

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, AMBIENTALES Y VETERINARIAS

INGENIERÍA AGRONÓMICA

TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO

“ DETERMINACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE DESINFECCIÓN Y UN
MEDIO DE CULTIVO PARA LA INTRODUCCIÓN Y
MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE ONCE ECOTIPOS DE *CUCURBITAS*
Y CUATRO DE *PASSIFLORAS* ”

AUTORA: VERÓNICA ELIZABETH PACHECO TACO

DIRECTORA: ING. GUADALUPE LÓPEZ

ASESORES: ING. CÉSAR TAPIA
BIOL. GABRIELA PIEDRA

ECUADOR

2005

INIAP - Estación Experimental Santa Catalina

RESUMEN

La diversidad genética existente en Ecuador en lo referente a cultivos andinos entre los que se pueden citar las *Passifloras* y *Cucurbitas*, ofrece buenas perspectivas para la obtención de cultivares de alta productividad y calidad de fruta debido a la variedad de especies adaptadas a diferentes altitudes y a las buenas características alimenticias.

Con el desarrollo de protocolos *in vitro* adecuados para estos géneros se puede conservar y propagar aceleradamente genotipos con buenas características agronómicas con el fin de disponer en cualquier momento de material de óptima calidad para programas de mejoramiento. Además al obtener material libre de patógenos (hongos, bacterias y virus) se puede asegurar un mayor rendimiento en el campo por la generación de material con alta calidad fitosanitaria y permitir el intercambio de germoplasma con otros países bajo las regulaciones vigentes.

La presente investigación se realizó en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en el Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología (DENAREF) en la Estación Experimental Santa Catalina con el fin de determinar una metodología de desinfección y un medio de cultivo para la introducción y micropropagación *in vitro* de *Cucurbitas* y *Passifloras*.

Se realizaron dos ensayos independientes para *Passifloras* y *Cucurbitas*. Cada uno de estos se llevó a cabo en tres etapas: Desinfección de explantes, introducción *in vitro* y micropropagación. Se seleccionaron once ecotipos de *Cucurbitas* y cuatro de *Passifloras*, en los cuales se evaluaron tres metodologías de desinfección y cuatro medios de cultivo tanto para la introducción como para la micropropagación *in vitro*.

En la etapa de desinfección los explantes de cada género fueron expuestos a tres metodologías de desinfección: Simple desinfección (d_1), doble desinfección (d_2) y desinfección con benomil y rifampicina (d_3). Las variables evaluadas fueron: Presencia de hongos, presencia de bacterias y porcentaje de explantes viables en tres épocas de evaluación (5, 10 y 15 días).

En las etapas de introducción y micropropagación *in vitro* se utilizó el medio básico de Murashige y Skoog (MS) complementado con diversas concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento. Las variables evaluadas en las dos etapas fueron: Longitud de planta, número de nudos por planta, presencia de raíces y porcentaje de supervivencia a los 15, 30 y 45 días.

Para *Cucurbitas* y *Passifloras*, en la etapa de desinfección, se presentan cuadros de resumen y gráficos comparativos en cada metodología de desinfección. En las etapas de introducción *in vitro* y micropropagación se utilizó un Diseño Completamente al Azar en arreglo factorial (ecotipos x medios de cultivo). Además se realizaron pruebas de Tukey al 5% para los factores ecotipos y medios de cultivo y para la interacción ecotipos por medios de cultivo.

La metodología de desinfección más efectiva para *Cucurbitas* fue la doble desinfección ya que con ella al finalizar las evaluaciones no se presentó contaminación por hongos, se obtuvo el promedio más bajo contaminación por bacterias (21,2%) y el mayor porcentaje de explantes viables (97%). En *Passifloras* la mejor metodología de desinfección fue la simple desinfección debido a que no se observó contaminación por bacterias, el porcentaje de contaminación por hongos fue bajo (8%) y todos los explantes sobrevivieron.

El medio de introducción m1 (MS + GA₃+ Pantotenato de Ca) fue el que presentó los mejores resultados para los dos géneros: En *Cucurbitas* se obtuvo plantas con 35.82 mm de longitud, 5,21 nudos por planta, 81,8% de explantes con raíces y un porcentaje de supervivencia del 100%. En *Passifloras* la longitud fue de 65,17 mm con 8 nudos por planta, un porcentaje de enraizamiento del 50% y con el 100% de explantes vivos.

El mejor medio de cultivo para la etapa de micropropagación fue el m4 (MS + GA₃ + ANA) tanto para *Cucurbitas* como para *Passifloras* ya que en este medio se consiguieron los mejores resultados para todas las variables evaluadas. En *Cucurbitas* todas los explantes sobrevivieron alcanzando una longitud de 21,39 mm con un promedio de 4.73 nudos por planta y un porcentaje de enraizamiento del

93,9%. En *Passifloras* el porcentaje de supervivencia fue del 100%, la longitud de 68,33 mm, el promedio de número de nudos fue de 7 por planta y un porcentaje de enraizamiento del 50%.

Se han obtenido los protocolos para el establecimiento y micropropagación *in vitro* de *Cucurbitas* y *Passifloras*, con los cuales se puede propagar grandes volúmenes de plantas de alta calidad fitosanitaria con igual identidad genética y en menor tiempo. Además, estos protocolos pueden ser modificados para reducir el crecimiento y desarrollo de las plántulas con el fin de conservar estos materiales, ya que la conservación de germoplasma bajo las condiciones *in vitro* es altamente seguro. Es así como se pueden eliminar los riesgos de pérdidas por causa del medio ambiente, disminuir el peligro de infecciones por patógenos y plagas y el costo de mantenimiento es inferior a cualquier otro método de conservación *ex situ*.

SUMMARY

Genetic diversity existing in Ecuador, regarding andean crops such as *Passiflora* and *Cucurbits*, offers good perspectives to obtain high quality and yielding cultivars due to the high variety of species adapted to different altitudes and also due to good nutritional characteristics.

The development of *in vitro* protocols for these genera will permit to conserve and to propagate rapidly elite genotypes in order to keep material availability for breeding programs. Additionally, pathogen free materials (virus, bacteria and fungus) can be obtained, assuming availability of materials with better quality and productivity that permit international exchange, under current regulations.

This research was conducted at the National Autonomous Institute for Agricultural Research (INIAP) in the National Department of Plant Genetic Resources and Biotechnology (DENAREF) located in Santa Catalina Experimental Station with the objective of identifying a disinfection methodology and media for introduction and micropropagation *in vitro* of *Cucurbits* and *Passifloras*.

Two independent essays were conducted for *Passiflora* and *Cucurbit*. Each one of these essays included three phases: Buds disinfection, *in vitro* introduction and micropropagation. Eleven ecotypes of *Cucurbit* and four of *Passiflora* were selected. Three methodologies for disinfection and four culture media for introduction and micropropagation were tested for these materials.

Buds from each genera were tested with three different disinfection methods: Simple disinfection (d1), double disinfection (d2) and disinfection by using benomil and rifampicina (d3). The following descriptors were evaluated: Presence of fungus (%), presence of bacteria (%) and viability of plantlets (%) at 5, 10 and 15 days.

During the introduction and micropropagation stages the Murashige and Skoog basic medium complemented by diverse concentrations and combinations of growth regulators. The evaluated variables included: plant length, number of knots per plant, root presence and plantlets surviving percentage at 15, 30 and 45 days.

For the disinfection stage, comparative figures and tables are presented for these species. For the introduction and micropropagation phases a Complete Random Design with a factorial arrangement (ecotypes by culture media) were used. Additionally, the Tukey test (5%) was applied for ecotypes and culture media and for the interaction ecotypes by culture media.

The more efficient disinfection method for Cucurbits was the double disinfection ones that no fungus infection was present and because this medium presented the least bacteria contamination (21,2%). With this method, 97% of plantlets were viable. For *Passiflora*, the simple disinfection was optimum due to the lack of bacteria contamination, low percentage of fungus contamination (8%) and all plants manage to survive.

The introduction media m1 (MS + GA3 + Calcium Pantotenato) presented the best results for these two species. *Cucurbits* presented the following values: 35,82 mm of plant length, 5,21 knots per plant, 81,8% of rooted plantlets and 100% of plantlets survival. *Passiflora* ecotypes presented plant length of 65.17 mm, 8 knots per plant and 50% of plantlets rooting; similarly 100% of plantlets survived.

Based on the results, the best culture medium for micropropagation of *Cucurbits* and *Passiflora* was m4 (Ms + Ga3 + ANA). In *Cucurbits* all plantlets survived reaching an average of 21,39 mm (length), 4,73 knots per plant and rooting percentage of 93,9%. In *Passiflora* 100% of the plantlets survived, they reach 68,33 mm, the average number of knots per plant was 7 and 50% of the plantlets presented a good root system.

Protocols for in vitro establishment and micropropagation for cucurbits and *Passifloras* have been obtained, these protocols will permit to multiply high number of plants, with high phytosanitary standards, genetic similarity and using less time. Besides, these protocols can be modified to reduce rapid growing of plants in order to conserve safely these materials by using in vitro techniques. By using this methodology we can void loss of germplasm due to environmental conditions, diminish pest and diseases infection and finally, the cost of maintaining germplasm is lower than any other ex situ conservation method.