

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**EFFECTO DEL ORIGEN DEL MATERIAL VEGETAL Y LA EDAD SOBRE  
LA CAPACIDAD MORFOGENETICA DE DOS ESPECIES DE *PASSIFLORA*  
( *Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* )  
CULTIVADAS *IN VITRO***

**DIDIAN CRISTINA BECERRA VARGAS**

**Bogotá, D.C  
Agosto de 2003**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**EFFECTO DEL ORIGEN DEL MATERIAL VEGETAL Y LA EDAD SOBRE  
LA CAPACIDAD MORFOGENETICA DE DOS ESPECIES DE *PASSIFLORA*  
( *Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* )  
CULTIVADAS *IN VITRO***

**DIDIAN CRISTINA BECERRA VARGAS**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial para optar al título de  
BIOLOGA**

**DIRECTORA  
CLAUDIA RAMIREZ S.  
Departamento de Biología  
Unidad de Biotecnología Vegetal**

**Bogotá, D.C.  
Agosto de 2003**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de julio de 1946:

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Bogotá, D.C. 25 de Julio de 2003

Señores

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

Ciudad

Estimados Señores:

Yo **Didian Cristina Becerra Vargas**, identificada con C.C. No. 52.622.255 de Bogotá, autor del trabajo de grado titulado **Efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad morfogenética de dos especies de *Passiflora* (*Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) cultivadas *in vitro***, presentado como requisito para optar al título de Bióloga en el año de 2003; autorizo a la Universidad Javeriana a:

- a) Reproducir el trabajo en medio digital o electrónico con el fin de ofrecerlo para la consulta en la Biblioteca General.
- b) Poner a disposición para la consulta con fines académicos, en la página web de la Facultad, de la Biblioteca General y en redes de información con las cuales tenga convenio la Universidad Javeriana.
- c) Enviar el trabajo en formato impreso o digital, en caso de que sea seleccionado para participar en concursos de trabajos de grado.
- d) Distribuir ejemplares de la obra, para la consulta entre las entidades educativas con las que la facultad tenga convenio de intercambio de información, para que este sea consultado en las bibliotecas y centros de documentación de las respectivas entidades.
- e) Todos los usos, que tengan finalidad académica.

Los derechos morales sobre el trabajo son de los autores de conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables. Atendiendo lo anterior, siempre que se consulte la obra, mediante cita bibliográfica se debe dar crédito al trabajo y a su (s) autor (es). Este documento se firma, sin perjuicio de los acuerdos que el autor (es) pacte con la Unidad Académica referentes al uso de la obra o a los derechos de propiedad industrial que puedan surgir de la actividad académica.

DIDIAN CRISTINA BECERRA VARGAS

C.C. 52.622.255 de Bogotá

**EFFECTO DEL ORIGEN DEL MATERIAL VEGETAL Y LA EDAD SOBRE  
LA CAPACIDAD MORFOGENETICA DE DOS ESPECIES DE *PASSIFLORA*  
( *Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* )  
CULTIVADAS *IN VITRO***

**DIDIAN CRISTINA BECERRA VARGAS**

**APROBADO:**

---

**CLAUDIA RAMÍREZ S. M. Sc.**  
**Unidad de Biotecnología Vegetal**  
**Directora del Trabajo de Grado**  
**Facultad de Ciencias**

**JURADOS:**

---

**GIOVANNI O. CANCINO E. Ph. D.**  
**Universidad Javeriana**

---

**JAIME A. PEDROZA M. M. Sc.**  
**Universidad Distrital**

**EFFECTO DEL ORIGEN DEL MATERIAL VEGETAL Y LA EDAD SOBRE  
LA CAPACIDAD MORFOGENETICA DE DOS ESPECIES DE *PASSIFLORA*  
( *Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* )  
CULTIVADAS *IN VITRO***

**DIDIAN CRISTINA BECERRA VARGAS**

---

**ANGELA UMAÑA M. Phil.  
Decana Académica  
Facultad de Ciencias**

---

**LUZ MERCEDES SANTAMARIA  
Directora Carrera de Biología  
Facultad de Ciencias**

## DESCRIPCIÓN TRABAJO DE GRADO

AUTOR O AUTORES

Apellidos	Nombres
<b>BECERRA VARGAS</b>	<b>DIDIAN CRISTINA</b>

DIRECTOR (ES)

Apellidos	Nombres
<b>RAMÍREZ SANDOVAL</b>	<b>CLAUDIA</b>

ASESOR (ES) O CODIRECTOR

Apellidos	Nombres

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: **BIOLOGA**

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: **Efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad morfogenética de dos especies de *Passiflora* (*Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) cultivadas *in vitro***

SUBTÍTULO DEL TRABAJO:

FACULTAD: **CIENCIAS**

PROGRAMA: Carrera **X** Especialización \_\_\_\_ Maestría \_\_\_\_ Doctorado \_\_\_\_

NOMBRE DEL PROGRAMA: **BIOLOGIA**

CIUDAD: **BOGOTA** AÑO DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO: **2003**

NÚMERO DE PÁGINAS: **106**



TIPO DE ILUSTRACIONES:

- Ilustraciones
- Mapas
- Retratos
- Tablas, gráficos y diagramas    **X**
- Planos
- Láminas
- Fotografías                            **X**

MATERIAL ANEXO (VÍdeo, audio, multimedia o producción electrónica):

Duración del audiovisual: \_\_\_\_\_ Minutos.

Número de casetes de vídeo: \_\_\_\_\_ Formato: VHS \_\_\_\_ Beta Max \_\_\_\_  $\frac{3}{4}$  \_\_\_\_

Beta Cam \_\_\_\_ Mini DV \_\_\_\_ DV Cam \_\_\_\_ DVC Pro \_\_\_\_ Vídeo 8 \_\_\_\_ Hi 8

\_\_\_\_\_

Otro. Cual? \_\_\_\_\_

Sistema: Americano NTSC \_\_\_\_\_ Europeo PAL \_\_\_\_\_ SECAM \_\_\_\_\_

Número de casetes de audio: \_\_\_\_\_

Número de archivos dentro del CD (En caso de incluirse un CD-ROM diferente al trabajo de grado: \_\_\_\_\_

DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES.

Capacidad morfogénica, discos foliares, edad, origen del material, *Passiflora mollissima* (H.B.K) Bailey (curuba), *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* (maracuyá), regeneración.

RESUMEN DEL CONTENIDO

En este estudio se evaluó la capacidad morfogénica de discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa* y *P. mollissima* de plantas desarrolladas *in vitro*, plantas adultas re-investigadas por poda y plantas de invernadero de distintas edades. Los discos fueron cultivados en condiciones *in vitro* en medio Murashige & Skoog (1962) y en medio

Nitsch & Nitsch (1968) (respectivamente), suplementados con Bencil- aminopurina y Kinetina.

La edad se constituyó en un factor importante para la capacidad morfogénica de *P. edulis* var. *flavicarpa*. Los discos foliares de plantas de invernadero de 1 y 2 meses de edad, son los explantes más adecuados para la regeneración de plantas de *P. edulis* var. *flavicarpa* por cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Por otra parte, se observó que adicionalmente al efecto de la edad, la ausencia de subcultivos periódicos, el proceso de oxidación y el tamaño del explante tuvieron un efecto sobre la capacidad morfogénica del material de invernadero en *Passiflora mollissima*.

En cuanto al efecto del origen del material vegetal se evidenció que el material de invernadero, posee una mayor capacidad morfogénica en ambas especies. Solo a partir de discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa* cultivados *in vitro* se obtuvieron plantas completas

*A todos aquellos que confiaron y creyeron en mi*

*Y a los que no..... también*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL por su apoyo logístico, en la realización de la etapa del laboratorio.

A Claudia Ramírez S. por la dirección de este trabajo, su asesoría y apoyo durante la realización del manuscrito.

A Andrea Forero, por sus consejos, enseñanzas y colaboración.

A Anita, Luz Adriana y Mónica, por su amistad y apoyo, y en especial a Carolina y Liz Dey por su ayuda y consejos en muchos aspectos del trabajo escrito.

A Over Quintero por su colaboración y su enseñanzas acerca del cultivo de curuba.

A Ricardo Martínez, por la realización y asesoría del análisis estadístico.

A Jorge, Julián y Camilo por la colaboración en los procedimientos del laboratorio.

A todos aquellos que me brindaron, su inmensa comprensión en los momentos difíciles de mi vida.

A mis hermanos y mi papá por su apoyo, a mis tíos y Abuelita por su preocupación y compañía desde lo lejos, y en especial a mi mamá que creyó en mi incondicionalmente.

**A DIOS POR SU INFINITO AMOR Y PACIENCIA**

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEORICO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Familia Passifloraceae .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.1. Género <i>Passiflora</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1.1. Subgénero <i>Passiflora</i>.....</b>	<b>4</b>
2.1.1.1.1. <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> .....	5
❖ Características generales y distribución.....	5
❖ Importancia Económica .....	6
❖ Aspectos agronómicos, ciclo de vida, propagación.....	7
❖ Plagas y enfermedades.....	9
<b>2.1.1.2 Subgénero <i>Tacsonia</i> .....</b>	<b>10</b>
2.1.1.2.1. <i>Passiflora mollissima</i> (H.B.K.) Bailey.....	11
❖ Características generales y distribución.....	11
❖ Importancia económica.....	12
❖ Aspectos agronómicos, ciclo de vida y propagación.....	13
❖ Plagas y enfermedades.....	15
<b>2.2. Cultivo de tejidos.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.1. Morfogénesis.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1.1. Regeneración <i>in vitro</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.2.1. Factores que afectan la respuesta morfogénica en la regeneración</b>	
<b><i>in vitro</i>.....</b>	<b>20</b>
2.2.2.1.1. Edad .....	20
2.2.2.1.2. Poda.....	27
2.2.2.1.4. Reguladores de Crecimiento .....	29
❖ a. Citoquininas .....	31
❖ b. Auxinas .....	31
2.2.2.1.5. Genotipo de la planta donadora y Tipo de explante.....	32
2.2.2.1.6. Tamaño del Explante .....	33
2.2.2.1.7. Oxidación y Contaminación.....	33
<b>2.3. Estudios <i>in vitro</i> en <i>Passiflora</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>3. FORMULACION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION.....</b>	<b>40</b>
<b>3. 1. Formulación del problema .....</b>	<b>40</b>

3. 2. Justificación del problema.....	40
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
4. 1. Objetivo general .....	42
4. 2. Objetivos específicos .....	42
5. 1. Tipo de estudio .....	43
5. 2. Población estudio y muestra.....	43
<b>5.3. Evaluación del efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad morfogénica de discos foliares .....</b>	<b>44</b>
5.3.1. Establecimiento del material de invernadero .....	44
5.3.2. Establecimiento del material re-invigorado .....	44
5.3.2.1. Desinfección.....	44
5.3.3. Establecimiento del material <i>in vitro</i> .....	45
5.3.3.1. Desinfección.....	45
5.3.3.2. Cultivo.....	45
5.3.4. Corte y obtención de discos foliares de material de invernadero <i>in vitro</i> y re-invigorado .....	46
5.3.5. Cultivo de discos foliares .....	46
<b>5.4. Diseño experimental.....</b>	<b>46</b>
<b>5.5. Tratamientos.....</b>	<b>47</b>
<b>1. Origen del material vegetal:.....</b>	<b>48</b>
<b>2. Edad del material vegetal:.....</b>	<b>48</b>
<b>3. Variables dependientes:.....</b>	<b>48</b>
Número de brotes por disco foliar: .....	48
Número de raíces por disco foliar: .....	48
Porcentaje de callo por disco foliar:.....	49
Porcentaje de oxidación por disco foliar:.....	49
<b>5. 6. Recolección de información.....</b>	<b>49</b>
<b>5. 7. Análisis de información .....</b>	<b>50</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>52</b>
<b>6.1. Efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad morfogénica de discos foliares de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>6.1.1. Número de brotes por disco foliar .....</b>	<b>52</b>

6.1.1.1. Comparación entre los tratamientos de (Invernadero, T1 – T6) vs. ( <i>In vitro</i> , T7 y Re- invigorado, T8).....	52
6.1.1.2. Comparación entre los tratamientos de ( <i>In vitro</i> , T7) vs. (Re- invigorado, T8).....	56
6.1.1.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 – T6)	56
<b>6.1.2. Número de raíces por disco foliar.....</b>	<b>60</b>
6.1.2.1. Comparación entre los tratamientos de ( Invernadero, T1 – T6) vs. ( <i>In vitro</i> , T7 y Re- invigorado, T8).....	60
6.1.2.2. Comparación entre los tratamientos de ( <i>In vitro</i> , T7) vs. (Re- invigorado, T8).....	62
6.1.2.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 – T6)	62
<b>6.1.3. Porcentaje de callo por disco foliar .....</b>	<b>66</b>
6.1.3.1. Comparación entre los tratamientos de ( Invernadero, T1 – T6) vs. ( <i>In vitro</i> , T7 y Re- invigorado, T8).....	67
6.1.3.2. Comparación entre los tratamientos de ( <i>In vitro</i> , T7) vs. (Re- invigorado, T8).....	67
6.1.3.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 –T6)	70
<b>6.1.4. Porcentaje de oxidación por disco foliar.....</b>	<b>72</b>
6.1.4.1. Comparación entre los tratamientos de (Invernadero, T1 – T6) vs. ( <i>In vitro</i> , T7 y Re- invigorado, T8).....	72
6.1.4.2. Comparación entre los tratamientos de ( <i>In vitro</i> , T7) vs. (Re- invigorado, T8).....	73
6.1.4.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 – T6)	75
<b>6.1.5. Enraizamiento y endurecimiento.....</b>	<b>80</b>
<b>6.2. Efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad morfológica de discos foliares de <i>P. mollissima</i>.....</b>	<b>83</b>
<b>6.2.1. Número de brotes por disco foliar .....</b>	<b>83</b>
6.2.1.1. Comparación entre los tratamientos de ( Invernadero, T1 – T4) vs. ( <i>In vitro</i> , T5 y Re- invigorado, T6).....	84
6.2.1.2. Comparación entre los tratamientos de ( <i>In vitro</i> , T5) vs. (Re- invigorado, T6).....	87
6.2.1.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 – T4)	87
<b>6.2.2. Número de raíces por disco foliar.....</b>	<b>90</b>
<b>6.2.3. Porcentaje de callo por disco foliar .....</b>	<b>90</b>
6.2.3.1. Comparación entre los tratamientos de (Invernadero, T1 – T4) vs. ( <i>In vitro</i> , T5 y Re- invigorado, T6).....	91
6.2.3.2. Comparación entre los tratamientos de ( <i>In vitro</i> , T5) vs. (Re- invigorado, T6).....	91
6.2.3.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 – T4)	92
<b>6.2.4. Porcentaje de oxidación por disco foliar.....</b>	<b>96</b>
6.2.4.1. Comparación entre los tratamientos de ( Invernadero, T1 – T4) vs. ( <i>In vitro</i> , T5 y Re- invigorado, T6).....	96
6.2.4.2. Comparación entre los tratamientos de ( <i>In vitro</i> , T5) vs. (Re- invigorado, T6).....	97

6.2.4.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 – T4)	101
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>104</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>106</b>



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición nutricional de varias especies de <i>Passiflora</i> por 100 gr. de porción comestible.....	8
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos utilizados con <i>Passiflora edulis</i> (maracuyá) .	47
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos utilizados con <i>Passiflora mollissima</i> (curuba).	47
<b>Tabla 4.</b> Número de muestreos utilizados en la recolección de datos después del cultivo <i>in vitro</i> y su equivalente en días.....	49
<b>Tabla 5.</b> Efecto de los tratamientos en el promedio del número de brotes por disco foliar en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> .....	54
<b>Tabla 6.</b> Efecto de los tratamientos en el promedio del número de raíces por disco foliar en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> .....	63
<b>Tabla 7.</b> Efecto de los tratamientos en el porcentaje de callo por disco foliar en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> .....	68
<b>Tabla 8.</b> Efecto de los tratamientos en el porcentaje de oxidación por disco foliar en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> .....	74
<b>Tabla 9.</b> Resultados de los contrastes ortogonales y los polinomios en las variables evaluadas en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> .....	78
<b>Tabla 10.</b> Efecto de los tratamientos en el promedio del número de brotes por disco foliar en <i>Passiflora mollissima</i> .....	85
<b>Tabla 11.</b> Efecto de los tratamientos en el porcentaje de callo por disco foliar en <i>Passiflora mollissima</i> .....	93
<b>Tabla 12.</b> Efecto de los tratamientos en el porcentaje de oxidación por disco foliar en <i>Passiflora mollissima</i> .....	98
<b>Tabla 13.</b> Resultados de los contrastes ortogonales y los polinomios en las variables evaluadas en <i>Passiflora mollissima</i> .....	103

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general del desarrollo de las distintas fases durante la regeneración.....	18
<b>Figura 2.</b> Diagrama del gradiente de juvenilidad en las plantas. ....	21
<b>Figura 3.</b> Ver pag. 107 .....	43
<b>Figura 4.</b> Efecto de los tratamientos en el promedio del número de brotes por disco foliar en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> .....	54
<b>Figura 5.</b> Efecto de la edad en el promedio del número de brotes por disco foliar en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> . ....	58
<b>Figura 6.</b> Formación de brotes a partir discos foliares de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> provenientes de plantas de invernadero de 2 (T2) meses.....	59
<b>Figura 7.</b> Efecto de los tratamientos en el promedio del número de raíces por disco foliar en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> . ....	63
<b>Figura 8.</b> Formación de raíces a partir de discos foliares de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> provenientes de plantas de invernadero de 2 (T2) meses.....	64
<b>Figura 9.</b> Efecto de la edad en el promedio del número de raíces por disco foliar en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> . ....	65
<b>Figura 10.</b> Efecto de los tratamientos en el porcentaje de callo por disco foliar en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> .....	68
<b>Figura 11.</b> Efecto de la edad en el porcentaje de callo por disco foliar en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> .....	70
<b>Figura 12.</b> Formación de callo a partir de discos foliares de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> provenientes de plantas de invernadero de 1 mes (T1). ....	71
<b>Figura 13.</b> Efecto de los tratamientos en el porcentaje de oxidación por disco foliar en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> . ....	74
<b>Figura 14.</b> Oxidación de discos foliares de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> provenientes de plantas de material re- invigorado (T8).....	76

<b>Figura 15.</b> Efecto de la edad en el porcentaje de oxidación por disco foliar en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> .....	77
<b>Figura 16.</b> Brotes obtenidos por cultivo <i>in vitro</i> de discos foliares de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> provenientes de material de invernadero de 2 (T2) meses de edad. .	79
<b>Figura 17.</b> Brote enraizado en medio MS sin reguladores de crecimiento .....	81
<b>Figura 18.</b> Plantas obtenidas por cultivo <i>in vitro</i> de discos foliares de <i>P. edulis</i> var. -- <i>flavicarpa</i> , <b>A.</b> Etapa de pre- endurecimiento. <b>B.</b> Etapa de endurecimiento.....	82
<b>Figura 19.</b> Efecto de los tratamientos en el promedio del número de brotes por disco foliar en <i>Passiflora mollissima</i> . .....	85
<b>Figura 20.</b> Formación de brotes a partir discos foliares de <i>P. mollissima</i> provenientes de plantas de invernadero de 3 meses (T3). .....	88
<b>Figura 21.</b> Efecto de la edad en el promedio del número de brotes por disco foliar en <i>Passiflora mollissima</i> .....	89
<b>Figura 22.</b> Efecto de los tratamientos en el porcentaje de callo por disco foliar de <i>Passiflora mollissima</i> .....	93
<b>Figura 23.</b> Efecto de la edad en el porcentaje de callo por disco foliar de <i>Passiflora mollissima</i> .....	94
<b>Figura 24.</b> Formación de callo a partir de discos foliares de <i>P. mollissima</i> provenientes de plantas de invernadero de 4 meses ( T4).....	95
<b>Figura 25.</b> Efecto de los tratamientos en el porcentaje de oxidación por disco foliar en <i>Passiflora mollissima</i> . .....	98
<b>Figura 26.</b> Oxidación de los discos foliares de <i>P. mollissima</i> provenientes de plantas de <i>in vitro</i> (T5). .....	100
<b>Figura 27.</b> Oxidación de los discos foliares de <i>P. mollissima</i> provenientes de plantas de invernadero de 3 mes (T3).....	100
<b>Figura 28.</b> Efecto de la edad en el porcentaje de oxidación por disco foliar en <i>Passiflora mollissima</i> . .....	102
<b>Figura 3.</b> Diagrama de flujo de la metodología utilizada para el desarrollo de la investigación .....	107

## LISTA DE ANEXOS

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	108
<b>Anexo 1</b> .....	126
<b>Anexo 2</b> .....	127
<b>Anexo 3</b> .....	128
<b>Anexo 4</b> .....	129
<b>Anexo 5</b> .....	130
<b>Anexo 6</b> .....	132
<b>Anexo 7</b> .....	134
<b>Anexo 8</b> .....	137
<b>Anexo 9</b> .....	140
<b>Anexo 10</b> .....	143
<b>Anexo 11</b> .....	146
<b>Anexo 12</b> .....	149
<b>Anexo 13</b> .....	152

## ABREVIATURAS

<b>BAP</b>	Bencil- aminopurina
<b>com. per.</b>	Comunicación personal
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>cm<sup>2</sup></b>	centímetro cuadrado
<b>D</b>	Días
<b>DDC</b>	Días después del cultivo en condiciones <i>in vitro</i>
<b><i>et al.,</i></b>	<i>et alia</i> (y otros)
<b>Ha</b>	Hectáreas
<b>kg/ Ha</b>	kilogramos por hectáreas
<b>KIN</b>	Kinetina
<b>m.</b>	metro
<b>ml.</b>	mililitro
<b>mm.</b>	milímetros
<b>mm<sup>2</sup></b>	milímetros cuadrados
<b>m.s.n.m.</b>	metros sobre el nivel del mar
<b>pH</b>	Logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones $\log_{10} (1/ [H^+])$ or $-\log_{10} [H^+]$
<b>vs.</b>	<i>versus</i> (contra)
<b>(%)</b>	porcentaje

## RESUMEN

En el presente estudio se evidenció el efecto de la edad y el origen del material sobre la capacidad morfogenética de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* (maracuyá) y *Passiflora mollissima* (H.B.K) Bailey (curuba). Discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa* fueron cultivados en condiciones *in vitro* en medio Murashige & Skoog (1962) suplementado con Bencil- aminopurina (BAP 4.44  $\mu\text{M}$ ) y Kinetina (KIN 2.32  $\mu\text{M}$ ) y discos foliares de *P. mollissima* en medio Nitsch & Nitsch (1968), suplementado con Bencil - aminopurina (BAP 13.3  $\mu\text{M}$ ) y Kinetina (KIN 9.3  $\mu\text{M}$ ). El origen del material vegetal se evaluó a partir de plantas desarrolladas *in vitro*, plantas adultas re- invigoradas por poda y plantas de invernadero de 1 a 6 meses de edad para *P. edulis* var. *flavicarpa* y de 1 a 4 meses para *P. mollissima*. Las muestras de semillas y plantas de *P. edulis* var. *flavicarpa* provenían de cultivos localizados en la Inspección de policía San Joaquín, al oeste de la cabecera del Municipio de la Mesa (Cundinamarca), y de *P. mollissima* provenían de un cultivo localizado en la Vereda Pozo Hondo Municipio de Facatativa (Cundinamarca). Para *P. edulis* var. *flavicarpa* se observó un mayor promedio de número de brotes por disco foliar a partir de plantas de 1 y 2 meses del material de invernadero (4.61 y 5.34 respectivamente), mientras que para *P. mollissima* se evidenció un mayor promedio de número de brotes por disco foliar a partir de plantas de 2 y 3 meses del material de invernadero (0.44 y 0.74 respectivamente). Se determinó que para ambas especies el material que responde con una mayor capacidad morfogenética es el proveniente de invernadero. Sin embargo, en este estudio, solamente plantas micropropagadas a partir de discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa* presentaron enraizamiento espontáneo, cuando fueron transferidas a medio Murashige & Skoog sin reguladores de crecimiento. Para la fase de endurecimiento la utilización de turba como sustrato resultó ser favorable para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

## ABSTRACT

The present study proved the effect of age and source of plant material on morphogenetic capacity of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* y *Passiflora mollissima* (H.B.K) Bailey. *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* leaf disc were cultivated under *in vitro* conditions using Murashige & Skoog medium supplemented with (4.44  $\mu\text{M}$ ) BAP and (2.32  $\mu\text{M}$ ) KIN. *P. mollissima* leaf disc were cultivated under *in vitro* conditions using Nitsch & Nitsch medium supplemented with (13.3  $\mu\text{M}$ ) BAP and (9.3  $\mu\text{M}$ ) KIN. Source of plant material was evaluated using *in vitro* developed plants, adult plants re- invigorated by pruning and plants from 1 to 6 months (*P. edulis*) and from 1 to 4 months (*P. mollissima*) grown in greenhouse conditions. The selected seeds and plants sample for *P. edulis* var. *flavicarpa* came from crops located in the area of Pozo Hondo, town of Facatativa (Cundinamarca), and for *P. mollissima* came form crops located in the small town of San Joaquin which is at the west side of la Mesa (Cundinamarca). Leaf disc of *P. edulis* var. *flavicarpa* plants from 1 to 2 months of age grown in greenhouse, had a great shoot average (4.61 y 5.34 respectively). On the other hand, leaf disc of *P. mollissima* plants from 2 to 3 months of age grown in greenhouse, it was found a great shoot average (0.44 y 0.74 respectively). It was concluded that plant material in greenhouse of both species, had a high morphogenetic capacity. However in this study only *P. edulis* var. *flavicarpa* plants micropropagated from leaf disc, formed spontaneously roots when transferring to Murashige & Skoog medium without growth regulators. The plantlets of this species were successfully acclimatized using peat moss as substrate.

## 1. INTRODUCCION

Dentro de la familia Passifloraceae, el género *Passiflora* comprende 400 especies, la mayoría de las cuales son cultivadas por sus frutos comestibles, mientras que otras son usadas como plantas ornamentales.

A pesar de ser frutas de gran consumo en el país, solo unas pocas especies se cultivan en forma comercial, entre las que se cuentan *Passiflora mollissima* (curuba de castilla), que se cultiva hace muchos años y cuenta con un mercado definido y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* (maracuyá), la cual ha tomado un gran auge debido a la facilidad de su industrialización. Estas dos especies, muy apetecidas y con un amplio mercado de exportación Europeo y Norteamericano, presentan problemas fitosanitarios que afectan su productividad y calidad.

El proceso de regeneración de brotes adventicios conocido como organogénesis, es una de las técnicas de cultivos de tejidos, que ofrecen una opción para obtener por medio de la micropropagación masiva; plantas en buenas condiciones, libres de virus y otros patógenos. Es importante considerar que factores como la edad y el origen del material vegetal, son determinantes para el éxito del proceso.

El presente trabajo, pretende evaluar la capacidad morfogenética de estas dos especies, a partir de discos foliares de plantas *in vitro*, plantas adultas re- invigoradas por poda y plantas de invernadero de 1 a 6 meses para *P. edulis* y de 1 a 4 meses para *P. mollissima*.



## 2. MARCO TEORICO

El nombre de *Passiflora* dado formalmente por L. Pluckenet en 1696, deriva de las palabras latinas “*Flor Passionis*” flor de la pasión (ESCOBAR , 1988; VECCHIA, 2000). Inicialmente, fue la flor la que atrajo la atención tanto de expertos botánicos como de coleccionistas por su gran belleza, sin embargo los frutos poco a poco se fueron consolidando como alimentos muy apetecidos por su valor nutricional y medicinal tanto en Europa como en América del Norte (IJJÁSZ, 1999).

### 2.1. Familia Passifloraceae

La distribución geográfica de ésta Familia es casi exclusivamente tropical y subtropical, contando con 23 géneros aproximadamente, 16 de los cuales se encuentran distribuidos en el Viejo Mundo; los géneros restantes se encuentran distribuidos en América, siendo uno de ellos *Passiflora*, el género más grande de la Familia (ESCOBAR, 1988; ESCOBAR, 1992).

Passifloraceae, es una Familia de plantas de tamaño medio, las cuales pueden encontrarse en forma de lianas o enredaderas herbáceas con zarcillos axilares, hasta árboles bajos y arbustos. Su descripción taxonómica corresponde a individuos que presentan hojas siempre alternas, pecioladas con estípulas pequeñas o a veces caedizas, en general ovadas, bilobuladas o hasta con 3 a 5 lóbulos, muy a menudo con nectarios en el haz, cáliz floral en forma de copa, campanulado ó tubular – campanulado, en cuyo vértice coloca el periantio y una corona de tubérculos o filamentos y órganos reproductores sobre una columnilla central; fruto en forma de baya globosa, con semillas, de testa dura, y endospermo carnoso, las cuales están rodeadas por un arilo (KILLIP, 1938; URIBE, 1972; CRONQUIST, 1978; HEYWOOD, 1985; ESCOBAR, 1988).

## **Ubicación Taxonómica:**

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Archiclamydeae

Orden: Violales

Suborden: Flacourtiineae

Familia: Passifloraceae

Tribu: Passiflorieae

Género: ***Passiflora***

Subgénero: *Passiflora*

Serie: *Incarnatae*

Especie: ***Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener.**

Subgénero: *Tacsonia*

Sección: *Bracteogama*

Especie: ***Passiflora mollissima* (H.B.K.). Bailey**

( Killip, 1938 y Cronquist, 1978 ).

### **2.1.1. Género *Passiflora***

El género *Passiflora* esta conformado por cerca de 450 especies y 22 subgéneros, según su morfología floral. En Colombia, se encuentran distribuidas 115 especies aproximadamente, desde el nivel del mar hasta los subpáramos y desde el bosque pluvial hasta las zonas semiáridas de la Guajira (ESCOBAR, 1988; ESCOBAR, 1992).

El género esta determinado taxonómicamente por las siguientes características: lianas, enredaderas herbáceas con zarcillos axilares o árboles. Sus hojas son alternas con nectarios extraflorales sobre la lámina o superficie adaxial del pecíolo; flores con 3 estilos; los sépalos y los pétalos 5; 5 estambres monadelfos hasta las anteras; frutos con el ovario unilocular con 3 placentas parietales; semillas con testa reticulada o con estriaciones transversales y su arilo anaranjado (ESCOBAR, 1988; COPPENS, 1997).

Aproximadamente 20 de estas especies son cultivadas como ornamentales por sus atractivas flores, mientras que otras especies como *P. laurifolia* y *P. foetida* se utilizan como cultivos de cobertura; otras como *P. foetida* se implementan en el control de malezas y en la prevención de la erosión (HEYWOOD, 1985; COPPENS, 1997; MAZZANI, 1999).

Además, los usos medicinales de algunas especies de este género son bien reconocidos. Por ejemplo de *P. incarnata* y *P. caerulea* se obtiene el medicamento “Passiflorina”, utilizado como calmante nervioso (GARCIA, 1992; MAZZANI, 1999). Por otro lado, el jugo fresco de las hojas de *P. ligularis* es una bebida contra la fiebre biliosa y tifoidea (GARCIA, 1992).

Sin embargo, Velez y de Velez (1990) hallaron que algunas especies contienen un glucósido cianogénico en la raíz, las hojas, la cáscara de los frutos verdes y las flores; este glucósido es un agente químico venenoso por liberar abundante ácido cianídrico (MAZZANI, 1999).

Sólo dos de los subgéneros son cultivados por sus frutos: subgénero *Tacsonia*, y el subgénero *Passiflora*. Aunque el género *Passiflora* es considerado como uno de los más ricos en especies frutales, de 20 a 60 aproximadamente, no obstante, son muy pocas las que comercialmente se cultivan (HEYWOOD, 1985; ESCOBAR, 1992; COPPENS, 1997; MAZZANI, 1999).

#### **2.1.1.1. Subgénero *Passiflora***

El subgénero *Passiflora* se distribuye a través de América Latina, con unas pocas especies en el Sur de los Estados Unidos, contando con 136 especies aproximadamente. Se encuentra desde los bosques a nivel del mar, hasta alturas de más de 2.500 m.s.n.m. (ESCOBAR, 1988; ESCOBAR, 1992).

Por lo general, el subgénero *Passiflora* es de hábitos herbáceos, brácteas enteras o serruladas, usualmente grandes e involucradas, sus flores son grandes y altamente coloreadas, cáliz campanulado a menudo corto, tubular, con fragancias y

estructuras elaboradas, que atraen abejas grandes hacia los nectarios de la flor, como son *Xilocopa* y *Eulaema* (KILLIP, 1938; ESCOBAR, 1992).

#### **2.1.1.1.1. *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*.**

Conocido popularmente como maracuyá, *Passiflora edulis* se presenta en dos variedades según KILLIP (1938) y MORTON (1987): variedad púrpura y amarilla.

Estas dos variedades son cultivadas en muchos países del Viejo Mundo como Hawái, Java, Sumatra, Malasia, Filipinas, Zimbabwe y Taiwan. Desde 1950, el interés por el cultivo de la variedad amarilla se intensificó en países de Sur América como Colombia Venezuela y Surinam, (MORTON, 1987).

La variedad *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, presenta frutos de mayor tamaño, así como una mejor resistencia a enfermedades como el *Fusarium* y plagas como los nemátodos (GOUVEIA, 1987).

#### **❖ Características generales y distribución**

*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* es una planta trepadora, vigorosa, leñosa perenne, que puede llegar a medir de 20 a 50 metros de largo. Presenta tallos verdes, zarcillos axilares; hojas ovadas en estado juvenil, y profundamente trilobuladas en estado adulto; pecíolos biglandulares en la base, las glándulas sésiles o cortamente estipitadas; brácteas ovadas, obtusas o acutadas en el ápice, claramente aserradas y pectinadas (KILLIP, 1938; OTERO, 1984; COPPENS, 1997).

Sus flores se presentan solitarias, axilares, fragantes, blancas y ligeramente violáceas, 5 sépalos oblongos de color verde y blanco, y 5 pétalos oblongos de color blanco, corona en 4 o 5 filamentos, blancos en la parte superior y violetas en la base; 5 estambres con grandes anteras; ovario ovoide o globoso, cericeo-tomentoso o glabroso (KILLIP, 1938; OTERO, 1984; COPPENS, 1997).

El fruto es casi redondo globoso, ovoide, de color amarillo o amarillo-verdoso, piel dura y coriácea, lisa y cerosa; en el interior tiene numerosas semillas,

envueltas en una masa aromática de color naranja, su sabor es menos perfumado y ligeramente mas ácido (OTERO, 1984).

### ❖ **Importancia Económica**

El maracuyá, ingresó a Colombia en 1960, por medio de la importación de plantas procedentes de Hawaii, Brasil y Venezuela (CHACON, 1988).

Sólo hasta 1980, las posibilidades de exportación (como jugo y concentrado), contribuyeron al desarrollo del cultivo en zonas del Valle del Cauca y la zona marginal baja cafetera de los departamentos de Caldas, Quindío, Risaralda y Tolima, así como del Huila. Estos cultivos se fortalecieron por la presencia en la zona de guadua o bambú, utilizada para el sistema de tutorado. Además, la presencia de grandes poblaciones de la abeja carpintera o abejorro negro *Xilocopa spp.* facilitaron las fases del cultivo (CHACON, 1991).

Según el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, el área total en Colombia de cultivos reportados, tanto de producción tradicional como tecnificada, para el maracuyá fue de 3.254 Ha, en el año de 1999, siendo la producción total de 64.792 Ton. en todo el país.

La exportación en fresco de esta fruta es casi imposible, ya que presenta muchas dificultades para su almacenamiento y transporte, como es el deterioro en 7 ó 10 días, cuando se almacena a temperatura ambiente debido al ataque de hongos y fermentaciones de la pulpa (CHACON, 1988).

De hecho, se ha establecido el comercio internacional basado en concentrados del jugo y otros derivados del maracuyá. También se han desarrollado mezclas con jugos de otras frutas menos ácidas, como pera, manzana, piña, naranja, mango y papaya así como la producción de néctares, jarabes, mermeladas, helados, pudines y enlatados (ZAPATA, 1987; CHACON, 1988).

El maracuyá produce también 2 subproductos en cantidades apreciables, la cáscara, utilizada como fuente de pectinas, forraje y abono, y las semillas que se hacen interesantes como fuente de grasas comestibles (ZAPATA, 1987; IDARRAGA, 1991).

El maracuyá no solamente es atractivo por su acidez y aroma particular, sino también por su valor nutricional, siendo una excelente fuente de provitamina A, riboflavina y niacina (Tabla 1).

*P. edulis*, es conocida y aprovechada, culturalmente en algunas regiones de Sur América, como sedativa, tónica, diurética, antiespasmódica, anticonvulsiva y antihelmíntica; se emplea para tratar convulsiones, parálisis, alcoholismo, dolores de cabeza, insomnio, cólico en niños, diarrea, gripe, histeria, neuralgia, hipertensión y síntomas originados por la menopausia (RAIN- TREE, 1996).

#### ❖ Aspectos agronómicos, ciclo de vida, propagación.

**Aspectos agronómicos.** El maracuyá, se adapta bien a los climas cálidos, con alturas entre 0 y 1300 m.s.n.m., temperaturas entre 20 y 30° C siendo su rango óptimo entre 24 y 28°C, con precipitaciones de 1500 mm. anuales, y con un requerimiento de suelos francos para su cultivo, con buena capacidad de retención de humedad, y pH entre 5.5. y 7.0 (ZAPATA, 1987; CHACON, 1991).

**Ciclo de vida.** La planta de maracuyá en forma silvestre, tiene un ciclo de vida natural de 15 años; mientras que la producción de una planta en un cultivo es de 2 ó 3 años, ya que después comienza la declinación por problemas de hongos (CHACON, 1988).

Por el hecho de ser una planta perenne leñosa, presenta dos fases durante su ciclo de vida; una fase juvenil y una fase madura o adulta (CHACON, 1991; HARTMANN, 1997).

En el cultivo de maracuyá, los primeros meses corresponden a la fase juvenil, es decir al período inicial de crecimiento, siendo su primera floración a los seis meses, para entrar en producción dos meses mas tarde (ZAPATA, 1987; CHACON,1991; COPPENS, 1997; HARTMANN, 1997).

**Tabla 1.** Composición nutricional de varias especies de *Passiflora* por 100 gr. de porción comestible.

Composición	<i>P. edulis</i> var. <i>flav.</i>	<i>P. ligularis</i>	<i>P.</i> <i>mollissima</i>	<i>P. quadrang.</i>	<i>P. laurifolia</i>
Agua (%)	84.9	86.0	92.0	88.0	81.0
Calorías	53.0	51.0	25.0	41.0	73.0
Proteínas (gr)	0.7	1.1	0.6	0.9	0.6
Grasa (gr)	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1
Carbohidratos					
Total (gr)	13.7	11.9	6.3	10.1	17.9
Fibra (gr)	0.2	0.3	0.3	0.0	0.2
Ceniza (gr)	0.5	0.9	0.7	0.9	0.4
Calcio (mg)	3.8	7.0	4.0	10.0	4.0
Fósforo (mg)	24.6	30.0	20.0	22.0	14.0
Hierro (mg)	0.4	0.8	0.4	0.6	0.4
Sodio (mg)					18.0
Potasio (mg)					49.0
Vitamina A (I.U.)	2410.0	0.0	1700.0	70.0	880.0
Tiamina (mg)	Traza	0.0	0.0	0.0	Traza
Riboflavina (mg)	0.1				
Niacina (mg)	2.2	2.1	2.5	2.7	1.4
Ac. Ascórbico (mg)	20.0	20.0	70.0	20.0	20.0

NAGY (1980).

La fase adulta, se caracteriza por un ciclo continuo entre la etapa reproductiva y vegetativa y comienza después de su primera producción (cosecha) (HARTMANN, 1997). Se han observado dos ciclos de producción en Colombia, siendo la cosecha principal en diciembre y enero, coincidiendo con las épocas de verano, seguida por un período de 4 meses de reposo invernal ó de lluvias, las cuales inducen las floraciones que al ser polinizadas y fecundadas, dan origen a la segunda cosecha, 60 días después de ocurrir la floración, es decir entre mayo y agosto (ZAPATA, 1987; CHACON, 1991).

El maracuyá es una planta autoincompatible, por lo que requiere de otros mecanismos para que ocurra la polinización. A pequeña escala se presenta la transmisión de polen por el viento, siendo la polinización por insectos la más

eficiente, porque las flores son grandes, atractivas, con abundante aroma y néctar, y los granos del polen son grandes y pegajosos (CHACON, 1991).

Entre sus polinizadores están: la abeja carpintera o abejorro negro (*Xilocopa sp*), la abeja melífera (*Apis mellifera*), y la avispa negra (*Polystes sp*) (CAICEDO, 1991).

**Propagación.** El sistema de propagación usado comercialmente, es la reproducción sexual, es decir utilizando semillas, en donde se seleccionan los mejores frutos con buen sabor, en conjunto con otras características agronómicas tales como alta fructificación, tamaño, espesor de corteza, cavidad bien llena y producción de jugo por planta (VASQUEZ, 1991).

Este método, presenta ciertas desventajas, ya que los frutos que se obtienen, no son uniformes, debido a la alta variabilidad genética, aspecto común en la familia Passifloraceae, lo cual se acentúa por causa de las frecuentes hibridaciones interespecíficas que se presentan en el medio natural (BRAIDG, 1991; CANCINO, 1994).

También se utiliza el sistema por reproducción asexual como son estaca, acodo e injerto (GOUVEIA, 1987, CHACON, 1991). Estos medios de propagación, para multiplicar material con características genéticas iguales a la planta madre, presentan ciertas desventajas como: Unos bajos niveles de producción, un tiempo de desarrollo de la planta lento y además la posibilidad de estar propagando material que tenga problemas endógenos a nivel sanitario (BRAIDG, 1994).

#### ❖ **Plagas y enfermedades.**

Esta especie de uso comercial como muchas otras, se encuentra expuesta al ataque de diversas plagas y enfermedades, por lo que se hacen importantes los programas en biotecnología y biología molecular con miras a su mejoramiento.

Entre sus problemas de plagas, se encuentran la larva de la mariposa (*Dione sp.*), la cual se alimenta de las hojas nuevas; los ácaros, que producen una defoliación



de las plantas; la mosca de la fruta, posiblemente de la especie *Anatrepha*; así como trips e insectos muy pequeños (ZAPATA, 1987; CHACON, 1991).

La principal enfermedad que se presenta en los semilleros es el “Damping off”, producida por los hongos del suelo, la cual puede evitarse por una adecuada desinfección antes de la siembra. En el cultivo la pudrición radicular, causada por varios hongos entre los cuales *Fusarium sp*, se presenta cuando los drenajes son deficientes y se produce acumulación de agua en el suelo (ZAPATA, 1987).

Se ha demostrado que además las *Passifloras* son infectadas por diversos grupos de virus, de los cuales los Potyvirus representan el mayor riesgo de daño a los cultivos y pueden afectar la apariencia composición y uniformidad de los frutos (GONGORA, 1992). Entre ellos se destaca “Passionfruit woodiness virus” (PWV), el cual es transmitido por inoculación mecánica, por medio de insectos de la familia *Aphididae* como son *Aphis gossypii*, y *Myzus persicae*, los cuales actúan como vectores; su transmisión es de manera no persistente, y sus síntomas en la planta se caracterizan por una lesión o veta local necrótica y clorótica, moteada y rugosa (BRUNT, 1996).

#### **2.1.1.2 Subgénero *Tacsonia***

Se distribuye en la zona Andina, a alturas entre 1.800 y 4200 m.s.n.m., representado por 37 a 47 especies, 21 de las cuales se encuentran en nuestro país, siendo 15 nativas (CAICEDO, 1991; ESCOBAR, 1991; HODSON, 1992).

En sus hábitos, son herbáceas, o bejucos sublianosos; flores vistosas, sin fragancias; calix cilíndrico, de colores verdes, rosados, azules o anaranjados abaxialmente, blancos o morados adaxialmente, mas largo que los sépalos, los pétalos insertados en la margen; esta morfología es apropiada para una polinización por colibríes como es el caso de la especie, *Ensifera ensifera* (KILLIP, 1938; ESCOBAR, 1988).

A diferencia del subgénero *Passiflora*, las especies del subgénero *Tacsonia*, son autocompatibles mostrando una gran capacidad de cruces interespecíficos, con gran éxito (ESCOBAR, 1991).

#### **2.1.1.2.1. *Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey.**

##### **❖ Características generales y distribución**

Esta especie es originaria del Norte de Suramérica donde crece en forma silvestre en regiones templadas, desde los paramos de Mérida en Venezuela, hasta la región de Chajaya en Bolivia (BERNAL, 1998). También ha sido introducida a México, Nueva Guinea, India Sri Lanka y Kenya (CAICEDO, 1997; BERNAL, 1998).

En nuestro país se encuentra en tierras frías a lo largo de las tres cordilleras en especial la oriental y la central, donde por lo común crece de forma silvestre (ERASO, 1985).

Es una planta trepadora, perenne, pubescente, con zarcillos que se originan en la base del pecíolo de la hoja, presenta tricomas rectos u ondulados; tallos cilíndricos estriados; hojas agudas en las puntas, partidas en tres lóbulos ovoides, duras y generalmente cubiertas de finos tricomas en ambas superficies, márgenes aserradas; pecíolos largo, con nectarios subsésiles; estipulas reniformes; pedúnculos delgados; brácteas ovadas u oblongas (DELGADO, 1988; ESCOBAR, 1988; CAICEDO, 1997; BERNAL, 1998).

Flores péndulas; tubo floral largo, carente de vellosidades, hipantio alargado cilíndrico, glabro, verde, de color rosado pálido o magenta, hacia el ápice en la superficie exterior; superficie interior, corona reducida a un anillo morado con crestecillas blancas; 5 pétalos subiguales a los 5 sépalos; 5 estambres con anteras, gineceo con tres estigmas ovarios oblongos (DELGADO, 1988; ESCOBAR, 1988; CAICEDO, 1997).

Fruto oblongo u obovoide, con pericarpio coriáceo o blando, amarillo al madurar; semillas obovadas, recubiertas por un arilo anaranjado, succulento, comestible (ESCOBAR, 1988; BERNAL, 1998).

### ❖ **Importancia económica**

Su cultivo comercial en Colombia comenzó en los años 50; se puede encontrar de manera silvestre y cultivada artesanalmente en el Altiplano Cundí-boyacense, páramos del Valle del Cauca, Antioquía y Cauca. Otros departamentos productores de este cultivo, que han incrementado sus áreas en los últimos años son Tolima Santander y Huila (CAICEDO, 1997; COPPENS, 1997).

Según el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, el área total en Colombia de cultivos reportados para 1999 es de 2.575 Ha, con una producción de 27.586 Ton. y un rendimiento de 10.713 kg/Ha.

El nivel de exportación es muy pequeño, debido a problemas agronómicos lo que hace imposible su comercialización al exterior en fruta fresca, siendo indispensable el procesamiento a pulpa congelada (CAMPO, 1991).

En la industria la fruta se utiliza para preparar sorbetes, mermeladas helados, jugos a partir de pulpa congelada y para saborizar productos lácteos como leche y yoghurt (FEDERACION, 1987; BERNAL, 1998).

En cuanto a su valor nutricional (Tabla 1), es excelente fuente en ácido ascórbico, niacina y provitamina A.

El éxito de esta fruta radica en sus características de aroma y sabor, las cuales son suaves, tenues y delicados, dándole amplias posibilidades como fruta exótica en los mercados de Europa y Norteamérica; por esto se hace indispensable, la consecución de variedades ideales, así como de un paquete tecnológico adecuado que permita incrementar la productividad de este cultivo que constituye una de las principales fuentes de ingreso para el campesino de clima frío (MARTINEZ, 1980; CIVETTA, 1984; CAMACHO, 1991; CAMPO, 1991).

Medicinalmente se utiliza en algunas regiones como infusión para combatir el insomnio, las depresiones, angustias y otros males nerviosos. Se utiliza también para

expulsar cálculos renales, el cocimiento de las hojas es vermífugo, el jarabe preparado con el cocimiento de la raíz se usa contra la pulmonía y la infusión de la raíz en las enfermedades urinarias (BERNAL, 1998).

Algunas tribus indígenas emplean el fruto fresco cortado y en forma de cataplasma sobre los abscesos y tumores, así como en decocción para purificar la sangre (BERNAL, 1998).

#### ❖ Aspectos agronómicos, ciclo de vida y propagación.

**Aspectos agronómicos.** *Passiflora mollissima*, es cultivada entre los 2.000 y los 3.600 m.s.n.m., a una temperatura de 12 a 18°C, con una humedad relativa promedio de 70%, un régimen de lluvias de 1.500 a 1800 mm. anuales, y siendo suelos aptos para su cultivo los franco- arenosos y franco- arcillosos o franco- limosos, con un buen contenido de materia orgánica (10%), un pH de 5 a 6.5 y una profundidad mínima de 1 m. (DELGADO, 1988; COPPENS, 1997).

**Ciclo de vida.** El ciclo de vida de una planta en un cultivo, oscila entre 4 y 10 años, teniendo un período no productivo de aproximadamente 2 años, donde su primera cosecha es de 10 a 12 meses después del transplante a campo (FEDERACION, 1987; HODSON, 1992).

La curuba, al ser una planta perenne, presenta dos fases durante su ciclo de vida; una fase juvenil y una fase madura o adulta (DELGADO 1988; HARTMANN, 1997). Siendo en el cultivo su primer año la fase juvenil o periodo inicial de crecimiento, esta planta florece, a partir del mes 13 de su transplante en campo, para entrar en cosecha 3 meses después (FEDERACION, 1987 ).

La fase adulta se caracteriza por un ciclo continuo entre la etapa reproductiva y vegetativa y comienza después de su primera producción (cosecha) (HARTMANN, 1997). Se han observado dos ciclos de producción en Colombia, siendo la cosecha principal de junio a septiembre, coincidiendo con las épocas de verano, seguida por un periodo de 3 meses de reposo invernal ó de lluvias, las cuáles inducen las

floraciones que al ser polinizadas y fecundadas, dan origen a la segunda cosecha, 90 días después de ocurrir la floración, es decir entre enero y marzo (CAICEDO 1997).

Factores eólicos favorecen la polinización de esta planta siempre y cuando no sobrepasen las 30 millas. Así como insectos que se alimentan de polen y otros animales como el caso del colibrí pico de espada, *Ensifera ensifera* (ERASO, 1985; ESCOBAR, 1988).

La curuba por su hábito de crecimiento tiende a ramificarse desde muy joven, generando que la mayor parte de sus ramas sean improductivas, lo cual afecta el valor comercial del cultivo (DELGADO 1988; CAICEDO 1997).

Durante el desarrollo es importante la poda de formación, la cual se inicia desde el vivero para favorecer el crecimiento de un solo tallo cortando las ramificaciones improductivas que se presentan y disponer a la planta para el sistema de tutorado en espaldera (CAICEDO 1997).

**Propagación.** *P. mollissima* se propaga por el método sexual utilizando, semillas de frutos con un buen desarrollo, maduros y que provengan de plantas con buenas características agronómicas como una excelente producción y resistencia a plagas y enfermedades, pero al igual que en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, presenta ciertas desventajas, ya que los frutos que se obtienen, no son uniformes, debido a la alta variabilidad genética, aspecto común en la familia Passifloraceae, lo cual se acentúa por causa de las frecuentes hibridaciones interespecíficas que se presentan en el medio natural (BRAIDG, 1991; CANCINO, 1994).

La propagación asexual mas utilizada es el acodo (OTERO, 1984). Este medio de propagación, en el cual es posible multiplicar material con características genéticas iguales a la planta madre, presentan desventajas como: unos bajos niveles de producción, un tiempo de desarrollo de la planta lento y además la posibilidad de estar propagando material que tenga problemas endógenos a nivel sanitario (BRAIDG, 1994).

### ❖ Plagas y enfermedades.

La tecnología aplicada es muy escasa, llevando a ser casi imposible encontrar una variedad con alta producción, resistente a ciertas plagas y enfermedades, haciendo del factor agronómico el principal problema que afecta su comercialización, ya que su cultivo se realiza a nivel de minifundio.

Dentro de las enfermedades, con mayor presencia en sus cultivos se encuentra la Antracnosis, causada por *Colletotrichum sp.* que se caracteriza por manchas oscuras, las cuales deforman el fruto, lo que impide su exportación en fresco al exterior (PIRB, 1984).

Plagas como la mariposa (*Dione juno*), que se alimenta de sus hojas flores y fruto, también se presentan en sus cultivos al igual que la mosca consumidora de botones florales, *Zapriothrica salebrosa* (Diptera) (CAICEDO, 1987).

Otro problema que afectan estos cultivos son las heladas, constituyendo uno de los mayores riesgos, aunque tienen que ser muy fuertes para que ocasionen daños (DELGADO, 1988).

## 2.2. Cultivo de tejidos.

Como conjunto de técnicas, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta, ya sean órganos (embriones, brotes, raíces, flores) o tejidos (células, callos y protoplastos), establecerlos y mantenerlos en desarrollo *in vitro*, en un medio nutritivo, bajo unas condiciones físicas y químicas apropiadas (ROCA, 1991; MROGINSKI, 1991; LINDSEY, 1992; HARTMANN, 1997).

Dentro de las diferentes técnicas usadas para la **regeneración** de plantas a través de cultivo de tejidos se encuentra, la formación de brotes adventicios (**organogénesis**), donde se utilizan como explantes, segmentos de hojas, pecíolos, tallos internodales, raíces y callos (PIERIK, 1987; HARTMANN, 1997) .

Estas técnicas de cultivos de explantes utilizadas en muchas especies han contribuido no sólo a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular, sino a un mejor aprovechamiento de tales eventos en mejoramiento genético, obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, así como a conservación de germoplasma y micropropagación (PIERIK, 1987; VILLALOBOS, 1991; HULME, 1992; BARKER, 1997; DE CLERK, 1997; HARTMANN, 1997 ; KUMAR, 1998).

La regeneración de brotes adventicios, a partir de discos de hojas o yemas presentes en explantes nodales, forman parte de muchos protocolos de micropropagación (DE CLERK, 1997), en los cuales se pueden distinguir las siguientes etapas:

Etapa 0: Selección y preparación de la planta donadora del explante. Donde se selecciona material en condiciones fisiológicas y fitosanitarias adecuadas teniendo en cuenta su capacidad morfogenética (CASSELLS, 1991).

Etapa I: Establecimiento del explante. Las plantas donadoras de explantes, presentan en su superficie microorganismos, principalmente hongos y bacterias que podrían competir con el crecimiento y desarrollo del explante en condiciones *in vitro*. Por lo tanto, es necesario después de seleccionar el explante, desinfectarlo superficialmente con productos químicos que pueden ser tóxicos para los microorganismos y que produzcan la menor oxidación posible. Después de la desinfección el explante es inoculado en el medio de cultivo apropiado (ROCA, 1991; CARRIZOSA, 1992; HARTMANN, 1997).

En esta etapa, el explante pasa por un período inicial, donde las células adquieren competencia, después del estrés ocasionado por el aislamiento de la planta donadora y por los tratamientos de desinfección, esperando que ocurra crecimiento producto de la división y elongación celular (DE CLERK, 1997; HARTMANN, 1997; KERSTETTER, 1997).

Etapa II: Proliferación de brotes. Donde se presenta la inducción y formación de brotes adventicios, directamente a partir del explante (en este caso discos foliares) e indirectamente a partir de callo, siendo importante la utilización de reguladores de

crecimiento, tales como las citoquininas que estimulan la división celular (DE CLERK, 1997; HARTMANN, 1997; TAIZ, 1998).

Etapa III: Enraizamiento. Los brotes obtenidos se transfieren por unos días a medio sin reguladores de crecimiento y posteriormente se subcultivan en medio para la inducción de raíces *in vitro*. Para este proceso se puede retirar o disminuir la adición exógena de citoquininas y adicionar auxinas exógenas.

Etapa IV: Endurecimiento. Antes de esta etapa se inicia una fase de aclimatación de las plantas *in vitro*, durante el cual se modifican las concentraciones de sales y azúcar, se reduce la humedad relativa y se incrementa la intensidad de la luz. Luego de este proceso se transfieren un ambiente en condiciones climáticas naturales, es decir *ex vitro* (CARRIZOSA, 1992; KIRDMANEE, 1995; NGUYEN, 1999).

### **2.2.1. Morfogénesis**

Muchas de las células de la planta son derivadas de los meristemos apicales de brotes y raíces. Estas células especializadas proveen el material necesario para la morfogénesis de la planta la cual es conseguida por una combinación de formación de nuevas células (división) y la expansión orientada de estas (NEWBIGIN, 1995; KERSTETTER, 1997; TAYLOR, 1997; TAIZ, 1998).

La morfogénesis, puede definirse como el desarrollo de la forma de las células y de los órganos; la evolución de una estructura desde un estado indiferenciado a un estado diferenciado (SMITH, 1992 ; SEGURA, 1993; TAIZ, 1998).

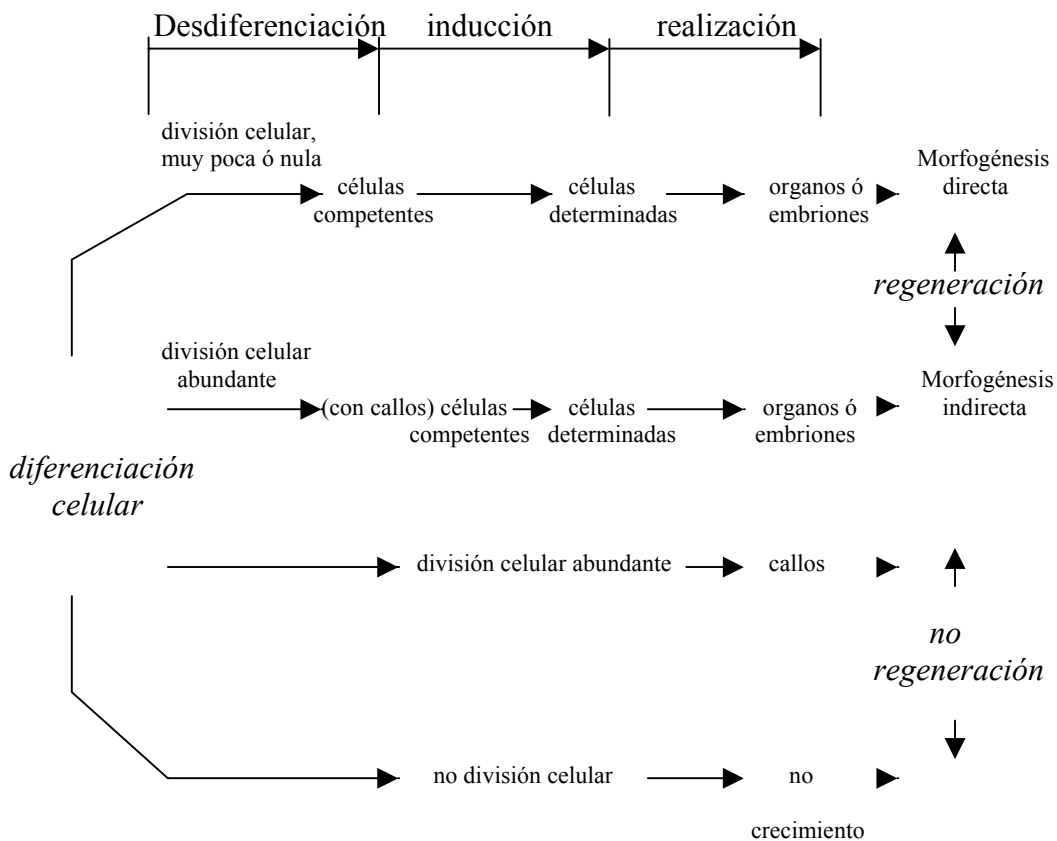
El desarrollo comprende dos procesos básicos: crecimiento y diferenciación (SEGURA, 2000). El crecimiento es un aumento irreversible de tamaño, acompañado de un incremento en peso seco, volumen, longitud o área (LAMBERS, 1998). La diferenciación se refiere al conjunto de cambios graduales y progresivos en estructura y función que hacen posible la especialización celular. La diferenciación celular depende de la expresión diferencial del material genético. Las células diferenciadas retienen por lo tanto toda la información genética indispensable para el



desarrollo de una planta completa lo cual es conocido como totipotencia. En este sentido, cuando una célula vegetal se somete a un estímulo particular (hormonas o nutrientes) durante un cultivo *in vitro*, se pueden regenerar raíces, brotes o embriones adventicios, dependiendo de factores como la especie, el genotipo de las plantas, el tejido que se cultive y la composición específica del medio (SEGURA, 1990; CAÑAS, 1993; DE CLERK, 1997).

### 2.2.1.1. Regeneración *in vitro*

La regeneración *in vitro* se conoce como una respuesta morfogénica a un estímulo, el cuál es un proceso de desarrollo dividido en varias fases según lo describen Christianson y Warnick (1983):



**Figura 1.** Esquema general del desarrollo de las distintas fases durante la regeneración

**Fase 1.** Desdiferenciación, ó fase inicial, donde las células responden a un estímulo organogénico. **Fase 2.** Inducción, en la cual las células, luego de responder a un estímulo organogénico, van determinadas a formar un órgano específico. En esta fase la composición hormonal en el medio es crítico. **Fase 3.** Realización, en donde las células están determinadas y el nuevo programa de diferenciación es iniciado a producir brotes (CHRISTIANSON, 1987; DE KLERK, 1997) (Figura 1).

En la regeneración *in vitro*, vía embriogénesis ó vía **organogénesis**, se distinguen dos modelos de desarrollo morfogénico como son la morfogénesis directa y la morfogénesis indirecta (SEGURA, 1993). La morfogénesis directa ocurre cuando los órganos ó embriones se originan directamente del explante en ausencia de proliferación de callo. Por el contrario, en la morfogénesis indirecta la formación de callo es previa al desarrollo de estructuras organizadas (Figura 1) (KRIKORIAN, 1991; SEGURA, 1993).

La formación de órganos u **organogénesis** comprende el desarrollo de meristemos caulinares o radicales (que originan tallos o raíces adventicias, respectivamente) a partir de los explantes directamente o a partir de callos (JARRET, 1991).

En la organogénesis *in vitro* la formación de brotes se caracteriza en primer lugar, por el desarrollo de una estructura meristemática, la cual dará origen a la formación de un primordio de yema el cual subsecuentemente desarrollara a un brote vegetativo con muchas hojas (BROWN, 1986; LIN, 1998). Este proceso implica la formación de estructuras monopolares que establecen conexión vascular con el tejido del que derivan, siendo su origen multicelular (BROWN, 1986; SEGURA, 1993).

El establecimiento de los cultivos de tejidos y su regeneración *in vitro*, depende en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee siendo importante dentro de este ultimo, la composición del medio y el control del medio ambiente físico (BROWN, 1986; MROGINSKI, 1991).

### **2.2.2.1. Factores que afectan la respuesta morfogénica en la regeneración *in vitro***

Autores como Murashighe (1974), Narayanaswamy (1977), Ammirato (1986), Brown y Thorpe (1986), han descrito una serie de factores que afectan la respuesta morfogénica *in vitro* como son el genotipo de la planta donadora, tipo de explante, su tamaño, su edad fisiológica y ontogénica, así como la composición química del medio nutritivo, siendo importante dentro de este el papel de los reguladores de crecimiento (JARRET, 1991; SEGURA, 1993).

#### **2.2.2.1.1. Edad**

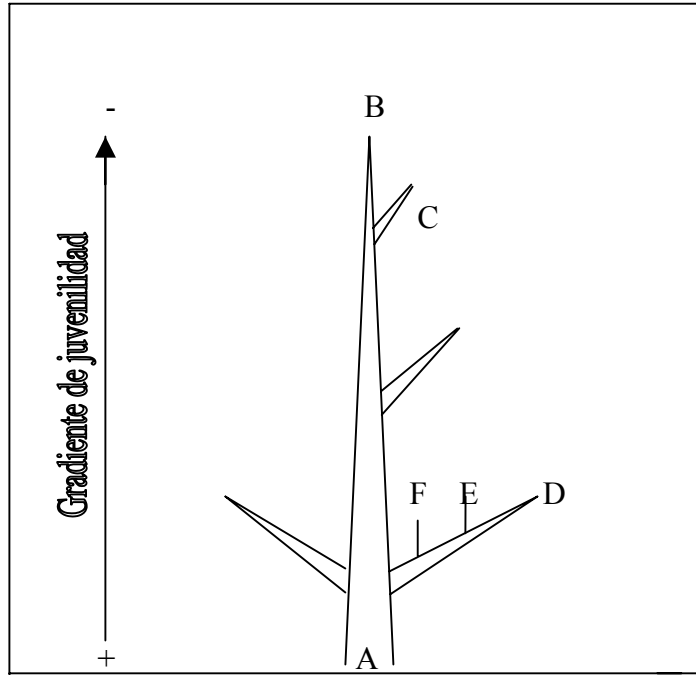
La edad es un factor importante ya que los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática y tienden a tener más plasticidad *in vitro* que los adultos, como es el caso de la respuesta de cotiledones, hipocótilos y hojas aisladas de material juvenil que son usadas para micropropagación (SCORZA, 1980; KANTHARAJAH, 1990; JARRET, 1991; DORNELAS, 1994).

Los tejidos juveniles presentan una mayor capacidad morfogénica, la cual se manifiesta en respuestas de crecimiento, proliferación y enraizamiento, a diferencia de un tejido maduro el cuál es más difícil de desdiferenciar e inducir a la producción de raíces y brotes (PIERIK, 1987; TRIPPI, 1990; DE KLERK, 1997).

Muchos autores concuerdan en que la maduración y la senescencia parecen ser los responsables para que la capacidad morfogénica decline en muchas especies leñosas, las cuáles presentan un gradiente de juvenilidad, que disminuye desde la base hacia el ápice (Figura 2) (SALA, 1990).

El grado de juvenilidad de un meristemo apical es proporcional a la distancia entre la unión de la raíz (A) y el meristemo. De esta manera si consideramos en la figura 2, las distancias AB, AC, AD, AE y AF, el meristemo B es el más maduro y el meristemo F el más juvenil, lo cual resulta en diferentes edades ontogénicas (PIERIK, 1987; HARTMANN, 1997).

Es así como la condición juvenil de los meristemas del tallo desaparece gradualmente a medida que aumenta la distancia entre el sistema radical y el meristemo apical (CARRIZOSA, 1992)



**Figura 2.** Diagrama del gradiente de juvenilidad en las plantas.

Por esto razón, los explantes tomados de la parte basal de la planta poseen una mayor capacidad morfogénica (formación de brotes y raíces adventicias) en condiciones *in vitro*, debido a que esta zona presenta el carácter más juvenil. La capacidad morfogénica de los cotiledones es generalmente mucho más elevada que la de las hojas que se puedan formar más tarde dentro de la planta (PIERIK, 1987; HARTMANN, 1997).

Esto resulta en una paradoja dentro de la terminología, ya que la parte basal de un árbol fisiológicamente más joven, cronológicamente es más vieja, mientras la cima o copa, la cual es cronológicamente la parte joven, fisiológicamente es la más madura (DINKEL, 1990; CARRIZOSA, 1992)

De tal forma la edad de las plantas puede verse desde dos puntos de vista:

**Estado fisiológico:** Se refiere al momento fenológico en que se encuentra la planta, es decir al progreso de la planta a través de estados identificables de desarrollo, como son embriogénesis, formación de semillas, desarrollo vegetativo, desarrollo reproductivo, senescencia y muerte de la planta. Estas fases del desarrollo no solo implican crecimiento y diferenciación celular, sino que incluye diferentes procesos fisiológicos tales como, fotosíntesis, síntesis de otros compuestos, respiración, absorción y transpiración entre otros. Cada uno de estos procesos influyen en la consecución de las distintas fases del desarrollo de la planta, siendo así parte esencial en el progreso de esta (LAMBERS, 1998; GÁRATE, 2000; CLAVIJO (com. per.) 2002).

La embriogénesis, implica la aparición de una serie de tejidos altamente organizados que van a desempeñar funciones muy concretas en la semilla, como es el caso de los cotiledones y el endospermo, órganos de acumulación de sustancias de reserva, es decir de, las proteínas los lípidos e hidratos de carbono, los cuales sirven como protección durante la desecación del embrión y son utilizadas habitualmente para alimentar a la planta hasta que ésta pueda establecerse como un organismo fotosintéticamente competente (TAIZ, 1998; MATILLA, 2000).

En el momento en que la planta comienza la actividad fotosintética, fijando el CO<sub>2</sub> para ser reducido a carbohidratos, los cuales sirven de sustrato principal de la respiración y cuya función es liberar la energía obtenida en forma de ATP y producir compuestos, comienza la producción de materia seca en la planta, como resultado neto del balance de estos procesos metabólicos básicos (LAMBERS, 1998; LUIS, 2000; CLAVIJO, comunicación personal 2002).

En el estado vegetativo, a medida que la planta se desarrolla, las hojas sufren una transición de órganos de demanda a órganos fuente. Inicialmente, las regiones marginales de la hoja, de más edad, comienzan a exportar azúcares mientras que las zonas basales, más jóvenes, actúan todavía como demanda. En estos momentos, estas regiones reciben azúcares desde la zonas marginales como del resto de la planta. Cuando la hoja alcanza una superficie de aproximadamente mas del 60% del área foliar expuesta, se completa la transición y se convierte en exportadora neta, de

fotoasimilados, los cuales van hacia el ápice de los tallos, las hojas y la raíces en desarrollo (LUIS, 2000; QUESADA, 2000).

Los meristemos apicales del tallo y de la raíz de las plantas jóvenes, experimentan mayores tasas de respiración, debido a la alta demanda de esqueletos de carbono para crear nuevas estructuras vegetales y a la alta demanda energética para sostener la tasa de crecimiento vegetativo (CARBÓ, 2000). De esta manera, durante el desarrollo vegetativo, toda la actividad fotosintética de la planta, esta dirigida hacia los órganos y tejidos en crecimiento, que son prioridades en esta etapa de desarrollo (LUIS, 2000).

Esta relación fuente- demanda cambia en el momento en que la planta, pasa a su estado reproductivo (floración y fructificación), ya que los asimilados producto de la fotosíntesis son destinados al desarrollo de las estructuras reproductivas (QUESADA, 2000).

Es así como se observa una alta tasa fotosintética de las hojas cerca de los frutos, lo cual origina una mayor producción de fotoasimilados que serán acumulados generalmente en forma de sacarosa en ellos (TRIPPI, 1990; TAIZ, 1998; MEDRANO, 2000). Los frutos al ser órganos de demanda irreversible, poseen un alto contenido de sacarosa el cual no será recuperado por la planta en ninguna circunstancia (LUIS, 2000). Por otra parte, a medida que la planta se desarrolla se reduce su tasa respiratoria (CARBÓ, 2000)

El alcanzar el desarrollo reproductivo en la planta supone entonces invertir gran cantidad de la energía asimilada en esta fase, lo cual lleva a un disminución en su desarrollo vegetativo (QUESADA, 2000).

En la mayoría de las plantas perennes leñosas, luego de su fase reproductiva, estas regresan a su fase vegetativa, guardando reservas para la segunda floración y fructificación, mientras que su siguiente ciclo lo cumple con mas lentitud, y es cuando la maduración del sistema radical y de sus hojas (principal sistema fotosintético), provoca un debilitamiento de la actividad vegetativa, siendo la producción de yemas escasa e irregular, con lo cuál se empieza a observar. un envejecimiento en la planta (DVE, 1989).

El envejecimiento irreversible de toda la planta se conoce como senescencia (QUESADA, 2000). Este proceso se refiere a los cambios degenerativos controlados endógenamente, los cuales causan la muerte de células, tejidos y órganos (ARTECA, 1996). Dentro de estos cambios se incluye la disminución en la clorofila, las proteínas totales, ácidos nucleicos, fotosíntesis (reducción en enzimas fotosintéticas), cambios en los reguladores de crecimiento, incremento en la permeabilidad de la membrana y abscisión (ARTECA, 1996; QUESADA, 2000).

Siendo la senescencia foliar la más comprendida, se afirma que no solo es un proceso degenerativo, sino también un proceso de reciclaje donde los nutrientes son transportados desde las células que envejecen a las hojas jóvenes, las semillas en desarrollo y los tejidos de reserva. Entre estos se encuentra la degradación de proteínas la cual permite el transporte de los aminoácidos liberados a otras partes de la planta. A la degradación de macromoléculas le sigue el transporte de los productos de la hidrólisis, así como la pérdida de la clorofila (QUESADA, 2000).

**Edad ontogénica:** Siendo el proceso genéticamente determinado de cambios, resultando en diferentes fases de desarrollo: fase embriogénica, fase juvenil, fase de transición fase de maduración y fase senescencia (HACKETT, 1987; DINKEL, 1990; SWARTZ, 1991; HARTMANN, 1997).

La fase embriogénica incluye los cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica que tiene lugar desde que se forma el cigoto hasta que se produce un embrión maduro dispuesto a germinar (MATILLA, 2000).

La fase juvenil es definida como el período inicial de crecimiento. Esta fase se caracteriza por un incremento en el tamaño de la planta, a partir de los brotes meristemáticos apicales, los cuales generan tallos, así como los órganos laterales dispuestos en el tallo (hojas y yemas laterales). Esta adición de estructuras en forma modular (denominada fitómero) comprende un órgano lateral (la hoja), un nudo, al que se le une la hoja, un meristemo axilar (la yema axilar), localizada en la axila de la hoja y un entrenudo (SEGURA, 2000). La expansión celular ocurre en la hoja y el entrenudo, pero usualmente no toma lugar dentro de la yema axilar hasta que esta se

libere de la dormancia, en respuesta a factores internos y ambientales, los cuales dan inicio al período de floración (NEWBIGIN, 1995; HARTMANN, 1997)

En algunas especies, se presentan ciertas características particulares de juvenilidad como son, una forma de crecimiento plagiotrópico; hojas enteras; filotaxia opuesta o alterna; presencia de espinas; capacidad de enraizamiento de esquejes alta, así como una buena capacidad de organogénesis *in vitro*, es decir una habilidad para la formación de tallos y raíces adventicias (TRIPPI, 1990; ARTECA, 1996; HARTMANN, 1997; QUESADA, 2000).

La fase de transición se caracteriza por cambios en sus características vegetativas, como son, la morfología de las hojas, la disposición de las hojas en el tallo (filotaxia), así como la capacidad de enraizamiento (HARTMANN, 1997; TAIZ; 1998). La fase de transición a la floración involucra un cambio en la morfogénesis y diferenciación celular del brote meristemático apical, los cuales son causados por factores internos (control genético), como son los ritmos circadianos y las hormonas, y factores externos como el fotoperíodo y la temperatura entre otros (TRIPPI, 1990; TAIZ, 1998).

Como consecuencia de este cambio se altera la estructura modular del fitómero. El desarrollo de la hoja se inhibe para dar lugar a una bráctea, y el meristemo axilar se transforma en un meristemo floral que se diferencia en una flor en lugar de una rama lateral. Estos cambios progresivos en la capacidad morfogénica del meristemo se denominan cambios heteroblásticos, los cuales son observados en un gradiente espacial desde la base al ápice de la planta; un ejemplo de estos cambios es cuando las hojas pasan de ser enteras en la fase juvenil, a ser trilobuladas en el estado adulto, como es el caso de algunas especies de *Passiflora* (TRIPPI, 1990; HARTMANN, 1997)).

En las especies leñosas no todos los meristemas participan en la formación de flores y frutos, permaneciendo algunos en estado quiescente, dentro de estructuras denominadas yemas para asegurar el futuro crecimiento vegetativo de la planta (ROLDAN, 2000).



La fase de madurez se caracteriza por un ciclo continuo entre etapa reproductiva y vegetativa la cuál comienza luego de su primera producción, en la mayoría de las plantas perennes leñosas. Esta fase de la planta se refiere a los cambios cualitativos los cuales permiten expresar su potencial reproductivo, en la producción de semillas. (HARTMANN, 1997; PEÑA, 2000).

En algunas especies se presentan ciertas características particulares en esta fase, como son un tipo de crecimiento ortotrópico, forma de las hojas lobuladas ó palmadas, filotaxia alterna o espiral, ausencia de espinas, capacidad de enraizamiento baja, así como un capacidad de organogénesis *in vitro* baja (TAIZ, 1998; QUESADA, 2000).

La fase de senescencia hace referencia al proceso de envejecimiento irreversible en la planta, la cual esta sujeta tanto a factores endógenos como son la edad y el desarrollo reproductivo, como a factores ambientales en los que se encuentra el estrés, las sequías, la deficiencia de nutrientes, las infecciones por patógenos, etc. El envejecimiento en si, causa una disminución en la resistencia al estrés y a las enfermedades, además de un incremento en la probabilidad de muerte (ARTECA, 1996; QUESADA, 2000).

Durante el desarrollo ontogénico, el tamaño de un árbol, el grado de especialización de cada órgano y la compleja interdependencia aumentan. Este proceso es asociado con los cambios fisiológicos de el sistema total y de sus partes (DINKEL, 1990).

Tanto la fase juvenil como la fase de madurez en la planta son estables. Esto quiere decir, que si se propaga a partir de material juvenil los brotes obtenidos serán juveniles. Análogamente, si se propaga a partir de explantes provenientes de material adulto, se obtendrán brotes con características adultas (QUESADA, 2000).

A medida que las células embrionarias se diferencian de acuerdo con un patrón desarrollado determinado se reduce la capacidad de expresar su totipotencialidad y se adquiere un estado fisiológico especializado. Por tal razón, explantes juveniles cuyas células no poseen aún una vía de desarrollo definida,

responden con versatilidad, mientras que los tejidos maduros presentan con frecuencia un comportamiento recalcitrante (CARRIZOSA, 1992).

En algunos casos esta condición puede ser revertida parcialmente, es decir lograr un cambio de la fase adulta a la fase juvenil. Este proceso de readquisición de algunas características juveniles en la planta se le denomina rejuvenecimiento y/o reinvigorización y esta se puede promover por medio de prácticas de cultivo como es la poda (DURZAN, 1984; HARTMANN, 1997)

#### **2.2.2.1.2. Poda**

Según RECHE (1995), y HARTMANN (1997), la poda anual es un importante aspecto del manejo de la arquitectura de la planta en relación a:

Mantener la juvenilidad o mejorar el enraizamiento

Formación de la planta para facilitar y acelerar la colección de propágulos

Incrementar la producción de esquejes

Reducción de brotes reproductivos

Dentro de los métodos de rejuvenecimiento pre- cultivo se encuentran diferentes tipos de poda como son:

**Modificación de la planta:** Las plantas son severamente cortadas cerca de su base, pero no hasta el límite con el suelo; con esta clase de poda se eliminan los brotes reproductivos de la planta (HARTMANN, 1997).

**Poda severa:** En la cual el tronco de la planta es cortado a más de la mitad de su tamaño anual; Esta poda es conocida por inducir el desarrollo de brotes con características más juveniles, con el fin de que los tejidos adultos respondan al manejo en condiciones *in vitro* (PIERIK, 1987; BALLESTER, 1990; CARRIZOSA, 1992; HARTMANN, 1997).

**Poda moderada:** Las plantas son cortadas un tercio o una mitad del crecimiento anual de sus brotes (HARTMANN, 1997).

**Poda ligera:** Esta clase de poda solo implica la remoción de esquejes desde el tronco (HARTMANN, 1997).

### **2.2.2.1.3. Diferencias entre plantas *in vitro* y plantas en condiciones de campo.**

Entre las plantas cultivadas *in vitro*, y aquellas que viven en condiciones naturales, existen diferencias substanciales, en aspectos tanto fisiológicos como morfológicos (HUYLENBROECK, 1995).

A lo largo de la evolución, las plantas en condiciones de campo han desarrollado un estado fisiológico característico y óptimo que les permite adaptarse a las condiciones medioambientales particulares a las que están expuestas.

Los brotes y las plantas *in vitro* por el contrario se encuentran en un medio de cultivo donde se les provee una fuente de carbono en forma de sacarosa, la cual reduce su necesidad para fotosintetizar, altos niveles de humedad, una baja intensidad lumínica, así como un conjunto de nutrientes básicos para la formación y el desarrollo de la planta (PREECE, 1990; HUYLENBROECK, 1995).

A nivel anatómico, las plantas *in vitro* presentan cambios en algunas de sus estructuras principales como son la cutícula y los estomas, siendo estas las rutas primarias para la pérdida del agua en las hojas. Grout & Aston (1977) observaron que la falta de formación de la capa cerosa epicuticular en plantas *in vitro* se debe a la alta humedad dentro del recipiente de cultivo (PREECE, 1990, HUYLENBROECK, 1995). Por otra parte, se ha observado que los estomas de plantas *in vitro* permanecen siempre abiertos (PREECE, 1990), a diferencia de los estomas de plantas en condiciones de campo, los cuales se abren para permitir la entrada de CO<sub>2</sub> en el día, mientras se cierran en la oscuridad (SALISBURY, 1994; TAIZ, 1998).

Los bajos niveles de luz afectan la fotosíntesis en algunas especies de plantas *in vitro* las cuales son delgadas y tienen característicamente un desarrollo pobre del parénquima de empalizada, además de un bajo contenido citoplasmático, un bajo desarrollo de los cloroplastos (órganos encargados de la fotosíntesis y del pigmento verde “clorofila”), los cuales se presentan planos, con desorganización del grana, carentes de gránulos de almidón y de una gran cantidad de espacio de aire en el mesófilo a diferencia de las plantas en condiciones de campo (PREECE, 1990; COZZA, 1997; AZCON- BIETO, 2000 ).

En hojas micropropagadas *in vitro* de especies como el abedul, el tejido vascular del nervio medio y los pecíolos es altamente reducido en comparación con el encontrado en plantas de campo, al igual que el tejido vascular de hojas micropropagadas de oliva donde se muestra un reducido número de elementos del floema (PREECE, 1990; COZZA, 1997).

A nivel fisiológico las plantas *in vitro* presentan cambios, como es una baja tasa de fotosíntesis, la cual es atribuida a la baja actividad de la Rubisco, la baja luz y un inadecuado intercambio de gases. La baja actividad de la Rubisco se debe probablemente a la presencia de sacarosa, ya que en condiciones naturales esta enzima cataliza de manera irreversible la combinación de CO<sub>2</sub> con la RuPB para formar dos moléculas de 3- PGA a partir de las cuales se forman sacarosa y almidón en las células (SALISBURY, 1994; DE LAS RIVAS, 2000).

Por otro lado, la exposición de las plantas *in vitro* a una intensidad lumínica baja, genera en ellas hojas delgadas las cuales se asemejan a las hojas de sombra, ya que presentan un porcentaje de clorofila a/clorofila b más bajo, siendo esta la principal biomolécula cromófora que interviene directamente en el proceso de absorción y conversión de la energía lumínica (PREECE, 1990; DE LAS RIVAS, 2000).

Otro aspecto que demuestra su pobre capacidad fotosintética es la baja fijación de carbono que presentan las plantas regeneradas *in vitro*, el cual es indispensable para la síntesis de carbohidratos y compuestos glucídicos en el cloroplasto.(PREECE, 1990; CARBÓ, 2000)

#### **2.2.2.1.4. Reguladores de Crecimiento**

El crecimiento de la planta, está basado en la producción de células en el meristemo, y consiguiente elongación de estas para formar nuevamente células. Ambos procesos, tanto de división celular como de elongación son afectados por las hormonas, las cuales son producidas por la misma planta y son los principales

factores internos que controlan el crecimiento y el desarrollo (GASPAR, 1996; TAIZ, 1998).

Las hormonas se producen en cantidades muy pequeñas en ciertas partes de las plantas y son transportadas a otras partes, donde ejercen su acción. Una misma hormona puede desplegar efectos distintos en diferentes tejidos de destino (PIERIK 1987; TAIZ, 1998).

Los compuestos producidos sintéticamente y las hormonas producidas naturalmente por la planta reciben el nombre de reguladores de crecimiento y son los principalmente responsables por la distribución de los compuestos sintetizados por la planta (PIERIK. 1987).

En condiciones *in vitro* las heridas en los tejidos de plantas, pueden reanudar división celular, es decir son inducidas a una actividad mitótica; pero esta actividad es típicamente limitante si no se somete a un estímulo apropiado. (TAIZ, 1998; ECHEVAR.RIA, 2000).

Desde los trabajos de White (1939) en formación de brotes en callos derivados de explantes de tabaco, pasando por los de Skoog y Miller (1953) en cultivos de callo de médula de tabaco, se demostró que la adición de hormonas es un estímulo apropiado en procesos de organogénesis (BROWN, 1986. SEGURA, 1993).

Dicho proceso se encuentra regulado por cambios en los niveles endógenos de auxinas y citoquininas (SEGURA, 1993). Según observaciones realizadas la separación espacial entre la biosíntesis de citoquininas en los ápices de las raíces y su sitio de acción, que se localiza en brotes y hojas, se equilibra con la biosíntesis de auxinas que se producen en los meristemos de los brotes y las hojas, y su transporte polar hacia la raíz (BURCH, 1993). Esta interdependencia se evidencia en la manipulación de las concentraciones de auxinas y citoquininas en medios de cultivo, permitiendo controlar la organogénesis *in vitro* (SEGURA, 1993; BURCH, 1993).

### ❖ a. Citoquininas

Las citoquininas fueron descubiertas en estudios dirigidos a identificar factores de estimulación de la división celular .

Entre los efectos fisiológicos descritos para las citoquininas, se encuentran el aumento de los niveles de Ca- calmodulina, la producción de etileno, el incremento de la relación tallo/raíz y expansión foliar (TAIZ, 1998; RAVEN, 1999).

A nivel *in vitro* se ha reportado que la combinación de dos citoquininas puede ser más eficiente para la proliferación de brotes (PEÑA, 2000).

La aplicación de citoquininas puede promover la síntesis de citoquininas endógenas. El BAP es rápidamente metabolizado y la ruptura del grupo bencil puede conducir a la formación de adenina. En micropropagación las citoquininas son utilizadas principalmente para lograr la producción de tallos múltiples y el desarrollo de yemas laterales, para inducir división y expansión celular (WANG, 1980; GEORGE, 1996; WEYERS, 1995).

### ❖ b. Auxinas

El término auxina proviene del griego *auxein*, que significa incrementar. Este término fue utilizado haciendo referencia a un compuesto que causaba la curvatura del coleótilo de avena hacia la luz. En la actualidad se sabe que esta auxina es el Acido Indolacético (AIA) (PEÑA, 2000).

En cuanto a los efectos fisiológicos de las auxinas se encuentra la formación de raíces adventicias, dominancia apical, promoción de biosíntesis del etileno, extensión y elongación celular, inducción y división celular y regulación de cambios en el citoesqueleto (GASPAR, 1996; KENDE, 1997; TAIZ, 1998).

Con la adición de auxinas en micropropagación, se busca principalmente estimular el crecimiento y favorecer la formación de raíces. Sin embargo, la respuesta del explante al aplicar auxinas depende del estado fisiológico del material vegetal, la naturaleza de la auxina, tiempo de aplicación y de la superficie de contacto (MONCOUSIN, 1991; GEORGE, 1996).

Adicionalmente, se presenta una relación entre la habilidad para estimular la división celular y las concentraciones de auxinas. Una concentración alta de auxinas, puede conducir a la acumulación de los metabolitos degradados de las citoquininas, puesto que las auxinas incrementan la actividad oxidasa. Una baja proporción de auxina / citoquinina determina la morfogénesis de brotes y una alta proporción promueve la formación de raíces. Un nivel intermedio de ambos reguladores da como resultado la producción de callo (SEGURA, 1993; GASPAR 1996; TAIZ, 1998).

#### **2.2.2.1.5. Genotipo de la planta donadora y Tipo de explante**

El genotipo es uno de los factores mas influyentes en la regeneración *in vitro* ya que, existen grandes diferencias en la división celular y la capacidad regenerativa en plantas provenientes de una misma especie, como lo observa SWARTZ (1991), quien considera que la respuesta morfogenética de los brotes regenerados, está fuertemente influenciada por el genotipo, ya que algunos explantes provenientes de diferentes individuos parentales presentaban una variación en su desarrollo, con las mismas concentraciones hormonales (BROWN, 1986; PIERIK, 1987; FORERO 1999).

En cuanto al tipo de explante, según estudios realizados por TRAN THANH VAN *et al.*, (1978), los explantes con capas de tejidos superficiales, es decir tejidos epidérmicos y subepidérmicos, que contengan pocas capas de células (capas delgadas), son un sistema multiprogramable, al cuál modificándole factores tales como la relación auxina - citoquinina, luz temperatura, luminosidad, pH etc., se pueden establecer varios programas morfogénicos (BROWN, 1986; SEGURA, 1993; CAÑAS, 1993).

La regeneración de brotes a partir de discos de hojas es considerado como un procedimiento rápido y fácil, ya que las células en la margen herida de las piezas cortadas de las hojas, pueden ser inducidas a experimentar una rápida división *in vitro* para formar callos regenerables o brotes directamente (OWENS, 1992; TAYLOR, 1992).

De acuerdo con el tipo de explante se pueden dar distintos tipos de respuestas como lo explica DORNELAS (1994) en su estudio de cultivo de tejidos en especies de *Passiflora* donde el observó que la organogénesis fue afectada por el explante utilizado en *P. edulis* var. *flavicarpa*; el mejor resultado lo obtuvo con cotiledones.

#### **2.2.2.1.6. Tamaño del Explante**

Por lo general, el tamaño puede determinar la respuesta *in vitro*, puesto que los explantes grandes poseen generalmente un potencial regenerador mas amplio, mientras que en los explantes pequeños la viabilidad y capacidad regenerativa es muy baja, además tienden a ser dañados fácilmente (PIERIK, 1987; VILLALOBOS, 1991).

Es importante tener en cuenta también el proceso de corte, ya que la relación entre el porcentaje del área superficial herida y la no herida puede influenciar la regeneración del explante (PIERIK, 1987).

#### **2.2.2.1.7. Oxidación y Contaminación**

El control sobre la oxidación y la contaminación es uno de los grandes problemas que se presentan en los cultivos de tejidos *in vitro*.

La contaminación ocasionada por microorganismos superficiales o endógenos de la planta donadora, como hongos, levaduras moho o bacterias y la oxidación son atribuidos a los procedimientos de desinfección y aislamiento del explante en el laboratorio (CASSELLS, 1991).

El procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes, descartando como primera medida, individuos en mal estado fitosanitario, utilizando productos químicos como son fungicidas ó desinfectantes superficiales y contando con un proceso de desinfección adecuado (CASSELLS, 1991; MROGINSKI, 1991).



La oxidación que experimentan muchos explantes luego de la excisión se caracteriza por un oscurecimiento en la superficie de corte de los tejidos vegetales el cual es causado al parecer por una condición de estrés mecánico a la que se ha sometido el explante (DIXON, 1995).

Este oscurecimiento, asociado con las heridas causadas al explante, que puede ser inhibitorio para el crecimiento del tejido causando posteriormente su muerte, se detecta por la necrosis del tejido y la presencia de un exudado en el medio (RAMIREZ, 1989 ;THOMAS, 1997).

La naturaleza del oscurecimiento en el tejido ocurre por acción de enzimas oxidasas conteniendo cobre, a menudo llamadas polifenoles oxidasas, fenolasas y tirosinas, las cuales son liberadas ó sintetizadas con substratos apropiados y condiciones oxidativas cuando los tejidos son heridos o senescentes. Otros compuestos formados tras la oxidación y polimerización de algunos fenoles, son las cumarinas, las cuales pueden activar las IAA oxidasas e inhibir la elongación celular y las quinonas que se producen también a partir de fenoles a través de la acción de peroxidases las cuales pueden catalizar su oxidación en presencia de peróxido (RAMIREZ, 1989). Si estas sustancias fenólicas permanecen en el medio de cultivo pueden inhibir el desarrollo de brotes y ocasionar la muerte del material vegetal (CARRIZOSA, 1992 ; THORPE, 1991).

Las peroxidases pueden actuar como catalizadores de la oxidación del IAA dejándolo inactivo ( DEBERGH, 1991). Estas enzimas juegan un papel importante en la vida de la planta ya que están asociadas con la biosíntesis de lignina, plasticidad de la pared celular, respuesta a daño mecánico, resistencia de enfermedades e invasión de microorganismos (RAMIREZ, 1989; PRESTAMO, 1993).

Los compuestos fenólicos son usados en plantas leñosas para diferenciar entre fases adultas y juveniles, ya que la síntesis de precursores de fenoles es más activa y compleja en tejidos maduros que en tejidos jóvenes (CARRIZOSA, 1992; DE KLERK, 1997).

KANTHARAJAH (1990), observó que si los explantes permanecían en un medio con reguladores de crecimiento para inducción de brotes por más de 4

semanas, se evidenciaba clorosis y eventual muerte del tejido, por lo cual es necesario el subcultivo luego de este periodo, en medio MS sin reguladores de crecimiento, para una efectiva elongación y enraizamiento (HODSON, 1994).

### 2.3. Estudios *in vitro* en *Passiflora*

Los trabajos, que hasta el momento se han llevado a cabo en cultivo de tejidos en especies de *Passiflora*, son muy pocos, comparados con otras especies.

Scorza & Janick (1976), a partir de discos de hojas inmaduras, en diferentes especies de *Passiflora* entre ellas *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, obtuvieron resultados que indicaban que la propagación *in vitro* podría ser utilizada para estas especies, aunque las respuestas, fueran diferentes en todas ellas. En el caso de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* empleando el medio basal MS, suplementado con 5.37  $\mu\text{M}$  de NAA y 4.43  $\mu\text{M}$  de BAP, obtuvieron formación de callos.

Moran & Robles (1978), demostraron la capacidad morfogenética de entrenudos, en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* y *Passiflora mollissima*. Observaron, la formación de callos, acumulación de almidón, la dediferenciación y la formación de vasos, y concluyeron que este potencial se podría utilizar para su multiplicación vegetativa, utilizando medio Nitsch suplementado con 6.2  $\mu\text{M}$  de KIN, como agente estimulador.

Por otra parte en 1980, Scorza & Janick, reportaron el florecimiento *in vitro* a partir de tallos, hojas y zarcillos jóvenes en *Passiflora suberosa*, en un medio basal de MS suplementado con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

En 1985, Desai & Mehta, observaron a partir de discos de hoja de un híbrido de *Passiflora alata* x *Passiflora caerulea*, formación de brotes (organogénesis directa), en un medio MS, con 5.0  $\mu\text{M}$  de BAP y 2.3  $\mu\text{M}$  de KIN y formación de raíces e inducción de callos en el mismo medio con 0.7  $\mu\text{M}$  de ANA y 2.3  $\mu\text{M}$  de KIN.

De nuevo Kantharajah & Dodd (1990) describieron una técnica de micropropagación *in vitro* para *Passiflora edulis* Sims, a partir de discos de hoja desde hojas inmaduras utilizando y segmentos nodales, observando que la multiplicación de brotes a partir de segmentos nodales era significativa en un medio MS con 8.9  $\mu\text{M}$  de BAP; en cuanto a los discos de hojas inmaduras en medio MS con 6.65  $\mu\text{M}$  de BAP y 2.68 de  $\mu\text{M}$  de ANA no se observaron brotes, pero sí, una producción de callos y raíces en el borde y la vena media.

Para 1991, Drew observó que en un híbrido de *Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* y además en varias especies, entre ellas *Passiflora mollissima*, los brotes juveniles crecen rápidamente en medio MS con 10  $\mu\text{M}$  de KIN y 5  $\mu\text{M}$  de AIA, mientras que el crecimiento de las yemas adultas no fue muy exitoso.

De otro lado, Amugune *et al.*, (1993), obtuvo regeneración directa de brotes sin callos, utilizando hojas inmaduras de plantas adultas de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* en presencia de 8.90  $\mu\text{M}$  de BAP y 2.32  $\mu\text{M}$  de KIN lo cual mostró un absoluto requerimiento de citoquininas para la formación de brotes. Este autor además observó que los discos de hoja, en el caso de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* son los explantes mas efectivos, en comparación con los cortes de tallo que solo regeneran 1 planta, ya que una hoja puede ser cortada en 10 discos de hoja, y 3 de estos 10, pueden regenerar a brote. Estos discos de hoja que regeneran brotes, usualmente tienen 2-3 brotes por disco, lo cual significa que de 6 a 9 plantas pueden ser regeneradas por hoja.

D'Utra-Vaz *et al.*, (1993), reportó que para la especie *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, se observó la regeneración de brotes, utilizando protoplastos del mesófilo de las hojas de 1 y 2 meses de edad, derivados de callos cultivados en un medio MS con 5.0  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA y 0.25  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP para luego enraizarlos. En ese mismo año Dornelas & Vieira aislaron protoplastos a partir de cotiledones de plantas de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* y otras dos especies silvestres *Passiflora amethystina* y *Passiflora cincinnata*, obteniendo brotes en un medio MS complementado con 2.0  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP; las plantas regeneradas produjeron raíces en un medio MS libre de hormonas.

Dornelas & Vieira (1994), en su experimento con diferentes especies de *Passiflora* obtuvieron también organogénesis directa, utilizando solo BAP, como regulador de crecimiento dentro del medio. Según estos autores el utilizar concentraciones aunque sea bajas de auxinas en medios donde las citoquininas son superiores, provoca inhibición en la formación de brotes, lo cual puede ser posible por los altos niveles de auxinas endógenas encontrados dentro de los explantes .

Kawata *et al.*, (1995), describieron una técnica de micropropagación de *Passiflora edulis*, a partir de múltiples subcultivos de primordios de brotes, utilizando para esto, tejido cortado de hojas de plantas de 3 años de edad y cultivados en medio MS suplementado con, 1 $\mu$ M de BAP y 1  $\mu$ M de IBA. Estos brotes, luego de 3 años mantenían su habilidad para regenerar plantas.

Desde 1986 se han realizado diversos trabajos en la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Javeriana, en varias especies de *Passiflora*, con el fin de desarrollar metodologías necesarias para obtener la propagación vegetativa *in vitro*, de estas especies frutales.

Cabe destacar los trabajos, realizados por Hodson & Rodríguez (1986), en propagación de especies nativas entre las que se encontraba *Passiflora mollissima*. En esta especie se observó que las yemas axilares localizadas en las posiciones mas alejadas de la yema apical presentan mayor desarrollo, siendo el medio más efectivo para su desarrollo Nitsch, suplementado con 4.4  $\mu$ M y 13.2  $\mu$ M de BAP. En 1998, Ovalle *et al.*, describieron la regeneración completa en plantas de *Passiflora mollissima*, utilizando explantes de hojas, cultivados en medio Nitsch, usando diferentes concentraciones de BAP y KIN; se encontró, que la mejor concentración para inducir brotes, fue 3.0 mg L<sup>-1</sup> BAP y 2.0 mg L<sup>-1</sup> de KIN.

Dentro de los trabajos de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* se encuentra el realizado por Hodson *et al* (1994) en regeneración en explantes de hojas de plantas de 6 meses de edad, donde se evaluó su capacidad morfogenética, en medio MS a diferentes concentraciones y combinaciones de BAP y KIN. el desarrollo de brotes se obtuvo utilizando BAP a 4.4. -13.3  $\mu$ M y KIN 4.6 -9.3  $\mu$ M. El crecimiento y enraizamiento de plantas fue logrado en medio MS libre de hormonas.

Forero (1999), en *Passiflora mollissima*, utilizando discos de hojas de material de invernadero e *in vitro* y usando *Agrobacterium tumefaciens*; concluye que el material *in vitro*, la cepa LBA4404, el plásmido pMON10098 y el empleo opcional de acetoseringona son las condiciones más adecuadas para los procesos de regeneración y transferencia de genes marcadores en tejidos foliares de *P. mollissima*; se observa además que tanto la procedencia del material vegetal como la edad de los mismos afecta la respuesta morfogénica de los explantes utilizados.

Otros trabajos importantes a este nivel fueron los de Hodson *et al.*, (1999), Gongora *et al.*,(2000) y Cancino *et al.*,(2001),. Hodson *et al.*, (1999), transformando *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* mediante *Agrobacterium tumefaciens* logró la inserción y expresión de los genes, CP de SMV (Soybean mosaic virus) y el gen CP de PWV (Passionfruit woodiness virus), utilizando como medio de regeneración MS suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de BA, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de KIN, 50 mg L<sup>-1</sup> de Kanamicina, 500 mg L<sup>-1</sup> de Carbenicilina y 300 mg L<sup>-1</sup> de Cefotaxime; Se logró la regeneración de plantas.

En el trabajo realizado por Gongora *et al.*,(2000) en dos especies de *Passiflora* (*P. mollissima* y *P. edulis* var. *flavicarpa*), se utilizaron discos de hoja de plantas *in vitro* o plantas jóvenes de invernadero para la transformación genética. Como medio de regeneración se utilizaron Nitsch (*P. mollissima*) y MS (*P. edulis* var. *flavicarpa*) suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de BA, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de KIN, 50 mg L<sup>-1</sup> de Kanamicina, 500 mg L<sup>-1</sup> de Carbenicilina y 300 mg L<sup>-1</sup> de Cefotaxime. En *P. mollissima* se observó la expresión de *B- gus* sobre el 32% de los explantes infectados, y la presencia del gen fue detectada en el 59% de los explantes infectados. Para *P. edulis* var. *flavicarpa* las plantas transgénicas, inoculadas con la cepa virulenta (SMV) mostraron menor susceptibilidad a Potyvirus.

Posteriormente Cancino *et al.*,(2001), en un estudio para establecer un sistema de transferencia de genes basado en *Agrobacterium tumefaciens* para *P. mollissima* y *P. edulis* var. *flavicarpa*, observó que el mayor porcentaje de transformación de explantes se obtenía utilizando la cepa 1065 (Pgusint) la cual transportaba los genes *gus* A ( $\beta$ - glucuronidasa) y *nptII* (neomicin fosfotransferasa II). La utilización del

flavonoide naringenin (100mM) como suplemento al medio de co-cultivo mejoró significativamente la expresión transgénica del gen *gus* en discos de hoja para *P. edulis* var. *flavicarpa* mientras que para *P. mollissima* se obtuvo la mayor expresión en tallos nodales con 300mM de naringenin. La presencia de los transgenes *gus* A y *nptII* se confirmó por medio de un PCR y la hibridización con Southern.

El presente estudio en cultivo *in vitro* de tejidos de *Passiflora* se basa en trabajos realizados en la Pontificia Universidad Javeriana como el de Hodson *et al.*, (1992), donde se sugiere que la utilización de explantes de hoja es uno de los mejores sistemas de regeneración para plantas de *Passiflora edulis* y el trabajo de Forero (1999), en transformación genética de *Passiflora mollissima* donde se observó que el uso de material vegetal de invernadero e *in vitro* tiene diferencias marcadas en cuanto a su respuesta *in vitro*, especialmente la disminución de brotes a medida que el tejido maduraba.

### **3. FORMULACION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION**

#### **3. 1. Formulaci3n del problema**

¿Cuál es el efecto de la edad y el origen del material vegetal, sobre la capacidad morfogenética de *Passiflora mollissima* y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*?

#### **3. 2. Justificaci3n del problema**

Dentro de la familia Passifloraceae, el género *Passiflora* comprende unas 400 especies, la mayoría de las cuales son cultivadas por sus frutos comestibles, mientras que otras son usadas como plantas ornamentales.

A pesar de ser frutas de gran consumo en el país, solo unas pocas especies se cultivan en forma comercial, entre las que se cuentan *Passiflora mollissima* (curuba de castilla), que se cultiva hace muchos años y cuenta con un mercado definido y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* (maracuyá) la cual ha tomado un gran auge debido a la facilidad de su industrializaci3n.

Aunque el cultivo de maracuyá cuenta con un amplio paquete tecnol3gico de producci3n, y con una demanda comercial s3lida, es importante trabajar en la obtenci3n de material de mejor calidad y características agron3micas homogéneas.

A pesar de que la curuba cuenta con un potencial importante de mercado interno y externo, en nuestro país el cultivo presenta limitantes relacionadas con el manejo agron3mico y problemas fitosanitarios.

Teniendo en cuenta que *Passiflora mollissima* (curuba de castilla) y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* (maracuyá), son una fuente importante de ingresos para el sector agr3cola, es importante trabajar en aspectos que puedan contribuir a aumentar la productividad, por ejemplo resistencia a plagas y enfermedades especialmente Potyvirus y Antracnosis.

A nivel de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se ha logrado la adaptación y desarrollo de protocolos de regeneración y proliferación de brotes como requisito indispensable en trabajos de transformación y mejoramiento genético de estas especies.

Estos protocolos forman parte de técnicas de micropropagación masiva las cuales pueden complementar los sistemas tradicionales de propagación tradicional, ya que permiten incrementar las tasas de multiplicación y las posibilidades de limpieza fitosanitaria, además del ahorro del espacio y tiempo.

La regeneración de brotes adventicios por medio de la organogénesis *in vitro*, requiere analizar el efecto de factores como la edad y el origen del material, los cuales son determinantes de este proceso a nivel *in vitro*.

Por consiguiente, el presente trabajo pretende profundizar en estos aspectos, con el fin de evaluar su efecto sobre la capacidad morfogenética de *Passiflora mollissima* y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* en condiciones *in vitro*.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad morfogenética de discos de hoja de *Passiflora mollissima* y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* de material *in vitro*, de invernadero de distintas edades, y re-invigorado por poda.

### 4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad morfogenética de discos de hoja de material de invernadero de distintas edades en *P. mollissima* y *P. edulis* var. *flavicarpa*.
2. Evaluar la capacidad morfogenética de discos de hoja de material *in vitro* en *P. mollissima* y *P. edulis* var. *flavicarpa*.
3. Evaluar la capacidad morfogenética de discos de hoja de material re-invigorado luego de podar plantas adultas de *P. mollissima* y *P. edulis* var. *flavicarpa*.
4. Evaluar la respuesta de los materiales de invernadero, *in vitro* y re-invigorado y determinar el mas adecuado, para la regeneración de plantas a partir de discos de hoja de *P. mollissima* y *P. edulis* var. *flavicarpa*.
5. Evaluar la respuesta del material de invernadero de distintas edades y determinar la mas adecuada, para la regeneración de plantas a partir de discos de hoja de *P. mollissima* y *P. edulis* var. *flavicarpa*.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5. 1. Tipo de estudio

Es un estudio experimental, de tipo analítico, puesto que es un conjunto de ensayos en los cuales se hacen cambios deliberados en algunas variables que pueden afectar un proceso biológico, de tal forma que se tenga la posibilidad de observar e identificar el efecto de los cambios en una respuesta determinada (MARTINEZ, 1997).

### 5. 2. Población estudio y muestra.

Como población estudio se analizaron plantas de *P. mollissima* y *P. edulis* var. *flavicarpa*, comúnmente conocidas como curuba de castilla y maracuyá amarillo, respectivamente.

La muestra seleccionada de semillas y plantas de *P. mollissima*, provenía de un cultivo localizado en la Vereda Pozo Hondo Municipio de Facatativá (Cundinamarca), a una altura de 2600 m.s.n.m. con una temperatura media de 12,4°C y una precipitación anual de 689 mm.

La muestra de semillas y plantas de *P. edulis*, se obtuvo de cultivos localizados en la Inspección de policía San Joaquín, al oeste de la cabecera del Municipio de la Mesa, (Cundinamarca), a una altura de 1300 m.s.n.m., con una temperatura media de 22°C y una precipitación anual de 1696 mm (IGAC, 1996).

La fase experimental del trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos e Invernadero de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Javeriana.

La metodología utilizada para la regeneración de brotes *in vitro* a partir de discos foliares de *P. mollissima* y *P. edulis* var. *flavicarpa* se describe en la figura 3.

**Figura 3.** Ver pag. 107

### **5.3. Evaluación del efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad morfogénica de discos foliares**

#### **5.3.1. Establecimiento del material de invernadero**

Para el establecimiento del material de invernadero, se germinaron semillas de *P. mollissima* y *P. edulis var. flavicarpa*. Primero, se les retiró el arilo para seguir con un proceso de escarificación con lija, luego de lo cual se imbibieron por 24h y posteriormente se sembraron en semilleros utilizando turba como sustrato (TSUBOI, 1992).

Las plantas producidas se mantuvieron en condiciones de invernadero con una temperatura de 14 a 22°C. Para mantener la humedad realizaron riegos cada dos días.

Para evaluar el efecto de la edad en el material de invernadero, cada 30 días se cortaron las hojas totalmente expandidas del extremo apical de plantas, de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 meses de edad, para *P. edulis var. flavicarpa* y de plantas de 1, 2, 3 y 4 meses de edad para *P. mollissima* (HODSON, 1992).

#### **5.3.2. Establecimiento del material re-invigorado**

Como material re-invigorado de ambas especies se utilizaron plantas de 11 meses de edad, las cuales fueron sometidas a un pre- acondicionamiento mediante una poda, cortando el tallo a más de la mitad de su tamaño, con el propósito de inducir características juveniles. Posteriormente se cortaron las hojas totalmente expandidas.

##### **5.3.2.1. Desinfección**

Luego de cortadas las hojas provenientes de los materiales de invernadero y re-invigorado, estas fueron lavadas superficialmente y esterilizadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% y Tween 20® (0.1% v/v), durante 8 minutos para *P. mollissima* y 12 minutos para *Passiflora edulis var. flavicarpa*, en agitación suave,

seguido por 4 lavados, de dos minutos cada uno, con agua destilada desionizada (FORERO, 1999).

### **5.3.3. Establecimiento del material *in vitro***

Para el establecimiento *in vitro* del material de *P. mollissima* y *P. edulis* var. *flavicarpa*, se utilizaron segmentos nodales de plantas de 3 meses de edad, mantenidas en invernadero.

#### **5.3.3.1. Desinfección**

Luego de su corte, los segmentos nodales fueron lavados por espacio de 10 minutos, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito para las hojas de *P. mollissima* y de 12 minutos para el material de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* (FORERO, 1999).

Posteriormente, se seccionaron en la parte inferior, de manera oblicua para aumentar la superficie de absorción de los componentes del medio de cultivo.

#### **5.3.3.2. Cultivo**

Los segmentos nodales, fueron cultivados en frascos con 20 ml. de medio de cultivo Nitsch & Nitsch (1968), con macronutrientes y micronutrientes completos para *P. mollissima*. Para *P. edulis* var. *flavicarpa* se utilizó el medio Murashige-Skoog (1962), el cual es suplementado con ácido nicotínico, piridoxina y tiamina. Ambos medios fueron solidificados con Agar - Agar Sigma®. El pH se ajustó a 5.8 previamente al procedimiento de esterilización). Los cultivos se mantuvieron en cuartos de incubación con una temperatura de 25°C ± 1°C, y un fotoperiodo de 16/8, proporcionada por tubos de luz blanca fluorescente 39W Sylvania® F48T12/D (OVALLE, 1988.)

Se realizaron subcultivos periódicos por espacio de 3 meses.

#### **5.3.4. Corte y obtención de discos foliares de material de invernadero *in vitro* y re-invigorado**

Se procedió a retirar los bordes de las hojas, con una cuchilla de bisturí, y se cortaron los discos foliares cuidando que conservaran parte de la nervadura media; con las heridas se buscó aumentar la superficie de absorción de los componentes del medio de cultivo (PIERIK, 1987).

#### **5.3.5. Cultivo de discos foliares**

Se colocaron adaxialmente, 4 discos foliares en frascos con 20 ml. de medio de cultivo MS (Anexo 2), suplementado con 4.44  $\mu\text{M}$  ( $1\text{mgL}^{-1}$ ) de BAP y 2.32  $\mu\text{M}$  ( $0.5\text{ mg L}^{-1}$ ) de KIN para *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, y medio Nitsch & Nitsch (Anexo 1), suplementado con 13.3  $\mu\text{M}$  ( $3\text{ mg L}^{-1}$ ) de BAP y 9.3  $\mu\text{M}$  ( $2\text{ mg L}^{-1}$ ) de KIN para *Passiflora mollissima*, ambos gelificados con Agar- Agar Sigma® al cual se le ajustó el pH a 5.8 previamente al procedimiento de esterilización (HODSON, 1992; HODSON, 1994)).

Los cultivos se mantuvieron en las condiciones anteriormente descritas para los segmentos nodales.

#### **5.4. Diseño experimental**

Los tratamientos se aplicaron bajo la estructura de un diseño completamente al azar, con 8 tratamientos para *Passiflora edulis* y 6 para *Passiflora mollissima* (Tabla 2 y 3), cada uno con 50 frascos.

La unidad experimental estuvo constituida por 5 frascos, para un total de 10 repeticiones por tratamiento. Como unidad muestral se tomó cada disco foliar .

## 5.5. Tratamientos

Están constituidos por el origen del material vegetal y las distintas edades, para cada una de las especies. Estos tratamientos se describen en las tablas 2 y 3.

**Tabla 2.** Tratamientos utilizados con *Passiflora edulis* (maracuyá) .

TRATAMIENTOS	VARIABLES INDEPENDIENTES	
	MATERIAL VEGETAL	EDAD
T1	Invernadero	1 mes
T2	Invernadero	2 meses
T3	Invernadero	3 meses
T4	Invernadero	4 meses
T5	Invernadero	5 meses
T6	Invernadero	6 meses
T7	<i>In vitro</i>	
T8	Re-invigorado	

**Tabla 3.** Tratamientos utilizados con *Passiflora mollissima* (curuba).

TRATAMIENTOS	VARIABLES INDEPENDIENTES	
	MATERIAL VEGETAL	EDAD
T1	Invernadero	1 mes
T2	Invernadero	2 meses
T3	Invernadero	3 meses
T4	Invernadero	4 meses
T5	<i>In vitro</i>	
T6	Re-invigorado	

### **1. Origen del material vegetal:**

*In vitro*: Material propagado *in vitro* a partir de segmentos nodales el cual se consideró como un estado juvenil.

Re-invigorado: Material sometido a un pre- acondicionamiento por medio de la poda, con el propósito de inducir características juveniles.

Invernadero: Material obtenido a partir de la germinación de semillas en condiciones de invernadero.

### **2. Edad del material vegetal:**

Las evaluaciones para el efecto de la edad con el material de invernadero se hicieron en un lapso de 6 meses para *Passiflora edulis* y de 4 meses para *Passiflora mollissima*, considerando cada mes como un tratamiento distinto para cada especie (Tabla 2 y 3).

### **3. Variables dependientes:**

Número de brotes por disco foliar:

Brotes que se desarrollaron a partir de los discos foliares los cuales fueron cuantificados y promediados por cada 5 frascos, para obtener así las 10 repeticiones para cada tratamiento.

Número de raíces por disco foliar:

Raíces que se desarrollaron a partir de los discos foliares las cuales fueron cuantificadas y promediadas por cada 5 frascos, para obtener así las 10 repeticiones para cada tratamiento.

Porcentaje de callo por disco foliar:

Callos que se desarrollaron a partir de los bordes de los discos foliares, los cuales fueron medidos en porcentaje, y se cuantificaron utilizando una escala de 0 (0%), 1 (< 25%), 2 (< 50%), 3 (< 75%) y 4 (< 100%). Estos valores luego se promediaron por cada 5 frascos para cada tratamiento (Anexo 4).

Porcentaje de oxidación por disco foliar:

Oxidación que se desarrolló a partir de los discos foliares la cual se midió en porcentaje y se cuantificó utilizando una escala de 0 (0%), 1 (< 25%), 2 (< 50%), 3 (< 75%) y 4 (< 100%). Estos valores luego se promediaron por cada 5 frascos para cada tratamiento (Anexo 4).

## 5. 6. Recolección de información

El registro de variables de respuesta, descritas anteriormente para cada tratamiento, se realizó en un lapso de 2 meses, donde se evaluaba a los 15, 30 45 y 60 días (muestreo 1, 2, 3 y 4 respectivamente), después del cultivo de los discos foliares (DDC), en condiciones *in vitro* (Tabla 4).

**Tabla 4.** Número de muestreos utilizados en la recolección de datos después del cultivo *in vitro* y su equivalente en días.

MUESTREO	DIAS
1	15 (DDC)
2	30 (DDC)
3	45 (DDC)
4	60 (DDC)



### 5. 7. Análisis de información

Los resultados obtenidos para cada variable de respuesta se analizaron por análisis de varianza (ANAVA) y pruebas de comparación mediante contrastes ortogonales y polinomios ortogonales, aplicando como método Scheffé. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico “Statistics”.

En el análisis de varianza (ANAVA), bajo el diseño completamente aleatorizado se tomó como fuentes de variación los tratamientos, los muestreos y su interacción.

Posteriormente, se realizaron contrastes ortogonales o comparaciones entre las medias. Un contraste ortogonal es una diferencia entre estas medias, en donde se plantea una hipótesis nula. Los contrastes ortogonales se realizaron comparando los tratamientos invernadero, *in vitro* y re-invigorado para los muestreos 1,2, 3 y 4.

Para el caso de *Passiflora edulis* fue:

#### **Z1: ( Invernadero, T1 – T6) vs. (In vitro, T7 y Re-invigorado, T8)**

Siendo la hipótesis nula :

$$H_0: \frac{\mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_6}{6} = \frac{\mu_7 + \mu_8}{2}$$

$$\text{entonces: } 2(\mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_6) - 6(\mu_7 + \mu_8) = 0$$

$$2\mu_1 + 2\mu_2 + 2\mu_3 + 2\mu_4 + 2\mu_5 + 2\mu_6 - 6\mu_7 - 6\mu_8 = 0$$

#### **Z2: ( In vitro, T7) vs. (Re-invigorado, T8)**

$$H_0: (\mu_7) - (\mu_8) = 0$$

$$\text{entonces: } \mu_7 - \mu_8 = 0$$

Para el análisis de los resultados obtenidos en las edades, se realizó un modelo de regresión polinomial ortogonal el cual se utiliza cuando los aumentos entre los niveles sucesivos de X son iguales y los valores de Y tienen una varianza común, siendo X la variable independiente (tratamientos) y Y la variable dependiente (variables de respuesta evaluadas). Es así como una relación funcional es de la forma  $Y = f(X)$ , la cual puede ajustarse de forma lineal, cuadrática, cúbica, cuarta ó quinta.

Para *Passiflora edulis* las relaciones funcionales se ajustaron a las formas polinomiales:

**Z3:** Lineal:  $Y = \beta_0 + \beta_1 X$

**Z4:** Cuadrática:  $Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2$

Para *Passiflora mollissima* las relaciones funcionales se ajustaron a las formas polinomiales:

**Z3:** Lineal:  $Y = \beta_0 + \beta_1 X$

**Z4:** Cuadrática:  $Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2$

**Z5:** Cúbica:  $Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \beta_3 X^3$

## **6. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **6.1. Efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad morfogénica de discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa*.**

El análisis de varianza (ANAVA), efectuado para cada una de las variables evaluadas (número de brotes, número de raíces, porcentaje de callo y porcentaje de oxidación), mostró diferencias altamente significativas para los tratamientos, los muestreos y la interacción tratamiento por muestreo (Anexo 5).

Por esta razón, se realizaron los diferentes contrastes y polinomios ortogonales para las variables de respuesta mencionadas anteriormente y que se describen a continuación:

#### **6.1.1. Número de brotes por disco foliar**

##### **6.1.1.1. Comparación entre los tratamientos de (Invernadero, T1 – T6) vs. (*In vitro*, T7 y Re- invigorado, T8)**

Entre los tratamientos evaluados se evidenció una diferencia altamente significativa, a partir del muestreo 2 (30 DDC), hasta el muestreo 4 (60 DDC) (Anexo 7; Tabla 9). Esto se reflejó en los valores promedio del número de brotes por disco foliar con el material de invernadero (entre 1.13- 5.34), en contraste con los valores promedio del material *in vitro* y re- invigorado (entre 0.33- 0.74) (Figura 4; Tabla 5).

El número de brotes por disco foliar fue mayor para el material de invernadero en comparación con el obtenido a partir del material *in vitro* y re- invigorado. Con estos resultados se evidencia que la capacidad morfogénica esta relacionada con el origen del material vegetal.

Una menor actividad meristemática en el material *in vitro* de *P. edulis*, puede ser explicada por la reducción en el tejido vascular de la nervadura media, sitio

principal de división celular, lo cual conduce a un menor número de brotes por disco foliar.

Esto se debe a que durante el cultivo *in vitro*, las plantas crecen bajo condiciones de alta humedad relativa y baja intensidad lumínica, que pueden originar cambios en aspectos de la morfología y en procesos fisiológicos de la planta (HUYLENBROECK, 1995; COZZA, 1997).

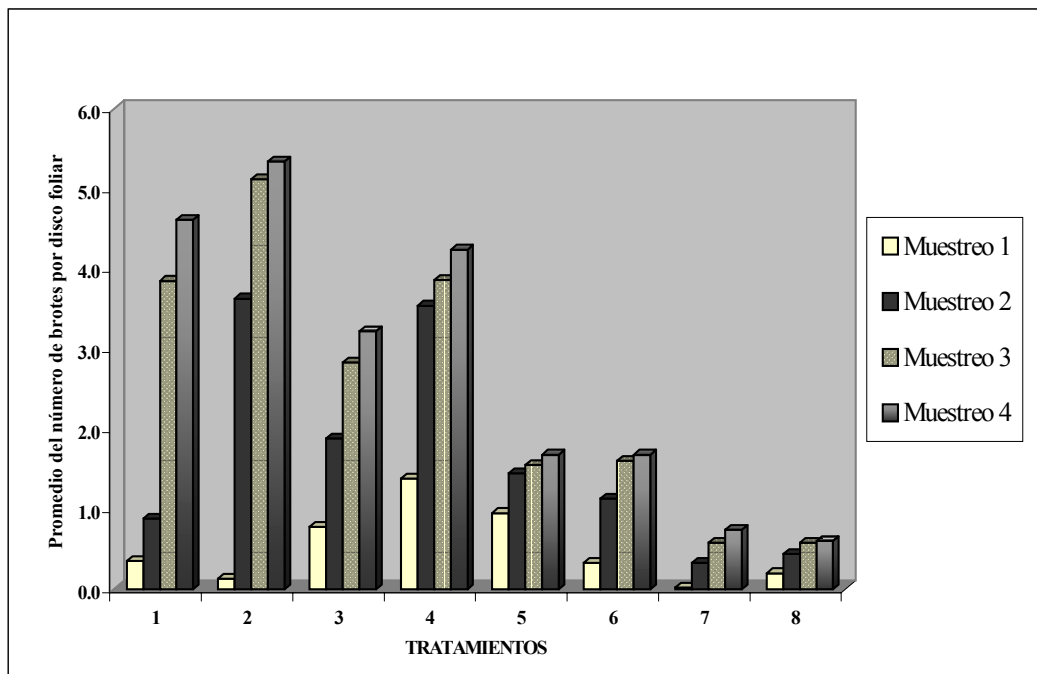
Es así como en estos cultivos se presenta una baja tasa fotosintética, hecho que es atribuido al suministro de carbono, en forma de sacarosa al medio de cultivo, lo que conlleva a una baja actividad de la Rubisco, enzima que cataliza de manera irreversible la combinación de CO<sub>2</sub> con la RuPB para formar dos moléculas de 3-PGA a partir de las cuales se forma sacarosa y almidón en las células (GOURICHON, 1996; DE LAS RIVAS, 2000).

Esta reducción en la producción de asimilados de la fotosíntesis, puede incidir en los procesos de crecimiento y desarrollo de tejidos y órganos en la planta, como lo observado por PREECE (1990) y COZZA (1997), en hojas de plantas propagadas *in vitro* de abedul y oliva, donde el tejido vascular de la nervadura media, presenta un reducido número de elementos del floema y del xilema, así como un desarrollo escaso de sus cloroplastos, órganos encargados de la fotosíntesis (QUESADA, 2000).

En el material de invernadero, el tejido vascular de la nervadura media de la hoja y el pecíolo probablemente está compuesto de un mayor número de elementos del floema cambium vascular y xilema. En la planta el cambium vascular es el encargado de la producción del floema hacia el exterior y el xilema hacia el interior, por un proceso de crecimiento secundario, en el cual la continua actividad mitótica de las células del cambium vascular, son la materia prima para la morfogénesis, como consecuencia de una combinación de formación de nuevas células y la expansión orientada de estas (SALISBURY, 1994; PHILLIPS, 1995; TAYLOR, 1997; TAIZ, 1998).

**Tabla 5.** Efecto de los tratamientos en el promedio del número de brotes por disco foliar en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*

Muestreo Tratamiento	1	2	3	4
T1	0.35	0.88	3.85	4.61
T2	0.13	3.63	5.12	5.34
T3	0.78	1.88	2.83	3.22
T4	1.38	3.54	3.86	4.24
T5	0.95	1.45	1.55	1.68
T6	0.33	1.13	1.60	1.68
T7	0.02	0.33	0.58	0.74
T8	0.20	0.44	0.58	0.60



**Figura 4.** Efecto de los tratamientos en el promedio del número de brotes por disco foliar en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*

Las células en el tejido vascular de la nervadura media de la hoja y el pecíolo, tienen entonces la capacidad de reanudar división celular, luego de un proceso de corte o herida, promoviendo de esta manera procesos de desdiferenciación e inducción de tejidos y órganos nuevos, lo cual es regulado por un balance de auxinas y citoquininas (KANTHARAJAH,1990; OWENS, 1992; DE KLERK, 1997; LANE, 1998; SRISKANDARAJAH, 1998; TAIZ, 1998; FORERO, 1999; SHRIVASTAVA, 1999)

Esto es concordante con lo reportado por HODSON (1994) para *Passiflora edulis*, LANE (1998) para *Pyrus pyrifolia*, APEZZATO (1999) para *Passiflora edulis*, según PEREIRA (2000) y JENKS (2000) para *Nymphoides indica*, quienes observaron a partir de la nervadura media, el borde de la hoja y explantes del pecíolo, la regeneración de brotes, los cuales incrementan en tamaño debido a la pronunciada actividad meristemática de las células del parénquima y epidermales, indicando así la primera fase para la diferenciación celular.

Adicionalmente, los resultados en relación con el material adulto serán referidos en términos de material re- invigorado puesto que con la poda realizada no se logró inducir un rejuvenecimiento, lo cual se evidenció por la menor respuesta morfogenética que es inherente de los tejidos adultos (CARRIZOSA, 1992; HARTMANN, 1997).

Con el proceso de poda, se esperaba la aparición de características morfológicas juveniles, tales como la forma de la hoja siendo estas trilobuladas, en la fase adulta y enteras en la fase juvenil según lo reportado por KAWATA (1995) para *P. edulis*, lo cual no se observó en este trabajo.

Esta discrepancia, puede deberse, a que solo se practicó una poda, ya que como se ha descrito en otros estudios, las podas severas y repetidas incrementan el crecimiento vegetativo de la planta, debido a que inducen a la formación de brotes juveniles, así como de raíces adventicias (PIERIK, 1987; CARRIZOSA, 1992; GROSSMAN, 1998).

Algunos autores concuerdan en que el rejuvenecimiento y/o la re- invigoración ocurre con mas dificultad en plantas leñosas, en contraste con especies

herbáceas. Un verdadero rejuvenecimiento (reversión de la fase adulta a la fase juvenil), se expresa en esta habilidad para la regeneración de brotes y raíces adventicias (FRANCLET, 1987; PIERIK, 1987; KAWATA, 1995; HARTMANN, 1997).

#### **6.1.1.2. Comparación entre los tratamientos de (*In vitro*, T7) vs. (Re- invigorado, T8)**

Los tratamientos evaluados no presentaron diferencias significativas en los muestreos 1, 2, 3 y 4 (15, 30, 45 y 60 DDC) (Anexo 7; Tabla 9), siendo menores los valores promedio del número de brotes por disco foliar tanto en el material *in vitro* (entre 0.02- 0.74), como en el material re- invigorado (entre 0.20- 0.60) (Figura 4; Tabla 5).

Estos resultados con el material re- invigorado pueden ser causados por un comportamiento recalcitrante de los tejidos adultos, que se traduce en una menor capacidad de regeneración. En condiciones *in vitro*, la desdiferenciación de células de una planta adulta, puede inducir características juveniles, pero en algunas especies se ha observado que para que esta mayor capacidad se exprese, son necesarios subcultivos periódicos para alcanzar un adecuado desarrollo y una sucesiva proliferación de brotes (PIERIK, 1987; GEORGE, 1994; KAWATA, 1995; CAPUANA, 1997; HARTMANN, 1997; SHRIVASTAVA, 1999).

Aunque el material *in vitro*, presente células rejuvenecidas según DREW (1991) y FORERO (1999), su capacidad para desarrollar brotes, parece estar relacionada con aspectos de la morfología y procesos fisiológicos ya mencionados, lo cual da como resultado una respuesta morfogenética menor.

#### **6.1.1.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 – T6)**

Para el efecto de la edad, en el material de invernadero, el muestreo 2 (30 DDC), presentó diferencias altamente significativas, ajustándose a la forma de

respuesta cuadrática, mientras que los muestreos 3 y 4 (45 y 60 DDC), presentaron diferencias altamente significativas y se ajustaron a la forma de respuesta lineal inversa (Anexo 7; Tabla 9). Es decir los valores promedio del número de brotes por disco foliar fueron mayores para las plantas de 1 y 2 meses provenientes del material de invernadero (entre 0.88- 5.34), comparados con los valores promedio de las plantas de 5 y 6 meses (entre 1.13- 1.68) (Figura 5 y 6; Tabla 5).

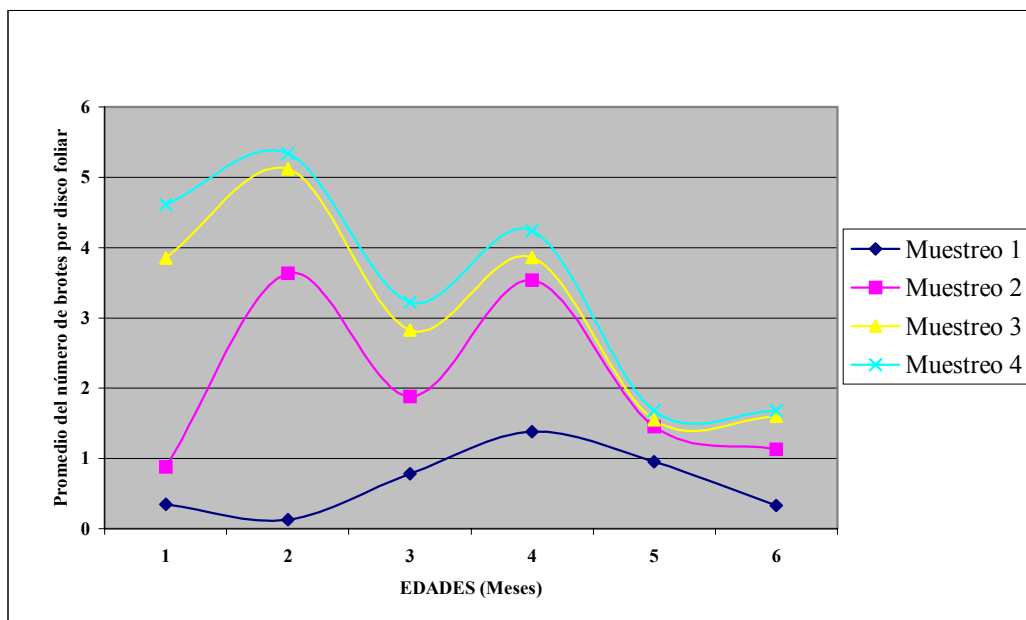
Estos resultados sugieren que la edad de la planta, fuente del material en condiciones *in vitro*, afecta la capacidad morfogénica en *P. edulis* var. *flavicarpa*, puesto que se evidenció una mayor respuesta a partir de los discos foliares de plantas de invernadero de 1 (T1) y 2 (T2) meses.

La competencia para la organogénesis y la regeneración de plantas decrece de la fase vegetativa, a estados mas avanzados, debido a que el gradiente de juvenilidad disminuye de la base al ápice de la planta. De esta manera, la condición juvenil de los meristemas del tallo desaparece a medida que aumenta la distancia entre el sistema radical y el meristemo apical (SALA, 1990; CARRIZOSA, 1992; CAPUANA, 1997; HARTMANN, 1997).

En este trabajo se observó un menor número de brotes por disco foliar a partir de plantas de invernadero de 5 (T5) y 6 (T6) meses. Estas plantas, presentaban algunas características morfológicas como es el alargamiento de el tallo y una mayor distancia en los entrenudos, lo cual puede indicar una fase de transición hacia la fase reproductiva.

Este hecho puede ser atribuído a que una planta de *P. edulis*, comienza su fase adulta, a partir del sexto mes después de la germinación, lo que conlleva a una tasa de crecimiento vegetativo reducido, a una menor formación de brotes vegetativos y a una distribución de los asimilados producto de la fotosíntesis para favorecer el desarrollo de estructuras reproductivas (DURZAN, 1990; COPPENS, 1997; HARTMANN, 1997; TAIZ, 1998; QUESADA, 2000)

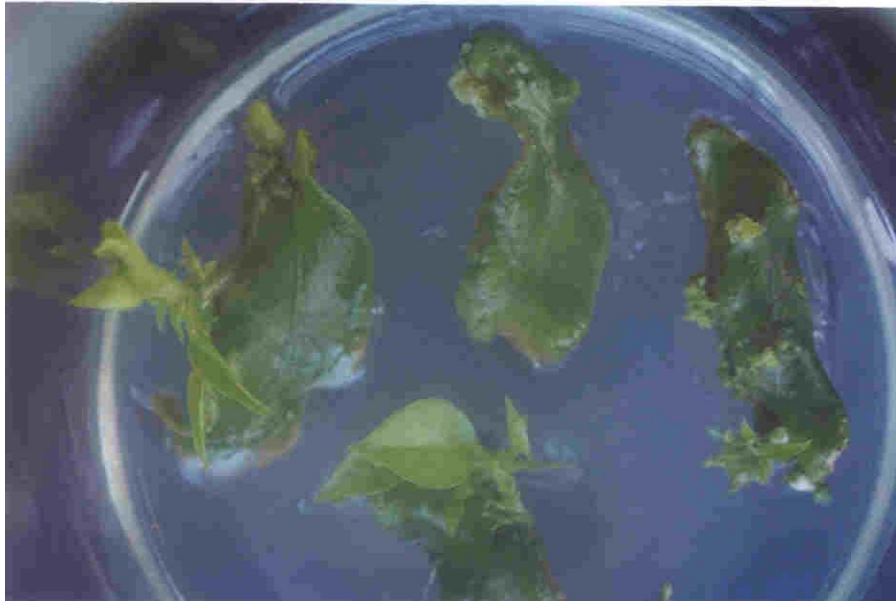




**Figura 5.** Efecto de la edad en el promedio del número de brotes por disco foliar en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*.

De forma general, con los materiales *in vitro*, re- invigorado e invernadero de distintas edades, la mayor producción de brotes a partir de discos foliares se registró entre el muestreo 2 (día 30 DDC) y el muestreo 4 (día 60 DDC). En otros trabajos se ha observado que algunos explantes no producen muchos brotes durante las primeras 4 semanas (LIN, 1998). El desarrollo de los brotes y su conexión vascular con el tejido del explante fue observado por PEREIRA (2000) después del día 40 del cultivo.

Por otra parte, el mayor número de brotes por disco foliar alcanzado con el material de invernadero fue de 5.34 (siendo el mayor promedio), lo que puede ser consecuencia de la formación de callo, la falta de subcultivo y los porcentajes de oxidación obtenidos en este trabajo.



**Figura 6.** Formación de brotes a partir discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa* provenientes de plantas de invernadero de 2 (T2) meses.

### **6.1.2. Número de raíces por disco foliar**

El suministro de auxinas en el medio, es un factor importante para la inducción y formación de raíces, en distintas especies de *Passiflora* según lo reportado por DESAI (1984), KANTHARAJAH (1990), DREW (1991), DORNELAS (1994), HODSON (1994) y PEREIRA (2000).

Este hecho difiere de lo observado en el presente estudio puesto que sin la aplicación exógena de auxinas, se evidenció una significativa formación de raíces adventicias (2.28, siendo el mayor promedio). Según DORNELAS (1994), OVALLE (1995) y FORERO, (1999), es probable que los niveles endógenos de auxina, sean suficientes para promover esta respuesta morfogénica en algunas especies de *Passiflora*.

La formación de raíces, se presentó cerca de la superficie de corte especialmente en la nervadura media, esto puede deberse a que auxinas como el AIA tienden a acumularse inmediatamente en estos sitios, como resultado de un transporte polar en las hojas jóvenes, el cual se realiza a través de las células de parénquima que se encuentran en contacto con los haces del tejido vascular (BANDURSKY, 1993; HARTMANN, 1997; TAIZ, 1998).

La formación de raíces se presentó en la región de la nervadura media de la hoja. En especies como la violeta africana y *Passiflora edulis var. flavicarpa* se ha observado que las raíces se desarrollan en zonas meristemáticas localizadas en regiones profundas cerca a la zona de vascularización del explante (HARTMANN, 1997; DE KLERK, 1997; APPEZZATO, 1999, según PEREIRA, 2000).

#### **6.1.2.1. Comparación entre los tratamientos de ( Invernadero, T1 – T6) vs. (In vitro, T7 y Re- invigorado, T8)**

Los tratamientos evaluados presentaron diferencias altamente significativas para los muestreos 3 y 4 (45 y 60 DDC) (Anexo 8; Tabla 9), siendo esto evidente en los valores promedio del número de raíces por disco foliar con el material de

invernadero (entre 0.51- 2.28), en comparación con el material *in vitro* y re-invigorado (entre 0.02- 0.05) (Figura 7; Tabla 6).

La menor producción de raíces a partir del material *in vitro* con respecto al material de invernadero, puede ser atribuido a una reducción del tejido vascular de la nervadura media, lo cual puede afectar la capacidad morfogénica de los discos foliares, de la misma manera que se describió para la formación de brotes (COZZA, 1997).

Esta reducción en los tejidos sería causada por una baja actividad fotosintética en las plantas *in vitro*, lo que genera probablemente un menor aporte de carbohidratos para su formación y desarrollo. Esto es concordante con lo reportado por PREECE, (1991), quien observó por ejemplo que las raíces formadas en plantas micropropagadas son delgadas y presentan un deficiente desarrollo del sistema vascular.

En condiciones de invernadero cuanto más alta es la tasa de fotosíntesis, mayor es el aporte de carbohidratos a la planta lo cual lleva a una adecuada formación y desarrollo de sus raíces (CARBÓ, 2000).

Por otra parte, el material re- invigorado, evidenció también menor formación, de raíces comparado con el material de invernadero, con lo cual se observa el efecto del origen del material vegetal sobre la capacidad morfogénica. Según lo reportado por CAPUANA (1997), uno de los principales criterios para evaluar si el material presenta características adultas en los cultivos *in vitro*, es su menor competencia para la formación de raíces, lo cual es concordante con lo observado en este trabajo, en el cual los tejidos juveniles regeneran fácilmente raíces adventicias, a diferencia de los tejidos adultos (SALISBURY 1994; DE KLERK, 1997; TAIZ, 1998; SEENI, 2000).

Esto indica que a medida que las células embrionarias se desdiferencian de acuerdo con un patrón de desarrollo determinado, se reduce la capacidad de expresar totipotencialidad (CARRIZOSA, 1992; CAPUANA, 1997).

Adicionalmente a esto en la fase juvenil, los asimilados producto de la fotosíntesis son dirigidos hacia los tejidos y órganos en desarrollo, como es el caso de

las hojas y raíces, mientras que en la fase adulta la prioridad es la formación de las estructuras reproductivas (LUIS, 2000; QUESADA, 2000).

#### **6.1.2.2. Comparación entre los tratamientos de (*In vitro*, T7) vs. (Re- invigorado, T8)**

Los muestreos 1, 2, 3 y 4 (15, 30, 45 y 60 DDC), de los tratamientos evaluados no presentaron diferencias significativas (Anexo 8; Tabla 9), siendo los valores promedio del número de raíces por disco foliar muy bajos para los materiales *in vitro* (entre 0.00- 0.03) y re- invigorado (entre 0.01- 0.05) (Figura 7; Tabla 6).

Estos resultados a partir del material re- invigorado pueden ser atribuidos a un comportamiento recalcitrante en los tejidos adultos, como es una menor capacidad de regeneración. En condiciones *in vitro*, la desdiferenciación de células de una planta adulta, puede inducir características juveniles, pero en algunas especies se ha observado que para que esta mayor capacidad se exprese, son necesarios subcultivos periódicos para alcanzar un adecuado desarrollo y una sucesiva proliferación de raíces (PIERIK, 1987; GEORGE, 1994; KAWATA, 1995; CAPUANA, 1997; HARTMANN, 1997; SHRIVASTAVA, 1999).

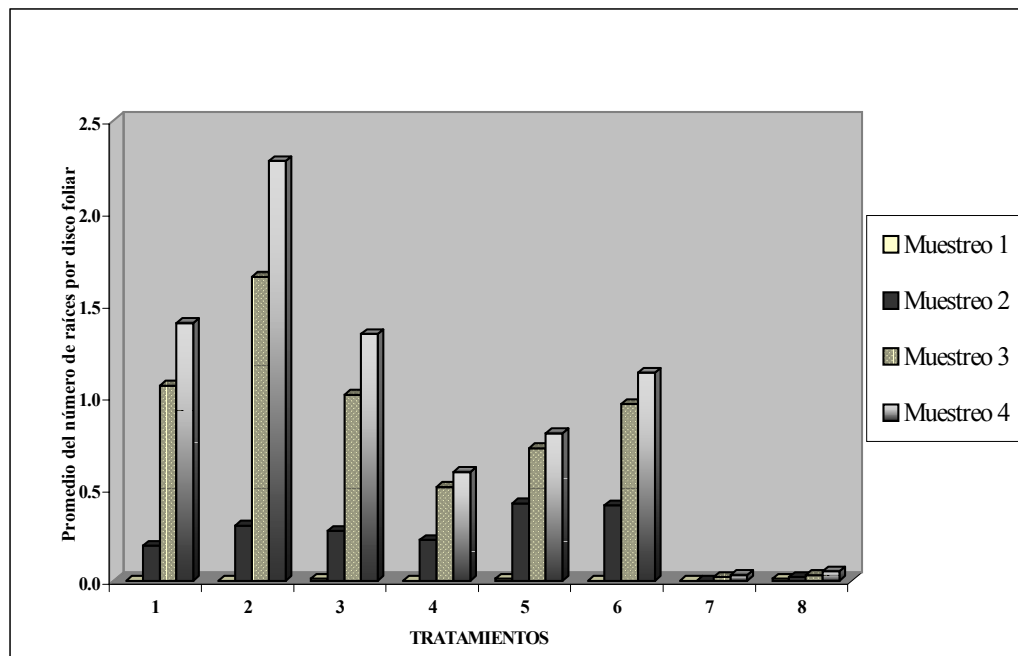
En cuanto al material *in vitro*, aunque este presente células rejuvenecidas según DREW (1991) y FORERO (1999), su capacidad para desarrollar raíces, parece estar relacionada con aspectos de la morfología y procesos fisiológicos ya mencionados, lo cual da como resultado una menor respuesta morfo genética.

#### **6.1.2.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 – T6)**

Para el efecto de la edad, en el material de invernadero, el muestreo 4 (60 DDC), presentó diferencias altamente significativas, ajustándose a la forma de respuesta lineal inversa (Anexo 8; Tabla 9), lo cual indica que el promedio del número de raíces, es menor a medida que aumenta la edad; en consecuencia las

**Tabla 6.** Efecto de los tratamientos en el promedio del número de raíces por disco foliar en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*.

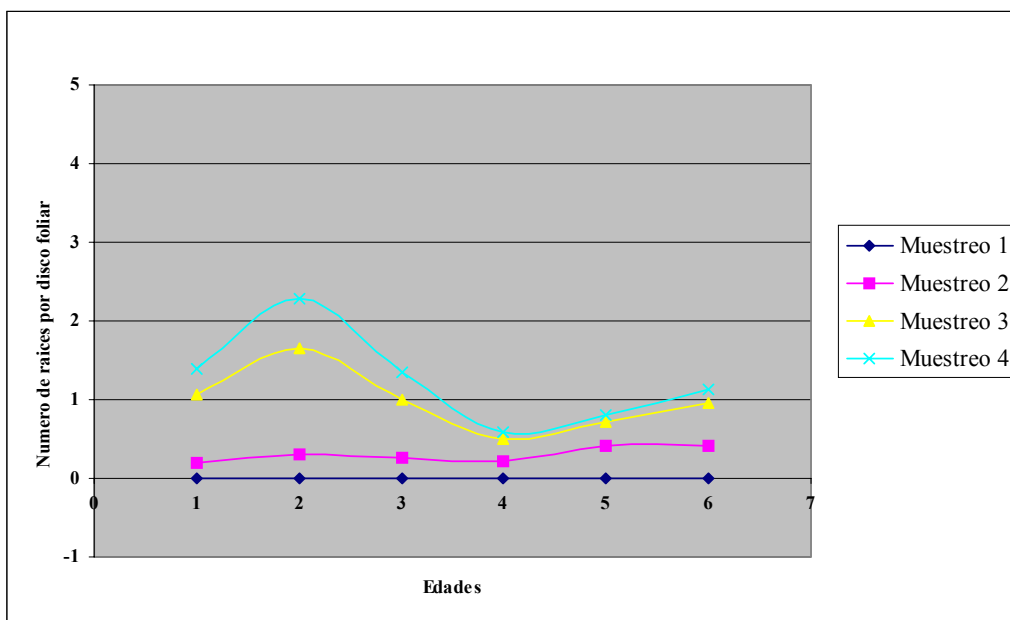
Muestreo \ Tratamiento	1	2	3	4
T1	0.00	0.19	1.06	1.40
T2	0.00	0.30	1.65	2.28
T3	0.01	0.27	1.01	1.34
T4	0.00	0.22	0.51	0.59
T5	0.01	0.42	0.72	0.80
T6	0.00	0.41	0.96	1.13
T7	0.00	0.00	0.02	0.03
T8	0.01	0.02	0.03	0.05



**Figura 7.** Efecto de los tratamientos en el promedio del número de raíces por disco foliar en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*.



**Figura 8.** Formación de raíces a partir de discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa* provenientes de plantas de invernadero de 2 (T2) meses.



**Figura 9.** Efecto de la edad en el promedio del número de raíces por disco foliar en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*.

plantas de 1 y 2 meses provenientes del material de invernadero presentan los mayores promedios (entre 1.40- 2.28) (Figura 8 y 9; Tabla 6).

Estos resultados indican que la capacidad morfogenética de los discos foliares esta relacionada con la edad y que este factor es influenciado por el estado fisiológico de la planta.

La formación de raíces depende del desarrollo de la planta, ya que después de la germinación las raíces jóvenes experimentan altas tasas de respiración, debido a la gran demanda por esqueletos de carbono para crecer rápidamente y así sostener la planta así como para la absorción de los nutrientes necesarios para su crecimiento. Aunque estas funciones se mantienen a lo largo de la vida de la planta, a medida que se pasa del estado vegetativo al estado reproductivo, se puede presentar una reducción en las tasas fotosintética y respiratoria lo cual conlleva a que las raíces dejen de crecer (CARBÓ, 2000).



Esto se refleja en la respuesta con el material de invernadero, ya que a medida que aumenta la edad, disminuye el número de raíces por disco foliar, con lo cual se evidencia que los tejidos juveniles de plantas de 1 (T1) y 2 (T2) meses, experimentan un mayor y mas rápido desarrollo en condiciones *in vitro* (PIERIK, 1987; DREW, 1991; TORPE, 1991; GEORGE, 1994; SALISBURY 1994; DE KLERK, 1997; TAIZ, 1998; FORERO, 1999; SEENI, 2000).

Por el contrario, en las plantas de 5 (T5) y 6 (T6) meses provenientes del material de invernadero, las cuales evidenciaron algunas características morfológicas que indican una fase de transición hacia la fase reproductiva, se observó una menor formación de raíces por disco foliar (COPPENS, 1997; HARTMANN, 1997).

Estos resultados confirman que en etapas tempranas de la fase reproductiva, la actividad meristemática disminuye o cesa en órganos vegetativos (SALISBURY, 1994, LUIS, 2000).

### **6.1.3. Porcentaje de callo por disco foliar**

Aunque con la utilización de dos citoquininas como KIN y BAP (las cuales actúan sinérgicamente), se induce una mayor producción de brotes en los discos foliares, la formación de callo también se observó. Esta producción de callo, puede ser atribuída a los niveles endógenos de auxinas y citoquininas que puedan estar presentes en los discos foliares (ZIMMERMAN, 1994; DORNELAS, 1994; HODSON 1994; BABU 2000).

Cuando se combinan citoquininas y auxinas en un medio de inducción, la formación de callo es mayor, lo cual puede tener un efecto negativo sobre la formación y proliferación de brotes, disminuyendo considerablemente (KANTHARAJAH, 1990; DORNELAS, 1994; HODSON 1994; GUOHUA, 1998).

En su mayoría, la formación de brotes en los discos foliares fue vía morfogénesis directa, pero no se puede obviar el hecho de que en algunos casos, la presencia de callo indujo morfogénesis indirecta. La producción de callo en cultivo de tejidos *in vitro* pueden alterar la estabilidad genética, lo cual incrementa el riesgo de

obtener variantes somaclonales con alteraciones en el fenotipo o en el genotipo (PIERIK, 1987; KANTHARAJAH, 1990; KRIKORIAN, 1991; SRISKANDARAJAH, 1998).

Es factible que se necesite un incremento en la concentración de citoquininas, en el medio de cultivo *in vitro*, que estimule mayor formación de brotes a partir de discos foliares. Es importante tener en cuenta que en algunos trabajos se reportan los altos niveles de citoquininas (entre 18.00 – 44.4  $\mu\text{M}$ ), como inhibidores de la organogénesis, lo cual indica que las concentraciones que se deben utilizar deben ser moderadas (HODSON, 1994; GUOHUA, 1998; SHRIVASTAVA, 1999; BHATT, 2000; ECHEVERRIGARAY, 2000).

La formación de callo a partir de discos foliares provenientes del material de invernadero *in vitro* y re- invigorado, se observó a nivel de corte, puesto que en el momento de la herida, las células cerca de la lesión son inducidas a una rápida división celular (OWENS, 1992; DE KLERK, 1997; TAIZ, 1998).

#### **6.1.3.1. Comparación entre los tratamientos de ( Invernadero, T1 – T6) vs. (*In vitro*, T7 y Re- invigorado, T8)**

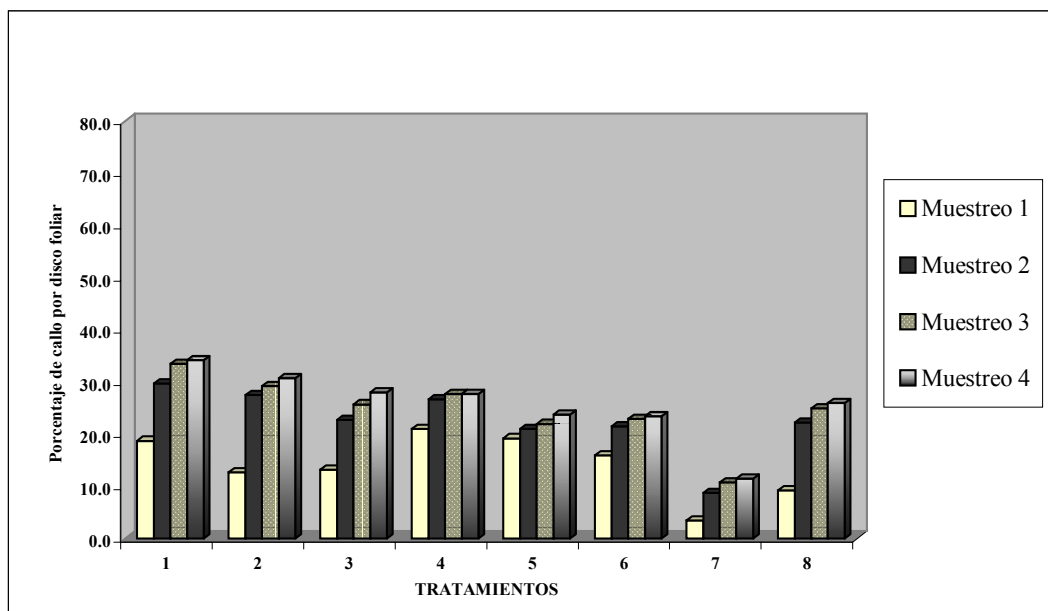
Los tratamientos evaluados presentaron diferencias altamente significativas entre los 4 muestreos (15, 30, 45 y 60 DDC) (Anexo 9; Tabla 9), como se observó en un mayor porcentaje de callo con el material de invernadero (entre 12.75- 34.25), comparado con los materiales *in vitro* y re- invigorado (entre 3.50- 26.00) (Figura 10; Tabla 7).

#### **6.1.3.2. Comparación entre los tratamientos de (*In vitro*, T7) vs. (Re- invigorado, T8)**

Los tratamientos evaluados mostraron diferencias altamente significativas desde el muestreo 2 (30 DDC), hasta el muestreo 4 (60 DDC) (Anexo 9; Tabla 9),

**Tabla 7.** Efecto de los tratamientos en el porcentaje de callo por disco foliar en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*

Muestreo Tratamiento	1	2	3	4
	%	%	%	%
T1	18.75	29.75	33.50	34.25
T2	12.75	27.50	29.25	30.75
T3	13.25	22.75	25.75	28.00
T4	21.00	26.75	27.75	27.75
T5	19.25	21.00	22.00	23.75
T6	16.00	21.50	23.00	23.50
T7	3.50	8.75	10.75	11.50
T8	9.25	22.25	25.00	26.00



**Figura 10.** Efecto de los tratamientos en el porcentaje de callo por disco foliar en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*

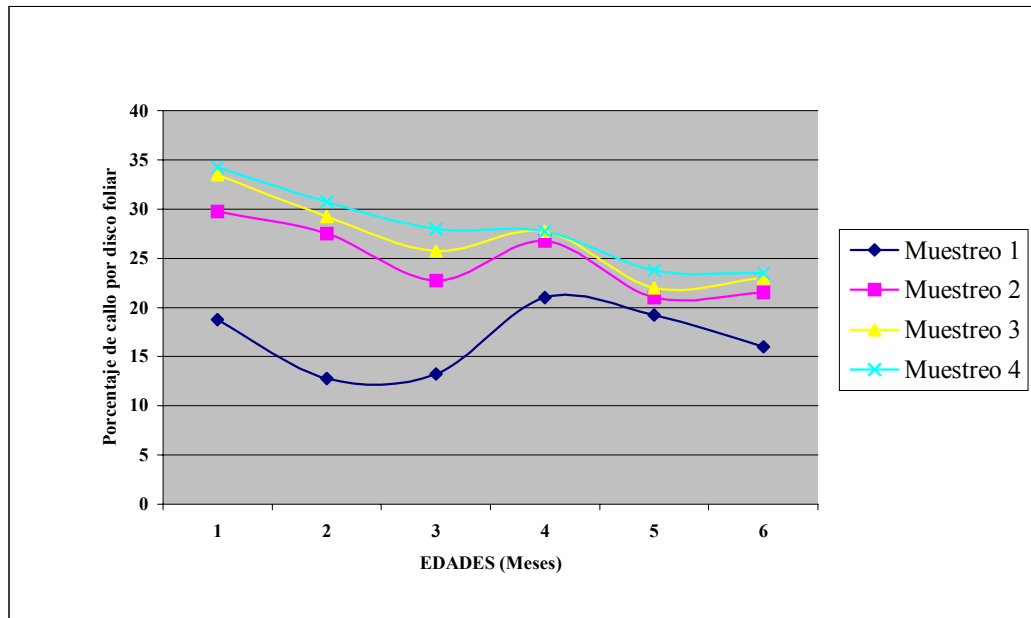
siendo evidente un mayor porcentaje de callo por disco foliar, con el material re-vigorado (entre 22.25- 26.00) a diferencia del porcentaje con el material *in vitro* (entre 8.75- 11.50) (Figura 10; Tabla 7).

La mayor respuesta con el material de invernadero, puede explicarse por la biosíntesis de auxinas, la cual se presenta principalmente en las hojas jóvenes de la planta. Estas hormonas, luego de un proceso de corte, pueden ejercer una acción local a través de los tejidos vasculares de la hoja, lo cual induce a una división celular abundante, dando como resultado una mayor producción de callo (DE KLERK, 1997; ECHEVERRÍA, 2000).

Por otra parte, aunque las hojas adultas pueden sintetizar AIA (auxina), una menor formación de callo en el material re- invigorado, probablemente es causada por un potencial de división más bajo en las células adultas, lo cual es producto de su estado fisiológico especializado (PIERIK, 1987; TAIZ, 1998; RAVEN, 1999).

Se ha observado además que el transporte polar, el cual es típico de las auxinas y se realiza por medio de células del cambium vascular en las hojas, es inhibido por compuestos fenólicos que son comunes en los tejidos adultos, influyendo en el proceso de formación de callo a partir de los discos foliares del material re- invigorado (ECHEVERRÍA, 2000).

El material *in vitro*, presentó una menor formación de callo con respecto al material re- invigorado y al material de invernadero, como consecuencia de las diferencias anatómicas y fisiológicas que se pueden presentar, principalmente la reducción del tejido vascular. Teniendo en cuenta que el crecimiento del callo se produce desde células del parénquima y de células del tejido vascular, su reducción daría probablemente como resultado una menor y mas baja división celular para su formación a partir del material *in vitro* (HARTMANN, 1997).

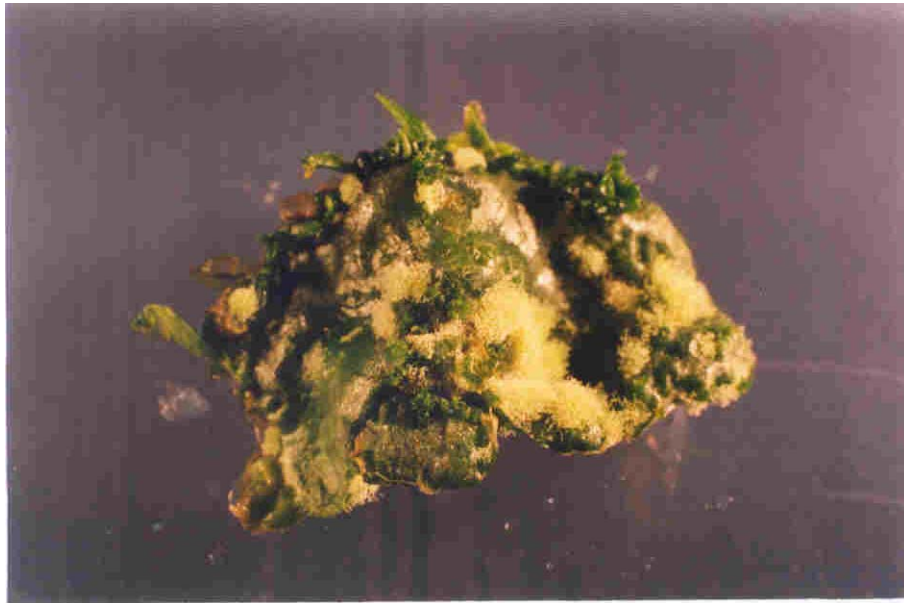


**Figura 11.** Efecto de la edad en el porcentaje de callo por disco foliar en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*

### 6.1.3.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 –T6)

Con respecto al efecto de la edad, el material de invernadero, en el muestreo 4 (60 DDC), presentó diferencias significativas, ajustándose a la forma de respuesta lineal inversa (Anexo 9; Tabla 9), con lo cual los mayores porcentajes se observaron con el material de invernadero de 1 y 2 meses (entre 30.75- 34.25) (Figura 11 y 12; Tabla 7).

Con el material de invernadero se observó un mayor potencial de crecimiento y división celular, en las plantas de 1 (T1) y 2 (T2) meses. Esta respuesta fue disminuyendo progresivamente a medida que aumentaba la edad, lo cual se evidenció en los bajos porcentajes de callo con los materiales de las plantas de 4 (T4), 5 (T5) y 6 (T6) meses, indicando una mejor respuesta por morfogénesis indirecta en los tejidos juveniles.



**Figura 12.** Formación de callo a partir de discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa* provenientes de plantas de invernadero de 1 mes (T1).

Esto se debe a que las células presentes en los tejidos de plantas en estados juveniles de 1 (T1) y 2 (T2) meses, no poseen una vía de desarrollo determinada por lo cual se observa una mayor y mas rápida división celular en contraste con las células en los tejidos de plantas de 4 (T4), 5 (T5) y 6 (T6) meses que se encuentran en estados mas avanzados, las cuales se presentan especializadas y con un comportamiento recalcitrante, causado por su posible transición a la fase reproductiva (CARRIZOSA, 1992).

#### **6.1.4. Porcentaje de oxidación por disco foliar**

La oxidación, se caracterizó por un oscurecimiento del tejido vegetal, ya que probablemente en el momento del corte o herida se promueve la liberación de ácido clorogénico y ésteres fenólicos, que sirven de sustrato a las enzimas polifenol oxidadas. Estas enzimas a su vez catalizan la oxidación de compuestos fenólicos a quinonas, las cuales además de actuar contra la protección del tejido, pueden acumularse y ser altamente tóxicas (RAMIREZ, 1989; THORPE, 1991; FORERO, 1999).

##### **6.1.4.1. Comparación entre los tratamientos de (Invernadero, T1 – T6) vs. (*In vitro*, T7 y Re- invigorado, T8)**

Los tratamientos evaluados, presentaron diferencias altamente significativas en el muestreo 2 (30 DDC) y el muestreo 3 (45 DDC), (Anexo 10; Tabla 9), lo cual se evidenció por un menor porcentaje de oxidación, para el material de invernadero, en contraste con los porcentajes del material *in vitro* y re- invigorado (entre 18.00-42.00 %). En el muestreo 4 (60 DDS), este porcentaje llegó a ser muy similar en los materiales de invernadero, *in vitro* y re- invigorado (Figura 13; Tabla 8).

#### 6.1.4.2. Comparación entre los tratamientos de (*In vitro*, T7) vs. (Re- invigorado, T8)

Los materiales *in vitro* y re- invigorado no presentaron diferencias significativas en los muestreos 1, 2, 3 y 4 (15, 30, 45 y 60 DDC) (Anexo 10; Tabla 9), siendo alto el porcentaje de oxidación por disco foliar, para estos dos tratamientos (entre 0.75- 68.00 %) (Figura 13 y 14; Tabla 8).

Los resultados obtenidos con los 3 materiales son probablemente causados por una pérdida de lípidos, proteínas y clorofila, que ocurre en el momento en que una hoja se separa de la planta. Este envejecimiento prematuro o senescencia puede conducir a la muerte de la hoja (SALISBURY, 1994; PHILLIPS, 1995; TAIZ 1998).

Estudios previos en *P. edulis* sugieren que este envejecimiento podría ser retardado mediante tratamientos con citoquininas, ya que este regulador de crecimiento al parecer estimula la proliferación de cloroplastos, promueve la síntesis de proteínas fotosintéticas, impulsa la formación de granas, e incrementa la síntesis de clorofila, lo cual favorece la permanencia de la coloración verde de la hoja (HODSON,1994).

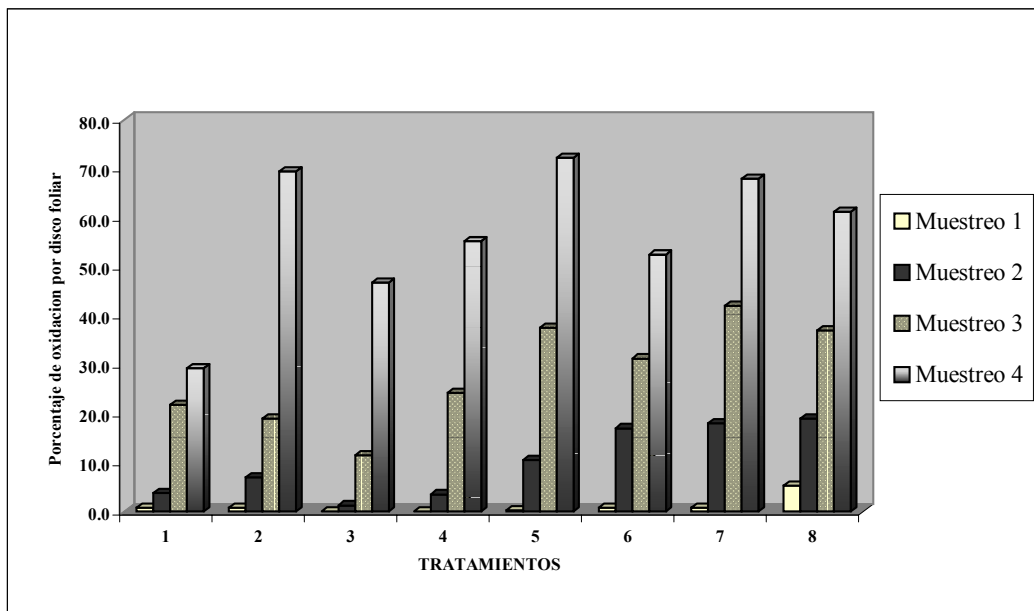
Esta situación probablemente se observó en el presente trabajo, donde los discos foliares de plantas de invernadero de *P. edulis* evidenciaron un menor promedio de oxidación, a través de los primeros 3 muestreos (45 DDC). Aunque la aplicación de las citoquininas no previene la senescencia completamente, su efecto sí puede ser retardado (TAIZ, 1998).

Por el contrario, el material *in vitro*, presentó una mayor oxidación desde el segundo muestreo (30 DDC), lo que probablemente se relaciona con la morfología de sus hojas, las cuales se presentan delgadas, con un bajo contenido de citoplasma así como de clorofila, y con un pobre desarrollo de cloroplastos, lo cual puede contribuir a un rápido proceso de oxidación en los discos foliares (PREECE, 1990; COZZA, 1997; NGUYEN, 1999).



**Tabla 8.** Efecto de los tratamientos en el porcentaje de oxidación por disco foliar en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*.

Muestreo Tratamiento	1	2	3	4
	%	%	%	%
T1	0.75	3.75	21.75	29.25
T2	0.75	7.00	19.00	69.50
T3	0.00	1.25	11.50	46.75
T4	0.00	3.50	24.25	55.25
T5	0.25	10.50	37.50	72.25
T6	0.75	17.00	31.25	52.50
T7	0.75	18.00	42.00	68.00
T8	5.25	19.00	37.00	61.25



**Figura 13.** Efecto de los tratamientos en el porcentaje de oxidación por disco foliar en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*.

En condiciones *in vitro*, los discos foliares obtenidos a partir del material, re- invigorado mostraron respuestas características de tejidos adultos como es la fenolización de compuestos comúnmente encontrado en tejidos leñosos, lo que se manifiesta en un oscurecimiento del medio de cultivo como resultado de la liberación de fenoles (BALLESTER, 1990; GONGORA, 1992; CAPUANA, 1997; HARTMANN, 1997; PANAI, 2000).

De otra parte, los porcentajes de oxidación en los materiales provenientes de invernadero, *in vitro* y re- invigorado pudo ser ocasionado por la permanencia de los discos foliares en el mismo medio cultivo *in vitro* durante los 4 muestreos (60 DDS). KANTHARAJAH (1990), observó que si los explantes permanecían en un medio con citoquininas por mas de 4 semanas, se evidenciaba una menor organogénesis, así como clorosis y eventual muerte del tejido, ya que este regulador de crecimiento ha sido reportado como estimulador de la síntesis de compuestos fenólicos, por lo cual es necesario realizar subcultivos periódicos (SEENI, 2000).

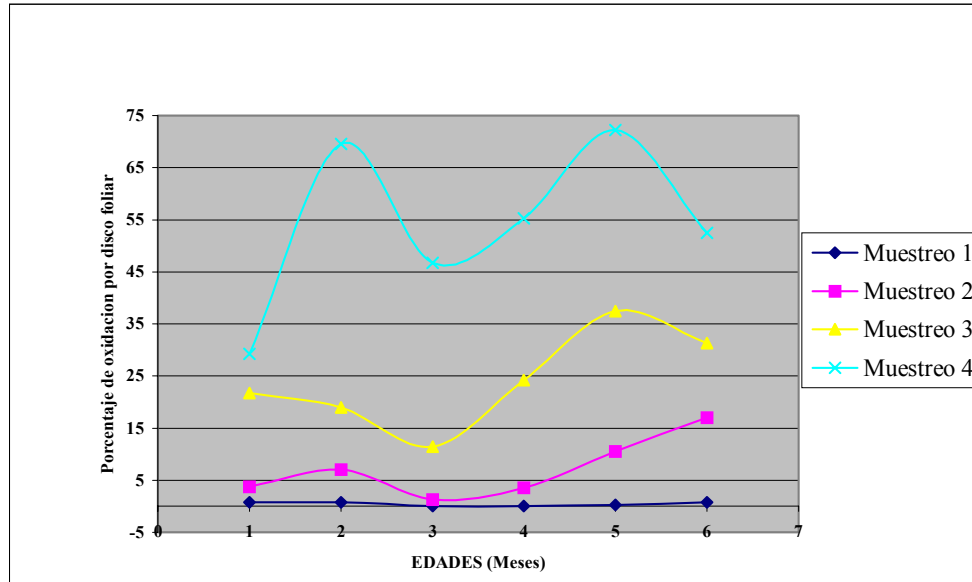
Una rápida transferencia puede estimular el crecimiento de nuevos brotes, además de evitar efectos inhibitorios por la liberación de estos compuestos al medio, desde el corte o la herida (ZAID, 1987; SUDARSONO, 1991; GUOHUA, 1998; SRISKANDARAJAH, 1998; SHRIVASTAVA, 1999 ).

#### **6.1.4.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 – T6)**

Con relación al efecto de la edad en el material de invernadero, se evidenció diferencias altamente significativas en el muestreo 2 (30 DDC), ajustándose a la forma lineal positiva, mientras para el muestreo 3 (45 DDC), se presentó una diferencia significativa (Anexo 10; Tabla 9). Esto indica que el porcentaje de oxidación por disco foliar fue menor para las plantas de 1 mes provenientes del material de invernadero (entre 3.75- 29.25) que para las plantas de 4, 5 y 6 meses (entre 3.50- 72.25) (Figura 15; Tabla 8).



**Figura 14.** Oxidación de discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa* provenientes de plantas de material re- invigorado (T8).



**Figura 15.** Efecto de la edad en el porcentaje de oxidación por disco foliar en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*

Estos resultados sugieren que la síntesis de precursores de fenoles es más activa y compleja hasta llevar a la muerte de los discos foliares a medida que aumenta la edad de las plantas provenientes del material de invernadero, durante los primeros 3 muestreos (45 DDC). Por esta razón la oxidación fue menor con las plantas de 1 (T1), 2 (T2) y 3 (T3) meses, comparada con la del material de las plantas de 5 (T5) y 6 (T6) meses de edad.

Para el muestreo 4 (60 DDC), por causa de la falta de subcultivo, esta oxidación fue muy alta con todo el material proveniente de invernadero (CARRIZOSA, 1992; DE KLERK, 1997; PANAI, 2000).

Adicionalmente, algunos autores mencionan que el etileno, estimula la oxidación y senescencia de los tejidos, e inhibe su regeneración en condiciones *in vitro*. La producción de este gas probablemente se deba a un sinergismo entre auxinas y citoquininas (HULME, 1992; NEWBIGIN, 1995; GASPAR, 1996).

**Tabla 9.** Resultados de los contrastes ortogonales y los polinomios en las variables evaluadas en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*

Variable	Muestreos	Contras. Ortogonal		Polinom. Ortogonal	
		Z1	Z2	Z3	Z4
				Lineal	Cuadrática
BROTE	M1	NS	NS	NS	NS
	M2	**	NS	NS	**
	M3	**	NS	**	NS
	M4	**	NS	**	NS
RAIZ	M1	NS	NS	NS	NS
	M2	NS	NS	NS	NS
	M3	**	NS	NS	NS
	M4	**	NS	**	NS
CALLO	M1	**	NS	NS	NS
	M2	**	**	NS	NS
	M3	**	**	NS	NS
	M4	**	**	*	NS
OXIDACION	M1	NS	NS	NS	NS
	M2	**	NS	**	NS
	M3	**	NS	*	NS
	M4	NS	NS	NS	NS

\*\* : menor a 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas

\* : menor a 0.05, son factores que tienen diferencias significativas.

NS: mayor a 0.05, son factores que no tiene diferencias significativas



**Figura 16.** Brotes obtenidos por cultivo *in vitro* de discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa* provenientes de material de invernadero de 2 (T2) meses de edad.

### 6.1.5. Enraizamiento y endurecimiento

Se logró obtener plantas enraizadas de *P. edulis* var. *flavicarpa*.

Los brotes obtenidos a partir de discos foliares de material de invernadero de 1 (T1) y 2 (T2) meses de edad, fueron enraizados en medio MS sin reguladores de crecimiento (Figura 16 y 17). DORNELAS (1994), obtuvo resultados similares en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*.

Para la fase de pre-endurecimiento y endurecimiento, se observó que el crecimiento y desarrollo de las plantas de *P. edulis* var. *flavicarpa* fue favorecido por la utilización de un sustrato como la turba, el aumento de la intensidad lumínica y la reducción gradual de la humedad relativa. Esto concuerda con lo descrito por PEÑA (2000), para algunas especies de *Vitis vinifera* en las cuales se encontró que la transferencia progresiva a un ambiente en condiciones naturales (*ex vitro*), disminuye al máximo el estrés ocasionado por este proceso (Figura 18).



**Figura 17.** Brote enraizado en medio MS sin reguladores de crecimiento





**Figura 18.** Plantas obtenidas por cultivo *in vitro* de discos foliares de *P. edulis* var. -- *flavicarpa*, **A.** Etapa de pre- endurecimiento. **B.** Etapa de endurecimiento

## **6.2. Efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad morfogénica de discos foliares de *P. mollissima*.**

El análisis de varianza (ANAVA), realizado para cada una de las variables evaluadas (número de brotes, porcentaje de callo, y porcentaje de oxidación), presentó diferencias altamente significativas para los tratamientos, los muestreos y su interacción (Anexo 6).

Por esta razón, se realizaron los diferentes contrastes y polinomios ortogonales para las variables de respuesta mencionadas anteriormente y que se describen a continuación:

### **6.2.1. Número de brotes por disco foliar**

La formación de brotes en su mayoría se observó desde el muestreo 2 (30 DDC), tanto a nivel de corte como de nervadura media, ya que al parecer en esta región de las hojas la actividad mitótica de las células del cambium vascular, son la materia prima para la morfogénesis, como consecuencia de una combinación de formación de nuevas células y la expansión orientada de estas, luego de un proceso de corte o herida, promoviendo de esta manera procesos de desdiferenciación e inducción de tejidos y órganos nuevos, lo cual es regulado por un balance de auxinas y citoquininas (OVALLE, 1988; SALISBURY, 1994; HODSON, 1994; PHILLIPS, 1995; TAYLOR, 1997; LANE, 1998; SRISKANDARAJAH, 1998; TAIZ, 1998; FORERO, 1999)

Estudios histológicos en *Pothomorphe umbellata* muestran que las células en la región de la nervadura media incrementan de tamaño y comienzan a dividirse en varios planos luego del día 6 de incubación, formando estructuras meristemáticas para el día 25, las cuales son inducidas al desarrollo de brotes el día 40 en condiciones *in vitro* (PEREIRA, 2000).

### 6.2.1.1. Comparación entre los tratamientos de ( Invernadero, T1 – T4) vs. (*In vitro*, T5 y Re- invigorado, T6)

Entre los tratamientos evaluados se presentaron diferencias altamente significativas para los muestreos 3 y 4 (45 y 60 DDC) (Anexo 11; Tabla 13). Esto se reflejó en los valores promedio del número de brotes por disco foliar obtenidos con el material de invernadero (entre 0.03- 0.74), a diferencia de los valores promedio de los material *in vitro* y re- invigorado (entre 0.00- 0.07) (Figura 19; Tabla 10).

Una mayor formación de brotes a partir del material de invernadero por encima de los obtenidos con el material *in vitro*, es una evidencia del efecto del origen del material sobre la capacidad morfogénica de los discos foliares.

De forma similar que en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* esta respuesta puede ser causada por las diferencias anatómicas y fisiológicas, que presentan estos materiales, ya que en condiciones *in vitro* las plantas presentan una baja tasa fotosintética (GOURICHON, 1996; DE LAS RIVAS, 2000). Esta reducción en la producción de asimilados de la fotosíntesis puede incidir en los procesos de crecimiento y desarrollo de tejidos y órganos en la planta (QUESADA, 2000).

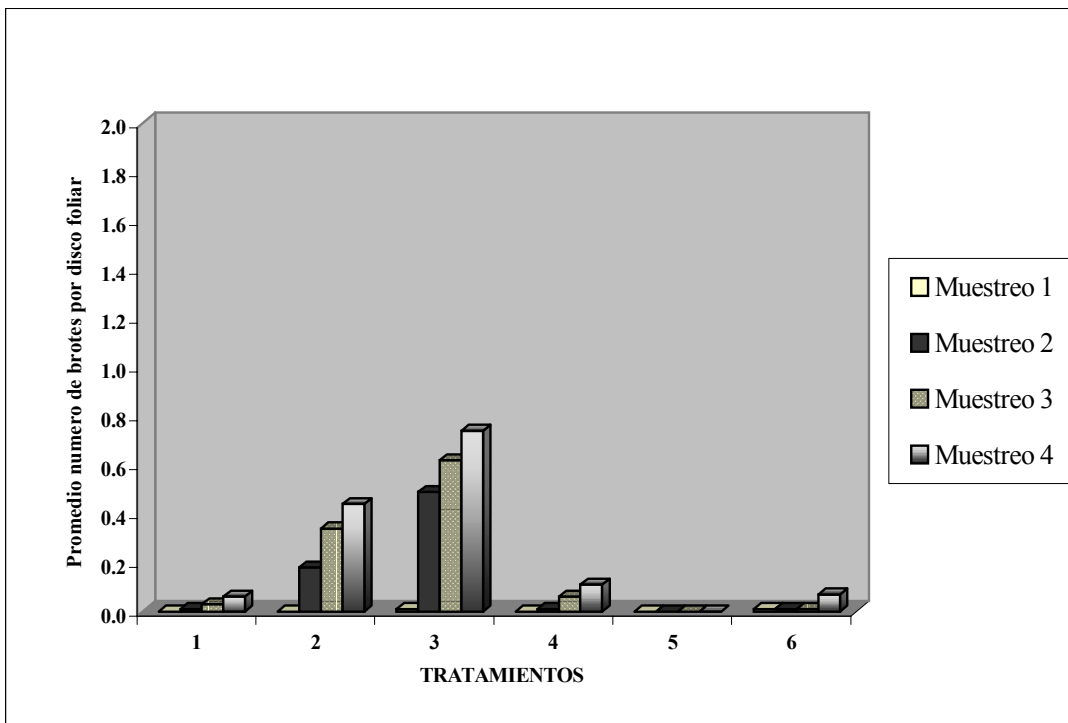
Esto es concordante con lo encontrado en hojas propagadas *in vitro* de algunas especies, donde el tejido vascular de la nervadura media y los pecíolos, presentan un reducido número de elementos del floema en comparación con el encontrado en plantas de invernadero (PREECE, 1990; COZZA, 1997).

Si el tejido vascular presenta un buen potencial de regeneración en *P. mollissima* según lo descrito por FORERO (1999) y lo obtenido en este trabajo para *P. edulis*, es probable que su reducción lleve a una baja capacidad morfogénica, la cual se expresa en una menor formación de brotes, como se observó con el material *in vitro*.

Por otra parte, se presenta una discrepancia con FORERO (1999), quien reportó una menor formación de brotes a partir de discos foliares de plantas de material de invernadero en comparación con discos foliares provenientes de material *in vitro*.

**Tabla 10.** Efecto de los tratamientos en el promedio del número de brotes por disco foliar en *Passiflora mollissima*.

Muestreo \ Tratamiento	1	2	3	4
T1	0.00	0.01	0.03	0.06
T2	0.00	0.18	0.34	0.44
T3	0.01	0.49	0.62	0.74
T4	0.00	0.01	0.06	0.11
T5	0.00	0.00	0.00	0.00
T6	0.01	0.01	0.01	0.07



**Figura 19.** Efecto de los tratamientos en el promedio del número de brotes por disco foliar en *Passiflora mollissima*.

Esto puede ser debido a que en este trabajo utilizaron plantas de invernadero de 8 meses de edad. De todas maneras, los resultados obtenidos en los dos casos indican que los tejidos jóvenes, presentan una mayor capacidad morfogénica en comparación con los de estados más avanzados (GEORGE, 1994; DE KLERK, 1997; SEENI, 2000).

Esta menor respuesta en los tejidos de estados fisiológicos más avanzados es concordante con la respuesta del material re-invigorado, el cual presentó un menor número de brotes por disco foliar en comparación con el material de invernadero. Nuevamente se observa que el proceso de poda utilizado en las plantas de 11 meses, no tuvo efecto en la capacidad morfogénica (CAPUANA, 1997). Es así como los resultados para *P. mollissima* también se referirán en términos de material re-invigorado.

Es probable que se requiera de un pre- acondicionamiento mediante podas severas y repetidas para una mejor respuesta ya que estos procedimientos pueden contribuir al crecimiento vegetativo de la planta debido a que inducen a la formación de brotes juveniles (CARRIZOSA, 1992; HARTMANN, 1997; GROSSMAN, 1998).

La respuesta con el material re- invigorado puede ser consecuencia del gradiente de juvenilidad el cual disminuye de la base al ápice de la planta. De esta manera, la condición juvenil de los meristemas del tallo desaparece a medida que aumenta la distancia entre el sistema radical y el meristemo apical, cuando la planta adquiere un estado fisiológico más avanzado.

Aunque las plantas de *P. mollissima*, comienzan su etapa reproductiva 2 años después de su germinación, muchos autores concuerdan en que la ausencia de floración en una planta no es siempre un indicador confiable de juvenilidad, por lo que es factible que el material re- invigorado exprese características propias de un tejido adulto (SALA, 1990; CARRIZOSA, 1992; HARTMANN, 1997; TAIZ, 1998).

### **6.2.1.2. Comparación entre los tratamientos de (*In vitro*, T5) vs. (Re- invigorado, T6)**

Los tratamientos evaluados, no presentaron diferencias significativas en los muestreos 1, 2, 3 y 4 (15, 30, 45 y 60 DDC) (Anexo 11; Tabla 13), siendo menores los promedios en número de brotes por disco foliar tanto para el material *in vitro* (0.00) como para el material re- invigorado (0.00- 0.07) (Figura 19; Tabla 10).

La menor capacidad de regeneración de brotes presentada con el material re- invigorado puede ser el resultado de un comportamiento recalcitrante típico de tejidos adultos. En condiciones *in vitro* la desdiferenciación de células de una planta adulta, puede inducir características juveniles, pero en algunas especies se ha observado que para que esta mayor capacidad se exprese, son necesarios subcultivos periódicos, para alcanzar un adecuado desarrollo y una sucesiva proliferación de brotes (PIERIK, 1987; GEORGE, 1994; KAWATA, 1995; CAPUANA, 1997; HARTMANN, 1997; SHRIVASTAVA, 1999).

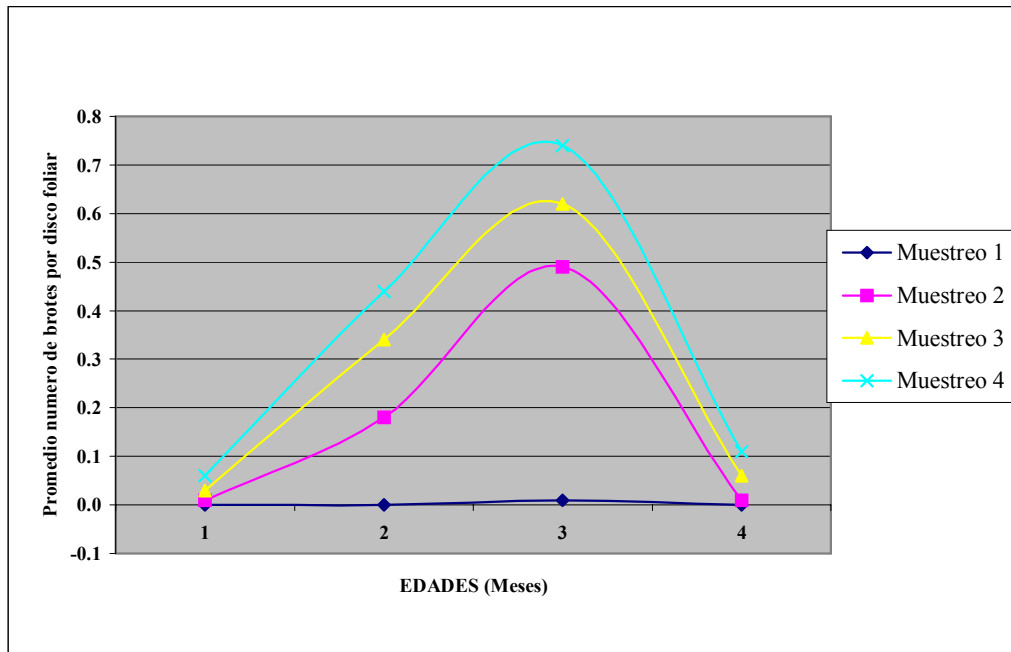
Aunque el material *in vitro*, presente células rejuvenecidas según DREW (1991) y FORERO (1999), su capacidad para desarrollar brotes, parece estar relacionada con aspectos de la morfología y procesos fisiológicos ya mencionados, lo cual da como resultado una respuesta morfogenética menor.

### **6.2.1.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 – T4)**

Con respecto al efecto de la edad, del material de invernadero, se encontraron diferencias significativas en el muestreo 2 (30 DDC), y altamente significativas para los muestreos 3 y 4 (45 y 60 DDC), ajustándose a la forma de respuesta cuadrática (Anexo 11; Tabla 14). Esta respuesta, se reflejó en los valores promedios del número de brotes por disco foliar a partir de plantas de 2 y 3 meses provenientes de material de invernadero (entre 0.18- 0.74) en contraste con los valores promedio a partir de los discos foliares de plantas de 1 y 4 meses (entre 0.00- 0.11) (Figura 20 y 21; Tabla 10).



**Figura 20.** Formación de brotes a partir discos foliares de *P. mollissima* provenientes de plantas de invernadero de 3 meses (T3).



**Figura 21.** Efecto de la edad en el promedio del número de brotes por disco foliar en *Passiflora mollissima*

El mayor número de brotes por disco foliar a medida que aumenta la edad del material de invernadero, puede ser atribuida al tamaño de las hojas utilizadas como fuente de los discos foliares, puesto que entre 1 y 2 meses de edad, su tamaño no sobrepasa los 5 mm<sup>2</sup> de longitud; este factor determina la respuesta en condiciones *in vitro*, ya que los discos foliares de mayor tamaño generalmente poseen un potencial de regeneración mas amplio, mientras que en los pequeños la viabilidad y capacidad regenerativa es muy baja, además son más susceptibles al daño mecánico en el momento de corte o herida, evento que probablemente ocurrió con el material obtenido de plantas de 1 mes de edad (T1) (PIERIK, 1987; VILLALOBOS, 1991).

De esta manera el mayor número de brotes se evidenció con plantas de 3 meses (T3), cuyos discos foliares presentaban una longitud entre 8 mm a 1 cm<sup>2</sup>, como lo reportado por HULME (1992) y PEREIRA (2000), quienes observaron que los discos entre 0.5 a 1cm<sup>2</sup>, presentaron una buena capacidad morfogénica.



La baja capacidad morfogenética observada en los discos foliares no solo fue influenciada por su tamaño, sino también por la formación de callo y los altos niveles de oxidación, desde el muestreo 1 (15 DDC), como se observó con plantas de invernadero de 1 (T1) y 4 (T4) meses de edad.

### **6.2.2. Número de raíces por disco foliar**

En trabajos previos, se ha reportado la aparición de raíces en forma espontánea, debido a los niveles endógenos de auxinas que se pueden encontrar en algunas especies de *Passiflora* (OVALLE, 1995; FORERO, 1999). Esto es contradictorio a lo observado en este trabajo, donde la respuesta en número de raíces por disco foliar fue 0.00

Las raíces al parecer se originan en zonas meristemáticas localizadas en regiones profundas cerca a la zona de vascularización del explante, por lo cual su proceso de inducción y formación probablemente es más demorado y necesita más tiempo, a diferencia de la formación de brotes presentada en las regiones meristemáticas marginales de las hojas (PEREIRA, 2000).

Además, el rápido proceso de oxidación, pudo ser un factor determinante en la respuesta de los discos foliares en cuanto al desarrollo de raíces, ya que la liberación de exudados al medio puede tener efectos inhibitorios sobre la organogénesis (SEENI, 2000).

### **6.2.3. Porcentaje de callo por disco foliar**

La formación de callo se observó a partir de los discos foliares de plantas provenientes de invernadero, *in vitro* y re- invigorado de *P. mollissima*. Según lo observado por FORERO (1999), el nivel endógeno de auxinas es suficiente para inducir su producción.

FORERO (1999), comparó sus resultados con los de OVALLE (1995), quien utilizó las mismas concentraciones de BAP (13.3  $\mu\text{M}$ ) y KIN (9.3 $\mu\text{M}$ ). OVALLE

(1995), observó que la formación de callo fue nula, en comparación con un alto porcentaje de brotes por disco foliar.

Si se tiene en cuenta que estos dos trabajos sirvieron de marco de referencia, y que las condiciones de los medios utilizados para la incubación de los discos foliares fueron las mismas, las diferencias son notables entre los tres reportes.

Estas discrepancias dentro de una misma especie, son influenciadas en cierta forma por la selección del genotipo utilizado, así como por su edad y su estado fisiológico, lo cual se refleja en la formación de brotes y en su capacidad de enraizamiento (BARKER, 1997; COZZA, 1997).

Según WANG (1980), WEYERS (1995), GEORGE (1996) y PEÑA (2000) la concentración óptima de citoquininas para lograr inducir una respuesta, depende del genotipo.

#### **6.2.3.1. Comparación entre los tratamientos de (Invernadero, T1 – T4) vs. (*In vitro*, T5 y Re- invigorado, T6)**

Los tratamientos evaluados presentaron diferencias altamente significativas en los muestreos 3 y 4 (45 y 60 DDC) (Anexo 12; Tabla 13), lo cual se evidenció en los porcentajes de callo por disco foliar con el material de invernadero (entre 25.00-54.50), a diferencia de los porcentajes con el material *in vitro* y re- invigorado (entre 15.25- 35.25) (Figura 22; Tabla 11).

#### **6.2.3.2. Comparación entre los tratamientos de (*In vitro*, T5) vs. (Re- invigorado, T6)**

Con este contraste se encontraron diferencias significativas para el muestreo 3 (45 DDC) y altamente significativas para el muestreo 4 (60 DDC) (Anexo 12; Tabla 13), lo cual se refleja en un mayor porcentaje de callo con el material re- invigorado, a diferencia del porcentaje obtenido con el material *in vitro* (Figura 22; Tabla 11).

La mayor respuesta con el material de invernadero, puede tener explicación en la biosíntesis de auxinas, la cual se presenta principalmente en las hojas jóvenes de la planta. Estas hormonas, luego de un proceso de corte, pueden ejercer una acción local a través de los tejidos vasculares de la hoja, lo cual induce a una división celular abundante, dando como resultado una mayor producción de callo (DE KLERK, 1997; ECHEVERRÍA, 2000).

Por otra parte, con el material re- invigorado, se presentó una menor formación de callo a partir de sus discos foliares diferente a la obtenida con el material de invernadero, al parecer por un potencial de división más bajo en las células adultas, atribuible a el estado fisiológico especializado.

Según lo reportado por ECHEVERRÍA (2000), la síntesis de compuestos fenólicos en los tejidos adultos inhibe el transporte polar de las auxinas, lo cual probablemente influye en el proceso de formación de callo a partir de los discos foliares provenientes del material re- invigorado.

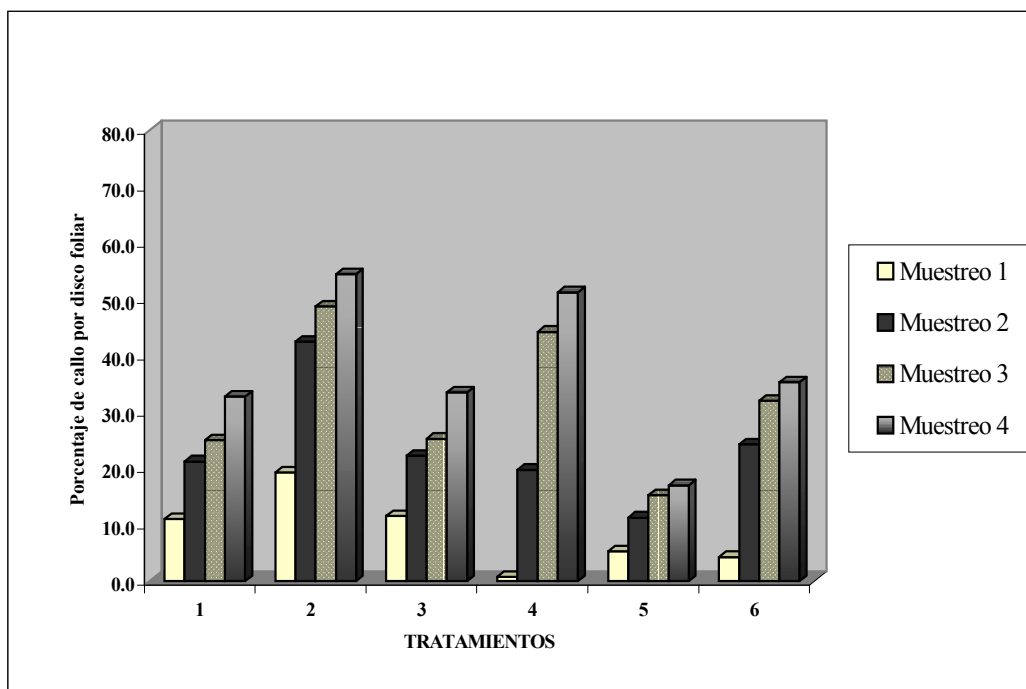
La menor producción de callo del material *in vitro*, con respecto al material de invernadero y al material re- invigorado, puede estar relacionada con la reducción del tejido vascular, siendo este el principal sitio de su formación, así como al tamaño de sus hojas, fuente de los discos foliares, las cuales por su tamaño pequeño son más propensas al daño mecánico y a una rápida oxidación (PREECE, 1990; COZZA, 1997; HARTMANN, 1997).

#### **6.2.3.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 – T4)**

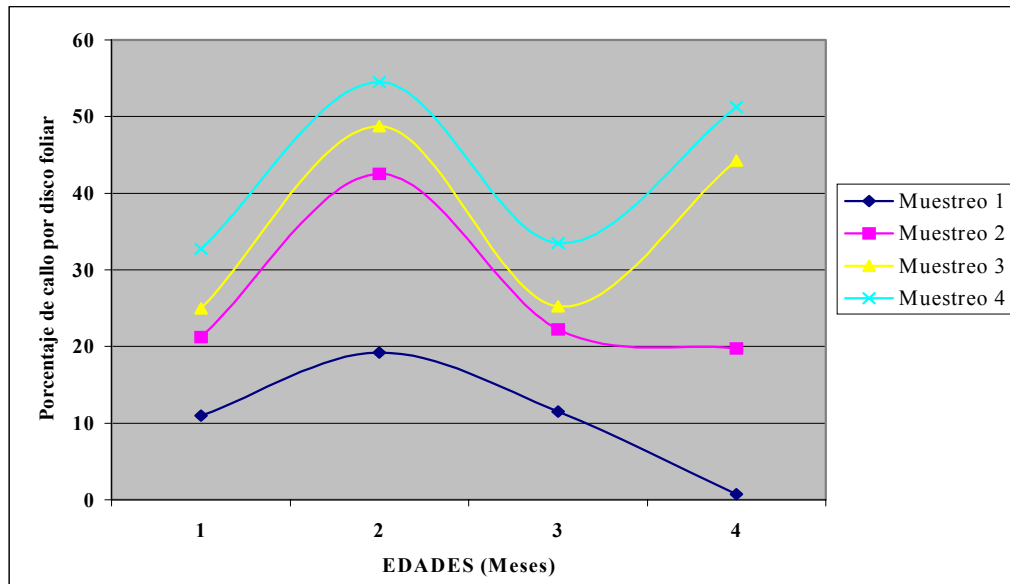
Con relación al efecto de la edad, del material de invernadero, se encontraron diferencias altamente significativas para los muestreos 3 y 4 (45 y 60 DDC), ajustándose a la forma de respuesta cúbica (Anexo 12; Tabla 14). Esto se observó en los mayores porcentajes de oxidación a partir de los discos foliares de plantas de 2 y 4 meses provenientes del material de invernadero (entre 44. 25- 54.50), comparados con los porcentajes de los discos foliares de plantas 1 y 3 mes de edad (entre 25.00- 33.50) (Figura 23 y 24; Tabla 11).

**Tabla 11.** Efecto de los tratamientos en el porcentaje de callo por disco foliar en *Passiflora mollissima*.

Muestreo Tratamiento	1	2	3	4
	%	%	%	%
T1	11.00	21.25	25.00	32.75
T2	19.25	42.50	48.75	54.50
T3	11.50	22.25	25.25	33.50
T4	0.75	19.75	44.25	51.25
T5	5.25	11.25	15.25	17.00
T6	4.25	24.25	32.00	35.25



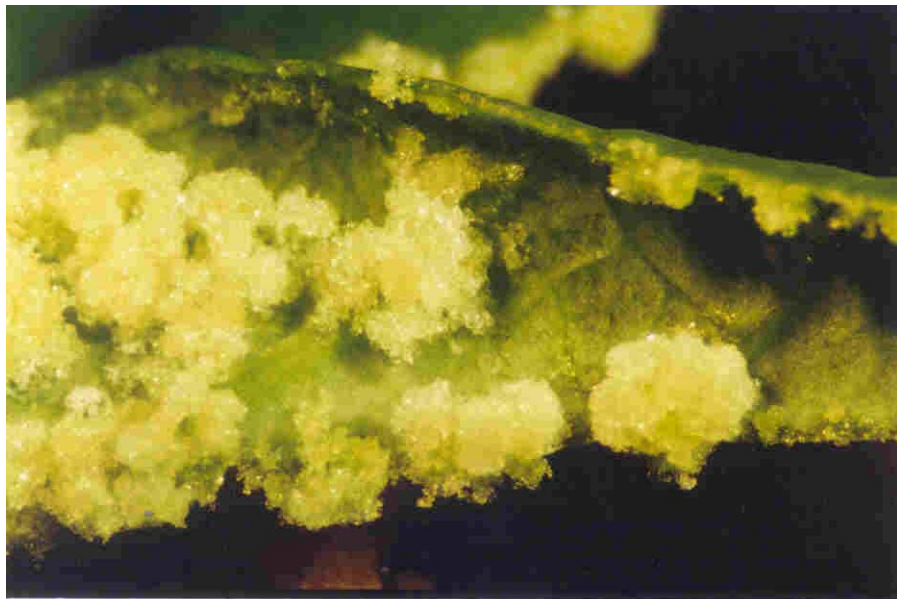
**Figura 22.** Efecto de los tratamientos en el porcentaje de callo por disco foliar de *Passiflora mollissima*



**Figura 23.** Efecto de la edad en el porcentaje de callo por disco foliar de *Passiflora mollissima*

La respuesta que se evidenció con el material de invernadero, fue probablemente influenciada por el tamaño de los discos foliares de plantas de 1 mes (T1), las cuales no sobrepasan los 5 mm<sup>2</sup> de longitud; este factor determinó la respuesta en condiciones *in vitro*, puesto que los explantes más grandes poseen generalmente un mayor potencial de regeneración, mientras que en los explantes pequeños la viabilidad y capacidad regenerativa es muy baja, además son más susceptibles al daño mecánico. En las condiciones evaluadas el mayor porcentaje de callo por disco foliar se observó a partir de plantas de 2 (T2) y 4 (T4) meses de edad (PIERIK, 1987; VILLALOBOS, 1991).

Esta mayor formación de callo en los discos foliares puede tener efectos negativos ya que al interactuar citoquininas y auxinas en el medio de cultivo *in vitro*, aumenta su producción, lo cual puede resultar en una disminución de la formación de brotes (ZIMMERMAN, 1994; DORNELAS, 1994; GUOHUA, 1998; FORERO, 1999).



**Figura 24.** Formación de callo a partir de discos foliares de *P. mollissima* provenientes de plantas de invernadero de 4 meses ( T4).

Esto es concordante con el hecho de que en los tratamientos donde se presentó una mayor formación de callo, la producción de brotes fue menor; mientras que cuando la formación de callos era menor se obtuvo mayor producción de brotes.

#### **6.2.4. Porcentaje de oxidación por disco foliar**

Los porcentajes de oxidación obtenidos pueden deberse en parte al procedimiento de desinfección aplicado, puesto que el uso del hipoclorito de sodio pudo acentuar el proceso de fenolización, ya que a pesar de ser usado en bajas concentraciones, es un desinfectante que puede ser tóxico para el material vegetal (FORERO, 1999).

También esta respuesta puede deberse a una condición de estrés mecánico en el momento de corte del explante (especialmente en especies perennes leñosas), por activación de las polifenol oxidasas, las cuales se encargan de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos a quinonas, que además de actuar contra la protección del tejido, pueden acumularse y ser altamente tóxicas, llevando a la muerte de los explantes (RAMIREZ, 1989; THORPE, 1991; FORERO, 1999; PANAI, 2000).

##### **6.2.4.1. Comparación entre los tratamientos de ( Invernadero, T1 – T4) vs. (*In vitro*, T5 y Re- invigorado, T6)**

Los tratamientos evaluados presentaron diferencias altamente significativas en el muestreo 4 (60 DDC) (Anexo 13; Tabla 13), siendo evidente un mayor porcentaje de oxidación por disco foliar con los materiales *in vitro* y re- invigorado (entre 82.75- 94.50), en comparación con el material de invernadero (entre 51.25- 80.25) (Figura 25; Tabla 12).

#### **6.2.4.2. Comparación entre los tratamientos de ( *In vitro*, T5) vs. (Re- invigorado, T6)**

Los materiales *in vitro* y re-invigorado no presentaron diferencias significativas durante los muestreos 1, 2, 3 y 4 (15, 30, 45 y 60 DDC)(Anexo; Tabla 13). Se observaron altos promedios de oxidación (entre 28.75- 94.50) (Figura 25 y 26; Tabla 12).

Sin embargo la oxidación con el material *in vitro*, comparado con la del material de invernadero puede deberse a la morfología de las hojas las cuales de acuerdo con lo descrito para otras especies presentan bajos contenidos de clorofila, citoplasma y un pobre desarrollo de los cloroplastos los cuales se observan planos y con desorganización del grana (PERECE, 1990; NGUYEN, 1999). Este desarrollo deficiente puede conducir a una pérdida rápida de lípidos, proteínas y clorofila cuando la hoja se separa de la planta, lo cual estimula un proceso de oxidación.

Estos resultados contrastan con los encontrados en anteriores trabajos con *Passiflora mollissima* como los realizados por FORERO (1999), donde el material *in vitro* tuvo una mejor respuesta, es decir un menor promedio de oxidación comparado con el material de invernadero.

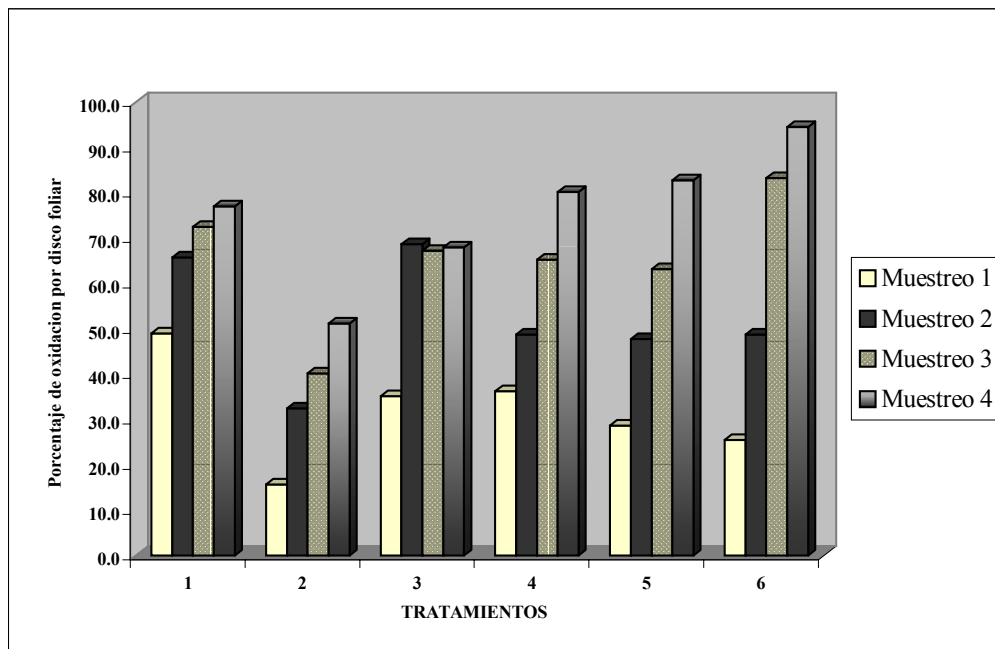
Estas respuestas contrastantes pueden ser atribuidas al efecto de la edad, si se tiene en cuenta que el material de invernadero utilizado por FORERO, (1999), con 8 meses edad presentó menor juvenilidad. Este resultado concuerda con el observado en el presente trabajo, en el cual el material re- invigorado de 11 meses de edad presentó mayor oxidación que el material de invernadero.

Probablemente el proceso de fenolización de compuestos que se presenta comúnmente en tejidos leñosos adultos es mayor con el material re- invigorado, lo cual promueve una rápida oxidación, ya que los fenoles son fácilmente oxidados a quinonas altamente tóxicas las cuales causan oscurecimiento del medio de cultivo y muerte de los discos foliares (BALLESTER, 1990; GONGORA, 1992; CAPUANA, 1997; HARTMANN, 1997; THOMAS, 1997).



**Tabla 12.** Efecto de los tratamientos en el porcentaje de oxidación por disco foliar en *Passiflora mollissima*.

Muestreo \ Tratamiento	1	2	3	4
	%	%	%	%
T1	49.00	65.75	72.50	77.00
T2	15.75	32.50	40.25	51.25
T3	35.25	68.75	67.25	68.00
T4	36.25	48.75	65.25	80.25
T5	28.75	47.75	63.25	82.75
T6	25.50	48.75	83.25	94.50



**Figura 25.** Efecto de los tratamientos en el porcentaje de oxidación por disco foliar en *Passiflora mollissima*.

La menor oxidación con el material de invernadero probablemente se debe a que el tratamiento con citoquininas puede retardar el envejecimiento prematuro de la hoja, ya que este regulador de crecimiento al parecer estimula la proliferación de cloroplastos e incrementa la síntesis de clorofila, lo cual favorece la permanencia de la coloración verde de la hoja. Aunque la aplicación de las citoquininas no previene la senescencia completamente, su efecto puede ser retardado por más tiempo (HODSON, 1994).

Los altos niveles de oxidación de los materiales *in vitro* y re- invigorado son causados por la falta de subcultivos periódicos ya que en trabajos donde se ha observado que este proceso es rápido, se sugiere prevenirlo realizando transferencias cada 3 a 4 semanas como mínimo. En especies como *Fragaria indica* (fresa), la transferencia de los explantes fue a las 24, 48 y 96 horas del cultivo *in vitro*, reportando que estos intervalos de tiempo detienen la liberación de compuestos fenólicos en el medio (THIES, 1992; BHATT, 2000; SEENI, 2000).



**Figura 26.** Oxidación de los discos foliares de *P. mollissima* provenientes de plantas de *in vitro* (T5).



**Figura 27.** Oxidación de los discos foliares de *P. mollissima* provenientes de plantas de invernadero de 3 mes (T3).

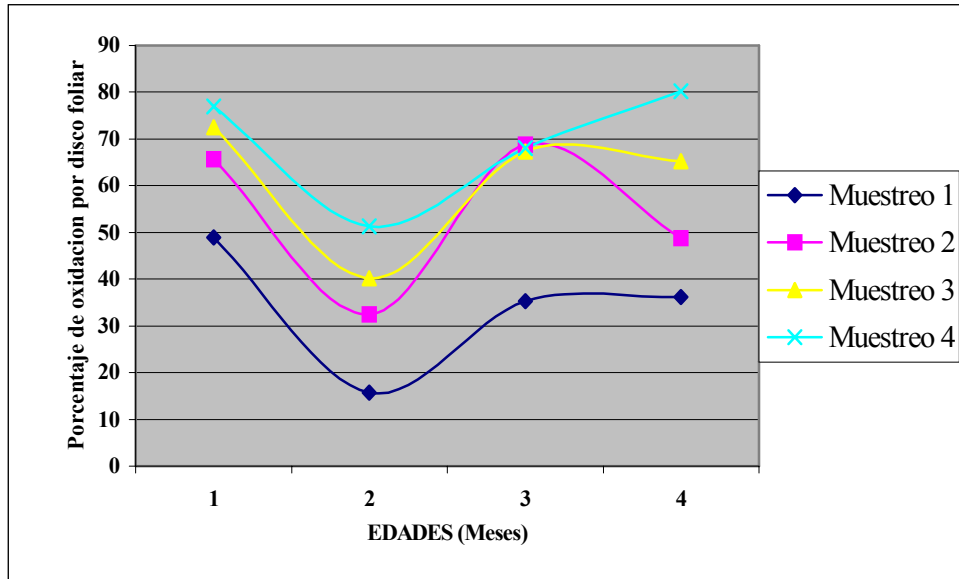
#### 6.2.4.3. Comparación entre las edades del material de invernadero (T1 – T4)

En relación con material de invernadero, el efecto de la edad, presentó diferencias altamente significativas para los muestreos 1, 2 y 3, (15, 30 y 45 DDC), ajustándose a la forma de respuesta cúbica, mientras que el muestreo 4 (60 DDC), mostró ser altamente significativo, ajustándose a la forma de respuesta cuadrática. Estas formas de respuesta reflejan los mayores porcentajes de oxidación a partir de los discos foliares de plantas de 1, 3 y 4 meses, en comparación con los porcentajes obtenidos a partir de los discos foliares de plantas de 2 mes provenientes del material de invernadero (Figura 27 y 28; Tabla 12).

Con el material de invernadero, se observó una mayor oxidación de los discos foliares de plantas de 1 mes (T1), lo cual puede ser atribuido al tamaño del explante, siendo mayor el área en un disco foliar de una planta de 2 meses (T2), puesto que los discos foliares más pequeños, pueden sufrir una mayor y mas rápida oxidación producida por el daño mecánico en el momento del corte (PIERIK, 1987; VILLALOBOS, 1991).

El aumento de la oxidación a partir de los discos foliares de plantas de 3 (T3) y 4 (T4) meses, permite sugerir que en los explantes más jóvenes es menor la síntesis de los precursores de fenoles (DE KLERK, 1997).

De otra parte, la permanencia en el mismo medio de cultivo *in vitro* durante los 4 muestreos (15, 30, 45 y 60 DDC), probablemente afecta la respuesta morfogénica de los discos foliares de plantas de invernadero de distintas edades. Esto es concordante con lo reportado en otros trabajos, donde la permanencia de los explantes en un mismo medio, acelera el proceso de oxidación y disminuye la organogénesis (ZAID 1987; SUDARSONO, 1991; GUOHUA, 1998). Por esta razón el, efecto del origen del material vegetal y la edad, en *P. mollissima*, no pudo ser evidenciado claramente, en contraste con lo descrito para *P. edulis*, en este mismo trabajo.



**Figura 28.** Efecto de la edad en el porcentaje de oxidación por disco foliar en *Passiflora mollissima*.

La utilización de antioxidantes como el ácido cítrico y el ácido ascórbico, en el proceso de desinfección del material vegetal podría reducir la oxidación de fenoles en el momento del corte o herida en los discos foliares, lo cual permitiría determinar una mejor capacidad morfogénica en esta especie (HARTMANN, 1997; PANAI, 2000).

**Tabla 13.** Resultados de los contrastes ortogonales y los polinomios en las variables evaluadas en *Passiflora mollissima*

Factor	Muestreo	Contrastes Ortogonal		Polinomios Ortogonales		
		Z1	Z2	Z3	Z4	Z5
				Lineal	Cuadrática	Cúbica
BROTE	M1	NS	NS	NS	NS	NS
	M2	NS	NS	NS	*	NS
	M3	**	NS	NS	**	NS
	M4	**	NS	NS	**	NS
CALLO	M1	NS	NS	*	*	NS
	M2	NS	NS	NS	*	*
	M3	**	*	NS	NS	**
	M4	**	**	NS	NS	**
OXIDAC.	M1	NS	NS	NS	NS	**
	M2	NS	NS	NS	NS	**
	M3	NS	NS	NS	*	**
	M4	**	NS	NS	**	NS

\*\* : menor a 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas

\* : menor a 0.05, son factores que tienen diferencias significativas

NS : mayor a 0.05, son factores que no tienen diferencias significativas

## 7. CONCLUSIONES

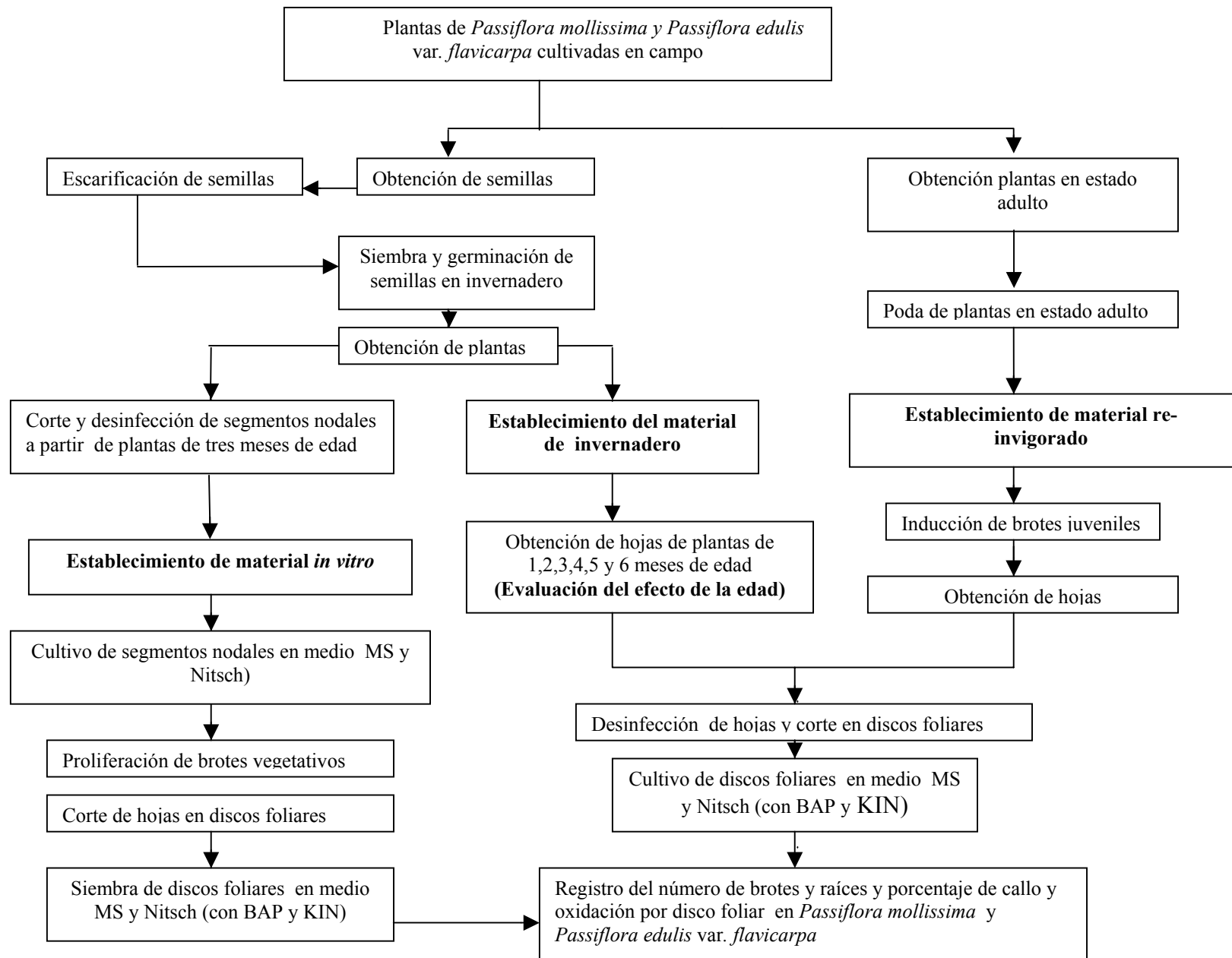
- Se evidenció la capacidad morfogenética de los discos foliares en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*.
- La utilización de discos foliares, no representa un método de regeneración de plantas eficiente y rápido en *Passiflora mollissima*.
- El material de invernadero responde mejor para la formación de brotes en *P. edulis* var. *flavicarpa* y *Passiflora mollissima*.
- La edad se constituyó en un factor importante para la capacidad morfogenética de *P. edulis* var. *flavicarpa*.
- Los discos foliares de plantas de invernadero de 1 y 2 meses de edad, son los explantes más adecuados para la regeneración de plantas de *P. edulis* var. *flavicarpa* por cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.
- El pre- acondicionamiento por medio de la poda del material de 11 meses de edad, no permitió evidenciar una buena capacidad morfogenética, a partir de discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa* y *Passiflora mollissima*, por lo cual no se obtuvo material con características juveniles.
- Adicionalmente al efecto del origen del material y la edad, la ausencia de subcultivos periódicos, el proceso de oxidación y el tamaño del explante tuvieron un efecto sobre la capacidad morfogenética del material de invernadero de *Passiflora mollissima*.

- Se logró obtener plantas completas a partir de discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa* cultivados *in vitro*.



## 8. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros tipos de explantes que evidencien una mejor capacidad morfogénica para *P. mollissima*
- Evaluar el uso de antioxidantes tales como el ácido ascórbico y el ácido cítrico, en el proceso de desinfección de discos foliares de *P. edulis* var. *flavicarpa* y *P. mollissima* que disminuyan la liberación de compuestos fenólicos en el medio de cultivo *in vitro*.
- Evaluar el efecto de diferentes tiempos de subcultivos que estimulen una mejor proliferación de brotes a partir de discos foliares de *P. mollissima*
- Evaluar el efecto de podas repetidas en material adulto de *P. edulis* var. *flavicarpa* y *P. mollissima* que promuevan la expresión de características juveniles en este material.



**Figura 3.** Diagrama de flujo de la metodología utilizada para el desarrollo de la investigación

## 10. BIBLIOGRAFIA

**AMUGUNE, N., GOPALAN, H., & BYTEBIER, B.** 1993. Leaf Disc Regeneration of Passion Fruit. **African Crop Science Journal** . 1 (2), 99- 104.

**ARTECA, R.** 1996. Plant Growth Substances. Principles and Applications. Chapman and Hall, New York. USA.

**AZCON- BIETO, J. FLECK, I., ARANDA, X., & XAMBÓ, A.** 2000. Fotosíntesis en un ambiente cambiante. En Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon- Bieto J., Talón M. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 203- 216.

**BABU, K., ANU, A., REMASHREE, A., & PRAVEEN, K.** 2000. Micropropagation of curry leaf tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 61: 199-203

**BALLESTER, A., SANCHEZ, M., SAN-JOSE, M., VIEITEZ, F., & VIEITEZ, A.** 1990. Development of Rejuvenation Methods for *in vitro* Establishment, Multiplication and Rooting of Mature Trees. In: Plant Aging. Basic and Applied Approaches. R. Rodríguez., R. Tamés and D. Durzan. NATO ASI Series. Series A, Life Sciences; Vol. 186. Plenum Press, New York. USA. pp 43- 49.

**BANDURSKI, R.** 1993. Auxinas. En: Fisiología y Bioquímica Vegetal. Azcon- Bieto. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 285- 300

**BARKER, M., PIJUT, P., OSTRY, M., & HOUSTON D.** 1997. Micropropagation of juvenile and mature american beech. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 51: 213- 213

**BERNAL, H.Y., & CORREA, J. E.** 1998. Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello. Tomo 12. Editorial Guadalupe Ltda. Santa Fé de Bogotá. Colombia. pp 325- 350.

**BHATT, I., & DHAR, U.** 2000. Micropropagation of Indian wild strawberry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 60: 83- 88

**BRAIDG, H.** 1991. Otras *Passifloras* Promisorias. Memorias. Primer Simposio Internacional de *Passifloras*. Palmira. Colombia. pp 240-241.

**BROWN, D., & THORPE, T.** 1986. Plant Regeneration by Organogenesis. In: Cell Culture and Somatic Cell genetic of Plants. Academic Press Inc. Vol. 3. pp 49-61.

**BRUNT, A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M., & GIBBS, A.** 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version :20<sup>th</sup> 1996. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/videl/>

**BURCH, L., & MCGAW, B.** 1993. Citoquininas. En: Fisiología y Bioquímica Vegetal. Azcon- Bieto. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 319-326.

**CAICEDO, G., VARGAS, H., & GAVIRIA, J.** 1991. Evaluación de *Xilocopa* spp. HYMENOPTERA: ANTHORHORIDAE- como Polinizadores en el Cultivo de Maracuyá *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. Degener. Memorias. Primer Simposio Internacional de *Passifloras*. Palmira. Colombia. pp 169- 171.

**CAICEDO, G., & GONZALEZ, V.F.** 1997. La Curuba de Castilla, un Frutal Andino. *Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey. Notas Divulgativas. Jardín Botánico José Celestino Mutis. Bogotá. Colombia. 21 p.

**CAMACHO, G.** 1991. Estudio del Crecimiento y Desarrollo de 2 tipos de Curuba. *Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey. Memorias. Primer Simposio Internacional de *Passifloras*. Palmira. Colombia. pp 85- 87.

**CAMPO, T.** 1991. Biotecnología y Propagación. Memorias. Primer Simposio Internacional de *Passifloras*. Palmira. Colombia. pp 241- 242.

**CANCINO, G.** 2001. Naringenin- enhanced *Agrobacterium* mediated transformation in *Passiflora*. Thesis *Doctoral*. University of Nottingham. Biological Sciences. Nottingham. England. 130 p.

**CANCINO, G., HODSON, E.** 1994. Cultivo de Tejidos y Micropropagación en “maracuyá” . *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. Degener. **Tablero –Revista del Convenio Andrés Bello.** 18 (47), 81-83.

**CAÑAS, M.** 1993. Metodologías *in vitro* de vegetales. Ediciones UIS. Bucaramanga. Colombia. 289 p.

**CARBÓ- RIBAS, M., & GONZÁLEZ- MELER M.** 2000. Fisiología de la respiración de las plantas. En Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon- Bieto J., Talón M. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 217 –234.

**CASSELLS, A.** 1991. Problems in tissue culture: culture contaminacion. In : Micropropagation technology and application. P. Debergh & R. Zimmerman. Kluwer Academic Publishers. USA. 479 p.

**CAPUANA, M., & GIANNINI, R.** 1997. Micropropagation of young and adult plants of cypress (*Cupressus sempervirens* L.). **Journal of Horticultural Science** 72 (3) 453- 460.

**CARRIZOSA, M., RAMIREZ, C., GUERRERO, E., SANTAMARIA, L., & HODSON, E.** 1992. Cultivo de Tejidos para la Propagación y Mejoramiento de Especies Forestales. III Congreso. La Investigación en la Universidad Javeriana. pp 547-559.

**CASTAÑO, R.** 1976. *Passifloras*. En: Frutales. Programa. Nacional de Hortalizas y Frutales. ICA. Segunda Edición. pp 364-395.

**CHACON, A. C.** 1988. El cultivo de Maracuyá en el Valle del Cauca. *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. Degener. Memorias. Primer Concurso Nacional de Frutales de Clima Frío. Centro Nacional Investigación Palmira. Colombia. pp 76-89.

**CHACON, A. C.** 1991. El cultivo de Maracuyá. *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. Degener. Memorias. Primer Simposio Internacional de *Passifloras*. Palmira. Colombia. pp 146- 152.

**CHRISTIANSON, M.** 1987. Causal Events In Morphogenesis. In: Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss, Inc. pp 45- 55.

**CIVETTA, A.** 1984. La curuba: su delta tecnológico. En: Tecnología. Revista del Instituto de Investigaciones Tecnológicas. No 152. Bogotá .Colombia. pp 31- 35.

**CLARK, S. E.** 1997. Organ Formation at the vegetative shoot meristem. **Plant Cell** 9, 1067-1076.

**COPPENS, G., SEGURA, S. D., HODSON, E., & GONGORA, G. A.** 1997. Les Fruits de la Passion. In: L'amélioration des Plantes Tropicales. Editeurs Scientifiques.

**COZZA, R., TURCO, D., BATI, C., & BITONTI,, M.** 1997. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 51: 215- 223

**CRFG.** 1996. Passion Fruit. *Passiflora edulis/ P. edulis flavicarpa*. <http://www.crfg.org/pubs/ff/passionfruit.html>.

**CRONQUIST, A.** 1978. The Evolution and Classification of Flowering Plants. Allen Press. New York Botanical Garden. USA. 396 p.

**DEBERGH, P. & READ, P.** 1991. Micropropagation. In : Micropropagation Technology and Application. P. Debergh & R. Zimmerman. Kluwer Academic Publishers. USA. 479 p.

**DE KLERK, G., ARNHOLDT- SCHMITT, B., LIEBEREI, R., & NEUMANN, K.** 1997. Regeneration of Roots, Shoots and Embryos: Physiological, Biochemical and Molecular aspects. **Biologia Plantarum** 39 (1): 53- 66.

**DE LAS RIVAS, J.** 2000. La luz y el aparato fotosintético. En Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon- Bieto J., Talón M. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 131- 154.

**DELGADO, C. H.** 1988. El Cultivo de Curuba. Memorias. Primer Concurso Nacional de Frutales de Clima Frío. Centro Nacional Investigación Palmira. Colombia. pp 13- 30.

**DESAI, H., & MEHTA, R.** 1985. Changes in Polyamine levels during Shoot formation, Root formation and Callus induction in Cultured *Passiflora caerulea*- *alato*- leaf disc. **J. Plant Physiol.** 119, 45- 54.

**DINKEL, A., & KLEINSCHMIT.** 1990. Aging in Tree Species: Present Knowledge. In: Plant Aging. Basic and Applied Approaches. R. Rodríguez., R. Tamés and D. Durzan. NATO ASI Series. Series A, Life Sciences; Vol. 186. Plenum Press, New York. USA. pp 51- 63.

**DIXON, A., & PAIVA, N.** 1995. Stress- induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell.** 7: 1085- 1097.

**DORNELAS, M., & VIEIRA, M.** 1993. Plant Regeneration from Protoplast Cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener., *P. Amethystina* Mikan. and *P. Cincinnata* Mast. . **Plant Cell Reports** 13: 103- 106.

**DORNELAS, M., & VIEIRA, M.** 1994. Tissue Culture Studies on Species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 36: 211- 217.

**DREW, R.** 1991. *In vitro* Culture of Adult and Juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 26: 23- 27

**DURZAN, D.** 1984. Special Problems: Adults vs. Juvenile Explants, Chap. 17, In: "Handbook of Plant Cell Culture, Crop Species". W. Sharp, D. Evans, P. Ammirato, and Y. Yamada, Eds., MacMillan Publishing Co., New York. USA. pp 471-503.

**DURZAN, D.** 1990. Adult vs. Juvenile Explants: Directed Totipotency. In: Plant Aging. Basic and Applied Approaches. R. Rodríguez., R. Tamés and D. Durzan. NATO ASI Series. Series A, Life Sciences; Vol. 186. Plenum Press, New York. USA. pp 19- 25.

**D'UTRA VAZ, F., DOS SANTOS, A., MANDERS, G., COCKING, E., DAVEY, M., & POWER, J.** 1993. Plant Regeneration from leaf Mesophyll Protoplast of the Tropical Woody Plant, Passionfruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener.): The Importance of the Antibiotic Cefotaxime in the Culture Medium. **Plant Cell Reports.** 12: 220- 225.

**DVE. EQUIPO DE ESPECIALISTAS AGRONOMOS.** 1989. El Gran Libro Ilustrado de la Poda de los Árboles Frutales . Editorial de Vecchi, S. A. España. pp 11-32.

**ECHEVERRÍA, M., BRAVO, J., & ARNAO, M.** 2000. Auxinas. En Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon- Bieto J., Talón M. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 305- 324.

**ECHEVERRIGARAY, S., FRACARO, F., ANDRADE, L., BIASIO, S., & SERAFÍN, A.,** 2000. *In vitro* shoot regeneration from leaf explants of Roman Chamomile. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 60: 1-4.

**ERASO, B. V.** 1985. El Cultivo de la Curuba. Documento. Tibaitata. Mosquera. Colombia. 18 p.

**ESCOBAR, L. A.** 1981. Experimentos Preliminares en la Hibridación de Especies Comestibles de *Passiflora*. **Actualidades Biológicas** 10 (38), 103- 111.

**ESCOBAR, L. A.** 1988. Flora de Colombia. PASSIFLORACEAE. No 10 Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia Bogotá, Colombia 138 p.

**ESCOBAR, L. A.** 1992. La Sistemática y la Evolución de las *Passifloras*. Memorias. Primer Simposio Internacional de *Passifloras*. Palmira. Colombia. pp 51- 54.

**FARIA, J., & SEGURA, J.** 1997. Micropropagation of Yellow Passionfruit by Axillary Bud Proliferation. **Hortscience** 32 (7). 1276- 1277

**FAURE, O., DIEMER, F., MOJA, S., & JULLIEN, F.** 1998. Mannitol and Thidiazuron improve *in vitro* shoot regeneration from spearmint and peppermint leaf disks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 52: 209- 212

**FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA.** 1987. Curuba. En: Producción, Manejo y Exportación de Frutas Tropicales. Reunión Técnica de la Red Latinoamericana de Agroindustria de Frutas Tropicales. Manizales. Colombia. pp 69- 72.



**FORERO, A.** 1999. Evaluación de Algunas Condiciones para la Transformación Genética de la Curuba de Castilla (*Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey) usando *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis de Pregrado Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Unidad de Biotecnología vegetal. Bogotá. Colombia. 138 p.

**FRANCLET, A., BOULAY, F., BEKKAOUI, F., FOURET, B., & WALKER, N.,** 1987. Rejuvenation. Cell and Tissue Culture in Forestry. Volume 1. General Principles and Biotechnology. J. Bonga & D. Durzan. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp 232 – 248.

**GARATE, A., & BONILLA I.** 2000. Nutrición mineral y producción vegetal. En Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon- Bieto J., Talón M. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 113- 130

**GARCIA, H.** 1992. Flora Medicinal de Colombia. Editorial Tercer Mundo Editores. Tomo 2. Santa Fé de Bogotá. Colombia. pp 261-264.

**GASPAR, T., KEVERS, C., PENEL, C., & GREPPIN, H.** 1996. Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture. **In Vitro Cell. Dev Biol- Plant** 32:272-289.

**GEORGE, F.** 1996. Plant propagation by tissue culture. Alden press Oxford. Great Britain. 759 p.

**GEORGE, M., & TRIPEPI, R.** 1994. Cytokinins, donor plants and time in culture affect shoot regenerative capacity of American elm leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 39: 27- 36.

**GONGORA, G., CANCINO, G., & HODSON, E.** 1992. Programa de biotecnología en especies frutales promisorias. III Congreso. La Investigación en la Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. pp 565- 570.

**GONGORA, G., HODSON, E., & FORERO, A.** 2000. “Genetic transformation of economically Passion Fruits in Colombia”. 6<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology. Quebec, Canadá.

**GOURICHON, G., SALLANON, H., & COUDRET, A.** 1996. Effects of sucrose, agar, irradiance and CO<sub>2</sub> concentration during the rooting phase on the acclimation of *Rosa hybrida* plantlets to *ex vitro* conditions. **Photosynthetica**. 32 (2): 263- 270.

**GOUVEIA, J.** 1987. El Cultivo de maracuyá. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. FAO. Resumen de las Conferencias dictadas durante la reunión celebrada en Manizales. Colombia. pp 79-90.

**GRAJALES, J. A.** 1991. Posibilidades de Mercado Internacional para Jugos Procesados Tropicales Memorias. Primer Simposio Internacional de *Passifloras*. Palmira. Colombia. pp 191- 195.

**GROSSMAN, Y., & DEJON, T.** 1998. Training and pruning system effects on vegetative growth potential, light interception, and cropping efficiency in peach trees. **J. AMER. SOC. HORT. SCI.** 123 (6): 1058- 1064.

**GUOHUA, M.** 1998. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 54: 1-7.

**HACKETT, W.** 1987. Juvenility and Maturity. In: Cell and tissue culture in forestry. Volume 1. General Principles and Biotechnology. J. Bonga & D. Durzan. 1987. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands. 422 p.

**HARTMANN, H., KESTER, D., & DAVIES, F.** 1997. Plant Propagation. Principles and Practices. Sixth Edition. Prentice Hall. New Jersey. USA. 770 p.

**HEYWOOD, V.H.** 1985. Las Plantas con Flores. Edición en Español. Editorial Reverté. S.A. España. pp 98- 99.

**HODSON, E., & CANCINO, G.** 1992. Micropropagación de la “Curuba” *Passiflora mollissima* (H. B. K.) Bailey (Passifloraceae). **Cuaderno Divulgativo # 27**. Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Santa fe de Bogotá. Colombia. 45 p.

**HODSON, E., GONGORA, G., CANCINO, G., OTONI, W., DAVEY, J.** 1994. Plant Regeneration from Explants of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. Degener. Unidad de Biotecnología Vegetal. In Memories: International Symposium of Plant Genetic Engineering. La Habana, Cuba.

**HODSON, E., GONGORA, G., DAVEY, R., POWER, B., NIBLETT, L., & VARGAS, J.** 1999. "Agrobacterium- mediated transformation of *Passiflora edulis* for Potyvirus resistance". In Memories: International Symposium of Plant Genetic Engineering. La Habana, Cuba.

**HODSON, E., & RODRIGUEZ, C.** 1986. Informe final de adaptación de técnicas de cultivo de tejidos vegetales para la corporación autónoma regional de las cuencas de los ríos Bogotá, Ubaté y Suárez, C.A.R. Unidad de Biología Vegetal. Departamento de Biología Pontificia Universidad Javeriana 180 p.

**HULME, J., HIGGINGS, E., & SHIELDS, R.** 1992. An efficient genotype-independent method for regeneration of potato plants from leaf tissue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 31: 161- 167.

**HUYLENBROECK., J. HUYGENS & DEBERGH., P.** 1995. Photoinhibition during acclimatization of micropropagated spathiphyllum "petite" plantlets. **In vitro Cell. Dev. Biol. Plant** 31: 160- 164.

**IDARRAGA, H.** 1991. Parámetros de Rendimiento y Calidad del Maracuyá como Materia Prima Industrial. Memorias. Primer Simposio Internacional de *Passifloras*. Palmira. Colombia. p 207-211.

**IGAC.** 1996. Diccionario Geográfico de Colombia. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Colombia. pp 109., 1174., 2029.

**IJJÁSZ, I., & EMOKE, S.** 1999. Maracuyá (Fruto de la Pasión). Editorial Panamericana. Santa Fé de Bogotá. Colombia. 48 p.

**JARRET, R., & LITZ, R.** 1991. Regeneración de Plantas en Cultivo de Tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis . En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Roca W., Mroginski I. CIAT. Cali. Colombia. pp 144- 149.

**JENKS, M., KANE, M., & McCONNELL, D.** 2000. Shoot organogenesis from petiole explants in the aquatic plant *Nymphoides indica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 63: 1- 8.

**KANTHARAJAH, A. & DODD, W.** 1990. *In vitro* Micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple Passionfruit). **Annals of Botany**. 65: 337- 339.

**KAWATA, K., USHIDA, C., KAWAI, F., KANAMORI, M., & KURIYAMA, A.** 1995. Micropropagation of Passionfruit from Subcultured Multiple Shoot Primordia. **J. Plant Physiol**. 174: 281- 284.

**KENDE, H., & ZEEVAART, J. A.** 1997. The Five “Classical” Plant Hormones. **Plant Cell** 9, 1197- 1210.

**KERSTETTER, R. A., & HAKE, S.** 1997. Shoot Meristem Formation in Vegetative Development. **Plant Cell** 9, 1001- 1010.

**KILLIP, E. P.** 1938. The American Species of Passifloraceae. Field Museum of Natural History. Vol 19 Part 1 and 2. Chicago USA. 613 p.

**KIRDMANEE, C., KITAYA, Y., & KOZAI, T.** 1995. Effects of CO<sub>2</sub> Enrichment and Supporting Material *In Vitro* on Photoautotrophic Growth of Eucalyptus Plantlets *In Vitro* and *ex vitro*. **In vitro Cell. Dev. Biol.** Plant 31: 144- 149.

**KRIKORIAN, A.** 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Roca W., Mroginski I. CIAT. Cali. Colombia. pp 95- 127.

**KUMAR, S., SARKAR, A., & KUNHIKANNAN, C.** 1998. Regeneration of plants from leaflet explants of tissue culture raised safed siris (*Albizia procera*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 54: 137- 143.

- LAMBERS, H., CHAPIN, F., & PONS T.** 1998. Plant physiological ecology. Ed. Spring- Verlag New. York. USA.
- LANE, W., IKETANI, H., & HAYASHI, T.** 1998. Shoot Regeneration from Culture Leaves of Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 54: 9-14.
- LAUX, T., & JÜRGENS, G.** 1997. Embryogenesis: A new start in life. **Plant Cell** **9**, 989- 1000.
- LEMOS, E., & BLAKE, J.** 1996. Micropropagation of juvenile and adult *Annona squamosa* . **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 46: 77- 79.
- LIN, H., DE JEU, M., & JACOBSEN E.** 1998. Formation of shoots from leaf axils of *Alstroemeria*: The effect of the position on the stem. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 52: 165- 169.
- LINDSEY., K & JONES., M.** 1992. Biotecnología vegetal agrícola. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España. 274 p.
- LITZ, R., & JARRET, R.** 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Roca W., Mroginski L. CIAT. Cali. Colombia. pp 143- 173.
- LUIS, A., & GUARDIOLA, J.** 2000. Transporte en el floema. En Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon- Bieto J., Talón M. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 65- 82.
- MANDERS, G., OTONI, W., D'UTRA VAZ, F., BLACKHALL, N., POWER, J., & DAVEY, M.** 1994. Transformation of Passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Report**. 13 (12), 697- 702.
- MARTINEZ, R.** 1980. La Curuba, recomendaciones para sembrarla. Distrito de Transferencia de Tecnología No 3. Fusagasuga. Colombia. 18 p

**MARTINEZ, R., & MARTINEZ, R.** 1997. Diseño de experimentos y análisis de datos estándar y no estándar. 1ra Edición. Ed. Guadalupe. Ltda. Bogotá. Colombia. 479 p.

**MATILLA, A.** 2000. Germinación y dormición de las semillas. En Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon- Bieto J., Talón M. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 435- 450.

**MAZZANI, E., PEREZ, D., & PACHECO, W.** 1999. Distribución y uso de especies del género *Passiflora* (Passifloraceae) en las zonas altas de los estados Lara y Falcón, Venezuela. **Plant Genetic Resources Newsletter**.119: 24- 32.

**MEDRANO, H., & FLEXAS, J.** 2000. Fijación del dióxido de carbono y biosíntesis de fotoasimilados. En Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon- Bieto J., Talón M. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 173- 186.

**MONCOUSIN, CH.** 1991. Rooting of microcuttings: general aspects. *Acta Horticulturae* 289: 301- 327.

**MORAN ROBLES, M.** 1978. Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. mollissima* Bailey. *Fruits*. 233 (10): 693- 699.

**MORTON, J.** 1987. Passionfruit. In: *Fruits of warm climates*. Miami. USA. pp 320-328.

**MROGINSKI, L., & ROCA, W.** 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Capítulo 2. En: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Roca W., Mroginski I. CIAT. Cali. Colombia. pp 19- 41.

**NAGY., S & SHAW., P.** 1980. *Tropical and Subtropical Fruits Composition, Properties and Uses*. The Avi Publishing Company. Wesport, Connecticut. U.S.A. 518 p.

**NEWBIGIN, E., SMYTH, D., & CLARKE, A.** 1995. Understanding and Controlling Plant Development. **Tibtech** (13): 338- 343.

NGUYEN., Q. KOZAI., T. NIU., G. & NGUYEN., U. 1999. Photosynthetic characteristics of coffee (*Coffea arabusta*) plantlets *in vitro* in response to different CO<sub>2</sub> concentrations and lights intensities. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 55: 133-139.

NIKAM, T., & SHITOLE, M. 1999. *In vitro* culture of Safflower L. Cv. Bhima: initiation, growth optimization and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 55: 15- 22.

OTERO, C. L. 1984. El Cultivo de Curuba. Revista **ESSO**. Agrícola. Vol. XLI. No 1. pp11- 17.

OTERO, C. L. 1984. El Cultivo de Maracuyá. Revista **ESSO**. Agrícola. Vol. XLI. No 1. pp 18- 24.

OVALLE, R., HODSON, E., & GONGORA, G. 1998. Plant Regeneration of Banana Passion Fruit (*Passiflora mollissima* (HBK) Bailey from Leaf Explants. En: IX International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Jerusalén. Israel. Junio 14- 19.

OWENS, L., & EBERTS, D. 1992. Sugarbeet Leaf Disc Culture: an improved procedure for inducing morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 31: 195-201.

PANAIA, M., SENARATNA, T., BUNN, E., DIXON, K., & SIVASITHAMPARAM, K. 2000. Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 63: 23-29.

PAYAN, F., & MARTIN. F. 1975. Barriers to the Hybridization of *Passiflora* Species. **Euphytica**. 24 (1975): 709- 716.

PEÑA, C. 2000. Adaptación de técnicas para la micropropagacion a partir de meristemas de *Vitis vinifera* L. Cv Muller Thurgau (Riesling x Sylvaner). Universidad Javeriana. Bogotá. Tesis de Pregrado. 127 p.

**PEREIRA, A., BERTONI, B., APPEZZATO- DA- GLORIA, B., ARAUJO, A., JANUARIO, A., LOURENCO, M., & FRANCA, S.** 2000. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 60: 47-53..

**PHILLIPS, W., & CHILTON, T.** 1995. Biology. Revised Edition . Oxford University Press. Printed in at The Alden Press, Oxford. Great Britain. 568 p.

**PIERIK, R.** 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. Netherlands. 344 p.

**POETHIG, R. S.** 1997. Leaf Morphogenesis in Flowering Plants **Plant Cell** 9, 1077-1087.

**PREECE, J., & SUTTER, E.** 1990. Acclimatización of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Micropropagation. Tehnology and Application. P. Debergh and R. Zimmerman. Kluwer Academic Publishers .Dordrecht., The Netherlands. 484 p.

**(PIRB) PROGRAMA INTERCIENCIA DE RECURSOS TECNOLOGICOS.**1984. *Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey. Editora Guadalupe. Bogotá. Colombia. 119- 124.

**PRESTAMO, G., & MANZANO, P.** 1993. Peroxidases of Selected Fruits and Vegetables and the Possible Use of Ascorbic Acid as an Antioxidant. *HortScience* 28 (1) : 48-50.

**QUESADA, M., & VALPUESTA, V.** 2000. Juvenilidad, senescencia y abscisión. En *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Azcon- Bieto J., Talón M. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 451- 464.

**RAMIREZ DEL CASTILLO, A.** 1989. Estudios Preliminares para la Propagación clonal *in vitro* de Mora (*Rubus glaucus*). Facultad Agronomía. Universidad Nacional. Tesis de Maestría. Bogotá Colombia. pp15- 23.

**RAVEN, H., EVERT, R., & EICHHORN.** 1999. Biology of plants. Six edition. W. Freeman and Company Worth Publishers. New York. USA. 944 p.



**RECHE, J.** 1995. Poda de Hortalizas en Invernadero. Hojas Divulgativas. I. G. Saljen. S. A. Madrid. España.. pp 2-5.

**ROCA, W., & MROGINSKI, L.** 1991. Establecimiento de un laboratorio de cultivos de tejidos vegetales. Capitulo 1. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Roca W., Mroginski I. CIAT. Cali. Colombia. pp 1- 19.

**ROLDAN, M., & ZAPATER, J.** 2000. Floración y su control ambiental. En Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon- Bieto J., Talón M. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 403- 418.

**ROYAL BOTANIC GARDENS KEW.** 2000. Passion Flowers and Passion Fruit. [http:// www.rbgekew.org.uk/ksheets/passion.html](http://www.rbgekew.org.uk/ksheets/passion.html). 3 p.

**SALA., REY, C., & RODRIGUEZ, R.** 1990 Recovery of Transient Juvenile Capacities During Micropropagation of Filbert. In: Plant Aging. Basic and Applied Approaches. R. Rodriguez., R. Tamés and D. Durzan. NATO ASI Series. Series A, Life Sciences; Vol. 186. Plenum Press, New York. USA. pp 27- 36

**SALISBURY., F. & ROSS., C.** 1994. Fisiología Vegetal. Grupo editorial Iberoamericana. México. México. 759 p.

**SCORZA, R., & JANICK, J.** 1976. Tissue culture in Passiflora. In: Proceedings of the 24<sup>th</sup> congress of the Am. Soc. Hort Sci Tropical region (Mayaguez Puerto Rico). Am Soc Hort Sci Virginia pp179- 183.

**SCORZA, R., & JANICK, J.** 1980. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa*. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 105 (6): 892- 897.

**SEENI, S., LATHA, P.** 2000. *In vitro* multiplication and ecorehabilitation of the endangered Blue Vanda. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 61: 1 – 8.

**SEGURA, J.** 1993. Morfogénesis *in vitro* . En: Fisiología y Bioquímica Vegetal. Azcon- Bieto. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 381- 392.

**SEGURA, J.** 2000. Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. En Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon- Bieto J., Talón M. Interamericana- Mcgraw Hill, Madrid. España. pp 285- 304.

**SHRIVASTAVA, N., & RAJANI, M.** 1999. Múltiple shoot regeneration and tissue culture studies on *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. **Plant Cell Reports** 18: 919-923.

**SMITH, R.** 1992. Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. Academic Press, Inc. San Diego. USA. 170 p.

**SOSA, J.** 1988. Sobre Poda de Setos. Ministerio de Educación Superior. La Habana. Cuba. pp 3—11.

**SRISKANDARAJAH., S & GOODWIN P.** 1998. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 53: 1 – 11.

**SUDARSONO, & GOLDY, R.** 1991. Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment on *Vitis rotundifolia* . **HortScience.** 26: 304- 307.

**SWARTZ., H.** 1991. Post culture behavior: genetic and epigenetic effects and related problems. In : Micropropagation Technology and Application. P. Debergh & R. Zimmerman. Kluwer Academic Publishers. USA. 479 p.

**TAIZ, L., & ZEIGER, E.** 1988. Plant Physiology. Second Edition. Sinauer Associates. Inc. Publishers. Suderland. Massachusetts. USA. 792 p.

**TAYLOR, C.** 1997. Plant Vegetative Development: From Seed and Embryo to Shoot and Root. **Plant Cell** 9, 981- 988.

**TAYLOR, T., & VEILLEUX, R.** 1992. Inheritance of Competencies for Leaf Disc Regeneration, Anther Culture, and Protoplast Culture in *Solanum phureja* and Correlations among them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 31: 95- 103.

**THIES, K., & GRAVES H.** 1992. Meristem micropropagation protocols for *Vitis rotundifolia* Michx. **HortScience**. 27 (5). 447- 449.

**THOMAS, P., & RAVINDRA, M.** 1997. Shoot tip culture in mango: Influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. **Journal of Horticultural Science**. 72(5): 713- 722

**THORPE, T., HARRY, I., & KUMAR, P.** 1991. Application of micropropagation to forestry. In : Micropropagation Technology and Application. P. Debergh & R. Zimmerman. Kluwer Academic Publishers. USA. 479 p.

**TRIPPI, V.** 1990. Aging of Meristem and Morphogenetic Potentialities. In: Plant Aging. Basic and Applied Approaches. R. Rodríguez., R. Tamés and D. Durzan. NATO ASI Series. Series A, Life Sciences; Vol. 186. Plenum Press, New York. USA. pp 3- 10.

**TSAY, H., HSU, J., YANG, T. & YANG, C.** 1984. Anther Culture of Passionfruit (*Passiflora edulis*). **J. Agric.. Res. China**. 33, 126-131.

**TSUBOI, H., & NAKAGAWA, J.** 1992. Efeito da escarificação por uxa ácido sulfúrico e água quente na germinação de sementes de maracujá zeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **Cientifica Sao Paulo** 20. (1): 63- 72.

**URIBE, L.** 1972. Catalogo Ilustrado de las Plantas de Cundinamarca. Vol. 15. Universidad Nacional , Instituto de Ciencias Naturales. Bogotá. Colombia. 165 p.

**VASQUEZ, J.** 1993. El Cultivo de Maracuyá. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. pp 3- 13

**VECCHIA, M.** 2000. IL genere *Passiflora* . [http:// www.Passiflora.it/](http://www.Passiflora.it/) . 7 p.

**VILLALOBOS, V., & THORPE, T.** 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Capítulo 6. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Roca W., Mroginski I. CIAT. Cali. Colombia. pp 127- 143

**WANG, J. & HU, Y.** 1980. Regeneration of virus- free plants through *in vitro* culture. In Advances in biochemical engineering. Ed. Fiechter. Springer Berlin.

**WEYERS, B., PATERSON, R., BROOK, A., & PENG, Z.** 1995. Quantitative analysis of the control of the physiological phenomena by plant hormones. *Physiologia Plantarum* 95: 486- 494.

**ZAID, A.** 1987. *In vitro* browning of tissues and media with especial emphasis to datepalm cultures- a review. In. *In vitro* problems related to mass propagation of horticultural plants. **Acta Horticulturae** 212: 561- 566.

**ZAPATA, M. L.** 1987. El Manejo Precosecha, Cosecha y Postcosecha de Maracuyá para la Exportación. **Tecnología**. Vol 27 (166). pp 7- 33.

**ZIMMERMAN, T., & SCORZA, R.** 1994. Benzyladenine and shortened light/dark cycles improve *in vitro* shoot proliferation of peach.. **HortScience**. 29 (6). 698.

**YU, T., YEH, S., CHENG, Y., & YANG, J.** 2000. Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 61: 29- 35.

## Anexo 1

Componentes del medio de cultivo Nitsch & Nitsch (1968) para *P. Mollissima*

	<b>COMPUESTO</b>	mg / l
NUTRIENTES INORGANICOS MAYORES	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	720
	KNO <sub>3</sub>	950
	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	185
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	90.37
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68
ELEMENTOS TRAZA	<b>COMPUESTO</b>	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10
	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	18.9
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025
	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025
FUENTES DE HIERRO	<b>COMPUESTO</b>	
	Na <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O	37.3
	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27.8
VITAMINAS	<b>COMPUESTO</b>	
	BIOTINA	0.05
	GLICINA	2
	AC. FOLICO	0.5
	AC. NICOTINICO	5
	PIRIDOXINA	0.5
	TIAMINA	0.5
SUPLEMENTOS ORGANICOS	<b>COMPUESTO</b>	
	INOSITOL	100
	GLUTAMINA	500
	SERINA	30
FUENTE DE CARBONO	<b>COMPUESTO</b>	
	SACAROSA	30
AGENTE GELIFICANTE	<b>COMPUESTO</b>	
	AGAR	6
MEDIO DE REGENERACION	<b>HORMONAS</b>	
	BENCIL AMINO PURINA	3
	KINETINA	2

## Anexo 2

Componentes del medio de cultivo Murashige- Skoog (1962) para *P. edulis* var. *flavicarpa*

	<b>COMPUESTO</b>	mg / l
NUTRIENTES INORGANICOS MAYORES	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	ELEMENTOS TRAZA	<b>COMPUESTO</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		22.3
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O		8.6
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O		0.25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O		0.025
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O		0.025
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O		6.2
FUENTES DE HIERRO	<b>COMPUESTO</b>	
	Na <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O	37.3
	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27.8
VITAMINAS	<b>COMPUESTO</b>	
	GLICINA	2
	<b>COMPUESTO</b>	
	AC. NICOTINICO	0.5
	PIRIDOXINA	0.5
	TIAMINA	0.1
	<b>COMPUESTO</b>	
	INOSITOL	100
FUENTE DE CARBONO	<b>COMPUESTO</b>	
	SACAROSA	30
AGENTE GELIFICANTE	<b>COMPUESTO</b>	
	AGAR	6
MEDIO DE REGENERACION	<b>HORMONAS</b>	
	BENCIL AMINO PURINA	1
	KINETINA	0.5

### Anexo 3

Modelo de planilla utilizado para toma de datos

FECHA

PERIODO:

ESPECIE

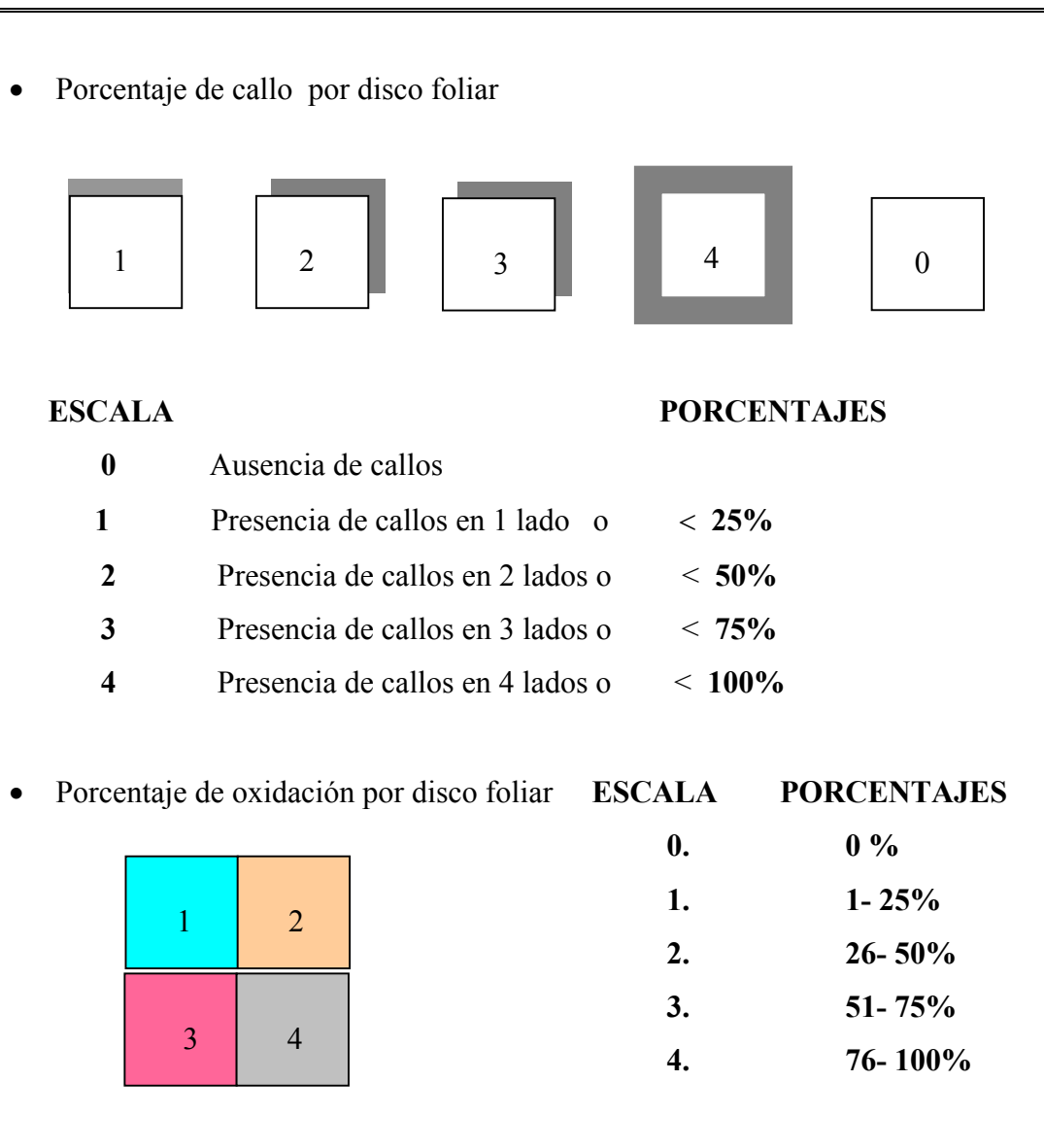
TRATAMIENTO:

MATERIAL VEGETAL DE:

DISCOS FRASCO	CALLO				OXIDAC				BROT E				RAI Z				BROTE X TRATAM			
	% Expl				% Expl				No Expl				No Expl							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15																				
16																				
17																				
18																				
19																				
20																				
21																				
22																				
23																				
24																				
25																				

## Anexo 4

Parámetros cuantitativos usados para porcentaje de oxidación y callo por disco foliar





## Anexo 5

Análisis de varianza (ANAVA) para las variables dependientes en *P. edulis* var. *flavicarpa*, tomando como fuentes de variación: muestreo y tratamiento.

### Número de brotes por disco foliar

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F- test	P- value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A: Muestreo	27.2464	3	9.08212	188.03	0.0000
B: Tratamiento	39.0981	7	5.58545	115.64	0.0000
<b>INTERACTIONS</b>					
<b>AB</b>	14.1617	21	0.67437	13.96	0.0000
RESIDUAL	13.9108	288	0.04830		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	94.4170	319			

P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas

P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas, estadísticamente sobre el porcentaje de oxidación, con un 95.0% de confiabilidad

### Número de raíces por disco foliar

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F- test	P- value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A: Muestreo	10.3177	3	3.43924	227.97	0.0000
B: Tratamiento	7.26331	7	1.03762	68.78	0.0000
<b>INTERACTIONS</b>					
<b>AB</b>	5.04001	21	0.24000	15.91	0.0000
RESIDUAL	4.34496	288	0.01509		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	26.9660	319			

P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas

P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas, estadísticamente sobre el porcentaje de oxidación, con un 95.0% de confiabilidad

### Porcentaje de callo por disco foliar

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F- test	P- value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A: Muestreo	2.08071	3	0.69357	121.87	0.0000
B: Tratamiento	3.43662	7	0.49095	86.27	0.0000
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	0.39180	21	0.01866	3.28	0.0000
RESIDUAL	1.63899	288	0.00569		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	7.54812	319			

P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas  
P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas, estadísticamente sobre el porcentaje de oxidación, con un 95.0% de confiabilidad

### Porcentaje de oxidación por disco foliar

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F- test	P- value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A: Muestreo	0.01468	3	0.00489	962.36	0.0000
B: Tratamiento	0.00135	7	1.925E-04	37.85	0.0000
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	8.495E-04	21	4.045E-05	7.95	0.0000
RESIDUAL	0.00146	288	5.086E-06		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	0.01835	319			

P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas  
P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas, estadísticamente sobre el porcentaje de oxidación, con un 95.0% de confiabilidad

## Anexo 6

Análisis de varianza (ANAVA) para las variables dependientes en *P. mollissima*, tomando como fuente de variación: muestreo y tratamiento.

### Número de brotes por disco foliar

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F- test	P- value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A: Muestreo	0.53995	3	0.17998	20.46	0.0000
B: Tratamiento	1.95256	5	0.39051	44.39	0.0000
<b>INTERACTIONS</b>					
<b>AB</b>	0.71138	15	0.04743	5.39	0.0000
RESIDUAL	1.82973	208	0.00880		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	5.03363	231			

P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas

P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas, estadísticamente sobre el porcentaje de oxidación, con un 95.0% de confiabilidad

### Porcentaje de callo por disco foliar

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F- test	P- value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A: Muestreo	8.10385	3	2.70128	202.54	0.0000
B: Tratamiento	4.49634	5	0.89927	67.43	0.0000
<b>INTERACTIONS</b>					
<b>AB</b>	1.75887	15	0.11726	8.79	0.0000
RESIDUAL	2.77411	208	0.01334		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	17.1332	231			

P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas

P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas, estadísticamente sobre el porcentaje de oxidación, con un 95.0% de confiabilidad

**Porcentaje de oxidación por disco foliar**

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F- test	P- value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A: Muestreo	10.3481	3	3.44937	279.45	0.0000
B: Tratamiento	4.02292	5	0.80458	65.18	0.0000
<b>INTERACTIONS</b>					
<b>AB</b>	1.60699	15	0.10713	8.68	0.0000
RESIDUAL	2.56742	208	0.01234		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	18.5454	231			

P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas  
P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas, estadísticamente sobre el porcentaje de oxidación, con un 95.0% de confiabilidad

## Anexo 7

Contrastes y Polinomios Ortogonales del número de brotes para tratamientos por muestreos en *P. edulis* var. *flavicarpa*

Contraste ortogonal **Z1** (Invernadero T1- T6) vs (*In vitro*, T7 y Re-invigorado, T8)

Coefficientes del Contraste: 1 1 1 1 1 1 -3 -3

Muestreo= 1

CONTRAST	1.5982	SS (CONTRAST)	1.0643
SCHEFFE'S F	1.05	P (SCHEFFE'S F)	0.4038
SE (CONTRAST)	0.3405		

Muestreo= 2

CONTRAST	3.7658	SS (CONTRAST)	5.9090
SCHEFFE'S F	5.83	P (SCHEFFE'S F)	0.0000 **
SE (CONTRAST)	0.3405		

Muestreo= 3

CONTRAST	5.0015	SS (CONTRAST)	10.423
SCHEFFE'S F	10.28	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.3405		

Muestreo= 4

CONTRAST	5.2182	SS (CONTRAST)	11.346
SCHEFFE'S F	11.19	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.3405		

Contraste ortogonal **Z2** (*In vitro* T7) vs (Re-invigorado, T8)

Coefficientes del Contraste: 0 0 0 0 0 0 1 -1

Muestreo= 1

CONTRAST	-0.1107	SS (CONTRAST)	0.0613
SCHEFFE'S F	0.06	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0983		

Muestreo= 2

CONTRAST	-0.0615	SS (CONTRAST)	0.0189
SCHEFFE'S F	0.02	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0983		

Muestreo= 3

CONTRAST	-0.0153	SS (CONTRAST)	1.17E-03
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0983		

Muestreo= 4			
CONTRAST	0.0613	SS (CONTRAST)	0.0188
SCHEFFE'S F	0.02	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0983		

Polinomio ortogonal **Z3** (entre edades T1- T6) Lineal  
 Coeficientes del Contraste: -5 -3 -1 1 3 5 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	1.3884	SS (CONTRAST)	0.2754
SCHEFFE'S F	0.27	P (SCHEFFE'S F)	0.9995
SE (CONTRAST)	0.5815		

Muestreo= 2			
CONTRAST	-0.9526	SS (CONTRAST)	0.1296
SCHEFFE'S F	0.13	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.5815		

Muestreo= 3			
CONTRAST	-5.7581	SS (CONTRAST)	4.7365
SCHEFFE'S F	4.67	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.5815		

Muestreo= 4			
CONTRAST	-6.5495	SS (CONTRAST)	6.1280
SCHEFFE'S F	6.04	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.5815		

Polinomio ortogonal **Z4** (entre edades T1- T6) Cuadrática  
 Coeficientes del Contraste: -5 -1 -4 -4 -1 5 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	-2.7505	SS (CONTRAST)	0.9006
SCHEFFE'S F	0.89	P (SCHEFFE'S F)	0.6076
SE (CONTRAST)	0.6370		

Muestreo= 2			
CONTRAST	-5.3426	SS (CONTRAST)	3.3980
SCHEFFE'S F	3.35	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.6370		

Muestreo= 3			
CONTRAST	-1.7778	SS (CONTRAST)	0.3763
SCHEFFE'S F	0.37	P (SCHEFFE'S F)	0.9952
SE (CONTRAST)	0.6370		

Muestreo= 4			
CONTRAST	-1.5914	SS (CONTRAST)	0.3015
SCHEFFE'S F	0.30	P (SCHEFFE'S F)	0.9990
SE (CONTRAST)	0.6370		

\*\* : P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas  
 \* : P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas  
 NS: P mayores 0.05, son factores que no tiene diferencias significativas

## Anexo 8

Contrastes y Polinomios Ortogonales del número de raíces para tratamientos por muestreos en *P. edulis* var. *flavicarpa*

Contraste ortogonal **Z1** (Invernadero T1- T6) vs (*In vitro*, T7 y Re-invigorado, T8)

Coefficientes del Contraste: 1 1 1 1 1 1 -3 -3

Muestreo= 1			
CONTRAST	5.21E-03	SS (CONTRAST)	1.13E-05
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.1903		
Muestreo= 2			
CONTRAST	1.0381	SS (CONTRAST)	0.4490
SCHEFFE'S F	1.42	P (SCHEFFE'S F)	0.1080
SE (CONTRAST)	0.1903		
Muestreo= 3			
CONTRAST	2.8372	SS (CONTRAST)	3.3540
SCHEFFE'S F	10.59	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.1903		
Muestreo= 4			
CONTRAST	3.3938	SS (CONTRAST)	4.7991
SCHEFFE'S F	15.15	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.1903		

Contraste ortogonal **Z2** (*In vitro* T7) vs (Re-invigorado, T8)

Coefficientes del Contraste 0 0 0 0 0 0 1 -1

Muestreo= 1			
CONTRAST	-3.45E-03	SS (CONTRAST)	5.96E-05
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0549		
Muestreo= 2			
CONTRAST	-0.0137	SS (CONTRAST)	9.32E-04
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0549		
Muestreo= 3			
CONTRAST	-4.46E-03	SS (CONTRAST)	9.97E-05
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000



SE (CONTRAST)	0.0549		
Muestreo= 4			
CONTRAST	-8.05E-03	SS (CONTRAST)	3.24E-04
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0549		

Polinomio ortogonal **Z3** (entre edades T1- T6) Lineal  
 Coeficientes del Contraste: -5 -3 -1 1 3 5 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	0.0120	SS (CONTRAST)	2.07E-05
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.3250		

Muestreo= 2			
CONTRAST	0.7113	SS (CONTRAST)	0.0735
SCHEFFE'S F	0.23	P (SCHEFFE'S F)	0.9998
SE (CONTRAST)	0.3250		

Muestreo= 3			
CONTRAST	-1.5689	SS (CONTRAST)	0.3516
SCHEFFE'S F	1.11	P (SCHEFFE'S F)	0.3362
SE (CONTRAST)	0.3250		

Muestreo= 4			
CONTRAST	-2.4255	SS (CONTRAST)	0.8404
SCHEFFE'S F	2.65	P (SCHEFFE'S F)	0.0002**
SE (CONTRAST)	0.3250		

Polinomio ortogonal **Z4** (entre edades T1- T6) Cuadrática  
 Coeficientes del Contraste: 5 -1 -4 -4 -1 5 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	-0.0416	SS (CONTRAST)	2.06E-04
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.3560		

Muestreo= 2			
CONTRAST	0.1647	SS (CONTRAST)	3.23E-03
SCHEFFE'S F	0.01	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.3560		

For Muestreo= 3			
CONTRAST	0.7860	SS (CONTRAST)	0.0735
SCHEFFE'S F	0.23	P (SCHEFFE'S F)	0.9998

SE (CONTRAST)	0.3560		
Muestreo= 4			
CONTRAST	0.8434	SS (CONTRAST)	0.0847
SCHEFFE'S F	0.27	P (SCHEFFE'S F)	0.9995
SE (CONTRAST)	0.3560		

\*\* : P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas

\* : P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas

NS : P mayores 0.05, son factores que no tiene diferencias significativas

## Anexo 9

Contrastes y Polinomios Ortogonales del porcentaje de callo para tratamientos por muestreos en *P. edulis* var. *flavicarpa*

Contraste ortogonal **Z1** (Invernadero T1- T6) vs (*In vitro*, T7 y Re-invigorado, T8)

Coefficientes del Contraste: 1 1 1 1 1 1 -3 -3

Muestreo= 1

CONTRAST	1.2892	SS (CONTRAST)	0.6926
SCHEFFE'S F	5.79	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.1169		

Muestreo= 2

CONTRAST	1.0444	SS (CONTRAST)	0.4545
SCHEFFE'S F	3.80	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.1169		

Muestreo= 3

CONTRAST	0.9778	SS (CONTRAST)	0.3984
SCHEFFE'S F	3.33	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.1169		

Muestreo= 4

CONTRAST	0.9890	SS (CONTRAST)	0.4076
SCHEFFE'S F	3.41	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.1169		

Contraste ortogonal **Z2** (*In vitro* T7) vs (Re-invigorado, T8)

Coefficientes del Contraste: 0 0 0 0 0 0 1 -1

Muestreo= 1

CONTRAST	-0.1332	SS (CONTRAST)	0.0887
SCHEFFE'S F	0.74	P (SCHEFFE'S F)	0.7886
SE (CONTRAST)	0.0337		

Muestreo= 2

CONTRAST	-0.2533	SS (CONTRAST)	0.3208
SCHEFFE'S F	2.68	P (SCHEFFE'S F)	0.0001**
SE (CONTRAST)	0.0337		

Muestreo= 3

CONTRAST	-0.2574	SS (CONTRAST)	0.3312
SCHEFFE'S F	2.77	P (SCHEFFE'S F)	0.0001**
SE (CONTRAST)	0.0337		

Muestreo= 4			
CONTRAST	-0.2582	SS (CONTRAST)	0.3334
SCHEFFE'S F	2.79	P (SCHEFFE'S F)	0.0001**
SE (CONTRAST)	0.0337		

Polinomios ortogonales **Z3** (entre edades T1- T6) Lineal  
 Coeficientes del Contraste: -5 -3 -1 1 3 5 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	0.2440	SS (CONTRAST)	8.51E-03
SCHEFFE'S F	0.07	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.1996		

Muestreo= 2			
CONTRAST	-0.9248	SS (CONTRAST)	0.1222
SCHEFFE'S F	1.02	P (SCHEFFE'S F)	0.4359
SE (CONTRAST)	0.1996		

Muestreo= 3			
CONTRAST	-1.1279	SS (CONTRAST)	0.1818
SCHEFFE'S F	1.52	P (SCHEFFE'S F)	0.0691
SE (CONTRAST)	0.1996		

Muestreo= 4			
CONTRAST	-1.1606	SS (CONTRAST)	0.1924
SCHEFFE'S F	1.61	P (SCHEFFE'S F)	0.0460*
SE (CONTRAST)	0.1996		

Polinomios ortogonales **Z4** (entre edades T1- T6) Cuadrática  
 Coeficientes del Contraste: -5 -1 -4 -4 -1 5 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	0.1009	SS (CONTRAST)	1.21E-03
SCHEFFE'S F	0.01	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.2186		

Muestreo= 2			
CONTRAST	0.1444	SS (CONTRAST)	2.48E-03
SCHEFFE'S F	0.02	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.2186		

Muestreo= 3			
CONTRAST	0.2568	SS (CONTRAST)	7.85E-03
SCHEFFE'S F	0.07	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.2186		

Muestreo= 4			
CONTRAST	0.1681	SS (CONTRAST)	3.36E-03
SCHEFFE'S F	0.03	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.2186		

\*\* : P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas

\* : P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas

NS: P mayores 0.05, son factores que no tiene diferencias significativas

## Anexo 10

Contrastes y Polinomios Ortogonales del porcentaje de oxidación para tratamientos por muestreos en *P. edulis* var. *flavicarpa*

Contraste ortogonal **Z1** (Invernadero T1- T6) vs (*In vitro*, T7 y , Re-invigorado T8)

Coefficientes del Contraste: 1 1 1 1 1 1 -3 -3

Muestreo= 1			
CONTRAST	-8.88E-03	SS (CONTRAST)	3.29E-05
SCHEFFE'S F	0.31	P (SCHEFFE'S F)	0.9987
SE (CONTRAST)	3.49E-03		

Muestreo= 2			
CONTRAST	-0.0297	SS (CONTRAST)	3.67E-04
SCHEFFE'S F	3.44	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	3.49E-03		

Muestreo= 3			
CONTRAST	-0.0267	SS (CONTRAST)	2.96E-04
SCHEFFE'S F	2.77	P (SCHEFFE'S F)	0.0001**
SE (CONTRAST)	3.49E-03		

Muestreo= 4			
CONTRAST	-0.0134	SS (CONTRAST)	7.46E-05
SCHEFFE'S F	0.70	P (SCHEFFE'S F)	0.8348
SE (CONTRAST)	3.49E-03		

Contraste ortogonal **Z2** (*In vitro* T7) vs (Re-invigorado, T8)

Coefficientes del Contraste: 0 0 0 0 0 0 1 -1

Muestreo= 1			
CONTRAST	-2.49E-03	SS (CONTRAST)	3.09E-05
SCHEFFE'S F	0.29	P (SCHEFFE'S F)	0.9992
SE (CONTRAST)	1.01E-03		

Muestreo= 2			
CONTRAST	-3.78E-04	SS (CONTRAST)	7.15E-07
SCHEFFE'S F	0.01	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	1.01E-03		

Muestreo= 3			
CONTRAST	1.07E-03	SS (CONTRAST)	5.76E-06
SCHEFFE'S F	0.05	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	1.01E-03		

Muestreo= 4			
CONTRAST	1.03E-03	SS (CONTRAST)	5.34E-06
SCHEFFE'S F	0.05	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	1.01E-03		

Polinomio ortogonal **Z3** (entre edades T1- T6) Lineal  
 Coeficientes del Contraste: -5 -3 -1 1 3 5 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	-6.53E-04	SS (CONTRAST)	6.10E-08
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	5.97E-03		

Muestreo= 2			
CONTRAST	0.0385	SS (CONTRAST)	2.12E-04
SCHEFFE'S F	1.98	P (SCHEFFE'S F)	0.0071**
SE (CONTRAST)	5.97E-03		

Muestreo= 3			
CONTRAST	0.0351	SS (CONTRAST)	1.76E-04
SCHEFFE'S F	1.65	P (SCHEFFE'S F)	0.0382*
SE (CONTRAST)	5.97E-03		

Muestreo= 4			
CONTRAST	0.0306	SS (CONTRAST)	1.34E-04
SCHEFFE'S F	1.26	P (SCHEFFE'S F)	0.2040
SE (CONTRAST)	5.97E-03		

Polinomio ortogonal **Z4** (entre edades T1- T6) Cuadrática  
 Coeficientes del Contraste: -5 -1 -4 -4 -1 5 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	3.82E-03	SS (CONTRAST)	1.73E-06
SCHEFFE'S F	0.02	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	6.54E-03		

Muestreo= 2			
CONTRAST	0.0312	SS (CONTRAST)	1.16E-04
SCHEFFE'S F	1.09	P (SCHEFFE'S F)	0.3608
SE (CONTRAST)	6.54E-03		

Muestreo= 3			
CONTRAST	0.0232	SS (CONTRAST)	6.43E-05
SCHEFFE'S F	0.60	P (SCHEFFE'S F)	0.9162
SE (CONTRAST)	6.54E-03		
Muestreo= 4			

CONTRAST	-0.0321	SS (CONTRAST)	1.23E-04
SCHEFFE'S F	1.15	P (SCHEFFE'S F)	0.2985
SE (CONTRAST)	6.54E-03		

\*\* : P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas  
\* : P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas  
NS : P mayores 0.05, son factores que no tiene diferencias significativas



## Anexo 11

Contrastes y Polinomios Ortogonales del número de brotes para tratamientos por muestreos en *P. mollissima*

Contraste ortogonal **Z1** (Invernadero T1- T4) vs (*In vitro*, T5 y Re-invigorado, T6)

Coefficientes del Contraste: 1 1 1 1 -2 -2

Muestreo= 1

CONTRAST	-3.45E-03	SS (CONTRAST)	9.93E-06
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.1027		

Muestreo= 2

CONTRAST	0.3865	SS (CONTRAST)	0.1245
SCHEFFE'S F	0.94	P (SCHEFFE'S F)	0.5174
SE (CONTRAST)	0.1027		

Muestreo= 3

CONTRAST	0.5832	SS (CONTRAST)	0.2835
SCHEFFE'S F	2.15	P (SCHEFFE'S F)	0.0092**
SE (CONTRAST)	0.1027		

Muestreo= 4

CONTRAST	0.6557	SS (CONTRAST)	0.3583
SCHEFFE'S F	2.72	P (SCHEFFE'S F)	0.0008**
SE (CONTRAST)	0.1027		

Contraste ortogonal **Z2** (*In vitro* T5) vs (Re-invigorado, T6)

Coefficientes del Contraste: 0 0 0 0 1 -1

Muestreo= 1

CONTRAST	-3.45E-03	SS (CONTRAST)	5.96E-05
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0419		

Muestreo= 2

CONTRAST	-3.45E-03	SS (CONTRAST)	5.96E-05
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0419		

Muestreo= 3

CONTRAST	-3.45E-03	SS (CONTRAST)	5.96E-05
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000

SE (CONTRAST)	0.0419		
Muestreo= 4			
CONTRAST	-0.0391	SS (CONTRAST)	7.66E-03
SCHEFFE'S F	0.06	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0419		

Polinomio ortogonal **Z3** (entre edades T1- T4) Lineal

Coefficientes del Contraste: -3 -1 1 3 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	3.45E-03	SS (CONTRAST)	5.96E-06
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.1326		

Muestreo= 2			
CONTRAST	0.1694	SS (CONTRAST)	0.0143
SCHEFFE'S F	0.11	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.1326		

Muestreo= 3			
CONTRAST	0.1947	SS (CONTRAST)	0.0190
SCHEFFE'S F	0.14	P (SCHEFFE'S F)	0.9999
SE (CONTRAST)	0.1326		

Muestreo= 4			
CONTRAST	0.2300	SS (CONTRAST)	0.0264
SCHEFFE'S F	0.20	P (SCHEFFE'S F)	0.9994
SE (CONTRAST)	0.1326		

Polinomio ortogonal **Z4** (entre edades T1- T4) Cuadrática

Coefficientes del Contraste: 1 -1 -1 1 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	-3.45E-03	SS (CONTRAST)	2.98E-05
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0593		

Muestreo= 2			
CONTRAST	-0.3719	SS (CONTRAST)	0.3458
SCHEFFE'S F	2.62	P (SCHEFFE'S F)	0.0013*
SE (CONTRAST)	0.0593		

Muestreo= 3			
CONTRAST	-0.4789	SS (CONTRAST)	0.5734
SCHEFFE'S F	4.35	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.0593		

Muestreo= 4			
CONTRAST	-0.5164	SS (CONTRAST)	0.6666
SCHEFFE'S F	5.05	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.0593		

Polinomio ortogonal **Z5** (entre edades T1- T4) Cubica  
 Coeficientes del Contraste: -1 3 -3 1 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	-0.0104	SS (CONTRAST)	5.36E-05
SCHEFFE'S F	0.00	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.1326		

Muestreo= 2			
CONTRAST	-0.4774	SS (CONTRAST)	0.1140
SCHEFFE'S F	0.86	P (SCHEFFE'S F)	0.6063
SE (CONTRAST)	0.1326		

Muestreo= 3			
CONTRAST	-0.3793	SS (CONTRAST)	0.0719
SCHEFFE'S F	0.55	P (SCHEFFE'S F)	0.9128
SE (CONTRAST)	0.1326		

Muestreo= 4			
CONTRAST	-0.3418	SS (CONTRAST)	0.0584
SCHEFFE'S F	0.44	P (SCHEFFE'S F)	0.9642
SE (CONTRAST)	0.1326		

\*\* : P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas  
 \* : P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas  
 NS: P mayores 0.05, son factores que no tiene diferencias significativas

## Anexo 12

Contrastes y Polinomios Ortogonales del porcentaje de callo para tratamientos por muestreos en *P. mollissima*

Contraste ortogonal **Z1** (Invernadero T1- T4) vs (*In vitro*, T5 y Re-invigorado, T6)

Coefficientes del Contraste: 1 1 1 1 -2 -2

Muestreo= 1

CONTRAST	0.4815	SS (CONTRAST)	0.1932
SCHEFFE'S F	0.97	P (SCHEFFE'S F)	0.4931
SE (CONTRAST)	0.1265		

Muestreo= 2

CONTRAST	0.5737	SS (CONTRAST)	0.2743
SCHEFFE'S F	1.37	P (SCHEFFE'S F)	0.1634
SE (CONTRAST)	0.1265		

Muestreo= 3

CONTRAST	0.7354	SS (CONTRAST)	0.4507
SCHEFFE'S F	2.25	P (SCHEFFE'S F)	0.0060**
SE (CONTRAST)	0.1265		

Muestreo= 4

CONTRAST	0.9849	SS (CONTRAST)	0.8084
SCHEFFE'S F	4.04	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.1265		

Contraste ortogonal **Z2** (*In vitro* T5) vs (Re-invigorado, T6)

Coefficientes del Contraste: 0 0 0 0 1 -1

Muestreo= 1

CONTRAST	0.0275	SS (CONTRAST)	3.78E-03
SCHEFFE'S F	0.02	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0516		

Muestreo= 2

CONTRAST	-0.2355	SS (CONTRAST)	0.2773
SCHEFFE'S F	1.39	P (SCHEFFE'S F)	0.1557
SE (CONTRAST)	0.0516		

Muestreo= 3

CONTRAST	-0.2801	SS (CONTRAST)	0.3923
SCHEFFE'S F	1.96	P (SCHEFFE'S F)	0.0195*
SE (CONTRAST)	0.0516		

Muestreo= 4			
CONTRAST	-0.2942	SS (CONTRAST)	0.4327
SCHEFFE'S F	2.16	P (SCHEFFE'S F)	0.0087**
SE (CONTRAST)	0.0516		

Polinomio ortogonal **Z3** (entre edades T1- T4) Lineal  
 Coeficientes del Contraste: -3 -1 1 3 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	-0.8463	SS (CONTRAST)	0.3581
SCHEFFE'S F	1.79	P (SCHEFFE'S F)	0.0377*
SE (CONTRAST)	0.1633		

Muestreo= 2			
CONTRAST	-0.3808	SS (CONTRAST)	0.0725
SCHEFFE'S F	0.36	P (SCHEFFE'S F)	0.9862
SE (CONTRAST)	0.1633		

Muestreo= 3			
CONTRAST	0.5065	SS (CONTRAST)	0.1283
SCHEFFE'S F	0.64	P (SCHEFFE'S F)	0.8391
SE (CONTRAST)	0.1633		

Muestreo= 4			
CONTRAST	0.4750	SS (CONTRAST)	0.1128
SCHEFFE'S F	0.56	P (SCHEFFE'S F)	0.9002
SE (CONTRAST)	0.1633		

Polinomio ortogonal **Z4** (entre edades T1- T4) Cuadrática  
 Coeficientes del Contraste: 1 -1 -1 1 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	-0.4073	SS (CONTRAST)	0.4148
SCHEFFE'S F	2.07	P (SCHEFFE'S F)	0.0124*
SE (CONTRAST)	0.0730		

Muestreo= 2			
CONTRAST	-0.3800	SS (CONTRAST)	0.3609
SCHEFFE'S F	1.80	P (SCHEFFE'S F)	0.0357*
SE (CONTRAST)	0.0730		

Muestreo= 3			
CONTRAST	-0.0712	SS (CONTRAST)	0.0127
SCHEFFE'S F	0.06	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0730		

Muestreo= 4			
CONTRAST	-0.0543	SS (CONTRAST)	7.37E-03
SCHEFFE'S F	0.04	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0730		

Polinomio ortogonal **Z5** (entre edades T1- T4) Cubica  
 Coeficientes del Contraste: -1 3 -3 1 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	0.2120	SS (CONTRAST)	0.0225
SCHEFFE'S F	0.11	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.1633		

Muestreo= 2			
CONTRAST	0.8919	SS (CONTRAST)	0.3977
SCHEFFE'S F	1.99	P (SCHEFFE'S F)	0.0175*
SE (CONTRAST)	0.1633		

Muestreo= 3			
CONTRAST	1.3222	SS (CONTRAST)	0.8741
SCHEFFE'S F	4.37	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.1633		

Muestreo= 4			
CONTRAST	1.1496	SS (CONTRAST)	0.6608
SCHEFFE'S F	3.30	P (SCHEFFE'S F)	0.0001**
SE (CONTRAST)	0.1633		

\*\* : P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas

\* : P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas

NS: P mayores 0.05, son factores que no tiene diferencias significativas

### Anexo 13

Contrastes y Polinomios Ortogonales del porcentaje de oxidación para tratamientos por muestreos en *P. mollissima*

Contraste ortogonal **Z1** (Invernadero T1- T4) vs (*In vitro*, T5 y Re-invigorado, T6)

Coefficientes del Contraste: 1 1 1 1 -2 -2

Muestreo= 1

CONTRAST	0.3813	SS (CONTRAST)	0.1211
SCHEFFE'S F	0.65	P (SCHEFFE'S F)	0.8274
SE (CONTRAST)	0.1217		

Muestreo= 2

CONTRAST	0.2525	SS (CONTRAST)	0.0531
SCHEFFE'S F	0.29	P (SCHEFFE'S F)	0.9958
SE (CONTRAST)	0.1217		

Muestreo= 3

CONTRAST	-0.5630	SS (CONTRAST)	0.2641
SCHEFFE'S F	1.43	P (SCHEFFE'S F)	0.1366
SE (CONTRAST)	0.1217		

Muestreo= 4

CONTRAST	-0.8445	SS (CONTRAST)	0.5943
SCHEFFE'S F	3.21	P (SCHEFFE'S F)	0.0001**
SE (CONTRAST)	0.1217		

Contraste ortogonal **Z2** (*In vitro* T5) vs (Re-invigorado, T6)

Coefficientes del Contraste: 0 0 0 0 1 -1

Muestreo= 1

CONTRAST	0.0539	SS (CONTRAST)	0.0145
SCHEFFE'S F	0.08	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0497		

Muestreo= 2

CONTRAST	-0.0188	SS (CONTRAST)	1.76E-03
SCHEFFE'S F	0.01	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0497		

Muestreo= 3

CONTRAST	-0.2165	SS (CONTRAST)	0.2343
SCHEFFE'S F	1.27	P (SCHEFFE'S F)	0.2260
SE (CONTRAST)	0.0497		

Muestreo= 4			
CONTRAST	-0.1188	SS (CONTRAST)	0.0706
SCHEFFE'S F	0.38	P (SCHEFFE'S F)	0.9823
SE (CONTRAST)	0.0497		

Polinomio ortogonal **Z3** (entre edades T1- T4) Lineal  
 Coeficientes del Contraste: -3 -1 1 3 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	-0.1801	SS (CONTRAST)	0.0162
SCHEFFE'S F	0.09	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.1571		

Muestreo= 2			
CONTRAST	-0.1344	SS (CONTRAST)	9.04E-03
SCHEFFE'S F	0.05	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.1571		

Muestreo= 3			
CONTRAST	0.0949	SS (CONTRAST)	4.50E-03
SCHEFFE'S F	0.02	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.1571		

Muestreo= 4			
CONTRAST	0.3099	SS (CONTRAST)	0.0480
SCHEFFE'S F	0.26	P (SCHEFFE'S F)	0.9976
SE (CONTRAST)	0.1571		

Polinomio ortogonal **Z4** (entre edades T1- T4) Cuadrática  
 Coeficientes del Contraste: 1 -1 -1 1 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	0.5193	SS (CONTRAST)	2.56E-04
SCHEFFE'S F	3.64	P (SCHEFFE'S F)	1.0000
SE (CONTRAST)	0.0703		

Muestreo= 2			
CONTRAST	0.1848	SS (CONTRAST)	0.0854
SCHEFFE'S F	0.46	P (SCHEFFE'S F)	0.9569
SE (CONTRAST)	0.0703		

Muestreo= 3			
CONTRAST	0.3695	SS (CONTRAST)	0.3414
SCHEFFE'S F	1.84	P (SCHEFFE'S F)	0.0307*
SE (CONTRAST)	0.0703		



Muestreo= 4			
CONTRAST	0.4349	SS (CONTRAST)	0.4728
SCHEFFE'S F	2.55	P (SCHEFFE'S F)	0.0017**
SE (CONTRAST)	0.0703		

Polinomio ortogonal **Z5** (entre edades T1- T4) Cubica  
 Coeficientes del Contraste: -1 3 -3 1 0 0

Muestreo= 1			
CONTRAST	-1.1345	SS (CONTRAST)	0.6436
SCHEFFE'S F	3.48	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.1571		

Muestreo= 2			
CONTRAST	-1.5814	SS (CONTRAST)	1.2504
SCHEFFE'S F	6.75	P (SCHEFFE'S F)	0.0000**
SE (CONTRAST)	0.1571		

Muestreo= 3			
CONTRAST	-1.0712	SS (CONTRAST)	0.5737
SCHEFFE'S F	3.10	P (SCHEFFE'S F)	0.0002**
SE (CONTRAST)	0.1571		

Muestreo= 4			
CONTRAST	-0.5602	SS (CONTRAST)	0.1569
SCHEFFE'S F	0.85	P (SCHEFFE'S F)	0.6246
SE (CONTRAST)	0.1571		

\*\* : P menores 0.01, son factores que tienen diferencias altamente significativas  
 \* : P menores 0.05, son factores que tienen diferencias significativas  
 NS : P mayores 0.05, son factores que no tiene diferencias significativas