

Propagación por estacas y estudio preliminar del establecimiento in vitro de granadilla (*Passiflora ligularis*, juss)

Dora Flores ¹

Jaime Brenes ²

Ana Guzmán ³

Palabras clave

Granadilla, cultivo de tejidos, macropropagación, micropropagación.

Resumen

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

En Costa Rica este cultivo ofrece una opción de diversificación agrícola para la zona de Los Santos y El Guarco de Cartago. El uso de técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos favorece la explotación de este, ya que permitiría el establecimiento de plantaciones más homogéneas que contribuirían a mejorar el rendimiento y la calidad del fruto.

El objetivo de esta investigación fue establecer la metodología de propagación por estacas y realizar un

estudio preliminar que conduzca al establecimiento in vitro de material. Se realizaron tres introducciones de estacas al invernadero y es empleado Agrirrot (0,01% AIB) para inducir el enraizamiento; se obtuvo un 50% o más de enraizamiento y brotación de las estacas en cada introducción.

Para el establecimiento in vitro se introdujeron brotes provenientes de estacas pretratadas en el invernadero. Se obtuvo un 37,5% de explantes muertos por quema, un 50% presentó contaminación fungosa, bacteriana o ambas y un 12,5% de material limpio y brotado.

Introducción

La granadilla (*Passiflora ligularis*) pertenece a la familia Passifloraceae. Es una especie importante en las tierras altas de América tropical; arriba de los 1000 metros y se encuentra cultivada desde México hasta Bolivia (León,

1 Ingeniera agrónoma, ITCR, teléfono: 550-2285, correo electrónico: dflores@itcr.ac.cr.

2 Ingeniero agrónomo, ITCR, teléfono: 550-2285, correo electrónico: jabrenes@itcr.ac.cr.

3 Estudiante de biotecnología, ITCR, teléfono: 550-2474, correo electrónico: apguzmanm@yahoo.com.

1987 y Morton, 1987). Es una especie de polinización abierta, razón por la cual presenta un alto porcentaje de variabilidad genética.

En Costa Rica este cultivo ofrece una opción de diversificación agrícola para la zona de Los Santos y El Guarco de Cartago. Sin embargo, 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.

El uso de técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos favorece la explotación de este, pues permitiría el establecimiento de plantaciones más homogéneas las cuales contribuirían a mejorar el rendimiento y la calidad del fruto, lo cual proporcionaría mayores posibilidades de competitividad a los productores, ya que en años anteriores se han tenido experiencias de exportación de fruta a escala internacional, incluyendo también países como Canadá y Alemania.

Es importante resaltar que con esta técnica se procura además la conservación del germoplasma, lo cual contribuye a evitar la erosión genética de la especie (CIAT, 1991).

El objetivo de esta investigación fue establecer la metodología de propagación por estacas y realizar un estudio preliminar que conduzca al establecimiento in vitro de material.

Materiales y métodos

Localización de la investigación

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

Selección del material vegetal

El material vegetal fue identificado y seleccionado por los investigadores del CIB, en forma conjunta con el agente de Extensión Agrícola de la Agencia de Servicios Agropecuarios de la zona de Los Santos y los agricultores dedicados al cultivo, en las localidades de La Sierra, El Congo de Santa María de Dota y de La Pastora de San Marcos de Tarrazú.

Establecimiento de estacas en invernadero

Las estacas colectadas presentaron de tres a cuatro nudos, un largo de 30 a 40 cm y un diámetro de grosor 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 protegerlo del ataque de hongos y bacterias presentes en el ambiente; el corte inferior se sumergió en agua y luego se introdujo en un enraizador comercial, Agrirrot (0,01% AIB).

Posteriormente, se sembraron en bolsas que contenían como sustrato tierra con materia orgánica desinfectada con Vitavax®. Se aplicó una solución de Agri-mycín® y Benlate® 3 gL⁻¹ cada quince días, con el fin de procurar la fitosanidad del material.

Material experimental

El material experimental por introducir en el cultivo in vitro consistió de brotes y nudos provenientes de estacas enraizadas en condiciones de invernadero.

Desinfección de los explantes

Los brotes se separaron de la estaca, se lavaron con agua y jabón durante 5 minutos y se enjuagaron con agua destilada. Se realizó una primera desinfección utilizando una mezcla de Agrimycín® 5 gL⁻¹ + Benlate® 5 gL⁻¹ + Metiofán 2 mL⁻¹, durante un

período de una hora en agitador orbital. Luego se aplicaron tres lavados con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar. Se realizó una segunda desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3,5 i.a, a una dosis del 50% (v/v) del producto comercial, durante 8 minutos, y nuevamente se hicieron tres enjuagues con agua destilada. Por último, se eliminaron las brácteas de los brotes en cámara de flujo laminar.

Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado consistió de las sales y vitaminas descritas por Murashige y Skoog (1962), con 30 g de sacarosa, 2,3 gL⁻¹ de Phytigel®. El pH se ajustó a 5,6. Se dispensó un volumen de 20 mL de cultivo por frasco.

Establecimiento in vitro

Durante la etapa del establecimiento in vitro se sembró un brote o nudo por frasco en el medio de cultivo suplementado con 5mgL⁻¹ de Bencil aminopurina (BAP), y se colocaron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 21 ± 2 °C y 2000 lux durante un período de dos semanas,

luego se subcultivaron en un medio con 3,5 mgL⁻¹ de BAP.

Micropropagación

Durante la etapa de micropropagación, los explantes limpios de hongos y bacterias obtenidos durante la etapa de establecimiento, fueron cultivados en el medio básico al que se le adicionó 2,5 mgL⁻¹ de BAP + 0,5 mgL⁻¹ AG₃.

Resultados y discusión

Establecimiento de estacas en invernadero

El material proveniente de La Sierra y El Congo de Santa María de Dota presentó infección por *Stemphyllium* sp. y *Fusarium solani*, situación que dificultó la obtención de material sano.

El material de La Pastora de San Marcos de Tarrazú no presentó problemas fitosanitarios y se logró un promedio de un 63% de estacas enraizadas y brotadas sanas, después de un mes y medio de introducidas en el invernadero (Figura. N.º 1).



Figura N.º 1. Brotación y desarrollo radical de las estacas en invernadero.

El logro del enraizamiento de las estacas estuvo influido por la calidad fitosanitaria del material, ya que la plantación tenía un adecuado manejo agronómico; las estacas se encontraban en una condición fisiológica óptima.

Se realizaron tres introducciones de estacas en el invernadero y se obtuvo un 50% o más de enraizamiento y brotación de las estacas en cada introducción (véase Cuadro 1 y Figura. 2).

Establecimiento in vitro

La disponibilidad en el invernadero de estacas enraizadas, brotadas y desinfectadas fue importante en la etapa de introducción de material in vitro. Se observó que el tamaño de la yema en la estaca fue una variable importante de considerar, pues yemas menores de

5 mm de longitud no sobrevivieron al proceso de desinfección.

El hipoclorito de sodio es una sustancia comúnmente empleada en la desinfección superficial de material vegetal en el proceso de introducción en el cultivo in vitro, ya que es fácil de conseguir, simple de manipular y a un costo asequible. Además, agitar los explantes junto con el desinfectante contribuye a disminuir la tensión superficial del agua, lo que permite así un mayor contacto del explante con la solución desinfectante (Abdelnour y Escalante, 1994).

En este estudio preliminar se obtuvo un 37,5% de explantes muertos por quema, un 50% presentó contaminación fungosa, bacteriana o ambas y se obtuvo un 12,5% de material limpio y brotado (Figura. N.º 3).

Los explantes limpios y brotados en la etapa de establecimiento in vitro fueron subcultivados en un medio de cultivo M&S reducido en BAP ($3,5 \text{ mgL}^{-1}$), debido a que los explantes empezaron a mostrar una toxicidad a concentraciones altas de BAP al permanecer expuestos más de quince días.

Cuadro N.º 1. Número de estacas enraizadas y brotadas en cada introducción.

Número de introducción	Número de estacas introducidas al invernadero	Número estacas enraizadas y brotadas
1	20	10
2	22	15
3	20	13

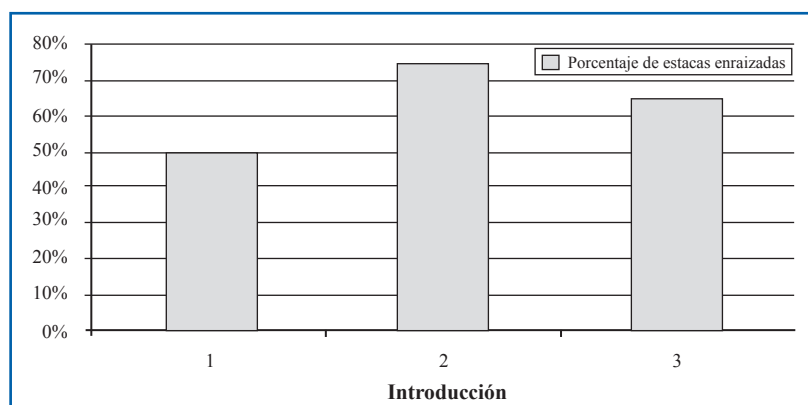


Figura N.º 2. Porcentaje del enraizamiento y brotación de estacas para cada introducción.



Figura N.º 3. Desarrollo de la yema in vitro a partir de tejido madre.

Micropropagación del material

En la fase de micropropagación la respuesta ha sido muy lenta, en las observaciones preliminares se han contabilizado de dos a tres brotes por explante (Figura. N.º 4).

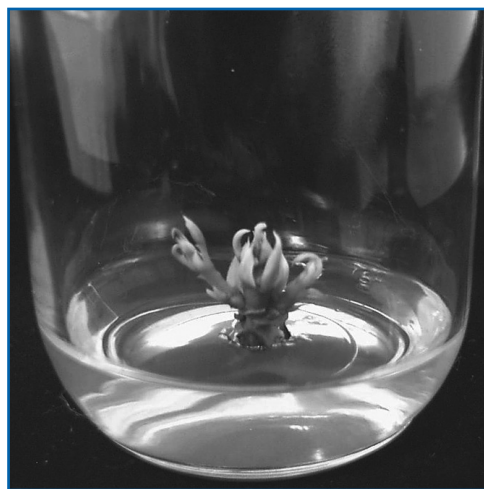


Figura 4. Micropropagación.

Conclusiones

El material contaminado por *Stemphyllium* sp. y *Fusarium solani* redujo la respuesta de enraizamiento y brotación de las estacas en invernadero.

Para el establecimiento de material in vitro, fue indispensable disponer de brotes provenientes de estacas pretratadas en el invernadero.

El tamaño de la yema que posee la estaca debe ser de 5 mm aproximadamente, ya que las más pequeñas no sobreviven.

Se debe continuar con la investigación, con el fin de lograr implementar el protocolo de establecimiento in vitro y micropropagación.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero recibido de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Bibliografía

- Abdelnour, A. y Escalante, V. 1994. *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Centro Agronómico de Investigaciones y Enseñanza. Turrialba. Costa Rica. 38 pp.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) 1991. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*. Roca, W. M & Mroginski, L. A (eds) . Cali, Colombia, 968 pp.
- León, J. 1987. *Botánica de los cultivos tropicales*. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José. 404-404 pp.
- Morton, J. 1987. *Sweet Granadilla*. 7 agosto del 2000. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/sweet>. 3 pp.
- Muraskige, T. & Skoog, F. 1962. "Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture". *Physiol. Plant.* 15. 473-497.