Superficie y producción**

Al analizar las principales agroindustrias de tamaño mediano a nivel regional, se observa que procesaban aproximadamente el 45% de la superficie regional de papayo en 2005.

Cuadro 16.- Producción y superficie estimada de la agroindustria de papayo a nivel regional 2005

Empresa	Ton Año producción	Superficie estimada de proceso
Papayas Cobert	56,5	2,8
Papayas Olivier	228	11,4
Papayas Yáñez	30	1,5
Papayas Saturno	700	35,0
Papayas Diaguíta	240	12,0
Papayas José Izquierdo	251	12,5
Total	1.505	75,3

Fuente: Bursátil Asesorías e Inversiones S.A. 2005

- **Mercado**

El estudio indica que la papaya chilena es un fruto de agradable sabor y aroma, que se consume sólo después de ser procesada, a diferencia de la papaya tropical que se consume en estado natural. Siendo una de las principales ventajas de la papaya sus alternativas de comercialización como son: papayas en conservas (al jugo o en almíbar), pulpa de papayas, mermeladas, jarabe, néctar y confitados.

El estudio además indica que la industria de papaya requiere altos niveles de inversión, siendo su atractivo relativamente escaso, dada su baja rentabilidad. Por ende la posibilidad de ingreso de actores nuevos es reducida. También dentro de sus desventajas se mencionan: inestabilidad en los precios de la papaya, falta de conocimiento del fruto en el exterior, no es un producto de consumo masivo, escasez de materia prima, existencia de una oferta de productos sustitutos masivos en el mercado y de menor valor (duraznos al jugo por ejemplo) y se requiere una fuerte inversión en marketing para aumentar el consumo.

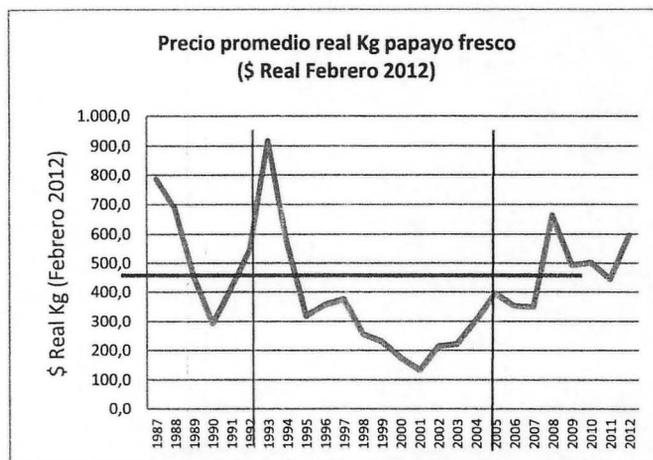
Finalmente el estudio concluye: “Como consecuencia de un largo período de precios bajos de la papaya, se produjo una disminución sostenida de la superficie plantada, lo que ha provocado que las diferentes agroindustrias tengan problemas de disponibilidad de materia prima para procesar”.

3.1.5 Análisis de la información de ODEPA

- **Precios mercado interno**

Al analizar la evolución de los precios promedios anuales transados en el mercado mayorista de Santiago de la fruta fresca, es posible distinguir que el precio promedio anual entre 1987 y los primeros meses del 2012, es de \$ 418 pesos el kg. en sus diversos calibres (\$ real a febrero de 2012). Dentro de este panorama es posible distinguir tres períodos: el primero de 1987 a 1994 con precios en general más altos que el promedio y una gran inestabilidad; un segundo período de 1995 al 2007 que se caracteriza por precios menores al promedio con valores que cayeron a menos de \$ 150 pesos el kg en el año 2001; y el tercer período con precios que van nuevamente al alza en relación al promedio de los 25 años (Gráfico 3).

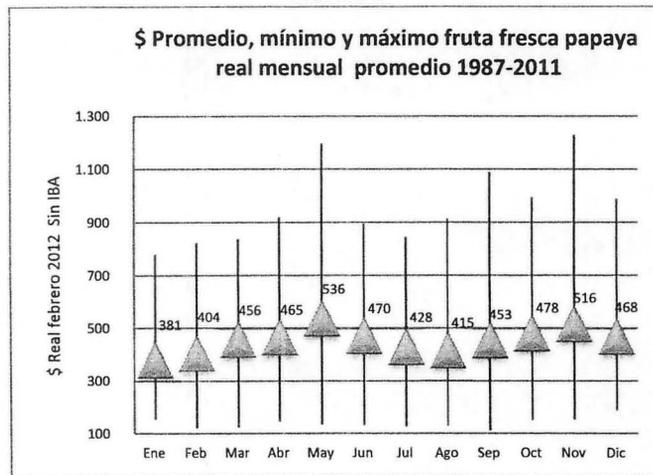
Gráfico 3



Fuente: ODEPA

En relación a los precios promedios mensuales de los últimos 25 años, se observa que en mayo y noviembre se presentan los mayores precios, en cambio enero y febrero son los de menor valor. Esto obedece al exceso de oferta en esta época del año. También se destaca una gran variabilidad mensual de los precios, siendo en verano la mayor variación v/s mayo y noviembre que presentan menor diferencia (gráfico 4).

Gráfico 4

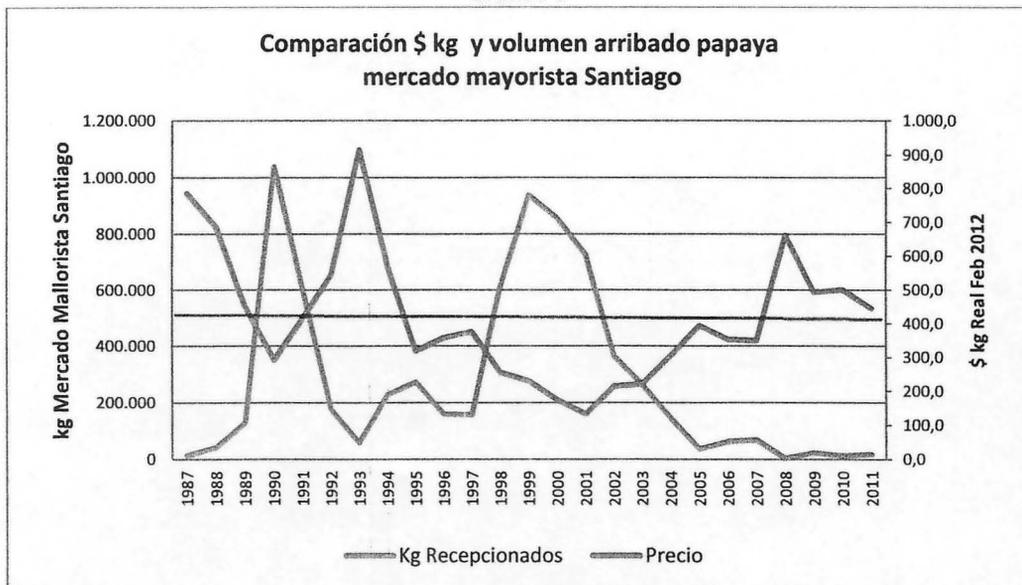


Fuente: ODEPA

- **Volúmenes transados mercado mayorista de Santiago**

Existe una importante variabilidad anual de los volúmenes transados, existiendo una clara correlación entre los volúmenes transados y el precio (gráfico 5). Las oscilaciones de los volúmenes transados, obedecen al aumento o disminución de producción de papaya, producto del incremento o detrimento de la superficie del papayo, no siendo atractivo vender en el mercado mayoristas de Santiago en períodos de buenos precios; en cambio en los períodos de exceso de fruta, bajos precios y escasos compradores, el mercado mayorista se transforma en una alternativa viable para transar la fruta.

Gráfico 5



Fuente: Odepa.

3.16 Análisis información exportación papaya. ProChile.

- **Papayas procesadas**

Las exportaciones de papayas procesadas se engloban dentro de la Glosa N° 2008999000 "Las demás frutas u otros frutos y demás partes comestibles de plantas preparadas o conservadas, incluso con adición de azúcar u otro edulcorante o alcohol". Sin embargo esta glosa también incluye otras frutas, por lo cual, para los efectos de este informe, sólo se contabilizó a las empresas que exportan papaya (cuadro 17)

Cuadro 17.- Evolución de las exportaciones de papaya procesada por empresa Chile.(US\$/FOB)

Empresa	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Tamaya Gourmet	187.745	217.077	38.404	54.390	83.234	127.511
Agrocomercial Frutos De Lipimávida S.A.	26.520	12.480	32.572	14.730	17.888	19.363
Agropedegua			-	13.843	13.009	10.500
Agroindustrial Serena		3.491				
Soc. Aggícola Nova Verde (Guallarauco)	45.796	7.429	5.149	8.604	8.394	7.430
Otros			12.895		21.305	
TOTAL	260.061	240.477	89.020	91.567	143.830	164.804

Fuente: Prochile.

De acuerdo a los antecedentes de ProChile, entre el 2006 y 2011, 5 empresas se dedicaron a la exportación de papaya, con volúmenes que han ido descendiendo en el período analizado hasta el 2008 y con ascensos moderados entre el 2009 y 2011, exportándose en la actualidad US\$/FOB 164 mil dólares, siendo Tamaya Gourmet la principal empresa productora y exportadora. Dentro de los productos exportados se encuentran particularmente papayas en conserva, actualmente se busca introducir en el mercado Norteamericano el jugo de papaya, por parte de Tamaya Gourmet.

Antes de 2006 existió un "Comité de Papaya", cuyos integrantes realizaron un análisis retrospectivo de las exportaciones entre 1996-2001. "A pesar de que la papaya ha logrado entrar en algunos mercados, es un proceso lento y difícil. Hay que tener claro que, aunque es factible de hacer y es rentable, también es algo muy a largo plazo", explica Alex Sawadi, product manager del Comité.

El análisis de ProChile explica también que una de las dificultades que ha frenado las exportaciones es el alto precio del producto (papayas al jugo), el que cuesta tres o cuatro veces más que la piña o el durazno en conserva; el otro punto fundamental es la promoción: "Esto es fundamental para la venta y el conocimiento del producto, entre los potenciales consumidores. Por eso es importante invertir en catálogos y degustaciones, para entregar la mayor información posible", dice Alex Sawadi

En relación a la exportación de papaya, Sawadi asegura que "Más que rentable es una obligación. El mercado nacional está saturado y es muy limitado. Esta es la única manera de mantener a las empresas a flote, las que muchas veces son pequeñas productoras"².

- **Papayas en fresco.**

En lo que respecta a exportación en fresco ha sido escasa y muy esporádica.

3.1.6. Estudio económico del papayo. INIA.

Para analizar la rentabilidad del papayo se realizó un análisis de ingresos y costos de dos importantes productores de la IV y V regiones en el 2012, a modo de ejemplo se presenta los resultados de un productor de Coquimbo (cuadro 18).

Cuadro 18.- Flujo neto cultivo papayo, Productor Región de Coquimbo (Millones de \$).

ITEM	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8
Ingresos	0	0	5,2	9,8	10,4	9,8	7,5	6,6	2,6
Costos		0,87	1,2	2,1	2,6	2,5	2,3	2,1	1,8
Inversión	-3								
Ingresos-costos		-0,87	4,0	7,7	7,8	7,3	5,2	4,5	0,8
Flujo neto	-3	-0,87	4,0	7,7	7,8	7,3	5,2	4,5	0,8

Fuente: INIA 2011

Se estimó un precio de \$ 260 pesos el kg como promedio, lo cual arroja un VAN al 12% de 19 millones y un TIR de 89%.

3.2 Conclusiones de la información secundaria

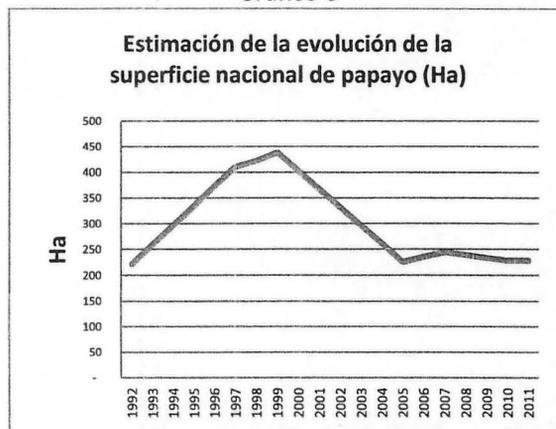
- **Evolución de la superficie nacional**

Las diversas fuentes analizadas establecen que hubo un crecimiento importante en la superficie de papayo en la década de los noventas, llegando su peak en 1999 con 450 ha plantadas³; posteriormente hay un descenso importante de la superficie llegando en 2005 a 226 ha, la que se ha mantenido al presente año en torno a las 220 ha. A partir de la información de los censos y catastros frutícolas se procedió a realizar una estimación de la evolución de la superficie de papayo a nivel nacional entre 1992 y 2011 (gráfico 6).

² Se refiere al período inicio de la década del 2000 donde se observan los menores precios de la papaya en el mercado nacional.

³ Estimación CIREN 1999

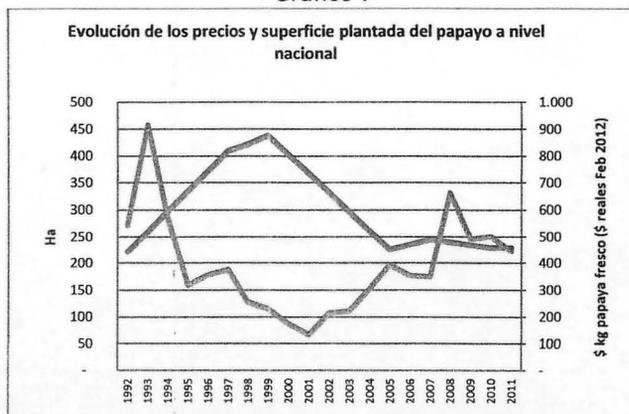
Gráfico 6



Fuente: Elaboración propia en base información Censos Agropecuarios y Catastros frutícolas.

Al relacionar los precios de la fruta (Mercado Mayorista Santiago. ODEPA) con la superficie plantada, se observa claramente una relación de los precios de la fruta con el área plantada. Es así que inicialmente hubo una superficie de 230 ha y precios altos de la fruta, esta condición hizo aumentar la superficie dada las perspectivas económicas que mostraba el cultivo en cuanto a su rentabilidad, como lo expuesto en el estudio de Agraria de 1997, que indicaba valores superiores de la papaya en comparación con hortalizas y otros frutos como el limón (gráfico 7).

Gráfico 7



Fuente ODEPA y Autor 2012.

Sin embargo, la situación empieza a cambiar con un descenso importante de la superficie, debido a una significativa baja de los precios alcanzando su menor valor en 2001, lo que se explicaría dado que el mercado no soportó mayor cantidad de fruta, como lo explica Alex Sawadi, product manager del Comité de Papaya en 2001: “El mercado nacional está saturado y es muy limitado. La exportación es la única manera de mantener a las empresas a flote, las que muchas veces son pequeñas productoras”. Esta situación redundó en una disminución importante de la superficie llegando en 2005 a los mismos valores de 1992, lo que coincide con el estudio de cluster realizado en 2004, donde varias empresas

agroindustriales manifiestan que existe baja cantidad de materia prima para el procesamiento en relación a períodos de finales de la década de los '90. El estudio agrega: "Como consecuencia de un largo período de precios bajos, se produjo una disminución sostenida de la superficie plantada, lo que ha provocado que las diferentes agroindustrias tengan problemas de disponibilidad de materia prima para procesar".

Finalmente en los años 2006 y 2007 la superficie lentamente empieza a crecer, gracias a los mejores precios de la fruta a partir de 2005, pero en 2007 esta tendencia se revierte ya que las heladas de ese año afectaron a un número importante de papayos, arrancando en algunos casos los huertos. "Han sido pérdidas altísimas, sólo volver a sembrar significa \$ 4 millones por hectárea, además hemos perdido clientes por no cumplir con nuestros compromisos", indicó en su momento Marino Ruiz de la Sociedad Agroindustrial Saturno⁴.

En cuanto a las comunas que sufren reducciones más drásticas de superficie éstas son La Serena y Coquimbo, lo que es coincidente con ambas fuentes, ya que estas zonas concentran la mayor superficie de producción.

- **Evolución de las explotaciones.**

Al analizar la disminución del número de explotaciones entre 1997 y 2007, se pueden observar dos fenómenos: las regiones con gran superficie productiva como la IV región (78% de la superficie nacional en 2007) reduce en forma importante las explotaciones (-22), tendencia coincidente con la información de los catastros frutícolas.

Sin embargo, se observa discrepancias en el número de explotaciones, lo que puede deberse a que los catastros son realizados en años distintos al censo, por lo tanto es posible pensar que esta diferencia se deba a esta razón. Sin embargo, lo más probable, es que los catastros incluyen a toda superficie mayor de 0,5 ha productiva, en cambio los censos consideran superficies menores, por lo cual esta última fuente está integrando un mayor número de explotaciones pequeñas dedicadas al papayo.

Finalmente, en las regiones I – XV y VII con escasas superficies, tanto el área dedicada al rubro como las explotaciones aumentan, por tanto, con la información disponible no se pueden sacar conclusiones taxativas, sin embargo hipotéticamente esta situación se debe a que el mercado de estas zonas está orientado al turismo, por ejemplo Frutos de Lipimávida (comuna de Vichuquén, provincia de Curicó de la VII región), que comercializa sus productos en una pequeña sala de ventas a un costado de la planta de proceso, siendo su período de mayores ventas el de la época de verano, cuando llegan turistas de las cercanías del lago Vichuquén y de los balnearios de Iloca y Duao⁵.

⁴<http://www.chilepotenciaalimentaria.cl/content/view/212960/Escasez-de-papayas-afectaria-elaboracion-de-jugos-y-yogures.html>

⁵ http://www.comparte.cl/comparte/productos_agricolas/Fichas%20Productores%20Pdf/Frutos%20de%20Lipimavida.pdf

- **Tamaño de las explotaciones.**

Al analizar la información de los catastros y el censo parece haber una contradicción en el promedio general, ya que el censo muestra que la superficie por explotación disminuye en el tiempo (cuadro 4); en cambio en el catastro, aumenta. Sin embargo, al considerar sólo la región más importante en superficie (IV Región) ambas fuentes muestran coincidencia. Por lo tanto, esta aparente contradicción se produce ya que el censo considera a productores de menor tamaño, los cuales han aumentado, a diferencia de los catastros que toman productores de papayo sobre las 0,5 hectáreas.

Si se hace una retrospectiva del tamaño de las explotaciones de acuerdo al catastro frutícola de la IV Región desde el 1992 a 2011, inicialmente en la región de Coquimbo una explotación tenían 2,8 ha de papayo, en cambio hoy el tamaño es de 7 ha por explotación. Una de las razones que explicaría esto, es por un lado, que los pequeños productores no pudieron resistir una baja de precios y por otro lado que las agroindustrias tendieron a realizar contratos con productores de mayor tamaño, lo que les permitió salvar de mejor manera la situación de menores precios ya que pudieron vender su fruta, lo cual es expresado por uno de los procesadores entrevistados en el estudio de Bursátil Asesorías e Inversiones S.A. 2005: “Los pequeños agricultores requieren dinero inmediato, con el proveedor grande se puede negociar a plazo” .

- **Producción estimada**

Al analizar las distintas fuentes, queda claro que se disminuye la producción especialmente producto del descenso de la superficie plantada en la IV Región, pasando de las 6.613 ton/anuales en 1997 - CNR-Agraria 1997- a 2.353 toneladas producidas en 2011- Catastro Frutícola Región Coquimbo 2011-. También esto es producto de la disminución del rendimiento el cual en 1999 era de 18,1 ton/ha, en 2005 17,1 ton/ha, y en 2011 de 16,4 Ton/ha.

- **Mercados**

En este aspecto todas las fuentes coinciden que el mercado interno es el de mayor relevancia con muy escasa participación de la fruta en los mercados externos, aunque este ha ido diversificándose en número de países y productos exportados.

Respecto al destino de la fruta en el mercado interno, existen contradicciones. Es así que el estudio Agraria-CNR 1997, manifiesta que de la producción de la región de Coquimbo, el 13% aproximadamente se comercializa en fresco y el 87% se destina a la agroindustria, situación distinta a la que indica CIREN, donde a la agroindustria le correspondió en 1999 procesar el 53,7% de la fruta, en 2005 el 32% y en 2011 el 24%. Ante esta divergencia se plantea la posibilidad que en el estudio de Ciren, se haya producido un error en el procesamiento de la respuesta, que inhabilitan esta fuente como referencia.

Otro aspecto relevante que muestran los estudios, es que a partir de la papaya la agroindustria elabora una serie de productos como papayas al jugo, néctar, mermeladas, papayas confitadas, miel, etc., las cuales son comercializadas por distintos tamaños de empresas (artesanal, mediana y gran agroindustria nacional). Siendo para el estudio de Agraria, la más relevante la agroindustria artesanal,

en cambio en el estudio de Bursátil se estima de mayor importancia la agroindustria de tamaño medio, que procesaba el 45% de la superficie regional de papaya en 2005.

IV.- Análisis de los resultados de la información primaria

4.1 Encuestas y entrevistas a productores y agroindustrias.

Para el análisis de los resultados, entendiendo que existen categorías y tipos de empresas, los encuestados se clasificaron en las siguientes categorías:

Productores venta en fresco:

- Productores pequeños ($\leq 5,0$ ha)
 - Oscar León Pinto (La Serena)
 - Ermanno Zandonnai Roberti (Coquimbo)
 - Hugo Barraza Bravo (La Serena)
 - Renato y Otros Baldesari Leita (Coquimbo y dejó el rubro).

- Productores grandes (≥ 15 ha)
 - José Antonio Valdés (La Serena)
 - Fabrizio Bortollotti (Coquimbo)
 - Eduardo Francisco Rosales Balanda (Coquimbo. Ya abandonó el rubro)

Agroindustria.

- Microempresas:
 - Papayas VyP. (La Serena)
 - Papayas Valle del Sol (La Serena)
 - Agrocomercial de Frutos Lipimávida. (Vichuquén)
 - Papayas el Encanto del Valle (La Serena)
 - Papayas Quela (La Calera V Región)
 - Conservera Guzmán (La Serena y dejó el Rubro)

- Pequeñas empresas:
 - Papayas Yañez. (La Serena)
 - Cooperativa Agrícola y Pisquera San Carlos Limitada -Papayas Olivier- (Vicuña)
 - Sociedad Agroindustrial Saturno Limitada (La Serena)
 - Huentelauquén (Canela)
 - José Francisco Izquierdo Zomosa. (La Serena y abandonó el Rubro).
 - Soc. Agrícola Bertolla e Hijos -Papayas Cobert- (La Serena y abandonó el rubro).

- Medianas empresas
 - o Tamaya Gourmet y Agrícola Tamaya (Ovalle)
 - o Sociedad Agrocomercial HC (La Serena)
 - o Agropedegua (Limache)
 - o Guallarauco (Limache)

- Grandes empresas.
 - o Frutisa. (Región Metropolitana)
 - o Criogen Alimentos Ltda. (Región Metropolitana)
 - o Watt's (Región Metropolitana)
 - o Bozzolo Hnos. A. y C. Ltda. "Conservas Centauro"
 - o Pentzke (Conservera Dos Caballos, dejó el procesamiento de papaya)

Los encuestados en este estudio actualmente poseen un total de 170,5 hectáreas, una reducción del 21% en relación a lo que poseían en 2007, equivalente a 207,5 hectáreas (85% de la superficie total según Censo 2007), esto muestra que gran parte de la superficie nacional fue incluida en la muestra, por lo tanto los resultados son altamente válidos.

En cuanto a una estimación de la superficie nacional actual, considerando lo informado por los encuestados y proyectada a nivel nacional, aproximadamente hay plantadas 200 hectáreas de papayo y si se le agregan dos nuevos entrantes identificados con 7 y 4 hectáreas, el resultado estaría en torno a las 211 ha, asumiendo un 5% de superficie no identificada, el total de hectáreas de papayo a nivel nacional sería aproximadamente 220 hectáreas.

A continuación se presentan los resultados por cada segmento de productores identificados.

4.1.1 Pequeños Productores

o Características Generales

Estos productores presentan superficies dedicadas a papayos en promedio de 1,5 ha (van de las 0,5 ha a 3 ha), siendo su importancia relativa baja, dado que poseen menos del 3% del área nacional de este cultivo. Tienen bastante tiempo en el rubro (> 20 años); producen todo el año y sus rendimientos promedios son de 23 ton/ha; del total superficie plantada un 75% se encuentra con riego por goteo y la diferencia por surco. En cuanto a sus problemas productivos se destacan los temas climáticos: radiación solar, heladas, sequía, entre otros; también destacan las plagas y enfermedades.

o Comercialización.

Este grupo de productores en general vende en fresco directamente en el predio o a intermediarios, escasamente mencionan si tienen algún contrato con la agroindustria. Los precios de comercialización oscilan entre los \$ 183 pesos a los \$ 433 pesos el kilo en los mejores calibres. Dentro de los principales problemas que mencionan en la comercialización de la papaya destacan: tamaño reducido del

mercado, demanda concentrada en época de visita de turistas, exceso de oferta en ciertos períodos del año (otoño-Invierno).

En relación al precio futuro de la papaya, en general opinan que no variará, que es un negocio de regular a bueno. En cuanto a seguir con el rubro, plantean que continuarán, a excepción de un productor que deja el rubro por su avanzada edad. En cuanto a aumentar la superficie la mayoría opina que no, dado que no continúa en el rubro por edad o porque existen otros rubros más rentables; sí destacan que es un rubro que permite la entrada mensual de dinero, a diferencia de otros que no cuentan con esta facilidad.

En cuanto a las proyecciones del rubro opinan que ha crecido poco o muy poco estos últimos 5 años, debido a que no existe mucho consumo de la papaya y al precio alto de la fruta, existiendo además frutos sustitutos como duraznos y piñas en conserva.

- **Productores que dejaron el rubro.**

En este aspecto mencionan que el huerto se hizo improductivo, y no tuvieron deseos de continuar y modernizar el cultivo.

4.1.2 Productores Grandes

- **Características generales**

Los dos encuestados poseen el 16% de la producción nacional; cuentan en promedio con 20 ha de papayo; llevan más de 10 años dedicados al rubro; la superficie plantada con papayo ha crecido estos últimos 5 años (8%, 3 ha); poseen un rendimiento promedio de 27,5 ton/ha/año y producen todo el año. En cuanto al rango de edades de sus huertos, el 30% está en formación, 13% producción creciente, 13% en plena producción y un 45% en producción decreciente, todos poseen riego por goteo. En torno a los problemas productivos se destaca los climáticos (heladas y temperaturas altas en verano) y la falta de mano de obra para la cosecha.

- **Comercialización**

Mayoritariamente tienen acuerdos comerciales con diversas agroindustrias de diversos tamaños, micro, pequeña y gran agroindustria de las regiones IV, V y Metropolitana. Los precios de la papaya van desde los \$ 150 pesos a los \$ 350 el kilo, dependiendo del calibre, precios que se van a mantener en el futuro. Dentro de los problemas de comercialización, destacan baja demanda del producto en invierno, ya que las pequeñas agroindustriales focalizan su negocio hacia turismo de verano demandando fruta principalmente en esta época, el mercado nacional es muy pequeño donde la exportación es mínima; por lo tanto cualquier aumento de la producción debido al incremento de la superficie puede traer consecuencias de baja de los precios o imposibilidad de vender el producto. Van a seguir en el rubro pero no ampliarán superficie, ya que la demanda se mantendrá en los niveles que hoy se encuentra, esto podría variar si se acrecentara en forma importante la exportación.

Creer que a nivel nacional se mantendrá la superficie de papaya y las razones de esto es que existe una cartera limitada de productos en base a papaya, la demanda nacional es estrecha y estacional, la exportación es pequeña, en invierno y algunos años atrás ha habido exceso de producción y bajos precios. También el fruto tiene importantes problemas productivos como sensibilidad a heladas y a altas temperaturas.

- **Productor que dejó el rubro**

Este productor poseía más de 15 ha en producción, dejó el rubro debido a que el predio se encontraba en las cercanías de la ciudad de la Serena y una inmobiliaria le ofreció una buena oferta de compra, por lo cual dejó la actividad agrícola. En cuanto a si volvería al rubro en otro territorio, manifestó que no.

4.1.3 Micro Agroindustria

- **Características generales**

Se entrevistaron 6 empresas. En promedio procesan 653 kg de papaya a la semana, aproximadamente 192 ton al año en total, lo que equivale a elaborar en conjunto un aproximado de 10 ha de papaya al año. Se ubican en la IV (La Serena, Coquimbo, Vicuña, Ovalle y Canela), V (La Calera) y VII regiones (Vichuquén). Elaboran papayas al jugo, néctar, papaya confitada, miel, jarabe, bombones, entre otros. En promedio tienen 13 años en el rubro y se observa un importante apoyo de instituciones estatales como INDAP, Sercotec y ProChile para la comercialización y mejoramiento de su infraestructura. En general presentan un importante crecimiento de sus ventas y desean aumentar su procesamiento, si resuelven en algunos casos temas de infraestructura y/o disponibilidad de fruta en período de verano cuando la venta de sus productos es mayor.

Todos se abastecen de materia prima de terceros, no teniendo plantaciones propias, tanto de productores grandes como pequeños, siendo el calibre y daños en los frutos los factores más importantes al decidir la compra de la fruta.

- **Comercialización**

Dentro de las microagroindustrias, el principal mercado que poseen es el turista en época de verano. Es así que existen empresas que están en lugares de tránsito de turistas siendo el local de venta su principal lugar donde comercializan, en el caso que están fuera de estos circuitos, comercializan en ferias de verano, mercados tradicionales (Recova) o puestos de venta especializados como es el caso de la empresa Limpimávida que comercializa también sus productos en locales del lago Vichuquén y en los balnearios de Iloca y Duao.

También sus productos son distribuidos por terceros, que le compran para abastecer a pequeños supermercados o locales de venta fuera de las regiones de origen donde elaboran sus productos.

En cuanto a los principales problemas que tienen en la comercialización, se encuentran la falta de materia prima por alto costo, debido por ejemplo a falta de la fruta producto del terremoto en la VII región, o sequía en el norte del país y falta de apoyo de programas estatales en algunos casos.

También alguna de estas empresas ha podido exportar algunos pequeños volúmenes en torno a los US\$ 20 mil anuales principalmente a Bélgica (Lipimávida) a través de la ONG Comparte (comercializadora de productos artesanales exportables). Cabe considerar que este es un mercado que se mantiene y no crece.

- **Empresa que dejó el rubro**

En general manifestó que se debe a temas de edad del productor y temas climáticos, ya que poseía una hectárea de papayas con la cual tuvo importantes problemas climáticos (heladas) y de manejo del cultivo que lo hicieron dejar el rubro.

4.1.4 Pequeña agroindustria

- **Características generales**

Los cuatro entrevistados poseen una importante tradición en el rubro, con más de 20 años procesando productos de papaya, destacándose las papayas al jugo, néctar, mermeladas, papayas confitadas, entre otros. En general los entrevistados se proveen ellos mismos de su materia prima contando con 33 ha para ello (13% de la superficie nacional de papayo), a excepción de uno que es en un 100% abastecido por terceros.

Al observar la tendencia de la superficie plantada, en este segmento tiende a disminuir, es así que como grupo poseían 40 ha en 2007, en cambio hoy cuentan con 33 ha. Sin embargo, el comportamiento de estos es disímil: un productor disminuye la superficie en forma importante; otro la mantiene y otro la aumenta; en cuanto a las proyecciones, dos de ellos no aumentarán su superficie. En cuanto a los rendimientos que poseen en promedio es cercano a las 20 ton/ha. Todos poseen sistemas de riego tecnificado.

Dentro de los principales problemas productivos que poseen se destaca la falta de mano de obra para la cosecha, escaso material de propagación, déficit de recursos hídricos y problemas fitosanitarios como el oídio.

En cuanto al procesamiento, las 4 empresas procesan aproximadamente 700 ton de papaya al año, equivalente a una superficie de 35 ha. Aunque éstos se abastecen principalmente de materia prima por ellos mismos, también la adquieren a terceros en pequeñas cantidades y dependiendo del año, según el precio, venden en fresco.

En cuanto a su comercialización, una parte importante la realizan en sus salas de venta, las cuales están ubicadas estratégicamente en los circuitos de turistas (Valle de Elqui, Huentelauquén, Canela); también comercializan a nivel regional como en Santiago a través de distribuidores propios, de terceros o envían pedidos por valija, abasteciendo a supermercados y otros locales de venta.

En general, dos de los entrevistados, consideran que ha disminuido el procesamiento de la papaya en los últimos 5 años, las razones de aquello obedecen a razones de mercado: poca demanda, baja rotación de los productos, escaso mercado de exportación, demanda tremendamente estacional y restringido uso de la fruta, la que es consumida principalmente en postres; también destacan la falta de fruta, lo que encarece el precio, debido a la escasez hídrica y de mano de obra.

En cuanto a las dos empresas que manifiestan que ha crecido el procesamiento, una de éstas considera que es debido al aumento de los turistas que visitan su punto de venta y que han podido entrar en distintos mercados, como la de la papaya pelada, para industria del yogurt. El otro ha crecido también por el aumento de turistas ya que el 40% de su venta es realizada a ellos, como también el crecimiento de mercados como hoteles, restaurantes, supermercados, Recova y además el desaparecimiento de otras agroindustrias (Cobert).

Dentro de los productos que reconocen que está demandando el mercado en forma importante, destacan el néctar y las papayas al Jugo. En cuanto a sus problemas de comercialización manifiestan que uno de ellos es el alto costo de la distribución (pequeños pedidos que requieren traslados a grandes distancias); competencia desleal de pequeñas empresas que no elaboran productos de calidad, lo que trae como consecuencia que se desprestigie en general la agroindustria; poca oferta de fruta y de alto costo especialmente en el presente año.

Finalmente, consultados sobre que requiere la industria para aumentar o consolidar el rubro de papayas, manifiestan que es necesario: mayor diversificación de cartera de productos en base a papaya, que permita que existan otras alternativas de consumo (sólo se usa como postre); que exista una mayor promoción de las cualidades de la papaya a nivel nacional, a objeto que aumente su consumo, apoyar las exportaciones y mayor apoyo estatal en general al rubro.

○ **Empresas que dejaron el rubro**

En ambos casos (2 empresas) se manifiestan principalmente que las razones correspondieron a temas familiares que los llevaron a dejar la actividad y otras expectativas profesionales ya que la actividad demanda importante cantidad de tiempo.

4.1.5 Agroindustria mediana

Para este análisis fueron entrevistadas 4 agroindustrias, las cuales se abastecen principalmente de sus propios predios, procesando 99 hectáreas de papaya (40% de la superficie plantada nacional). Su característica de mediano tamaño obedece por un lado a la superficie que procesan, la diversidad de productos que elaboran de papaya (congelados, conserva, pulpa, confitado, mermelada, jugo, entre otros), los mercados que atienden y su experiencia exportadora.

Otra de las características que los distingue es que explotan la condición de microclima exento de heladas y con temperaturas medias que posee ciertas zonas de la IV como de la V Región, ofreciendo una gama de productos únicos que posee esa condición, como obviamente la papaya, chirimoya, alcachofas, lúcumas, palto, entre otras.

En cuanto a los rendimientos del papayo, están por sobre las 23 ton/ha/año; toda la superficie la presentan tecnificada (riego por goteo), dentro de los problemas productivos destacan la imposibilidad de identificar el sexo de las plantas, manejo de enfermedades (*Erwinia* y *Phytophthora*) y problemas climáticos (heladas, verano cálido, sequía).

En relación a la potencial ampliación de la superficie, en general manifiestan que no tienen intención de aumentar la superficie plantada, explican que la introducción de 50 hectáreas nuevas de plantaciones desestabilizará el mercado y caerán los precios. Lo que en general buscan es consolidar la superficie que tienen actualmente; en relación al área que mantenían hace 5 años atrás, la mayoría la conserva, aunque uno presentó drásticas reducciones de superficie, pasando de las 38 ha a las 10 ha, las razones de ello es que han influido importantes factores climáticos, que han incidido fuertemente en la reducción de la superficie (heladas e inundación).

En cuanto a los mercados que actualmente atienden, se destacan papaya en fresco, siendo los principales proveedores de los supermercados a nivel nacional. En lo que respecta a papaya procesada destacan los productos elaborados por ellos mismos que comercializan con su marca propia y de terceros con destino a supermercados: papayas al jugo y pulpa, bases sin azúcar y congelados los cuales son elaborados para otras agroindustrias como la de los helados, yogurt, alimentos, mermeladas, entre otros.

Dentro de los problemas que presenta la comercialización, en lo que respecta a papaya en fresco, destacan que es un mercado de poca demanda y que se mantiene estable. Además es una fruta que no se consume en fresco sino que debe ser pelada y cocinada para su consumo; otra de las dificultades que posee son la corta duración en postcosecha y la gran cantidad de sustitutos que posee.

En cuanto a la papaya al jugo, es un mercado que ha crecido, sin embargo, este producto es caro en relación a sus sustitutos como los duraznos y piñas al jugo; es un producto suntuario el cual se ve afectado en su consumo rápidamente en períodos de recesión o crisis económicas, ejemplo de ello es la crisis de 1998 que hizo bajar drásticamente el consumo de este producto; también para su venta se requiere una alta inversión en marketing.

En torno a los productos procesados que elaboran para terceros como la industria de los helados, yogurt, congelados, jugos, leche cultivada, etc., este mercado en el último tiempo ha tenido un importante crecimiento, sin embargo aun no demanda una gran cantidad de fruta, ya que por ejemplo los yogurts no emplean más del 6% de fruta en su elaboración y también entran en la categoría de productos no masivos, lo mismo para el caso de helados y otros.

El desafío para este sector en el mercado interno, es que la papaya se ha ido consolidando como un producto **gourmet**, cuya definición es: "Alimento de alta calidad, producido con una dedicación especial o arte en la confección y presentación del producto, y/o el envase; en inglés: fine food, en alemán: delikatessen"⁶, esto permite descomoditizar la papaya creando un valor único para clientes

⁶ http://www.prochile.cl/documentos/pdf/encuentro_gourmet_holanda.pdf

especialmente del segmento de mayores ingresos. El interés de apuntar a esta estrategia es porque tanto a nivel nacional como internacional este es un segmento que ha ido creciendo en forma importante, ligado no solo a los productos procesados de papaya, sino también a otras industrias que demandan este producto, que han tenido un rápido crecimiento dentro del concepto gourmet (helados, industria láctea, jugos naturales y bebidas). El desafío para este sector, en esta área, es que se requiere una alta y permanente inversión en marketing.

Otros de los desafíos que presenta el sector en la comercialización es la exportación, en general los entrevistados manifiestan que existe interés y han realizado exportaciones, sin embargo no se han consolidado, dentro de los problemas que manifiestan es que el producto es desconocido; que requiere alta inversión en marketing para su introducción; que a veces los pedidos externos son superiores de los que pueden abastecer; que es un producto caro que compite con otras frutas de menor valor como el caso del durazno y la piña al jugo, entre otros factores. En definitiva uno de los encuestados manifiesta: "En general la gente en los mercados externos no está dispuesta a pagar por un producto caro, que desconoce su sabor".

También expresan que para enfrentar exitosamente el mercado requieren de asociatividad de los exportadores de papaya: "Se necesita salir como uno sólo al mercado externo", lo cual no ocurre. Además también expresan que en muchos países aun no existen los protocolos sanitarios para entrada de la fruta y los productos aprobados a aplicar para el control de plagas y enfermedades.

4.1.6 Gran agroindustria

Estas empresas presentan una cartera general de productos alimenticios procesados y su ámbito de acción es nacional, abasteciendo en forma importante a supermercados como D&S, Cencosud, Supermercados del SUR, Telemercado, San Francisco, Tottus, Unimarc entre otros; siendo la papaya o sus derivados un producto más dentro de su oferta.

Dentro de los productos que elaboran se encuentran las papayas al jugo envasado en vidrio, como en tarro, congelados para la industria de alimentos, mermeladas, entre otros. El 100% de su abastecimiento de materia prima proviene de terceros tanto a partir de productores principalmente grandes, quienes les entregan las papayas en fresco o vienen procesadas desde las agroindustrias medianas (pulpa, congelada, etc.). En las entrevistas no se pudo dilucidar el volumen que procesan, sin embargo asumiendo que un 13% de fruta a nivel nacional se venden en fresco y descontando lo que elaboran las otras agroindustrias analizadas anteriormente, el volumen anual de procesamiento debe estar en torno a las 900 ton de fruta fresca, equivalente a 45 ha de papayo, valor aproximado al estimado por el estudio de Agraria en 1997.

En cuanto a la comercialización de la papaya, en relación a las otras frutas procesadas que comercializan, tiene una demanda menor, también es una fruta cara en relación a por ejemplo al durazno, frambuesa, entre otras y menos del 50% de la papaya es aprovechable en el proceso, lo que también la hace poco competitiva.

En cuanto a los productos en específico, que comercializan las empresas entrevistadas, expresan que el mercado de mermelada de papayas no crece, el mercado de papaya congelada es muy escaso, el mercado de papayas al jugo en tarro se mantiene, en cambio el mercado de papayas al jugo en envase de vidrio, especialmente en el canal de los supermercados, aumenta.

En cuanto a la exportación de productos en general, no ven muchas oportunidades, si potencialmente a granel en bolsas que permitan una larga duración del producto ya que el envase de vidrio, que es el envase en que en general se exporta la papaya, es muy caro.

4.2 Entrevistas a actores públicos.

4.2.1 Entrevista profesional INDAP

Con el objeto de conocer las acciones de INDAP asociada al rubro, se procedió a entrevistar al sr. Constantino Vega, Ejecutivo Integral del Área de La Serena, provincia de Elqui, quien expresa:

- No existe acciones específicas sobre el rubro del papayo, esto debido a que los rubros definidos de trabajo para el área son: hortalizas, frutales (almendros, paltos y olivos), flores de corte y caprinos. Las razones que explican esta situación obedecen a que el rubro del papayo es desarrollado en la provincia por productores medianos y grandes, quienes no poseen el perfil de INDAP. Los pequeños productores que poseían papaya dejaron el rubro después de las heladas de 2007 debido a que perdieron la totalidad de los cultivos.
- Han existido en años anteriores sólo apoyos puntuales a algunos pequeños productores para mostrar y vender sus productos en la Expomundo Rural.

4.2.2 Entrevista profesional de Sercotec

Se procedió a entrevistar a esta institución debido a que en las encuestas realizadas a las micro-agroindustrias, una de ellas manifestó que había tenido apoyo de esta institución a través del programa capital semilla, permitiéndole mejorar sus instalaciones. Con el objeto de conocer más en profundidad las acciones de este servicio se entrevistó a la sra. Catalina Olivares, asesora del Director Regional de Coquimbo, quien expresa:

- La institución no cuenta con programas que atiendan o favorezcan algún rubro en específico, estos programas son de carácter general y vía concurso, favoreciendo a la PYME a través de programas de emprendimiento, capital semilla, entre otros. Si los empresarios asociados al rubro de la papaya cumplen con los requisitos para ser elegibles y del concurso específico, estos serán favorecidos por la institución, como ha sucedido con el apoyo de capital semilla a uno de las micro-agroindustrias.

4.2.3 Entrevista profesional ProChile

De acuerdo a la información secundaria analizada, esta institución tuvo un rol relevante a final de los '90 y principios de la década del 2000, en el inicio de las exportaciones del rubro, para lo cual se procedió a entrevistar al Sr. Alex Sawadi, Coordinador Área Agroindustrias, quien expresa:

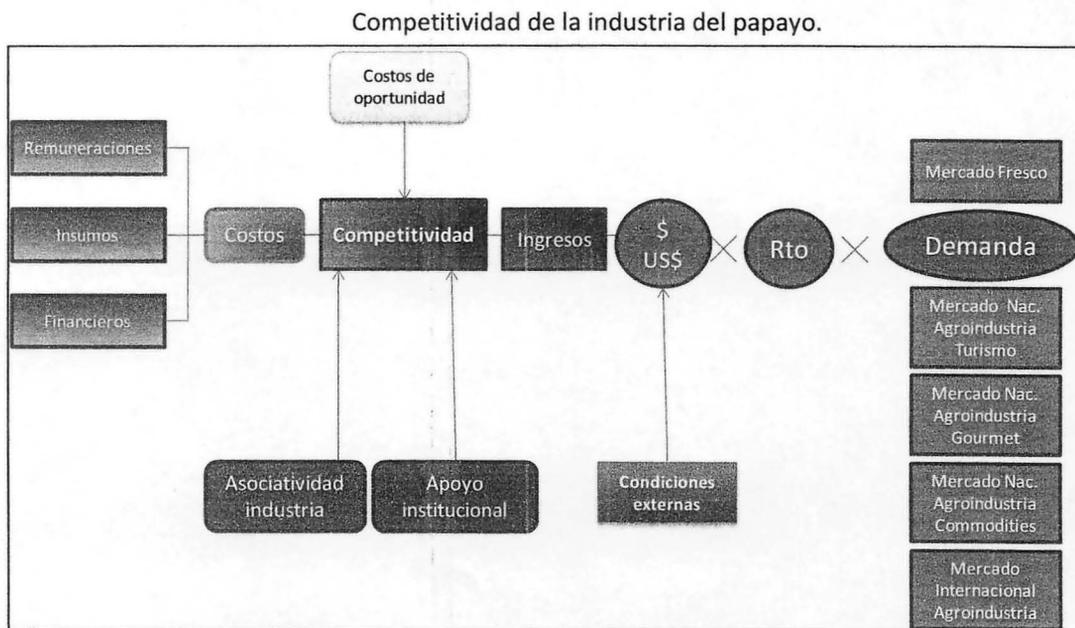
- Entre 1996 y 2002 hubo una importante acción de ProChile en conjunto con los productores y procesadores de la papaya, quienes formaron el "Comité de la Papaya"; se sumó a esta iniciativa un Profo conformado por empresarios apoyados a través de CORFO, quienes pudieron colocar su producto en EE.UU, Finlandia, España, Canadá, Suiza y Argentina, entre otros; tanto en supermercados como en hoteles.
- Aunque el producto se pudo colocar en el mercado externo, no cumplió las expectativas esperadas debido a que existió baja rotación de este, en nuevos pedidos debido a:
 - El producto es desconocido por lo cual su introducción es lenta.
 - Se requieren para una exitosa introducción recursos importantes en marketing y en educación del consumidor, y dada las características de los productores, estos no contaban con niveles de recursos para invertir en comercialización internacional ni tenían la capacidad financiera para resistir grandes períodos de retorno, que permitiesen introducir el producto en forma exitosa.
 - Es percibido como un producto caro el cual compite con productos de menor valor como la pera, piña y duraznos en conserva.
 - Es un producto considerado en los mercados externos como exótico y gourmet, siendo este un segmento de alto valor pero de escaso volumen (2-3% del mercado mundial de alimentos).
 - Faltó mayor fuerza en la promoción para lograr una introducción del producto.
- Actualmente la institución apoya al rubro en forma individual, a través de ferias internacionales de productos gourmet (Fancy Food Show). Además se presta apoyo a través de estudios de mercados específicos, como apoyo en el conocimiento de mercados y contactos comerciales con potenciales clientes.
- Sobre las posibles proyecciones del rubro en el mercado internacional, opina que es necesario innovar en los siguientes aspectos:
 - Abordar estrategias comerciales que acorten el ciclo de penetración a través de por ejemplo de la entrada del producto, a través de uno ya conocido. Por ejemplo helado con frutos de papaya, o en combinación con otros jugos ya conocidos.
 - Desarrollar tecnologías que permita obtener menor costo de producción y que logren mantener las características naturales del producto, a través de esterilización en frío y envasado aséptico; conservando el color, las vitaminas, el olor y el sabor natural de la fruta.
 - Desarrollar tecnologías de envases, que permitan un almacenaje del producto que no requiera de refrigeración y que permita evitar la oxidación del producto, obteniendo un buen sabor y fácil de conservar y comer.

- Es indispensable que el sector se agrupe para enfrentar un proceso exitoso de internacionalización.
- Desarrollo de productos artesanales que no pierdan sus propiedades (Ej: papayas deshidratadas que no se endurezcan con el paso del tiempo).
- Desarrollo de nuevos productos como jugos de frutas superfruit (bebidas que contienen compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas, fibra dietética soluble); desarrollo de aguas minerales con alto contenido de papaína, jugo de papaya estabilizado en frío, entre otros.

4.3 Competitividad del rubro

Para determinar la competitividad del rubro del papayo se utilizó una adaptación de la metodología establecida por el departamento de estudios de la Asociación de Exportadores de Chile (2006), en el cual se mide la competitividad de la industria exportadora de fruta chilena en función a la variación de su margen operacional, que corresponde al ingreso operacional menos su costo operacional; lo que a su vez está influenciado en general por los costos de oportunidad, la asociatividad de la industria, el apoyo institucional, las condiciones externas, la demanda de los consumidores, entre otros.

En el siguiente diagrama se sintetiza la metodología para establecer la competitividad de la industria.



Fuente: Adaptado Asoex 2006.

A continuación se analizan los elementos que contribuyen o disminuyen la competitividad del rubro papaya.

- **Costos:** En general tanto para la industria de la fruta en fresco como la agroindustria este último tiempo ha tenido un aumento de sus costos, especialmente en lo referente a la mano de obra, energía y gastos financieros; se suma a esto el mayor costo de suministro del agua para el cultivo producto de la sequía que vive la zona de producción. Todo este escenario ha implicado una pérdida de competitividad del rubro en esta variable.
- **Costos de oportunidad:** Esto sucede cuando existen dos o más alternativas de inversión, buscándose desarrollar siempre la más rentable. En este sentido el papayo ha ido perdiendo competitividad ya que la principal zona productora de este cultivo se encuentra en las cercanías de los sectores urbanos y de parcelas de agrado de La Serena y Coquimbo, siendo la venta de terrenos dedicados al papayo al sector inmobiliario, mucho más rentable que su cultivo. A su vez en la misma zona compite con frutales como el palto y el limón los cuales tienen mercados muchos más amplios tanto a nivel nacional como externo y que han tenido una buena rentabilidad este último tiempo.
- **Asociatividad de la industria:** En parte de la década de los '90 como en los 2000, la industria mostró una importante asociatividad empresarial conformándose el "Comité de la papaya", el "Profo de productores de papaya", lo que le permitió a la industria explorar el mercado externo a menores costos que en forma individual; sin embargo hoy no existe una asociatividad de la industria, lo que impide avanzar más rápidamente en acelerar procesos de innovación que le permitan mejorar la competitividad del rubro.
- **Apoyo institucional:** En general hubo un importante apoyo institucional al sector, a través de programas de ProChile como CORFO, sin embargo esto ha disminuido por diversas razones, dentro de ellas que el sector empresarial no se encuentra asociado, existiendo en la actualidad apoyos individuales, principalmente, a las empresas a través de fondos de capital semilla, participación en ferias tanto nacionales como internacionales, entre otros. Rompe esta dinámica el proyecto que actualmente está ejecutando INIA a través del FIA. Sin embargo, es posible establecer que en este ámbito el rubro ha perdido competitividad.
- **Ingresos.** En este ámbito se analiza los precios el rendimiento y la demanda, que son los factores que constituyen el ingreso percibido por el productor.
 - **Precios:** En lo que respecta al precio promedio de la fruta fresca (papaya) en este último tiempo ha tendido a aumentar. Sin embargo, estos muestran una alta inestabilidad mensual siendo especialmente menores en el período invernal. En cuanto a los precios de los productos procesados de la papaya han aumentado o se han mantenido de acuerdo a la información entregada por los entrevistados. En cuanto a los precios de los productos de exportación, éstos han aumentado, sin embargo esta alza ha sido contrarrestado por efecto de la disminución del valor del dólar que ha ocurrido en este último tiempo.
 - **Rendimiento:** En general este factor ha tenido un detrimento y esta tendencia continuará debido a la escasa renovación de huertos que presenta el frutal, se suma a lo anterior que las variedades existentes presentan importantes factores que inciden drásticamente en la pérdida de la producción como las heladas y la alta radiación

solar. Tampoco se observa un mercado de plantas genéticamente mejoradas y sanitariamente testeadas que permitan asegurar mayores rendimientos de la fruta, entre otros factores. En lo que respecta al rendimiento de la fruta en la agroindustria, ésta posee un bajo rendimiento ya que más del 50% se pierde en el proceso, a su vez no existe un mercado de variedades genéticamente mejoradas que permitan el aumento de la pulpa de la fruta.

- **Demanda:** En torno a este factor es indispensable analizarlo por cada uno de los mercados que tiene la fruta.
 - **Mercado en fresco:** La demanda por fruta fresca no ha crecido producto de diversos factores analizados anteriormente, como la cantidad de sustitutos existentes, que no se puede consumir en fresco siendo necesario pelarla y cocerla, atentando con las tendencias del consumidor, quienes buscan productos listos para llevar.
 - **Mercado nacional agroindustria turismo.** Este corresponde al mercado que se ha generado en torno el consumo de los turistas que visitan la zona del valle de Elquí u otras zonas de producción de papayas como Huentelauquén, donde existen agroindustrias en torno a los flujos de turistas que se generan; este es un mercado que seguirá creciendo y que le aportan competitividad a la agroindustria.
 - **Mercado nacional agroindustria gourmet.** La papaya se ha ido posicionando en esta área a través de sus cualidades funcionales, como de sabor, textura, entre otros; asociado a productos como papayas al jugo, néctares, mermeladas especiales, entre otros; abriéndose espacio en los supermercados, hoteles y restaurantes. También ha ido ganando protagonismo a través de la introducción del producto en otros alimentos gourmet como helados y yogurts, lo que le ha permitido generar mayor competitividad al rubro ya que la demanda por estos productos ha ido ganando espacio a nivel nacional.
 - **Mercado nacional agroindustria de los commodities.** Este mercado tiene que ver con los productos genéricos como papayas en tarro, mermeladas, entre otros. En general este mercado ha disminuido o se ha mantenido no proyectándose tendencias de crecimiento, además es un mercado que presenta muchos sustitutos como los duraznos, piñas en tarro, entre otros.
 - **Mercado externo agroindustria.** En general es un mercado pequeño que aún está en proceso de conocimiento del producto, con variaciones anuales importantes en los volúmenes exportados, además se ve amenazado por las vicisitudes del valor del dólar.

Por lo tanto como conclusión en lo que respecta a los **ingresos** de la industria, podemos decir que su competitividad ha disminuido, aunque no de la misma forma para los distintos mercados ya que la agroindustria asociada al turismo como la de los productos gourmet ha

aumentado, sin embargo la escasa productividad de los huertos es un factor decisivo del rubro, lo cual le ha hecho perder competitividad.

Finalmente a modo de conclusión, el rubro en general ha ido perdiendo competitividad ya que en las fuerzas negativas como el aumento de costos, los costos de oportunidad del rubro, la nula asociatividad de la industria, el escaso apoyo institucional, la disminución del rendimiento promedio de los huertos, el escaso desarrollo del mercado externo y el casi nulo crecimiento de los mercados de la fruta en fresco y de la agroindustria de los comodities, han atentado con mayor fuerza sobre las tendencias positivas que mejoran la competitividad como el aumento de los precios de este último tiempo, el crecimiento de la demanda de los mercados de los productos gourmet y el mercado turístico asociado a esta agroindustria.

V.- Conclusiones

1.- En relación a la evolución de superficie de papayo, de la década de los noventa a nuestros días, tanto el descenso como el ascenso de la superficie, obedecen en primer lugar a un tema de rentabilidad del cultivo (precios de la fruta). Es así que cuando los precios estuvieron altos hubo mayor interés en introducirse en el rubro y cuando los precios bajaron más allá del punto de equilibrio, la gente arrancó los huertos y los cambió por otros frutales o pasaron a otra actividad. Las razones que explican este comportamiento obedecen a las siguientes razones:

- No se cumplieron las proyecciones de las rentabilidades esperadas del cultivo a finales de los noventa y principios de 2000, debido a que la papaya es un producto suntuario con una demanda elástica al precio, y ante períodos de bajo crecimiento económico y crisis económicas (1998 Crisis Asiática) se resiente fuertemente la demanda y las personas cambian la papaya y sus derivados por productos sustitutos como duraznos y piñas al jugo, que presentan menor valor y por ende los precios de la papaya disminuyen y los productores al no cumplirse las expectativas de rentabilidad arrancan sus papayos o no los renuevan.
- La segunda razón de la disminución, es que en la década del '90 y 2000 se esperaba que la exportación pudiese atraer una importante cantidad de fruta, aunque hubo interés por abrir mercados externos, cosa que sucedió, la demanda esperada por este fruto fue menor a la esperada. En general se manifiesta que es un producto desconocido y caro que compite con otras frutas en conserva más baratas.
- A partir de 2004 los precios se tornan interesantes lo que hizo que se plantara más superficie, pero no a los niveles de la década de los noventa; se pasó de las 225 ha en 2005 a las 245 en 2007. Sin embargo, durante las heladas de 2007 una parte importante de los papayos se afectaron y tuvieron que ser arrancados en 2008, subiendo el precio de la papaya en 2008. Se

estima que desde ese año y hasta la actualidad la superficie plantada bordea las 220 hectáreas.

- Finalmente aunque se han observado buenos precios del papayo este último tiempo y aunque los productores se han recuperado del daño por heladas, un factor que ha impedido el crecimiento del papayo es la sequía que afecta la zona, entre otros, lo que ha hecho que algunos agricultores hayan decidido no regar el papayo, si esta condición continúa probablemente en el corto plazo tenderá a disminuir la superficie.

2.- En torno a las proyecciones de las plantaciones de papayo, de acuerdo a las encuestas como a partir de la información secundaria no hay señales de que la superficie vaya a disminuir a lo que existe hoy o exista o vaya a existir un aumento significativo de la superficie de cultivo para los próximos 5 años, manteniéndose la superficie actual en torno a las 220 - 230 hectáreas a nivel nacional, ocurriendo sólo plantaciones para mantener la superficie que actual que poseen. Además los productores de importantes superficie de cultivo, en general establecen que aumentos de un 20% de la superficie actual, desestabilizarán los precios, como ha ocurrido en períodos anteriores como a finales de la década de los '90 y principios del 2000. Las razones que los han llevado a tener este moderado optimismo son las siguientes, las cuales fueron clasificadas en tendencias positivas y negativas al aumento de la superficie:

Tendencias positivas

- El país está en un ciclo económico positivo, con crecimiento esperado para los próximos años en torno al 4 a 5% el PIB, lo que ha demostrado en períodos anteriores que el consumo de papaya aumentará.
- La demanda de productos gourmet ha crecido en la industria de los alimentos (lácteos, helados, jugos, etc.), donde la papaya juega un rol cada vez más importante gracias a sus propiedades nutraceuticas y funcionales, tendencia cada vez más requerida en los productos alimenticios. Sin embargo, aunque es un mercado creciente no demanda todavía mucha fruta.
- La demanda de papaya al jugo y néctar ha crecido especialmente ligado al canal de los supermercados, demandando una importante cantidad de fruta, también se observa que el canal de hoteles y restaurantes ha aumentado.
- El turismo que también aumenta con los ciclos positivos de crecimiento, presenta un importante incremento, especialmente en la principal zona productora del país de papaya (Valle de Elqui), como en otras zonas de influencia turística (Canela y Lipimávida) haciendo crecer la demanda por esta fruta en sus distintos productos elaborados.
- Avance tecnológicos de envases que permiten disminuir los costos, en relación al vidrio.

Tendencias Negativas

- La papaya y sus derivados disminuyen fuertemente la demanda ante ciclo económicos negativos.

- Tiene una importante cantidad de sustitutos como fruta fresca y procesada.
- Los mercados tradicionales atendidos por la gran agroindustria de papayas al jugo en tarro y mermeladas no presentan crecimiento, misma tendencia sigue la papaya en fresco.
- La productividad de la papaya es drásticamente afectada por las condiciones climáticas (heladas y Tº altas).
- La escasez y mayor costo de la mano de obra.
- Menor disponibilidad de suelos con condiciones agroclimáticas adecuadas para el cultivo del papayo, producto del crecimiento de la ciudad de La Serena y Coquimbo y el aumento de las parcelas de agrado en la zona.
- Las exportaciones de papaya no juegan un rol preponderante en la demanda de fruta.
- Escasez hídrica especialmente en la zona de mayor producción de papaya.

VI.- Propuesta de acciones tendientes al mejoramiento de la competitividad del rubro

Dentro de los factores que inciden en la competitividad, es posible establecer que existen factores que no dependen directamente del rubro como son el costo de los insumos (mano de obra, energía, etc.), los costos de oportunidad y el precio, especialmente el valor de la divisa, por lo cual no se proponen acciones en estas áreas. A continuación se proponen intervenciones especialmente en las siguientes áreas para mejorar la competitividad del rubro:

- **Apoyo y fomento de la asociatividad de la industria.** La asociatividad empresarial ha demostrado ser una estrategia exitosa para enfrentar los mercados globalizados y la creciente y fuerte competencia, demostrándose que a mayor nivel de organización para la coordinación y cooperación, se logra una mayor efectividad en el resultado de los objetivos comunes y por ende genera mayor competitividad.
- **Fomentar el apoyo institucional al rubro.** Aunque obviamente en gran medida depende de la asociatividad de las propias empresas, actualmente es necesario avanzar y probablemente sea necesario que tomen un rol más protagónico las instituciones estatales para fomentar la asociatividad del rubro, toda vez que este es parte de la tradición reconocimiento de la región de Coquimbo y de ciertas localidades de la V y VII Región, lo que también genera una serie de emprendimientos de pequeñas y medianas agroindustrias que ven en este rubro una importante oportunidad de desarrollo.
- **Generar innovaciones que permitan mayor rendimiento del rubro.** Esta tarea es fundamental ya que es uno de los factores de mayor incidencia en el rubro sobre su competitividad, para lo cual se requiere avanzar en el desarrollo de mejoramientos de técnicas de cultivo como genéticos, que permitan por ejemplo, mejorar el rendimiento, desplazar la producción hacia

períodos de mayor demanda de fruta (verano), utilización de variedades de mayor porcentaje de pulpa en la fruta, entre otros.

- **Generar innovaciones que permitan aumentar el consumo especialmente en los mercados que presentan perspectivas de crecimiento.**
 - **Desarrollo de nuevos productos.** En general en la industria de los alimentos el aumento de consumo se genera a través del desarrollo de nuevos productos, en esta área se pueden explorar productos como aguas minerales con sabor a papaya, el desarrollo de jugos superfruit con combinación con otras frutas, entre otros. Para lo cual además de requiere:
 - **Desarrollo o pruebas de tecnologías ya existentes, que permitan una mejor conservación del producto.** Algunos ejemplos podrían ser esterilización en frío y envasado aseptico, sistemas de alta presión para la pasteurización, lo que permite conservar el color, las vitaminas, el olor y el sabor natural de la fruta.
 - **Desarrollo o pruebas de nuevos envases,** que permitan un almacenaje no requiriéndose refrigeración y evitando la oxidación del producto.
 - **Desarrollo de nuevas formas y ocasiones de consumo.** Tradicionalmente la papaya se ha consumido como postre, el desafío es generar nuevas formas y ocasiones de consumo.
 - **Desarrollar estrategias de promoción genéricas.** Asociadas a campañas que fortalezcan las propiedades funcionales del producto y que generen un aumento del consumo.
 - **Desarrollo de estrategias permanentes de promoción del producto en el mercado externo.** La experiencia ha demostrado que el producto tiene un espacio en el mercado exterior, sin embargo se requiere de un trabajo permanente de promoción en los distintos canales, ya que la introducción de un nuevo producto es una actividad de largo plazo.

ANEXOS DE ESTE ESTUDIO, VER EN INFORME 3