

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**ESTABLECIMIENTO, MICROPROPAGACIÓN Y
ENRAIZAMIENTO *in vitro* DE GRANADILLA (*Passiflora
ligularis*, juss).**

INFORME FINAL



Elaborado por:
M.Sc. Dora Flores, Investigadora Principal
Ing. Jaime Brenes, Investigador Adjunto

Abril 2004

ESTABLECIMIENTO, MICROPROPAGACIÓN Y ENRAIZAMIENTO *in vitro* DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*, juss).

RESUMEN

El cultivo de la granadilla es una opción para los productores de la zona de los Santos, ya que en años anteriores se han tenido experiencias de exportación de fruta a nivel internacional, incluyendo países como Canadá y Alemania. Sin embargo entre los principales problemas que deben ser atendidos se menciona la heterogeneidad de las plantaciones, el bajo rendimiento y la mala calidad del producto, provocando la disminución de los volúmenes de exportación.

La multiplicación *in vitro* favorecería enormemente la explotación de este cultivo, ya que permitiría el establecimiento de plantaciones más homogéneas y contribuiría a mejorar la calidad del fruto. Además es importante resaltar que esta técnica también permite la conservación del germoplasma, contribuyendo a evitar la erosión genética de la especie.

En esta investigación la selección de plantas en campo se realizó con base en la productividad y la calidad del fruto. Las estacas colectadas presentaron de tres a cuatro nudos, un largo de 30 a 40 cm y un diámetro aproximado de 1 ½ a 2 cm, las cuales fueron trasladadas al invernadero.

El sustrato utilizado en la siembra de las estacas consistió de tierra con un alto contenido de materia orgánica, en una relación de 3:1, previamente desinfectado con Vitavax®.

Se logró hasta un 75% de enraizamiento y brotación de las estacas.

Para el establecimiento *in vitro* los mejores resultados se obtuvieron con el material proveniente de invernadero, el cual fue desinfectado con una mezcla de Agrimicín y Benlate 5g L⁻¹ cada uno y una segunda desinfección con Hipoclorito de Sodio al 50% producto comercial.

El medio de cultivo utilizado fue un M&S suplementado con 3mg L⁻¹ de 6-Bencil Amino Purina. Se logró un 21% de explantes limpios y brotados.

Para la multiplicación *in vitro*, los explantes se subcultivaron en el mismo medio empleado en la etapa de introducción. Se observó una elongación de los brotes.

Las etapas de desarrollo y enraizamiento no se realizaron, debido a la poca disponibilidad de material en la etapa de multiplicación.

Introducción

La demanda por los alimentos para la subsistencia se ha venido satisfaciendo a través de técnicas agrícolas tradicionales las cuales incorporan en la mayoría de los casos un uso inadecuado de agroquímicos, esto ha provocado efectos negativos importantes para el medio ambiente y la salud humana y animal, sin embargo en muchos de los casos no se ha logrado el fin deseado.

El uso de las nuevas estrategias que permitan un desarrollo sostenible con el fin de satisfacer la necesidad por alimentos a nivel mundial está basada en técnicas biotecnológicas, que combinadas con las técnicas tradicionales pueden contribuir a desarrollar una estrategia integral como parte de la solución a los grandes problemas que actualmente enfrentan los productores a nivel nacional.

En la gran mayoría de los casos el material de siembra utilizado por los agricultores no es el más adecuado lo cual provoca bajos rendimientos y mala calidad del producto.

Entre las técnicas biotecnológicas más usadas se encuentra el cultivo de tejidos, el cual consiste en cultivar un explante con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas, en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas (Roca y Mroginski 1991), entre sus ventajas está la propagación en forma masiva de una planta seleccionada con características notables de rendimiento y calidad, obteniendo replicas de iguales características a la planta original y como consecuencia un crecimiento más rápido y cosechas más uniformes.

La multiplicación *in vitro* es especialmente útil en cultivos como la granadilla que son de polinización abierta y se propagan por semilla, lo que ha conducido al establecimiento de plantaciones desuniformes y la obtención de frutos sin calidad.

Marco teórico

La granadilla (*Pasiflora ligularis*) es la especie más importante de las tierras altas de América Tropical arriba de los 1000 metros y es encontrada cultivada desde México hasta Bolivia (León, 1987 y Morton, 1987). En Costa Rica existen algunas plantaciones las cuales se ubican principalmente en la Zona de los Santos y el Guarco de Cartago.

Es una planta trepadora de tallos cilíndricos y glabros, hojas acorazonadas de 8 a 16 cm de largo, de color verde oscuro. El pecíolo presenta de 3 a 5 pares de glándulas filiformes.



Las flores se encuentran en pedúnculos hasta de 5 centímetros de largo, los sépalos y pétalos son oblongos, verduscos y miden de 3 a 5 cm de largo. La corona está formada por varias series de filamentos que se caracterizan por presentar bandas alternas y transversales, azules y blancas (León, 1987 y Morton, 1987).

El fruto es de forma ovoide o elipsoidal, tiene el pedúnculo de 6 a 12 cm de largo, la cáscara es dura, amarilla, con puntos blancos en la madurez, se notan 6 líneas longitudinales. El epicarpo está constituido de esclerénquima, de menos de un milímetro de espesor, pero que da al fruto una consistencia fuerte, el mesocarpo es blanco y esponjoso de 5 milímetros de ancho y el endocarpo consta de una película blanca, que se separa en la madurez del mesocarpo.

Las semillas están distribuidas en 3 placentas longitudinales, elípticas, negras y rodeadas por un arilo amarillo y es la parte comestible, tiene un sabor agradable dulce y aromático (León, 1987 y Morton, 1987).

La granadilla es una especie de polinización abierta, razón por la cual presenta un alto porcentaje de variabilidad genética.

Tradicionalmente este cultivo ha sido poco explotado y su manejo se ha llevado a cabo por medio de la implementación de técnicas agrícolas tradicionales.

El establecimiento de las plantaciones se ha realizado a partir de semilla botánica, lo cual ha generado una gran variación entre las plantas, provocando serios problemas en la calidad del producto.

La multiplicación *in vitro* favorecería enormemente la explotación de este cultivo, ya que permitiría el establecimiento de plantaciones más homogéneas y contribuiría a mejorar la calidad del fruto.

Además es importante resaltar que esta técnica también permite la conservación del germoplasma, contribuyendo a evitar la erosión genética de la especie .

DEFINICION DEL PROBLEMA

Costa Rica ha basado su economía agrícola en la explotación de un número reducido de cultivos como el banano, la caña de azúcar, el café y el arroz, también en los últimos años ha explotado los ornamentales y las raíces y los tubérculos, sin embargo las nuevas políticas internacionales y la reducción de los precios plantea la urgente necesidad de trabajar en la explotación de cultivos no tradicionales, incorporándoles nueva tecnología y valor agregado, con el fin de ofrecer alternativas a los productores y así minimizar los riesgos de variación de la oferta y demanda de los cultivos tradicionales.

Es importante destacar que debido a la falta de diversificación agrícola, falta de tecnología y poco valor agregado de muchos de los productos agrícolas que se cultivan en la zona de los Santos, ha incidido en las expectativas económicas de los agricultores provocando gran desmotivación y un fenómeno de

migración importante de sus habitantes hacia zonas urbanas e inclusive fuera del país.

Años atrás en la zona de los Santos una gran mayoría de cultivos no tradicionales fueron sustituidos por el cultivo del café (aproximadamente una reducción del 60% del área sembrada)¹, en ese tiempo se cotizaba a muy buen precio, sin embargo con la presencia de nuevas plagas, enfermedades y el cambio de políticas comerciales internacionales, ha hecho que la actividad deje de ser rentable para un número significativo de agricultores.

El cultivo de la granadilla es una opción para estos productores, ya que en años anteriores, se han tenido experiencias de exportación de fruta a nivel internacional incluyendo países como Canadá y Alemania.

Actualmente se conserva algún material que puede ser rescatado, sin embargo los productores no cuentan con tecnología que les permita implementar un manejo adecuado. La explotación de este cultivo aplicando técnicas modernas ofrece buenas posibilidades a los agricultores de esta zona.

Los principales problemas que deben ser atacados son la heterogeneidad de las plantaciones, el bajo rendimiento y la mala calidad del producto.

Con este proyecto se pretende seleccionar en campo material elite, con el fin de establecer un protocolo para producir masivamente materiales de buena calidad, además establecer la metodología de manejo en invernadero.

A futuro los agricultores dispondrían de materiales de excelente cualidades, que lograrían obtener en forma oportuna, para el establecimiento de sus plantaciones, asegurándose un alto rendimiento en su cosecha y la obtención de un producto de buena calidad.

El uso de la diversificación agrícola, aunado a la aplicación de tecnología moderna, abre mayores posibilidades de competencia a nuestros productores, ya que las diferentes políticas de apertura de mercados actualmente han

¹ Comunicación Personal Ing José Alberto Flores, Planificador Económico Social y Extensionista Agrícola

revolucionado el mundo, exigiéndole a los países mayores rendimientos y mejor calidad de los productos que se ofrecen.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer el protocolo para la micropropagación y el enraizamiento *in vitro* de la granadilla (*Pasiflora ligularis*).

Objetivos específicos

- Seleccionar plantas madres
- Seleccionar el tipo de explante que se va a utilizar para establecer *in vitro*.
- Evaluar diferentes métodos de desinfección para la introducción de explantes de granadilla.
- Evaluar diferentes medios de multiplicación para lograr la brotación de los materiales introducidos.
- Probar diferentes medios de cultivo para el crecimiento *in vitro* de la granadilla.
- Evaluar diferentes medios de cultivo para el enraizamiento de las vitroplantas.

Cuadro resumen de objetivos, actividades y productos

Objetivos	Actividades	Productos
Seleccionar plantas madre y coleccionar material	Identificar en el campo plantas élite de granadilla en cinco zonas: la Sierra, el Congo de Santa María de Dota, el campus del ITCR, Paraíso de Cartago y La Pastora San Marcos de Tarrazú Seleccionar estacas Sembrar las estacas en el invernadero	Disponibilidad de estacas brotadas en el invernadero
Seleccionar tipo de explante	Se seleccionaron brotes provenientes de campo y de invernadero	Los brotes seleccionados presentaron un tamaño de 15mm de longitud
Evaluar diferentes métodos de desinfección	Se realizaron 13 introducciones utilizando material proveniente de campo y de invernadero empleando diferentes desinfectantes en forma individual y mezclados, variando los tiempos de exposición	Microestacas provenientes de invernadero establecidas <i>in vitro</i>
Evaluar diferentes medios de multiplicación	Se probó únicamente un medio M&S suplementado con 3 mg L ⁻¹ de bencilamino purina (BAP)	Medio de cultivo establecido.
Evaluar diferentes medios de desarrollo	No se probó ningún medio	No se logró llegar a esta etapa
Evaluar diferentes medios de enraizamiento	No se probó ningún medio	No se logró llegar a esta etapa

Metodología

Localización del ensayo.

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales y en el invernadero del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Central, Cartago.

Selección del material vegetal

El material vegetal fue identificado y seleccionado por los investigadores del Centro de Investigación en Biotecnología en forma conjunta con el Agente de Extensión Agrícola de la Agencia de Servicios Agropecuarios y los agricultores dedicados al cultivo. La selección de plantas se realizó con base en la productividad y la calidad del fruto. La investigación se inició con material proveniente de la Sierra, el Congo de Santa María de Dota, el campus del ITCR, de Paraíso de Cartago y de la Pastora de San Marcos de Tarrazú en la zona de los Santos.

Establecimiento de estacas en invernadero

Las estacas seleccionadas presentaron de 3 a 4 nudos, y una madurez intermedia. Fueron expuestas a un enraizador comercial Agrirroot^R (AIB al 0.01%)

Posteriormente se sembraron en bolsas que contenían como sustrato una mezcla de tierra con granza de arroz desinfectada con Vitavax^R.

Desinfección e introducción al cultivo *in vitro*.

Para la introducción de material *in vitro* inicialmente se trabajó con material proveniente de campo. Posteriormente cuando las estacas que se introdujeron al invernadero brotaron, se inició la introducción y establecimiento con material de invernadero.

Para las pruebas de desinfección se utilizaron funguicidas y bactericidas comerciales, Benlate y Agri-mycin 100, además hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio, alcohol al 70%, solos o mezclados. Una vez desinfectados se inocularon en diferentes medios de cultivo.

Se realizaron nueve introducciones *in vitro* de material proveniente de campo, ocho fueron a partir de microestacas y una de cultivo de meristemos, además se logró realizar una introducción a partir de microestacas empleando material proveniente de invernadero. Los procesos de desinfección y el medio de cultivo, se fue variando en las diferentes introducciones, por esta razón se anotará en los resultados el procedimiento de desinfección y el medio de cultivo empleado en cada introducción, con el fin de contribuir a una mejor comprensión de este informe.

Multiplicación *in vitro*

Una vez establecido el material *in vitro*, los explantes fueron subcultivados en un medio de cultivo M&S suplementado con 3mg/L de 6- Bencil Amino Purina (BAP).

Desarrollo y Enraizamiento

Las etapas de desarrollo y enraizamiento no se lograron debido a la poca cantidad de material que se encontraba en la etapa de multiplicación.

Resultados y discusión

Selección del material vegetal

Colecta de estacas y brotes



Plantación de granadilla

Las primeras plantas madres fueron seleccionadas en las fincas de productores, ubicadas en la Sierra y el Congo de Santa María de Dota, sin embargo las plantas se encontraban en período de floración y fructificación. Esta condición no es la óptima para iniciar un proceso de obtención de estacas y brotes, ya que la planta tiene detenido el crecimiento vegetativo.

Sin embargo, a pesar de esta situación se realizaron varias introducciones *in vitro*, con brotes provenientes directamente del campo, con el fin de iniciar las pruebas de desinfección del material. Las introducciones de la 1 a la 8 se realizaron con material proveniente de campo.

Desinfección e introducción al cultivo *in vitro*



Eje de granadilla con yemas

Se colectaron ejes de las plantas y se trasladaron al laboratorio. Posteriormente se seccionó el eje en trozos de aproximadamente 15mm que presentaran una yema, se sometieron a un proceso de desinfección.

A continuación se describe el medio de cultivo, el procedimiento de desinfección y los resultados obtenidos en las dos primeras introducciones.

Introducciones 1 y 2

Medio de cultivo

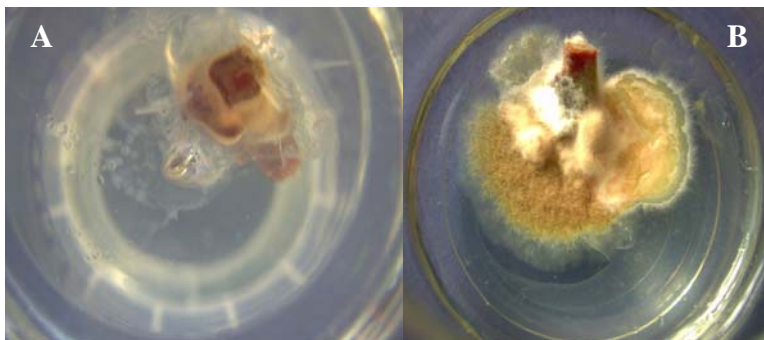
MEDIO DE CULTIVO	
Macroelementos	50ml
Microelementos	2ml
Hierro	5ml
Vitaminas	5ml
Sacarosa	30g
Phyta gel	2g
pH	5,6

Procedimiento de desinfección

- Lavados con agua y jabón por 10 minutos
- Lavados con agua bidestilada
- Exposición de las estacas a una solución de Agrimycin 2g L⁻¹, Benlate 2g L⁻¹ por 10 minutos
- Posteriormente se realizaron tres lavados con agua bidestilada.
- Exposición de las estacas a Hipoclorito de calcio (CaOCl) al 6% producto comercial por un período de 15 minutos en bomba de vacío
- Por último se procedió a realizar tres lavados con agua bidestilada estéril en la cámara de flujo laminar.

Resultados

Introducción	Total de explantes introducidos	Contaminación fungosa	Contaminación Bacteriana	Sobrevivencia	Presencia de clorosis
1	96	72,9%	27%	0%	0%
2	48	25%	56.2%	18.8%	0%



Contaminación bacteriana y fungosa

A pesar de que se obtuvo un 18.8% de supervivencia en la segunda evaluación, continuaron apareciendo hongos y bacterias que tardaron más en expresarse, y a los diez días ocasionaron la pérdida total del material.

Después de que se analizaron los datos obtenidos en la primera etapa de introducciones se decidió cambiar el medio de cultivo y trabajar con material colectado en el campus del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

A continuación se describen los medios de cultivo y el procedimiento de desinfección .

Introducciones 3, 4 y 5

Medios de cultivo

MEDIO DE CULTIVO N0 1		MEDIO DE CULTIVO N0 2	
Macroelementos	50ml	Macroelementos	50ml
Microelementos	2ml	Microelementos	2ml
Hierro	5ml	Hierro	5ml
Vitaminas	5ml	Vitaminas	5ml
BAP	0,5mg	BAP	1,5mg
AG3	0,5mg	AG3	1,5mg
Sacarosa	30g	Sacarosa	30g
Phyta gel	2g	Phyta gel	2g
pH	5,6	pH	5,6

Procedimiento de desinfección

- Lavados con agua y jabón + tween 20 por 15 minutos
- Lavados con agua bidestilada.
- Exposición de las estacas a una solución de Agrimycin 2g L⁻¹, Metiofan 5cc L⁻¹ y Kasumin 5cc L⁻¹ por un período de 40 minutos
- Posteriormente se realizaron tres lavados con agua bidestilada.
- Exposición de las estacas a Hipoclorito de calcio (CaOCl) al 4% producto comercial por un período de 15 minutos
- Se realizaron lavados con agua bidestilada
- Exposición del material a Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 50% producto comercial durante un período de 15 minutos en cámara de flujo laminar
- Por último se procedió a realizar tres lavados con agua bidestilada estéril.

Resultados

Introducción No 3

Medio de cultivo	Total de explantes introducidos	Contaminación fungosa	Contaminación Bacterina	Sobrevivencia	Presencia de clorosis
Medio 1	28	11%	0	25%	64%
Medio 2	40	37.5%	33%	16.6%	12.9%

Al provenir los explantes directamente del campo se contaminaron a los 10 días después de introducidos.

Introducción No 4

Medio de cultivo	Total de explantes introducidos	Contaminación fungosa	Contaminación Bacteriana	Sobrevivencia	Presencia de clorosis
Medio 1	44	42%	37%	5%	16%
Medio 2	48	83,4%	16,6%	0	0

Los explantes que sobrevivieron se contaminaron a los 15 días después de introducidos.

Introducción No 5

Medio de cultivo	Total de explantes introducidos	Contaminación fungosa	Contaminación Bacteriana	Sobrevivencia	Presencia de clorosis
Medio 1	48	35,4%	16,6%	20,8%	27%
Medio 2	31	35,4%	13%	35,4%	16%

A los 10 días los explantes sobrevivientes se contaminaron con bacteria endógena y se necrosaron.

Se realizó un análisis de los datos obtenidos y se decidió variar el medio de cultivo #2 y proponer un medio considerando la disminución de la concentración de sales

y manteniendo la concentración de los reguladores del crecimiento en relación a los dos medios planteados anteriormente, ya que a pesar de que en algunas de las introducciones anteriores se logró la desinfección de algunos explantes, luego al pasar el tiempo comenzaron a necrosarse los explantes y no se logró la elongación del brote.

Introducciones 6 y 7

A continuación se describen los medios:

MEDIO DE CULTIVO N0 1		MEDIO DE CULTIVO N02	
Macroelementos	50ml	Macroelementos	25ml
Microelementos	2ml	Microelementos	1ml
Hierro	5ml	Hierro	5ml
Vitaminas	5ml	Vitaminas	5ml
BAP	0,5mg	BAP	1,5mg
AG3	0,5mg	AG3	1,5mg
Sacarosa	30g	Sacarosa	30g
Phyta gel	2g	Phyta gel	2g
pH	5,6	pH	5,6

Procedimiento de desinfección:

Debido a que los porcentajes de contaminación bacteriana y fungosa continuaron altos se decidió realizar una desinfección más fuerte:

- Lavados con agua y jabón + Tween 20 por 25 minutos
- Lavados con agua bidestilada.
- Exposición de las estacas a una solución de Agrimycin 2g L⁻¹, Metiofan 5cc L⁻¹ y Kasumin 5cc L⁻¹ por un período de 40 minutos
- Posteriormente se realizaron tres lavados con agua bidestilada.
- Exposición del material a Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 50% producto comercial durante un período de 15 minutos en cámara de flujo laminar
- Se realizaron lavados con agua bidestilada
- Exposición de las estacas a Hipoclorito de calcio (CaOCl) al 4% producto comercial por un período de 15 minutos
- Por último se procedió a realizar tres lavados con agua bidestilada estéril.

Resultados

Introducción No 6

Medio de cultivo	Total de explantes	Contaminación fungosa	Contaminación Bacteriana	Sobrevivencia	Presencia de clorosis
Medio 1	46	57,6%	26,8%	7,6%	8%
Medio 2	47	66,6%	16,6%	8,5%	8,3%

La evaluación se llevó a cabo a los 3 días y luego a los 10 días de introducido el material, se observó un incremento importante en la esporulación de los hongos y a los 15 días se murió el material.

Resultados

Introducción No7

Medio de cultivo	Total de explantes introducidos	Contaminación fungosa	Contaminación Bacteriana	Sobrevivencia	Presencia de clorosis
Medio 1	42	19%	50%	16,6%	14,4%
Medio 2	45	28.85%	22.15%	20%	29%

En esta introducción se logró mantener la sobrevivencia de algunos explantes por un período de 30 días, sin embargo conforme transcurría el tiempo los explantes iniciaron un proceso de oxidación y se perdieron a pesar de subcultivarlos.

Introducción No8

Medio de cultivo

MEDIO DE CULTIVO	
Macroelementos	100ml
Microelementos	2ml
Hierro	5ml
Vitaminas	5ml
BAP	0,5mg
AG3	0,5mg
Sacarosa	30g
Phyta gel	2g
pH	5,6

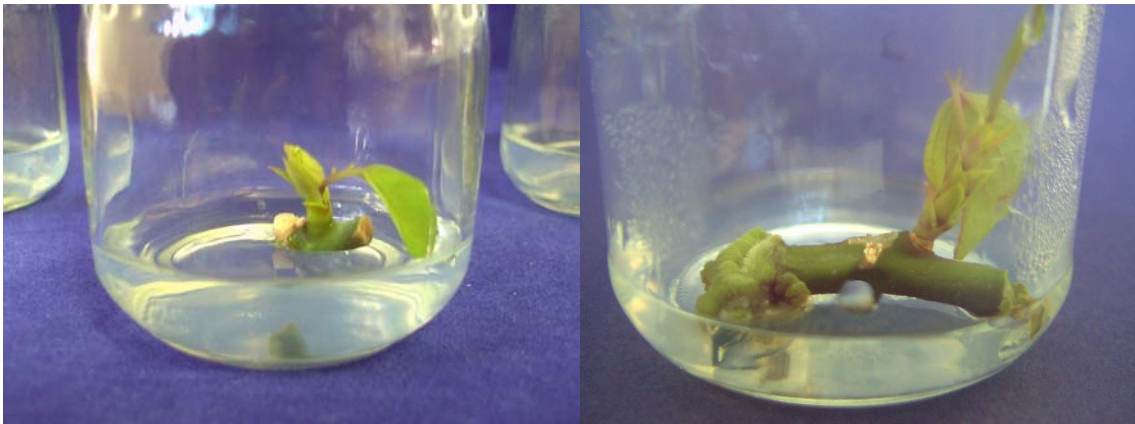
Procedimiento de desinfección

- Lavados con agua y jabón + Tween 20 por 25 minutos
- Lavados con agua bidestilada.
- Exposición de las estacas a una solución de Agrimycin 2g L⁻¹, Metiofan 5cc L⁻¹ y Kasumin 5cc L⁻¹ por un período de 40 minutos
- Posteriormente se realizaron tres lavados con agua bidestilada.
- Exposición del material a Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 50% producto comercial durante un período de 15 minutos. Luego se realizaron tres lavados agua bidestilada.
- Exposición de las estacas a Hipoclorito de calcio (CaOCl) al 4% producto comercial por un período de 15 minutos, en cámara de flujo laminar
- Por último se procedió a realizar tres lavados con agua bidestilada estéril.

Resultados

Introducción No 8

Medio de cultivo	Total de explantes introducidos	Contaminación fungosa	Contaminación Bacteriana	Sobrevivencia	Presencia de clorosis
Medio	88	30,6%	36,3%	5,8%	27,3%
Medio	93	32,4%	27%	13,6%	27%



Brotos de granadilla *in vitro*

Uno de los factores que ha incidido en el poco éxito que se ha tenido en la etapa de establecimiento *in vitro* de la granadilla, ha sido trabajar con material que proviene del campo, ya que es material muy contaminado y dependiendo de las condiciones climáticas se agrava más la contaminación. La mayoría de las introducciones se realizaron en épocas muy húmedas, lo cual favoreció la presencia de hongos y bacterias en los brotes que se introdujeron.

Debido a esta situación no se logró estandarizar un protocolo de desinfección y es la razón por la cual los resultados varían mucho las introducciones.

CULTIVO DE MERISTEMOS

Se colectaron ejes de las plantas y se trasladaron al laboratorio, posteriormente se seccionó el eje en trozos de aproximadamente dos centímetros que presentaban una yema y se sometieron al siguiente proceso de desinfección:

- Lavados con agua y jabón + Tween 20 por 25 minutos
- Lavados con agua bidestilada.
- Exposición de las estacas a una solución de Agrimycin 2g L^{-1} , Metiofan 5cc L^{-1} y Kasumin 5cc L^{-1} por un período de 40 minutos
- Posteriormente se realizaron tres lavados con agua bidestilada.
- Exposición de las estacas a Hipoclorito de calcio (CaOCl) al 4% producto comercial por un período de 15 minutos y se realizaron tres lavados con agua bidestilada.
- Exposición del material a Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 50% producto comercial durante un período de 15 minutos en cámara de flujo laminar.
- Por último se procedió a realizar tres lavados con agua bidestilada estéril.

Una vez desinfectado el material se procedió a la extracción del meristemo utilizando un estereoscopio.

A continuación se describe el medio de cultivo para la introducción de meristemos:

MEDIO DE CULTIVO	
Macroelementos	100ml
Microelementos	2ml
Hierro	5ml
Vitaminas	5ml
ANA	0,1mg
BAP	0,5mg
Sacarosa	30g
Phyta gel	2g
pH	5,6

Resultados

# Introducción	Total de explantes introducidos	Contaminación fungosa	Contaminación Bacteriana	Sobrevivencia	Presencia de clorosis
1	48	23%	33,3%	43,7%	0
2	59	6,7%	17%	46%	30%



Meristemo de granadilla

En ambas introducciones se logró disminuir los porcentajes de contaminación fungosa y bacteriana, además se obtuvo un alto porcentaje de sobrevivencia de los meristemas, sin embargo la mayoría formó un callo y no se diferenció.

ENRAIZAMIENTO Y BROTACIÓN DE ESTACAS EN INVERNADERO

Paralelamente a los trabajos realizados de introducción de material proveniente de campo, se establecieron varios lotes de estacas en invernadero con el fin de inducir el enraizamiento y la brotación.

Para el establecimiento de este ensayo hubo que esperar a que las plantas finalizaran el período de fructificación, con el fin de promover el crecimiento vegetativo.

Las estacas presentaban de tres a cuatro nudos y un diámetro de 1 ½ a 2 cm, fueron expuestas a una concentración de 0.01 % de ácido indolbutírico (AIB) durante un minuto, luego fueron sembradas en bolsa con un sustrato con alto contenido de materia orgánica y granza de arroz, previamente desinfectado con Vitavax.

En varias ocasiones se fue a las diferentes zonas a recolectar material y no se localizó material con el tamaño y grosor adecuado, por esta razón se procedió a trabajar con las pocas plantas de granadilla que se encuentran en el campus del ITCR, con el fin de disminuir el gasto en transporte, sin embargo se observó la presencia de un hongo que provocó la muerte de las estacas.

Debido a esta situación se buscó el apoyo de un fitopatólogo de la Universidad Nacional quién visitó el campus y tomo una serie de muestras, con el fin de analizar el estado fitosanitario del material con que se estaba trabajando. Fue así

que se logró identificar que el material del campus está contaminado por *Stemphyllium sp.* y *Fusarium solani*.

Luego del análisis y de la confirmación del estado fitosanitario del material se inició la búsqueda de nuevas plantaciones y se identificó un material en Paraíso de Cartago. Se introdujo de nuevo material al invernadero sin embargo se volvió a presentar el hongo y las estacas murieron.

Posteriormente se identificó una finca la Pastora en San Marcos de Tarrazú, destinada a la producción de frutales de altura (peras, manzanas, ciruelas, melocotón y granadilla).

La plantación de granadilla tiene una edad de siete años, es manejada en forma orgánica y es de origen colombiano. Las estacas colectadas presentaron de tres a cuatro nudos, un largo de 30 a 40 cm y un diámetro aproximado de 1 ½ a 2 cm.

Una vez cortadas las estacas, se preparó una pasta de Vitavax®. que se colocó en el corte superior, para proteger el corte expuesto ante el ataque de hongo y bacterias presentes en el ambiente y el corte inferior se introdujo en el recipiente que contenía el enraizador comercial, Agrirrot (0,01% AIB).

El sustrato utilizado en la siembra de las estacas consistió en tierra con un alto contenido de materia orgánica, en una relación de 3:1, se llenaron macetas con medio kilogramo de sustrato previamente desinfectado con Vitavax® y se procedió a la siembra.

Resultados

# de Introducción	# de estacas introducidas	# estacas enraizadas	Porcentaje
1	20	10	50%
2	22	15	75%
3	20	13	65%

Lograr el enraizamiento de este material estuvo influenciado por la calidad fitosanitaria del material, la edad fisiológica y cuidado en general de la plantación. En las tres siembras realizadas siempre se obtuvo un 50% o más de enraizamiento y brotación de las estacas.



Estaca enraizada



Estaca brotada

Introducción *in vitro* de material proveniente de invernadero

La estimulación del enraizamiento y brotación de las estacas en invernadero fue determinante para la etapa de introducción y establecimiento *in vitro* de material, ya que estas plantas sirvieron de fuente de yemas.

Las estacas brotadas fueron tratadas con funguicidas y bactericidas (Agrimycin® + Benlate® 9g L⁻¹) en el invernadero, con el fin de iniciar la limpieza del material antes de que se realizara la introducción al laboratorio, lo que contribuyó a tener mayor éxito en esta etapa.

A continuación se describe la metodología de desinfección

Los brotes se separaron de las estacas y posteriormente se lavaron con agua abundante.

Luego se lavó de uno en uno con un cepillo de dientes suave.

Posteriormente el material vegetal se expuso a una mezcla de Benlate® + Agrimycin® 5g L⁻¹ , por un período de 60 minutos y se realizaron tres lavados con agua bidestilada.

Luego se expuso el material a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 50% producto comercial por 10 minutos y se realizaron tres lavados con agua bidestilada estéril.

Por último se eliminaron las brácteas de los brotes en cámara de flujo laminar y se lavaron los brotes con agua bidestilada estéril.

El medio de cultivo empleado consistió en un M&S suplementado con 3mg L⁻¹ mgL⁻¹ BAP.

Resultados

# Introducción	Total de explantes introducidos	Contaminación fungosa	Contaminación Bacteriana	Limpios	Muertos
1	38	44%	26.3%	21.05%	7.91

Esta introducción fue la única que se logró realizar con material proveniente de invernadero, lo que permitió aplicar una desinfección más leve, lo cual se ve reflejado en la calidad de los explantes que sobrevivieron.

Es importante mencionar que la yema no sufrió maltrato, por lo que logró abrir con más fuerza. Además el material actualmente fue subcultivado en medio de cultivo fresco manteniendo la misma fórmula y los explantes continúan muy vigorosos.



En esta foto se observan los explantes limpios de hongos y bacterias.

Además muestran buena apertura de la yema.

No se presentaron problemas de fenolización de los explantes.

Microestacas de granadilla brotadas

Conclusiones

Entre las principales conclusiones se mencionan las siguientes:

Las estacas recolectadas en la Sierra, el Congo, Paraíso de Cartago y el campus del ITCR, presentaron una contaminación severa por *Stemphyllium* sp. y *Fusarium solani*.

El material proveniente de la Pastora de San Marcos de Tarrazú, en su mayoría no presentó problemas fitosanitarios, por lo que fue el único material con el que se logró una buena respuesta al enraizamiento y la brotación.

Para lograr el establecimiento de material *in vitro*, fue indispensable tomar los brotes de estacas establecidas en invernadero, ya que a este material se le aplicaron algunos agroquímicos, con el fin de introducir al laboratorio material más limpio.

El tamaño de la yema que posee la estaca debe ser de 5mm aproximadamente, ya que yemas de menor tamaño son muy inmaduras y no logran abrir una vez establecidas *in vitro*.

El medio de multiplicación (M&S suplementado con 3mg L⁻¹ de BAP) contribuyó a la elongación del brote.

Recomendaciones:

Actualmente se continúa dando mantenimiento al material establecido *in vitro*, con el fin de que este no se pierda y a futuro continuar el trabajo con esta especie.

Problemas

Los problemas fitosanitarios que presentó el material proveniente de la Sierra, el Congo de Dota, Paraíso de Cartago y el campus del ITCR, provocó un atraso importante en el establecimiento de las estacas en invernadero. Esta situación demoró el inicio de la etapa de introducción y establecimiento del material *in vitro*, sin embargo en este momento hay material en el invernadero y en el laboratorio al cual se le está dando mantenimiento, con el fin de continuar con la etapa de introducción *in vitro* y a futuro seguir con la investigación de esta interesante y prometedora especie.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Abdelnour, A.; Escalant, V. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Centro Agronómico de Investigaciones y Enseñanza. Turrialba. Costa Rica. p 38.
- 2- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. 333 p.
- 3- George, E., Puttock, D. 1987. Plant culture media. Formulation and uses. England. 141 – 142p.
- 4- León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José. 404 – 404p.

- 5- Muraskige, T., Skoog, F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15. 473 – 497.

- 6-Morton, J. 1987. Sweet Granadilla. 7 agosto del 2000. [Http //www.hort.purdue.edu/newcrop/ morton/ sweet](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/sweet). 3p

- 7- Pierik . 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi Prensa, España. 325 p.

- 8- Roca, W., Mroginski, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Colombia, 968p.