

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, AMBIENTALES Y VETERINARIAS

INGENIERÍA AGRONÓMICA

TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGRÓNOMA

DETERMINACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE DESINFECCIÓN Y UN
MEDIO DE CULTIVO PARA LA INTRODUCCIÓN Y MICROPROPAGACIÓN
IN VITRO DE 12 ECOTIPOS DE AJI (*Capsicum sp.*) Y CUATRO DE TOMATE
DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*)

AUTORA: **MARÍA ANA NAVARRO ORTEGA**
DIRECTORA: **ING. GUADALUPE LÓPEZ**
ASESORES: **ING. CESAR TAPIA M.Sc.**
 BIOL. GABRIELA PIEDRA

LATACUNGA – ECUADOR

2005

RESUMEN

Las variedades tradicionales en la zona andina están en un franco proceso de erosión genética pese a la disponibilidad de mercados potenciales fuera de la región. En este marco, existen cultivos nativos como el tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y algunos tipos de ají (*Capsicum* sp.) que están siendo afectados por este fenómeno; además por plagas y enfermedades principalmente. Frente a esta problemática se hace necesario el estudio de estos géneros y su respuesta al cultivo de tejidos ya que con el desarrollo de protocolos *in vitro* adecuados para estas especies se podrá conservar y propagar grandes volúmenes de plantas en menor tiempo, además el cultivo *in vitro* es un método efectivo para la eliminación de infecciones virales obteniéndose de esta manera material limpio para la siembra de estas especies.

La presente investigación se realizó en el Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología (DENAREF), del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), con el propósito de determinar una metodología de desinfección y un medio de cultivo para la introducción y micropropagación *in vitro* de ají y tomate de árbol.

El ensayo se llevó a cabo en tres etapas: desinfección de explantes, introducción y micropropagación *in vitro*. Se seleccionaron 12 ecotipos de ají y cuatro de tomate de árbol, en los cuales se probaron tres metodologías de desinfección y cuatro medios de cultivo para la introducción y micropropagación *in vitro*.

La semilla seleccionada fue germinada y mantenida en invernadero, luego de la planta madre se cortaron los explantes, se desinfectaron con las tres metodologías propuestas (Anexo 1) y se sembraron en medio básico (MS). Al final de esta etapa se seleccionó la mejor metodología de desinfección mediante la evaluación de presencia de hongos, presencia de bacterias y viabilidad de explantes.

Para la etapa de introducción y micropropagación *in vitro* se prepararon los medios de cultivo planteados para cada especie, los explantes se sembraron en tubos de ensayo de 18 x 150 mm con 5 ml de medio de cultivo formulado para cada etapa. Las

plántulas fueron mantenidas en el cuarto de cultivo a $18 \pm 2^\circ\text{C}$, con una humedad relativa del 70% y un fotoperíodo de 16 horas luz con 3000 lux de iluminación y 8 horas de oscuridad. Se evaluó longitud de planta (mm), número de nudos por planta, presencia de raíces y supervivencia de explantes. Se micropropagaron las plántulas de cada ecotipo y del medio que mejor respondió a la fase de introducción *in vitro*.

Los resultados observados indican que la mejor metodología de desinfección para ají es la doble desinfección pues presentó porcentajes bajos de contaminación por hongos (5,6%) y por bacterias (16,7%). Además se observó un buen porcentaje de explantes viables (94,4%). En tomate de árbol la mejor metodología de desinfección fue la simple desinfección ya que no se observó contaminación por hongos ni bacterias y se obtuvo 100% de viabilidad de explantes.

El medio de cultivo apropiado para introducción *in vitro* de ají es el medio 2 (ácido indolacético (IAA) + bencilamino purina (BAP) + carbón activado) pues la mayor longitud de planta se consiguió en este medio (9,8 mm) y 4,19 nudos por planta a los 45 días de evaluación con el 97,2% de supervivencia de explantes. Para tomate de árbol el medio 2 (ácido giberélico (Ga3) + Pantotenato de Ca) presentó la mayor longitud de planta (29,25 mm) con 5,17 nudos en la última evaluación, un buen porcentaje (75%) de raíces durante el proceso de evaluación.

En la primera evaluación de la etapa de micropropagación *in vitro* de ají se pudo observar que los cuatro medios probados no dieron buenos resultados puesto que los explantes no crecieron, y se finalizaron las evaluaciones de esta etapa. En tomate de árbol el medio que proporcionó los mejores resultados fue el medio 4 (bencilamino purina (BAP) + ácido giberélico (Ga3) + ácido naptalenacético (ANA)) el que presentó un buen porcentaje (91,7%) de enraizamiento de plantas, 3 nudos por planta y 14,33 mm en longitud de planta, mientras que en el resto de medios los valores fueron más bajos.

SUMMARY

Some traditional varieties in the Andean region are in a franc process of genetic erosion in spite of the readiness of potentials markets outside the region. In this regard, native crops such as tree tomato (*Solanum betaceum*) and pepper (*Capsicum sp.*) have been affected by this phenomenon and also for the attach of pests and spelling. To solve this problem, it becomes necessary to study these genders and one alternative is to test tissue culture protocols to conserve, to multiply plants rapidly and also to eliminate virus infection, before planting them in the field.

The present research was carried out at the National Department of Plant Genetic Resources and Biotechnology (DENAREF), of the National Autonomous Institute for Agricultural Research (INIAP), with the purpose of determining a disinfection method and a culture media for cultivation, introduction and micropropagation of pepper and tree tomato.

The experiment was carried out in three different stages: buds disinfection, introduction and micropropagation *in vitro*. Twelve selected ecotype of pepper and four of tree tomato were used, in which three disinfection methodologies and four cultivation culture media were applied for *in vitro* introduction and micropropagation.

Selected seeds were germinated and maintained in a greenhouse. Then from the mother plant, buds were cut out. They were disinfected following the three proposed methodologies (Annex 1) and they were sowed using Murashige Skoog basic media. At the end of this stage the best disinfection methodology was selected by means of the evaluation of presence of fungus, bacteria and plantlets viability.

For the stages of *in vitro* introduction and micropropagation, the planned different culture media were prepared and plantlets were sowed in glass-tubes of 18 x 150 mm with 5 ml of specific media. Plantlets were maintained in a cultivation room at $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$, with a relative humidity of 70% and a photoperiod of 16 hours light with 3000 lux of illumination and 8 hours of darkness. The following descriptors were

evaluated: plant longitude (mm), photoperiod, number of knots per plant, presence of roots and plantlets survival (%). Plantlets from different ecotypes were propagated by using the best media from the previous experimental phase.

The observed results indicate that the best disinfection methodology for pepper is the double-disinfection which presented low percentages of contamination for fungus (5.6%) and for bacteria (16.7%). Also good percentages of viable plantlets were observed (94.4%). For tree tomato, the best disinfection methodology was the simple disinfection, since contamination was not observed neither for fungus nor for bacteria and 100% of plantlets viability was obtained.

For pepper the appropriate media for *in vitro* introduction media # 2 (indole-acetic acid (IAA) + benzylaminopurine (BAP) + activated charcoal). This media produced the highest plant longitude (9.8 mm), 4.19 knots per plant at 45 days of evaluation with 97.2% of plantlets survival. For tree tomato, the media # 2 (gibberellic acid (Ga3) + Calcium pantotenato) presented the highest plant longitude (29.25 mm) 5.17 knots per plant and a good percentage (75%) of roots were also determined during the evaluation process.

During the preliminary evaluation of pepper, none of the media used presented good results so the evaluation process conclude without results. In tree tomato the medium that provided the best results was the number 4 (benzylaminopurine (BAP) + gibberellic acid (Ga3) + naphthalacetic acid (ANA)) because it presented a good rooting percentage (91.7%), 3 knots per plant and 14.33 mm of plant longitude, while in the rest of media tested, results presented lower values.