

# ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN DE GULUPA (*Passiflora edulis* SIMS.) A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS Y YEMAS AXILARES

*Elsa H. Manjarrés-Hernández\** y *Margarita Perea-Dallos\*\**

\* Bióloga, Universidad Nacional de Colombia. Estudiante de Maestría en Ciencias Biológicas Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC). Docente del Departamento de Biología y Microbiología, Universidad de Boyacá, Tunja, Boyacá, Colombia. Autor para correspondencia, correo electrónico: elsa.manjarrés@uptc.edu.co

\*\* Bióloga. Ph.D. Profesora Emérita, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Correo electrónico: emperead@unal.edu.co

Recibido: 1 de octubre; aprobado: 8 de octubre de 2012

## RESUMEN

La gulupa es una fruta exótica que se ha posicionado en el mercado internacional por su alto nivel nutricional. Dicha característica ha originado una alta demanda de frutos de buena calidad. En este trabajo se estableció un protocolo para la propagación *in vitro* a partir de embriones cigóticos, semillas y de segmentos nodales de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.); dentro del diseño experimental se variaron las concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) para la desinfección de semillas y explantes *ex vitro*. En el establecimiento del cultivo de embriones cigóticos, se realizó imbibición de las semillas en dos concentraciones de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) previa a la siembra en el medio básico Murashige Skoog (M&S), suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP). Para la evaluación de la propagación se realizaron 25 tratamientos con variación de las concentraciones de BAP y kinetina (Kin) en medio básico M&S, con fotoperiodo 16/8 h y temperatura de 25±2°C. Se observó que para la desinfección de los explantes se requiere de una concentración de NaClO de 1-2%; imbibición de las semillas por 24 h con AG<sub>3</sub> (4,33 µm) en el medio M&S con adición de BAP (6,66 µm), para la germinación de los embriones cigóticos, así se obtuvo inducción de brotes y crecimiento de los mismos. La proliferación de brotes y su elongación se observó en el medio básico M&S, con adición de tiamina 3 mg/L, AG<sub>3</sub> 0,58 µm, BAP 4,44 µm y kinetina 4,65 µm.

**Palabras clave:** Passifloraceae, multiplicación clonal, segmentos nodales, kinetina, 6-bencilaminopurina (BAP).

## ABSTRACT

### ESTABLISHMENT OF A PURPLE PASSION FRUIT (*Passiflora edulis* SIMS.) PROPAGATION PROTOCOL FROM ZYGOTIC EMBRYOS AND AXILLARY SHOOTS

The purple passion fruit is an exotic fruit that has been positioned in the international market due to its high nutritional value. This characteristic has led to a high demand for good quality fruit. In this research a protocol for *in vitro* propagation from zygotic embryos, seeds and gulupa nodal segments (*Passiflora edulis* Sims.) was established. Within the experimental design the concentrations of sodium hypochlorite (NaClO) were varied for seed dress in explants disinfection *ex vitro*. In establishing the culture of zygotic embryos imbibition of seeds was performed in two concentrations of gibberellic acid (AG<sub>3</sub>) prior to planting in the basic medium Murashige Skoog (M&S), supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP). For the evaluation of propagation 25 treatments were tested with varying concentrations of BAP and kinetin (KIN) in basic medium M&S, with photoperiods of 16/8 h and 25±2°C temperature. It was observed that for disinfection of explants a concentration of 1-2% NaClO is required; seed imbibition for 24 h with AG<sub>3</sub> (4.33 µm) in the M&S medium with BAP (6.66 µm) addition for zygotic embryos germination thus obtaining shoots induction and their proliferation. Shoots proliferation and their elongation was observed in basic medium M&S, with addition of thiamine 3 mg/L, AG<sub>3</sub> 0.58 µm, 4.44 µm BAP and kinetin 4.65 µm.

**Key words:** Passifloraceae, clonal multiplication, nodal segments, kinetin, 6-benzylaminopurine (BAP).

## INTRODUCCIÓN

La gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) es una fruta exótica originaria de la región comprendida entre la Amazonia brasileña, el norte de Argentina y Paraguay (Morton, 1987; Escobar, 1988); se ha posicionado en el mercado internacional en el quinto lugar de exportaciones de frutales después del banano, plátano, banano bocadillo y uchuva. Los países hacia donde se exporta la gulupa son principalmente Inglaterra, Francia, Holanda, Suecia, España y Alemania logrando un volumen de 700.000 kg/año. En Colombia, su cultivo se ha convertido en una excelente alternativa agrícola y en una importante fuente de ingresos para los agricultores por su alto valor en el mercado internacional, por considerar que es un fruto muy apetecido por su exquisito sabor, aroma y contenido en vitamina C, hierro y fósforo (Departamento Técnico “Agricultura de las Américas”, 1987; Wenkam, 1990; OCATI, 2006).

La calidad y el rendimiento de los cultivos en general dependen del material vegetal a propagar, en gulupa son pocos los estudios sobre la propagación, los métodos actuales generan materiales de siembra de baja calidad, con bajos porcentajes de germinación, baja población de plantas establecidas y por ende bajos rendimientos (Gutiérrez *et al.*, 2011); en Colombia hay un desconocimiento sobre la procedencia de este material, hecho que explica la alta variabilidad de los cultivos haciendo difícil conservar materiales con características agronómicas deseables; ello debido a que la gulupa es una planta alógama, por lo tanto la reproducción sexual representa mayor variabilidad fenotípica en las plantaciones, características poco deseadas para las variedades comerciales cuando se requiere calidad de la fruta, uniformidad y alta productividad (Forero & Becerra, 2008).

Aunque las plantas producidas por vía sexual son vigorosas y presentan una vida más larga que por esqueje, para este tipo de propagación se recomienda utilizar las semillas obtenidas en un intervalo de tiempo no mayor de un año, debido a que ellas pierden

rápidamente viabilidad. Las semillas germinan entre los 20 y 30 días (Morton, 1987), con un porcentaje de 80 a 85% (Forero & Becerra, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2011), sin embargo esta germinación presenta dificultades de tipo físico y químico, ya que la testa es pétreo y posee una resina que la hace impermeable.

Por lo tanto, la contribución de los procesos biotecnológicos a través de los sistemas *in vitro* permiten mejorar la calidad de la planta y establecer cultivos que garanticen una mejor producción. La propagación clonal conocida como micropropagación es una alternativa que permite la producción de plantas uniformes y con altos estándares de calidad para el establecimiento de cultivos comerciales, por lo tanto en pasifloras esta técnica representa una excelente alternativa en la producción del material vegetal (Roca & Mroginski, 1997; Perea & Tirado, 2011).

La diversidad genética que presenta el cultivo de gulupa, justifica la necesidad de establecer un protocolo de micropropagación que permita la propagación clonal y la obtención de plantas libres de patógenos, utilizando explantes primarios yemas axilares tomadas de plantas adultas con características deseables y embriones cigóticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. La investigación se desarrolló en tres etapas: en la primera, se realizó la selección y obtención del material vegetal; en la segunda, se evaluaron diferentes concentraciones de hormonas (BAP & kinetina) para el crecimiento de segmentos nodales; y en la tercera, se desarrolló el proceso de multiplicación.

**Selección de plantas madre:** Las plantas adultas se localizaron en la vereda San Raimundo del municipio de Granada (Cundinamarca) ubicada en 4°31'00" de latitud Norte y 74°20'50" longitud Oeste de

Greenwich, a 2300 msnm y temperatura media de 15°C. Se seleccionaron plantas que presentaron alta producción y frutos de buen tamaño. De estas plantas se colectaron frutos maduros y estacas de 5-8 cm de longitud, al menos con dos yemas axilares cada una, las cuales se mantuvieron húmedas durante su traslado al laboratorio.

**Establecimiento *in vitro* de cultivos:** Los frutos se enjuagaron con agua más Tween 20® (0,1 mL/100 mL). Las semillas se colectaron en un tamiz y posteriormente desinfectadas en una solución de Isodine® al 3%, hipoclorito de sodio al 2% durante 20 min y luego de realizar el lavado con agua destilada estéril y enfriamiento durante 8 días a 10°C, se procedió al proceso de imbibición por 24 y 48 h con AG<sub>3</sub> 2,88 µm y AG<sub>3</sub> 4,33 µm; se cultivaron semillas *in vitro*, semillas *ex vitro* y embriones cigóticos bajo condiciones asépticas en medio básico M&S (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con diferentes concentraciones de BAP (T0: 0 µm, T1: BAP 2,22 µm, T2: BAP 4,44 µm, T3: BAP 6,66 µm)

en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16/8 h y 25±2°C y las semillas *ex vitro* en una parcela de 1 m<sup>2</sup>.

**Segmentos nodales:** Para la desinfección de los segmentos nodales obtenidos de plantas *in vivo* al igual que para los obtenidos a partir de embriones cigóticos *in vitro*, se aplicó agua destilada más Tween 20® (0,1 mL/100 mL) (v/v) durante 5 min en agitación constante; inmersión en Isodine® al 3%, hipoclorito de sodio al 1% durante 20 min y finalmente tres enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, en cámara de flujo laminar, de las yemas de cada segmento nodal se eliminaron las hojas en desarrollo y se escindió el meristemo acompañado de dos primordios foliares. Los meristemas se cultivaron por triplicado en 25 tratamientos con diferentes concentraciones y combinaciones de citoquininas BAP y Kin (Tabla 1) en el medio básico M&S suplementado con AG<sub>3</sub> 0,58 µm, tiamina 3 mL/L, agar 8 g/L y sacarosa 30 g/L. En total se cultivaron 75 meristemas.

**Tabla 1.** Tratamientos realizados para la inducción de brotes

Tratamiento	Fitohormonas µm		Tratamiento	Regulador µm	
	BAP	Kinetina		BAP	Kinetina
T1	0	0	T14	4,44	6,97
T2	0	2,32	T15	4,44	9,3
T3	0	4,65	T16	6,66	0
T4	0	6,97	T17	6,66	2,32
T5	0	9,3	T18	6,66	4,65
T6	2,22	0	T19	6,66	6,97
T7	2,22	2,32	T20	6,66	9,3
T8	2,22	4,65	T21	8,88	0
T9	2,22	6,97	T22	8,88	2,32
T10	2,22	9,3	T23	8,88	4,65
T11	4,44	0	T24	8,88	6,97
T12	4,44	2,32	T25	8,88	9,3
T13	4,44	4,65			

**Multiplicación:** Después de la evaluación del tratamiento más adecuado para el desarrollo de los segmentos nodales, se realizó la propagación en el medio básico M&S, con adición de tiamina 3 mg/L,  $AG_3$  0,58  $\mu\text{m}$ , BAP 4,44  $\mu\text{m}$  y kinetina 4,65  $\mu\text{m}$ ; se cultivaron 50 segmentos a los que se le determinó número de brotes, hojas y segmentos nodales, y longitud de las plántulas propagadas además de la influencia en el crecimiento y vigor.

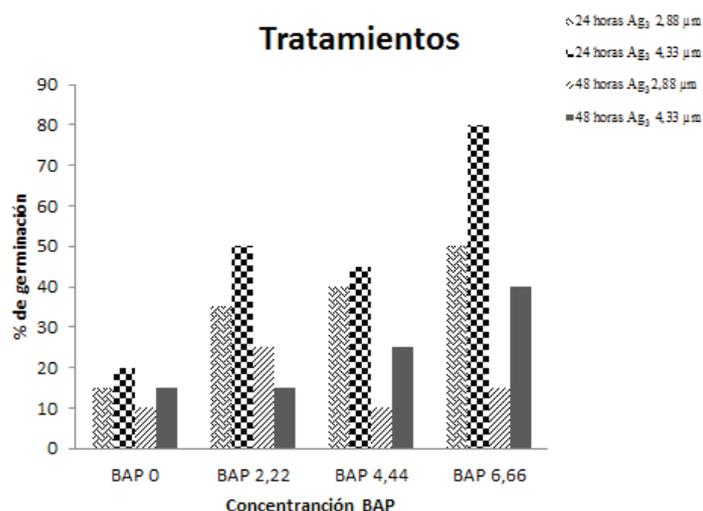
**Análisis estadístico:** El diseño fue totalmente aleatorizado, se hizo análisis de varianza (ANOVA); se realizaron comparaciones múltiples entre los tratamientos por el método de Scheffé debido a que este posee pocas restricciones y permite comparar combinaciones de las medias de los tratamientos (Canavos, 1999). Los datos se procesaron con el paquete estadístico SPSS 15.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

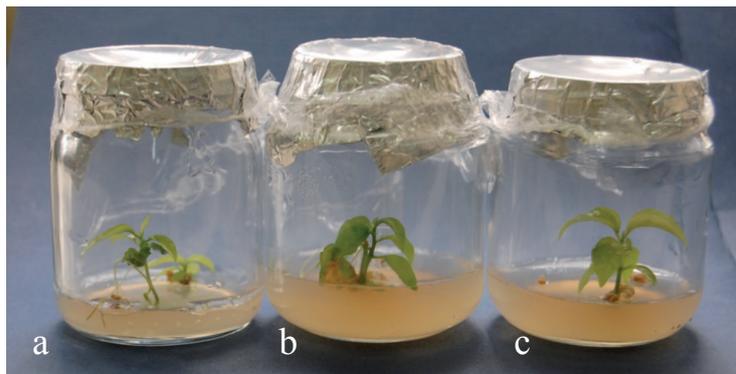
**Establecimiento *in vitro* de cultivos:** Los procesos de asepsia superficial son importantes para mantener la viabilidad y facilitar la reactivación del crecimiento y desarrollo del explante (Rache &

Pacheco, 2012). Roca & Mroginski (1997) muestran que evitar la contaminación es un aspecto básico para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, pues en el mejor de los casos los microorganismos no destruyen los cultivos pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican. Por lo tanto, algunos autores como Olivera *et al.* (2010) y Chaves *et al.* (2005), proponen además de la asepsia superficial el uso de germicidas para reducir la contaminación de explantes durante el establecimiento *in vitro*.

**Semillas:** El proceso de asepsia superficial aplicado permitió obtener semillas 100% asépticas. Los porcentajes de germinación de los embriones cigóticos oscilaron entre 10 y 50%, y se demuestra la importancia del efecto del ácido giberélico y la etapa inicial de enfriamiento de las semillas para romper dormancia, es decir, generar las condiciones adecuadas para la germinación de la semilla (Schmidt, 2000; Mantilla, 2003). Las mejores respuestas se obtuvieron en los tratamientos con imbibición durante 24 h en  $AG_3$  (4,33  $\mu\text{m}$ ) y concentración de BAP (6,66  $\mu\text{m}$ ), en los que el porcentaje de germinación fue del 80% (Figuras 1 y 2).



**Figura 1.** Porcentaje de germinación de embriones en los tratamientos con imbibición de la semilla en  $AG_3$  2,88 y 4,33  $\mu\text{m}$  y diferentes concentraciones de BAP en el medio de cultivo.



**Figura 2.** Germinación y desarrollo de embriones cigóticos a las 6 semanas. a) Medio de cultivo suplementado con BAP 6,66  $\mu\text{M}$  y 48 h AG<sub>3</sub> 4,33  $\mu\text{M}$ . b) Medio de cultivo suplementado con BAP 6,66  $\mu\text{M}$  y 24 h AG<sub>3</sub> 2,88  $\mu\text{M}$ . c) Medio de cultivo suplementado con BAP 6,66  $\mu\text{M}$  y 24 h AG<sub>3</sub> 4,33  $\mu\text{M}$ .

Aunque se obtuvo un protocolo efectivo de asepsia superficial de las semillas, los tratamientos empleados para la germinación no permitieron obtener la cantidad de material vegetal necesaria para continuar con las etapas siguientes. En condiciones *ex vitro*, la germinación de semillas de gulupa se produce entre 20 y 30 días y presenta dificultades de tipo físico y químico, ya que la testa es de textura pétreo y posee una resina que la hace impermeable (Hartmann *et al.*, 2002; Jiménez, 2006) por lo que el embrión difícilmente puede romper esta cubierta.

Se ha reportado que las semillas latentes de pasifloras requieren tratamientos de escarificación y temperaturas alternas entre 20 y 30°C durante 16 h y 8 h, respectivamente, durante seis semanas para promover germinación, debido a que así se producen cambios físicos en la cubierta de las semillas que favorecen la entrada de agua que induce la germinación (Ellis *et al.*, 1985).

Hechenleitner *et al.* (2005) muestran que en *P. pinnatistipula* Cav. las semillas se deben remojar por 24 h en agua fría y sembrar posteriormente, la germinación comienza después de 4 semanas con 70% de germinación, en la eventualidad de disponer de semillas secas deben ser remojadas en agua tibia durante 24 h. Por otra parte, Camacaro *et al.* (2005) reportan que las semillas de *P. edulis* Sims. *f. flavicarpa* presentan diferentes grados de latencia que van desde 15 hasta 45 días.

Otro proceso que se ha reportado para romper dormancia de semillas es el pretratamiento con frío (Mantilla, 2008; Balaguera *et al.*, 2010) debido a que ello permite la degradación de ácido absísico (ABA) presente en la semilla, lo que a su vez aumenta la relación AG<sub>3</sub>/ABA para que ocurra la germinación (Baskin & Baskin, 1998; Davis, 2004).

En este caso, el frío y la imbibición de las semillas en AG<sub>3</sub> permitieron que las semillas hidratadas aumentaran los niveles endógenos de AG<sub>3</sub>, hormona que se acumula en el embrión después de 24 h de imbibición, y que estimula la síntesis de  $\alpha$ -amilasa, en la capa de aleurona (Davis, 2004; Barceló *et al.*, 2001); esta enzima es importante para el paso de los productos almacenados al escutelo y así iniciar el crecimiento de las plántulas, debido a que se promueve la división celular en la semilla haciendo que se rompa la dormancia, desencadenando las actividades metabólicas previas a la germinación de los embriones (Gutiérrez *et al.*, 2011). Las plántulas germinadas *in vitro* a partir de embriones cigóticos presentaron tallos gruesos, nudos cortos y alta vigorosidad, sin embargo, se debe revisar la obtención del material vegetal a partir de semillas cultivadas *in vitro* debido a la importancia de que el material a propagar provenga de condiciones asépticas y controladas, y así poder garantizar la sanidad y uniformidad de las plántulas en la fase de propagación. En cuanto a las semillas cultivadas *ex vitro* el 100% germinaron, las plántulas obtenidas presentaron un desarrollo y crecimiento óptimo.

**Yemas axilares:** Cuando los explantes primarios proceden de plantas adultas, el establecimiento de cultivos y la proliferación *in vitro* son difíciles por la susceptibilidad de los cultivos a la contaminación exógena y endógena que pueden presentar los explantes y la escasa reactividad de los tejidos adultos a la proliferación *in vitro*.

El uso de explantes a partir de segmentos nodales de plantas adultas de vivero, mostró una baja capacidad de regeneración a comparación de los segmentos nodales de plántulas obtenidas a nivel *in vitro* o *ex vitro*, esta capacidad está determinada por el estado de desarrollo de la planta y se ha comprobado que las plantas juveniles tienen una mayor capacidad de regeneración (Pierik, 1990; Roca & Mroginski, 1997), por lo que se considera prioritario intentar conseguir mejores porcentajes de germinación de semillas y embriones cigóticos *in vitro*. La razón para el menor poder regenerativo de estos explantes, puede estar relacionada con la edad de la plántula y su estadio de desarrollo, pues son factores determinantes para la regeneración y en este caso, a pesar de que los explantes fueron seleccionados de una planta adulta, con condiciones agronómicas y fisiológicas deseables, el crecimiento de brotes fue restringido, acelerando la senescencia de los tejidos debido a que no se encontraban en estado óptimo.

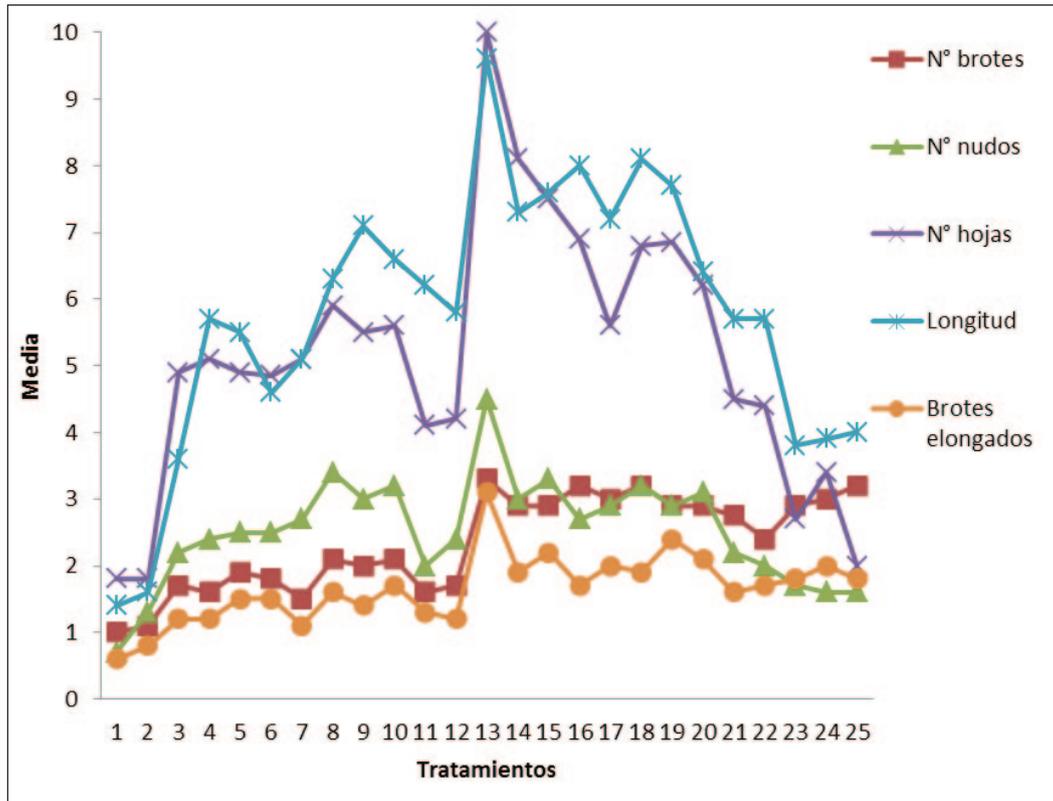
Además, se debe tener en cuenta el medio de cultivo y las condiciones físicas bajo las cuales se desarrolla la siembra, pues de esto depende que las células competentes demuestren su capacidad intrínseca para el crecimiento organizado (Rivera & Perea, 2001).

Experimentalmente para gulupa se determinó que los explantes que se desarrollaron mejor, fueron aquellos que contenían segmentos nodales largos

de plántulas jóvenes provenientes de semillas sembradas *ex vitro*, mientras que la utilización de segmentos nodales provenientes de plantas adultas mostraron deficiencias en la proliferación de brotes y su respectiva elongación.

**Propagación:** Los primeros brotes de los segmentos nodales cultivados en los 25 tratamientos evaluados se observaron a los ocho días, en las siguientes semanas se evidenciaron diferencias entre los tratamientos en cuanto al número de yemas neoformadas, 2, 3 y 4 y la longitud de los microtallos desarrollados a la cuarta semana, que fueron de 6 a 7 cm.

El análisis de varianza para los datos de número de brotes, yemas y hojas, longitud del microtallo y brotes elongados, mostró diferencias estadísticamente significativas. La prueba de Scheffé corroboró la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los 25 tratamientos, este método permite separación de medias para las variables y de esta manera se hallan las diferencias entre los tratamientos (Compton, 1994); las comparaciones múltiples mostraron que el tratamiento con BAP 4,44  $\mu\text{m}$  y kinetina 4,65  $\mu\text{m}$  presentó la mayor media para todas las variables (Figura 3). Estos resultados muestran la eficiencia de la combinación de auxinas y citoquininas, los cuales se contrastan con los obtenidos por Kantharajah & Dodd (1990) quienes cuantificaron un menor número de yemas axilares de las plántulas obtenidas a partir de segmentos nodales y discos de hojas en un medio suplementado con 8,88  $\mu\text{m}$  BA. Asimismo, Isutsa (2003) logró establecer la regeneración de plantas mediante el empleo de yemas apicales de *P. edulis* en el medio M&S con adición de BAP 22,2  $\mu\text{m}$  y AG<sub>3</sub> 11,6  $\mu\text{m}$  y para la inducción de raíces utilizó ANA 21,5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.** Medias de los tratamientos para cada longitud, número de nudos, hojas, brotes y brotes elongados.

Es de resaltar que en todos los tratamientos hubo proliferación de brotes, crecimiento de los microtallos, presencia de hojas y mínimo uno o dos nudos por explante, así que aunque algunos tratamientos no hayan obtenido la mayor media para las variables, en términos experimentales se pueden usar otras concentraciones en la relación BAP y kinetina como el tratamiento BAP 6,66  $\mu\text{m}$  y kinetina 6,97  $\mu\text{m}$  o BAP 8,88  $\mu\text{m}$  y kinetina 4,65  $\mu\text{m}$ .

Respecto al desarrollo de yemas apicales y axilares, en este trabajo se observó que las yemas apicales se desarrollaron en un periodo más corto que las yemas axilares. En el medio suplementado con BAP 4,44  $\mu\text{m}$  y kinetina 4,65  $\mu\text{m}$  la tasa de multiplicación medida por la diferencia entre el número de ápices más el número de segmentos nodales y el número de

segmentos iniciales fue de 4,5, con longitud media de los microtallos de 9 cm, observándose que en presencia de estos reguladores cada microtallo produjo mayor cantidad de yemas neoformadas debido a que los entrenudos fueron más cortos. Mientras que en *P. edulis* var. *flavicarpa*, Rivera & Perea (2001) evaluaron la activación de yemas utilizando el medio Murashige y Skoog (M&S) combinado con 13,32  $\mu\text{m}$  de BAP, 1 mg/L de tiamina y 160 mg/L de floroglucinol, los cultivos permanecieron durante la primera semana en oscuridad y luego se utilizó el fotoperiodo de 16/8 h, temperatura  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , con lo que se obtuvo el desarrollo de brotes abundantes y vigorosos después de 16 semanas con una tasa de multiplicación de 3,7 y longitud de plántulas de 6,5 cm confirmando que no siempre las concentraciones altas de citoquininas inhiben la elongación de los brotes.

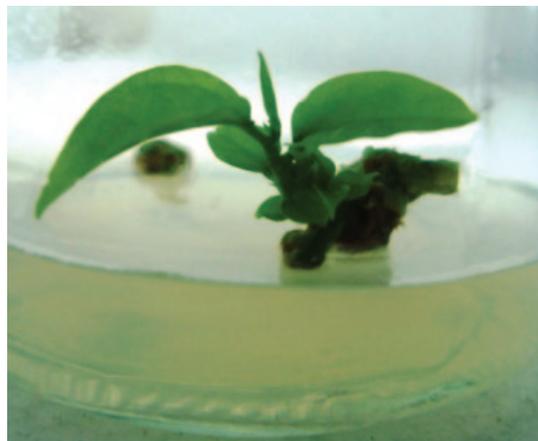
En relación a la formación y desarrollo de los brotes, se observó que para las concentraciones bajas de citoquininas (Figura 4) en particular BAP, muchos de los brotes no crecieron, mientras que para las concentraciones intermedias a altas de las citoquininas se observó crecimiento de brotes. Sin embargo, son las concentraciones intermedias de BAP y kinetina las más adecuadas para el crecimiento y vigorosidad de las plántulas, porque a concentraciones relativamente altas de citoquininas se reduce la dominancia apical, lo que permite el desarrollo de las yemas axilares.

Estos resultados permitieron establecer que BAP y kinetina son eficientes para inducir la división celular en los segmentos nodales de gulupa, lo cual corrobora los trabajos realizados en maracuyá donde se reportan las mismas fitohormonas como inductores de división celular (Rivera & Perea, 2001).

Otros trabajos también muestran a las citoquininas como inductores de brotes en pasifloras. Por ejemplo, Faria & Segura (1997) reportan los estudios en propagación *in vitro* de maracuyá realizados a partir de diferentes explantes hipocótilos y yemas apicales con reguladores de crecimiento como bencil adenina (BA) y ácido indolacético (AIA). Dornelas & Vieira (1993) utilizaron cotiledones cultivados en el medio de cultivo M&S suplementado con BA en una concentración de 8,8  $\mu\text{m}$ , para la regeneración a partir de discos de hojas. Monteiro *et al.* (2000) también usaron como regulador el BA. Además, en organogénesis de segmentos internodales, hojas e hipocótilos, entre otros (Biasie *et al.*, 2000; Fernando *et al.*, 2007).

De esta manera, se podría considerar que todas las combinaciones y concentraciones de citoquininas aplicadas son efectivas. Cabe resaltar que aunque no se evaluaron diferentes concentraciones de auxinas,

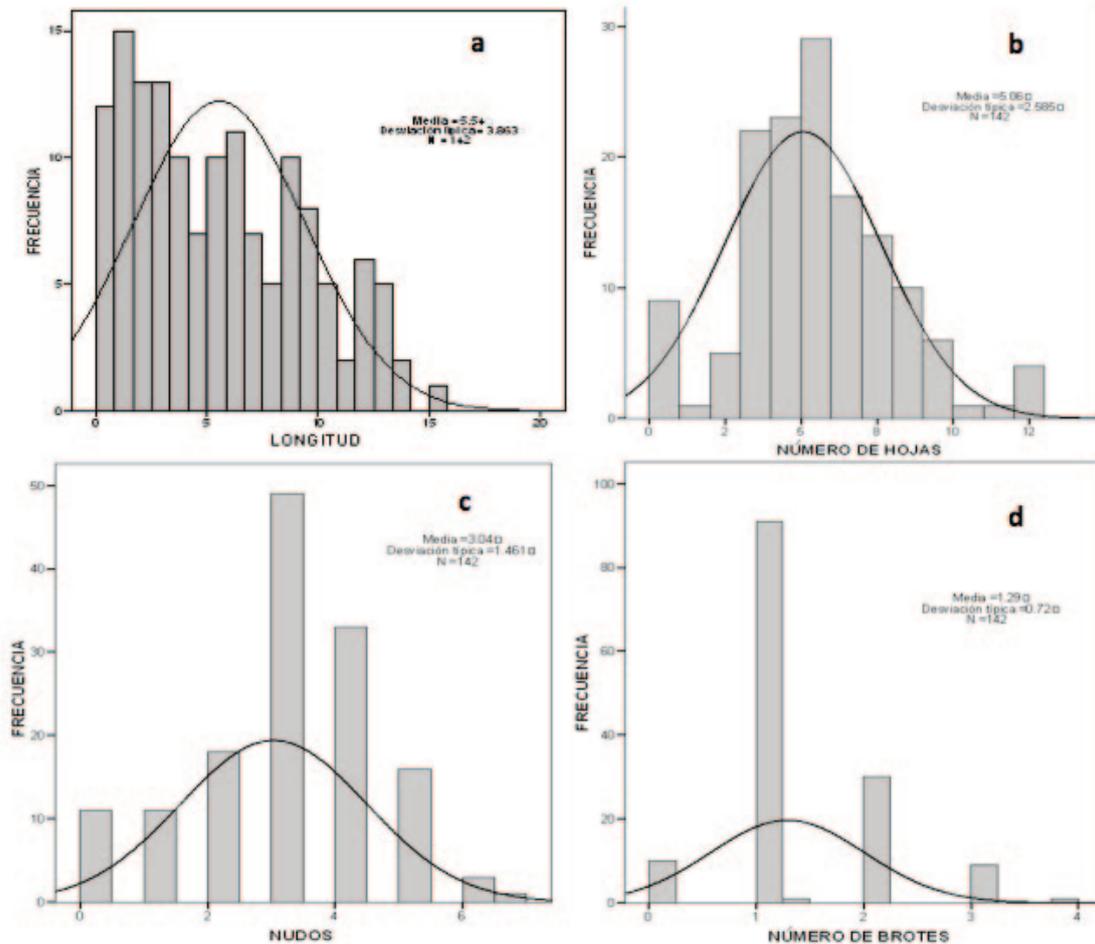
estas son muy utilizadas para la elongación celular, división celular y con concentraciones bajas para la formación de raíces adventicias (Pierik, 1990). Butenko (1968), reporta que las concentraciones bajas de auxina estimulan el crecimiento del tejido y la ausencia de estas puede inhibirlo.



**Figura 4.** Desarrollo de brotes con tratamiento de citoquininas (kinetina 2,32  $\mu\text{m}$ ) después de cinco semanas del tratamiento.

Para todos los tratamientos utilizados en la inducción de brotes, se utilizó una concentración de giberelinas en particular ácido giberélico AG<sub>3</sub> 0,58  $\mu\text{m}$ , este regulador de crecimiento promueve el alargamiento de las regiones subapicales y consecuentemente, el desarrollo de tallos más largos (Weaver, 1976), lo cual se evidencia en la proporción de brotes elongados en los experimentos probados.

La variable longitud o altura de las plántulas está dividida en dos grupos: el primero, con más cantidad de plántulas que osciló entre 0 y 5 cm y el otro grupo, de 5 a 13 cm. Por otra parte, la mayoría de plántulas tuvieron entre 3 y 8 hojas, 3 a 4 nudos y un brote por explante (Figura 5).

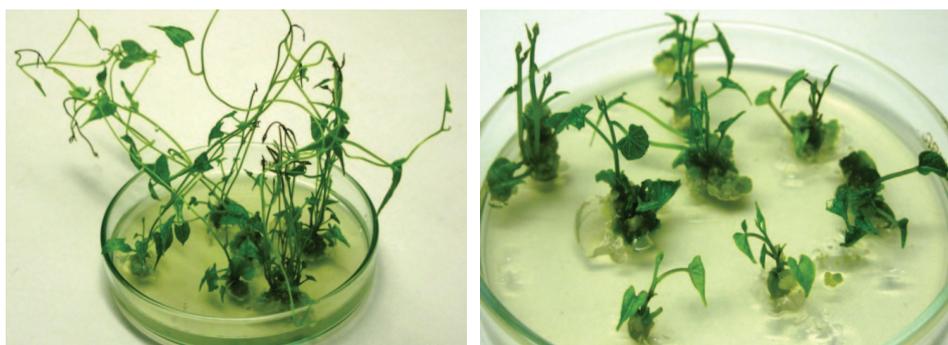


**Figura 5.** Frecuencias para: (a) Longitud, (b) Número de hojas, (c) Nudos y (d) Número de brotes de las plántulas propagadas a la quinta semana de siembra.

En promedio, las plántulas tuvieron una longitud de 5,54 cm, 5 hojas, 3,04 nudos y 1,25 brotes. Las Figuras 5c y 5d, muestran una distribución normal, lo cual permite predecir el futuro número de nudos y hojas en las plántulas propagadas en este medio. La variación del crecimiento en longitud de las plántulas en algunos casos fue superior a 10 cm, mientras que en otras plántulas la máxima altura fue de 2,5 cm, estas diferencias se pueden dar por las condiciones fisiológicas iniciales de los explantes utilizados para la propagación. El número de brotes por explante

en promedio fue de uno (Figura 5d), lo cual es importante para la fase de aclimatación y transferencia de la plántula completa a condiciones *ex vitro*.

Para la fase de multiplicación se utilizó M&S con BAP 4,44  $\mu\text{m}$  y kinetina 4,65  $\mu\text{m}$  (Figura 6), debido a que en este tratamiento los microtallos presentaron entrenudos más cortos con mayor cantidad de yemas neoformadas, características útiles para establecer ciclos de micropropagación.



**Figura 6.** Plántulas propagadas en el medio M&S suplementado con BAP 4,44  $\mu\text{m}$  y kinetina 4,65  $\mu\text{m}$ .

### CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo de micropropagación de *Passiflora edulis* Sims. a partir de embriones cigóticos y yemas axilares de plántulas desarrolladas en medios *in vitro* y *ex vitro*. Se estableció el proceso de propagación clonal con el empleo de las citoquininas, BAP y kinetina para la producción masiva de plántulas con características deseables para su producción.

El protocolo consiste en la germinación *in vitro* de embriones cigóticos previo a un proceso de 10 días en frío imbibición de las semillas por 24 h en  $\text{AG}_3$  (4,33  $\mu\text{m}$ ) y medio de cultivo básico M&S suplementado con BAP (6,66  $\mu\text{m}$ ); y multiplicación de segmentos nodales en medio M&S con BAP 4,44  $\mu\text{m}$  y kinetina 4,65  $\mu\text{m}$ .

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balaguera, H., Álvarez, J. & Cárdenas, J. 2010. Efecto de la estratificación fría y la cobertura plástica en semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) para la obtención de plántulas. Rev. UDCA Actualidad & Divulgación Científica. 13(2):89-97.
- Barceló, J., Nicolás, G., Sabater, B. & Sánchez, R. 2001. Fisiología vegetal. Ediciones Pirámide, Madrid.
- Baskin, C. C. & Baskin, J. M. 1998. Seeds. Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. Academic Press, N. York.
- Biase, L., Falco, A., Rodríguez, B. & Jammzzi, P. 2000. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. Journal of Agricultural Science. 57(4):661-665.
- Butenko, R. 1968. Plant tissue culture and plant morphogenesis. Ed. M.Kh. Chailakhyan, Moscú, Rusia.
- Camaraco, N., Pérez, D., Miranda, M., Carvajal, R. & Espinoza, M. 2005. Métodos para la ruptura de latencia de semillas de parchita (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa*). Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Estado Aragua.
- Canavos, G. 1999. Probabilidad y estadística. Aplicaciones y métodos. McGraw-Hill.
- Chaves, A., Schuch, M. & Erig, A. 2005. Establecimiento e multiplicacao *in vitro* de *Physalis peruviana* L. Ciênc. Agrotec., Lavras. 29(6):1281-1287.
- Compton, M. 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 37:217-242.
- Davis, P. 2004. Plants hormones. First Edition. Kluwer Academic Publishers, United States.
- Departamento Técnico "Agricultura de las Américas". 1987. Agricultura de las Américas. 176:13-15.
- Dornelas, M. & Vieira, M. 1993. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan and *P. cincinnata* Mast. Plant Cell Reports.13:103-106.
- Ellis, R., Hong, T. & Roberts, E. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Rome, IT. V. Engels, J.M.M.
- Escobar, L. 1988. Flora de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. pp. 5-20.
- Faria, C. & Segura, J. 1997. "In vitro" control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant. 33:209-212.
- Fernando, J., Viera, M., Machado, S. & Apezato, B. 2007. New insights into the "in vitro" organogenesis process: the case of *Passiflora*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 91:37-44.
- Forero, C. & Becerra, N. 2008. Propagación de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) por estacas. Tesis de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Gutiérrez, M. I., Miranda, D. & Cárdenas, J. F. 2011. Efecto de tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y cholupa (*Passiflora maliformis* L.). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. 5(2):209-219.
- Hartmann, H., Kester, D., Davies, F. & Geneve, R. 2002. Plant propagation: principles and practices. 7th ed. Prentice Hall, New Jersey, NJ.

- Hechemleitner, V., Gardner, M., Thomas, P., Echeverría, C., Escobar, B., Brownless, P. & Martínez, C. 2005. Plantas amenazadas del centro-sur de Chile. Distribución, conservación y propagación. Primera edición. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo.
- Isutsa, D. 2003. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) varieties. *Scientia Horticulturae*. 99:395-400.
- Jiménez, Y. 2006. El cultivo de la gulupa *Passiflora edulis* Sims. Trabajo de grado - Horticultura. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Manizales, Colombia.
- Kantharajah, A. & Dodd, W. 1990. *In vitro* propagation of *Passiflora edulis* (purple passion fruit). *Annals of Botany*. 65:337-339.
- Mantilla, A. 2003. Ecofisiología de la germinación de semillas. Cap. 29. pp. 901-922. En: Reigosa, M. J., Pedrol, N. & Sánchez-Moreiras, A. (eds.). *La Ecofisiología Vegetal. Una Ciencia de Síntesis*.
- Mantilla, A. 2008. Desarrollo y germinación de semillas. pp. 537-558. En: Azcón-Bieto, J. & Talon, M. (eds.). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid.
- Monteiro, A., Higashi, E., Gonçalves, A. & Rodriguez, A. 2000. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 36:527-531.
- Morton, J. 1987. *Fruits of warm climates*. Creative Resources Systems, Inc. Winterville, NC. Passionfruit. Miami, FL. pp. 320-328.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*. 15:473-497.
- OCATI S.A. 2006. Colombian tropical fruits. Departamento técnico.
- Olivera, P., Tamariz, C. & Gutiérrez, M. 2010. Desinfección e influencia del bencil aminopurina (BAP) y ácido naftalén acético (ANA) en la multiplicación *in vitro* de *Perezia coerulea* Wedd, planta medicinal altoandina. *Rev. Aporte Santiaguino*. 3(1):117-124.
- Perea, M. & Tirado, A. 2011. Cultivo de tejidos *in vitro*. Manual de prácticas de laboratorio. Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Pierik, R. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Ediciones Mundiprensa, Madrid, España.
- Rache, L. & Pacheco, J. 2012. Establecimiento de un protocolo de propagación de *Physalis peruviana* L. a partir de yemas axilares adultas. *Ciencia en Desarrollo*. 4(1).
- Rivera, R. & Perea, M. 2001. Morfogénesis *in vitro* de *Passiflora*. spp. 177-183. En: Perea Dallos, M. (ed.). En: *Biotechnology Agrícola: Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas*.
- Roca, W. & Mroginski, L. 1997. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.
- Schmidt, L. 2000. *Guide to handling of tropical and subtropical forest seed*. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark.
- Weaver, R. 1976. *Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura*. Editorial Trillas, México.
- Wenkam, N. S. 1990. *Food of Hawaii and the Pacific basin, fruits and fruit products: Raw, processed, and prepared*. Vol. 4: Composition. Hawaii Agricultural Experiment Station Research and Extension Series 110.