

Cultivo in Vitro de
Passiflora quadrangularis L.

MICROISIS:	1599
FECHA:	2/02/91
ENCARGADO:	MARGAS

P O R

Sucre Nicolás Rodríguez Navarrete

T E S I S

PRESENTADA A LA
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA

COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCION
DEL TITULO DE

INGENIERO AGRONOMO

El Zamorano, Honduras
Abril, 1989

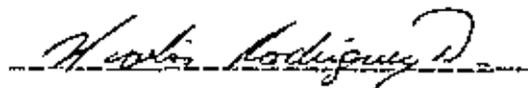
BIBLIOTECA WILSON POPENO
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APARTADO 88
TEGUIGALPA HONDURAS

CULTIVO IN VITRO
DE
Passiflora quadrangularis L.

Por:

SUCRE NICOLAS RODRIGUEZ NAVARRETE

El autor concede a la Escuela Agrícola Panamericana permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para los usos que considere necesario. Para otras personas y otros fines, se reservan los derechos de autor.



Sucre Nicolás Rodríguez Navarrete

10 de abril de 1989

iii

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres, Sucre y Fanny que me dieron amor y apoyo en todo momento, a mis hermanos Sucre José y Luz Angélica y a mis abuelos José y Rosa.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar sincero agradecimiento a mi consejero y amigo Juan José Alán por su ayuda prestada en la realización de esta tesis. A mis consejeros Roberto Young y José Antonio Perdomo.

A las familias Dysli - Rodríguez y Corral - Rodas, con quienes compartí mis momentos de esparcimiento.

A mis compañeros de clase y amigos, en especial a O. Ovalle, I. Lazo, I. Auhing, L. Sabando, J.C. Saenz, C. Arteaga, F. Mendoza. A mis amigos J.A. Perdomo, D. Moreira y R. Espinal.

Mis agradecimientos a la Fundación Wilson Popenoe, y al Ing. Rodolfo Arámbulo, Director de la misma.

A todas las personas que de una u otra manera me ayudaron en la realización de este trabajo.

v

INDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	3
III. MATERIALES Y METODOS.....	15
IV. RESULTADOS.....	19
V. DISCUSION.....	29
VI. CONCLUSIONES.....	33
VII. RECDMENDACIONES.....	34
VIII. LITERATURA CITADA.....	35
IX. ANEXOS.....	38

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Dosis y combinaciones de citoquininas y auxinas empleadas en los cultivos <u>in vitro</u> de <u>Passiflora quadrangularis</u> . El Zamorano, 1988.....	14
Cuadro 2. Dosis y combinaciones de auxinas y citoquininas aplicadas al medio para repiques de callos friables de <u>P. quadrangularis</u> . El Zamorano, 1988.....	18
Cuadro 3. Efectos de la aplicación de 2,4-D y BA en el medio líquido de Nitsch, sobre el crecimiento de explantes de hojas de <u>P. quadrangularis</u> . El Zamorano, febrero de 1989.....	21
Cuadro 4. Efectos de la aplicación de AIA y BA en el medio líquido de Nitsch, sobre el crecimiento de explantes de hojas de <u>P. quadrangularis</u> . El Zamorano, febrero de 1989.....	25
Cuadro 5. Efectos de la aplicación de AIA y K en el medio líquido de Nitsch, sobre el crecimiento de explantes de hojas de <u>P. quadrangularis</u> . El Zamorano, febrero de 1989.....	27

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Efectos de la aplicación de 2,4-D y BA en el crecimiento de explantes de hojas de <u>Passiflora quadrangularis</u> en el medio líquido de Nitsch. El Zamorano, febrero de 1989.....	20
Figura 2. Efectos de la aplicación de 4 mg/L de 2,4-D, sobre el medio líquido de Nitsch, en el desarrollo de raíces adventicias (via callo), al cultivarse explantes de hojas de <u>P. quadrangularis</u> . El Zamorano, febrero de 1989.....	22
Figura 3. Efectos de la aplicación de AIA y BA en el crecimiento de explantes de hojas de <u>Passiflora quadrangularis</u> en el medio líquido de Nitsch. El Zamorano, febrero de 1989.....	24

INDICE DE APENDICES

	Página
Apéndice 1. Composición del medio de cultivo de Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969).....	39

COMPENDIO.

Passiflora quadrangularis es una de las especies más importantes dentro del género Passiflora. En el presente trabajo se pretendió multiplicar, in vitro, plantas de P. quadrangularis, usando explantes de hojas. Se probó el medio de cultivo de Nitsch, líquido para los cultivos iniciales y solidificado con agar para los subcultivos. Se probó el efecto de auxinas (2,4-D y AIA) y citoquininas (BA y K), solas o en interacciones. La mejor formación de callo se logró con 4 mg/L de 2,4-D, donde también se indujo a rizogénesis via callo en un 11 %. Resultados similares se obtubieron con la interacción de 1 mg/L de AIA y 1 mg/L BA. Los subcultivos de callos friables, sobre medios con un cambio en la concentración de hormonas, únicamente indujeron a un mayor crecimiento del callo en cultivo. Se presume que los niveles endógenos de hormonas en el tejido, tanto de auxina como de citoquininas, sean bajos.

I. INTRODUCCION

El género Passiflora es originario, predominantemente, de América tropical. De alrededor de 400 especies conocidas, varias tienen importancia económica como productoras de frutos comestibles. Una de las más importantes por su calidad y su disseminación en los trópicos es la Passiflora quadrangularis L. (Martin y Nakasone, 1970).

La P. quadrangularis es conocida también como parcha granadilla, parcha real o badea en los países andinos.

Es una planta trepadora, perenne, con tallos de forma cuadrangular, con bordes alados y lisos. Produce frutos grandes de color verde amarillento, de sabor y aroma muy apetecidos. Romero (1956), indica que la dispersión de esta especie a través de los países tropicales va desde el nivel del mar hasta los 1400 m de altitud.

Araque (1963), ha llamado a P. quadrangularis la "pera tropical" por la delicadeza del fruto y su gran potencial para reemplazar a la papilla de pera para niños, evitando de esta manera la fuga de divisas al hacer estas importaciones. La producción de enlatados, jaleas, mermeladas, vinos, concentrados para jugo y hasta como ornamental en jardines exteriores, son motivo para que la hayan clasificado como la

segunda en importancia, después del maracuya, entre las del género Passiflora (IEPGR, 1986).

En algunas passifloras cultivadas la autoincompatibilidad es común (León, 1968), lo que hace que la polinización cruzada sea la norma en esta especie. Posiblemente, esta sea la razón para la baja producción de frutos y de semillas en la especie P. quadrangularis, recomendándose las polinizaciones manuales en lugares donde los agentes polinizadores son pocos (Purseglove, 1968).

Las semillas producen poblaciones de alta variabilidad y tienen un período de reposo variable, que hace que las plántulas se produzcan durante un período prolongado.

Purseglove (1968), indica que la propagación vegetativa por medio de estacas es posible. Este sistema, obviamente, resolvería algunos de los problemas relacionados con el uso de semillas para la propagación, pero no es eficaz en cuanto al número de plantas producidas.

En el presente trabajo se pretende multiplicar plantas de P. quadrangularis a partir de cultivos in vitro, utilizando diversos explantes.

II. REVISION DE LITERATURA

Los trabajos de Haberlandt en 1902, son frecuentemente señalados en la literatura como pioneros en el cultivo de tejidos (Bhojwani y Razdan, 1983; Murashige, 1979). Sus resultados experimentales de aislamiento de células y tejidos de diferentes especies de plantas (Lanium purpureum y Eichhornia crassige), en los cuales obtuvo sobrevivencia y crecimiento de las células. Sin embargo, no obtuvo división celular al cultivarlas en medios de crecimiento asépticos consistentes en soluciones de azúcar y sales. El propuso que las hormonas, desconocidas en ese entonces, podrían ser la causa de la división, crecimiento y diferenciación celular; igualmente, propuso que las células de las plantas poseen totipotencia, o sea, la capacidad de desarrollarse en plantas completas, y que dicha capacidad se manifestaría en el cultivo in vitro.

Fue hasta 1934 que Kögl et al. (citado por Murashige, 1979) identifican la primera hormona, el ácido indol-acético (AIA). Bhojwani y Razdan (1983), citan a Miller et al., quienes en 1955 aislaron la primera citoquinina conocida, la kinetina (K); continúan citando a Skoog y a Miller quienes, en 1957, demostraron que la diferenciación de raíces y brotes, a partir de explantes de tabaco en cultivo, está en función de los niveles de auxinas y citoquininas y su

interacción. Dicha diferenciación podría ser regulada por cambios en la concentración de las dos sustancias en el medio de cultivo.

Actualmente, el término cultivo de tejidos de plantas se usa para referirse al cultivo in vitro de cualquier parte de la planta, ya sea de una célula o un órgano.

El cultivo de tejidos in vitro, de acuerdo con la parte o estructura de la planta que se usa, podemos clasificarlo en : 1.- cultivo de embriones; 2.- cultivo de órganos, ya sean ápices, raíces, tallos, etc.; 3.- cultivo de tejidos, como los de origen epidérmico o de cambium; 4.- cultivo de células y, 5.- cultivo de protoplastos (Murashige, 1979).

Las ventajas del cultivo in vitro sobre los sistemas tradicionales de propagación, mejoramiento y selección de plantas, radican en una rápida propagación clonal, producción de plantas libres de patógenos, hibridaciones somáticas, producción de haploides y poliploides (Murashige, 1979)

Los factores que generalmente determinan el éxito del cultivo in vitro son dos: 1.- el origen del explante y, 2.- el medio nutricional de cultivo.

Gamborg y Shyluk (1981), indican que los medios de

cultivo consisten de componentes esenciales y otros opcionales, los primeros constituidos, básicamente, de sales inorgánicas, fuentes de energía y carbono, vitaminas y reguladores de crecimiento. Algunas sustancias como el nitrógeno orgánico, ácidos orgánicos y sustancias complejas como la proteína hidrolizada, extractos de malta o preparados de plantas pueden ser importantes; sin embargo, son opcionales.

Diez y seis elementos se reconocen como esenciales para el desarrollo y crecimiento de las plantas, dichos elementos han sido divididos de acuerdo con la cantidad relativa requerida por la planta en: macroelementos (C, H, O, N, P, K, Ca, Mg y S) y microelementos (Fe, Mn, Cu, Zn, B, Mo y Cl). Gamborg y Shyluk (1981), indican que el adicionar Co puede ser importante, y que el I puede ser usado u omitido.

Azúcares como la glucosa y la sacarosa se usan comúnmente en concentraciones que van de 2 a 3%, como fuentes de carbono y energía (Murashige, 1974).

Dentro de los reguladores de crecimiento de las plantas, los más usados son las auxinas, las citoquininas y las giberelinas.

Bhojwani y Razdan (1983), hacen referencia al uso de

auxinas como estimuladores de la división celular, y de la formación de callos, e inductores de la formación de raíces. Dentro de este grupo las más usadas son el ácido indol acético (AIA), ácido indol butírico (AIB), ácido naftaleno acético (ANA), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido 2,4,5 triclórofenoxiacético (2,4,5-T). Las citoquininas son normalmente adicionadas para la división celular y formación de brotes a partir de callos y órganos. Se considera que la bencil adenina (BA), la furfuril-amino-purina o quinetina (K) y la isopentenil-adenina (2iP) son las citoquininas más usadas.

La capacidad de las células de las plantas, gracias a la información genética que contienen, de diferenciarse, dividirse y desarrollar órganos completos y plantas, es lo que se conoce como totipotencia (Berthouly y Guzmán, 1987 ; Bhojwani y Razdan, 1983).

El proceso de diferenciación y organización (morfogénesis) que se relaciona con la formación de nuevos tejidos y órganos especializados se realiza por medio de un proceso llamado organogénesis.

La forma física en que se suministran los medios de cultivo, ya sean líquidos (con o sin puentes de papel) o sólidos (con agar) juega un papel importante en el

crecimiento de los cultivos (Alán, 1979).

La iniciación de un callo se puede hacer a partir de cualquier parte de la planta. Generalmente, la formación de un callo a partir de tejidos jóvenes o nuevos de la planta son comunes, posiblemente por el estado de división en que se encuentran sus células. En todo caso, esta formación dependerá de que se le proporcionen las condiciones óptimas al cultivo.

La formación de plantas a través de organogénesis es en sí la iniciación y desarrollo de brotes via callo, y normalmente la posterior aparición o formación de raíces (Tisserat, 1985), donde los brotes son estructuras unipolares conectadas al tejido de origen.

Thorpe (1982), indica que es posible obtener callos típicos de cada especie luego de hacer uno o dos subcultivos, y que con condiciones físicas líquidas del medio, un grupo de células características para dicho medio se desarrollan más rápidamente. Existe una gran variación en las características de textura y coloración de los callos de acuerdo con la especie que les dio origen.

La regeneración de plántulas a partir de callos podría

mostrar una variación genética o desviación de la forma normal diploide hacia poliploides con sus respectivas anomalías morfológicas según indica Narayanaswamy (1977). A esto se puede agregar lo señalado por Thorpe (1982), acerca de la pérdida de la capacidad de morfogénesis del callo luego del subcultivo del mismo, posiblemente por la pérdida del estado original de ploidía de la especie.

Tisserat (1985), indica que una elevada concentración de auxinas y una baja concentración de citoquininas promueve la formación de callos, en el cual la composición celular puede ser heterogénea. En general, las sustancias promotoras del crecimiento son las responsables del proceso de organogénesis.

Las raíces y brotes via callo, como proceso de organogénesis, aparecen como órganos monopolares y de características totalmente normales (Reinert, Bajaj y Zbell, 1977), la nova organogénesis puede suceder a partir del cambio de una célula dentro de una masa de células (Thorpe, 1982).

La micropropagación clonal in vitro puede llevarse a cabo directamente de algunos explantes como meristemas o yemas, o via callo. Esto puede ilustrarse con la micropropagación comercial, en la cual, Boxus et al. (1977),

se refieren a la posibilidad de micropropagar fresas (Fragaria ananassa) por dos vías principales: la primera es la técnica desarrollada por los japoneses (Oosawa et al., 1974, citados por Boxus et al., 1977), por medio de la cual es posible regenerar plantas al cultivarse callos, los cuales se originan a partir del cultivo de meristemas o de anteras. La segunda técnica, es la perfeccionada por Boxus en 1974, en la cual los brotes se desarrollan a partir de yemas laterales formadas en la base de cada hoja.

Nakayama (1966), trabajando con Passiflora caerulea encontró que luego de hacer repiques se produce la formación de brotes, posiblemente por la reposición del desgaste de los componentes del cultivo inicial. Similares resultados obtuvo Morán (1979), cuando trabajó con Passiflora edulis y P. mollissima.

Trabajando con papaya, Drew (1988) observó que hay un crecimiento más rápido de los brotes en medios líquidos en comparación con los medios sólidos. Carvelli (1987), observó un incremento en el número de brotes en forma de rosetas basales, cada vez que el producto de un explante de Aconitum noveboracense y A. napellus era repicado o subcultivado durante períodos de cuatro semanas. Sin embargo, Harbage y Stimart (1987), observaron que para subcultivos de callos de Rhododendron existía una correlación negativa entre el

número de subcultivos y el número de brotes producidos.

Mackay y Kitto (1988), se refieren al elevado número de raíces producidas con una alta concentración de auxinas, concluyendo que el tipo de auxinas y su concentración no afecta el número de brotes en cultivos in vitro de estragón francés (Artemisia dracunculus L. var. sativa).

El efecto de las condiciones ambientales en las que se produce un explante de cereza (Prunus spp.), tiene consecuencias en la capacidad de enraizamiento de los brotes producidos a partir de dicho explante (Ranjit, Kester y Nicke, 1988). Aunque en ausencia de auxinas, los enraizamientos de cultivos in vitro de brotes de col china (Brassica campestris), originados de los ápices de plántulas, se llevan a cabo, la presencia de estas sustancias incrementa el porcentaje de enraizamiento, a la vez que hay un mejoramiento en el crecimiento de los brotes (Kee, Chandler y Thorpe, 1987). La expresión potencial de la organogénesis de una determinada especie al cultivarse in vitro, está determinada por la interacción o las limitaciones de los factores esenciales, como las hormonas de dicho cultivo sobre el genotipo del explante.

El contacto de las células vecinas a través de sus

membranas o plasmodesma, como mecanismo de comunicación celular, es importante en el proceso de diferenciación (Reinert, Bajaj y Zbell, 1977), quienes también citan a Key *et al.* y a Teissere, Penon y Pichar, que dicen que hay evidencias de que las auxinas estimulan la síntesis del ARNm y ARNr, lo que estaría correlacionado con la expresión de los genes.

Reinert, Bajaj y Zbell (1977), dicen que el sinergismo de las auxinas y las citoquininas es debido al efecto de las primeras en la transcripción nuclear, y el de la segunda en prevenir la degradación del ARNm (traslación).

Nakayama (1966), obtuvo brotes de Passiflora caerulea, al cultivar explantes originados a partir de secciones de tallos en presencia de kinetina en el medio de cultivo, en concentraciones de 1 mg/L cultivados en oscuridad; además observó que el ácido indol-acético en concentraciones de 0.1 mg/L inhibía dicha diferenciación y provocaba rizogénesis.

Morán (1978), trabajando con yemas axilares de Passiflora edulis var. flavicarpa y P. mollissima obtuvo un alto porcentaje de yemas en desarrollo durante la primera fase del cultivo, luego hizo repiques, y 20 días después del subcultivo aparecieron raíces. Morán (1979), al cultivar trozos de entrenudos de las mismas especies encontró que el

medio de Nitsch con 2 mg de kinetina/L inducía la formación de callos, con la posterior aparición de brotes luego de 20 días de realizar los repiques sobre el mismo medio de cultivo fresco.

III. MATERIALES Y METODOS.

1.- Material vegetal.

Se utilizaron semillas de frutos maduros de Passiflora quadrangularis recolectadas en la zona de Milagro, Provincia del Guayas, República del Ecuador. Las semillas, previo lavado, fueron puestas a germinar en el invernadero del Departamento de Horticultura de la Escuela Agrícola Panamericana.

Luego de la germinación se transplantaron a bolsas de plástico negro de 25 x 30 cm, que contenían suelo previamente desinfectado con bromuro de metilo a razón de una libra por metro cúbico de suelo.

El mantenimiento posterior de las plantas se hizo en el vivero, con podas y fertilizaciones periódicas para controlar su crecimiento y la producción de brotes nuevos de donde se tomaron las hojas fuentes de explantes.

2.- Explantes.

Los explantes fueron tomados de las hojas tiernas de brotes terminales, las que fueron seccionadas en pedazos de aproximadamente 0,75 x 0,75 cm.

3.- Medios de cultivo.

Se utilizó el medio de cultivo líquido de Nitsch (1969) (Apéndice 1), con puentes de papel como estructura de soporte. Luego de preparados los medios se ajustó el pH a 5.6. Posteriormente, con ayuda de jeringas automáticas, se transfirieron 5 ml de medio a tubos de ensayo de 18 x 125 mm, y 10 ml cuando se usaron frascos de vidrio de 125 ml de capacidad, en cuyo caso se solidificó el medio con agar al 0.8 % (peso/volumen).

Se estudió el efecto de cuatro hormonas: dos auxinas, el ácido indol acético (AIA), y el ácido 2,4 diclorofenoxi acético (2,4-D); y dos citoquinina, la bencil adenina (BA) y la kinetina (K). En el Cuadro 1 se presentan las dosis y combinaciones de citoquininas y auxinas que se usaron en los ensayos.

CUADRO 1. Dosis y combinaciones de citoquininas y auxinas empleadas en los cultivos *in vitro* de Fassiflora quadrangularis. El Zamorano, 1988.

CITOQUININAS (mg/L)	AUXINAS (mg/L)				
	0	0,5	1,0	2,0	4,0
0	0;0	0;0,5	0;1,0	0;2,0	0;4,0
1,0	1,0;0	1,0;0,5	1,0;1,0	1,0;2,0	1,0;4,0
5,0	5,0;0	5,0;0,5	5,0;1,0	5,0;2,0	5,0;4,0
10,0	10,0;0	10,0;0,5	10,0;1,0	10,0;2,0	10,0;4,0

Se estudió el efecto de las interacciones de AIA con K,

AIA con BA y 2,4-D con BA en ensayos separados.

Cada tratamiento constó de 10 repeticiones. Cada explante se consideró como una repetición.

4.- Cristalería

Se emplearon tubos de ensayo de 16 x 150 mm, y de 18 x 150 mm, para los cultivos iniciales, y frascos de vidrio de 125 ml.

Para esterilizar el agua destilada se utilizaron erlenmeyers de 125 ml.

Tanto la cristalería como el medio y los instrumentos fueron esterilizados en una autoclave a 1,06 Kg de presión por cm cuadrado, a 121 grados centígrados durante 20 minutos.

5.- Desinfección del material vegetal.

Porciones apicales de ramas de tres meses de edad se cortaron (20 cm terminales), las cuales fueron lavadas con jabón y enjuagadas con agua destilada estéril; se cortaron las hojas tiernas y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1 - 2 %, a la cual se le agregó una gota de dispersante " Tween 80 " por cada 100 ml de solución

preparada. El material vegetal se mantuvo en la solución desinfectante durante 15 minutos en agitación constante.

Posteriormente, se transfirieron en la cámara de flujo laminar, donde se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril para eliminar el hipoclorito.

6.- Disección y cultivo.

En la cámara de flujo laminar se hicieron los cortes de porciones de hojas con ayuda de pinzas y bisturí, previamente humedecidos en alcohol, flameados y enfriados en agua destilada estéril. Luego, se cortaron porciones cuadradas de hojas de aproximadamente 0,56 cm cuadrados. Los explantes fueron transferidos a cada tubo de ensayo con su medio de cultivo. Posteriormente, los tubos de ensayo se cerraron con tapas de plástico.

7.- Área de crecimiento.

Los cultivos se incubaron en una cámara de crecimiento con una intensidad luminosa de 2000 lux, durante 16 horas diarias, la cual fue provista por lámparas fluorescentes tipo "Daylight".

La temperatura se mantuvo a 25 grados centígrados, más o menos 2 grados centígrados.

8.- Evaluación de los tratamientos

Luego de iniciados los cultivos se tomaron datos a las ocho semanas de los diferentes tipos de crecimiento observados: formación de callos, organogénesis (raíces o brotes), según fue el caso, con las características de cada uno.

Los datos se presentan en forma porcentual, con base en el número de sobrevivientes de cada tratamiento (no infectados). La forma en que se evaluó el tamaño de los diferentes callos se detalla en los cuadros respectivos.

9.- Repiques.

Para los repiques se seleccionaron callos friables (callos de apariencia esponjosa), los cuales fueron extraídos de los tubos de ensayo en los que crecían. Se eliminaron las porciones de tejido viejo, y se transfirieron a un nuevo medio con un cambio en la concentración de hormonas, las cuales se presentan en el Cuadro 2.

CUADRO 2.- Dosis y combinaciones de auxinas y citoquininas aplicadas al medio para repiques de callos friables de *P. quadrangularis*. El Zamorano, 1988.

CITOQUININAS (mg/L)	AUXINAS (mg/L)		
	0	0,05	0,1
0	0;0	0;0,05	0;0,1
1,0	1,0;0	1,0;0,05	1,0;0,1
5,0	5,0;0	5,0;0,05	5,0;0,1
10,0	10,0;0	10,0;0,05	10,0;0,1

IV. RESULTADOS

Todos los resultados que se presentan a continuación fueron tomados en los cultivos iniciales luego de ocho semanas de crecimiento sobre medios líquidos de Nitsch, y varias combinaciones de hormonas, con puentes de papel como estructura de soporte de los explantes.

1.- Efecto del 2,4-D y la BA en el crecimiento de explantes de hojas de P. quadrangularis.

Los resultados del ensayo (Fig 1, Cuadro 3), muestran que no hubo desarrollo de los explantes cuando fueron cultivados sin hormona. Inicialmente el tejido se mantuvo verde, pero, pasada la segunda semana comenzó a tornarse amarillento como síntoma de muerte del tejido.

En los medios de cultivo con 2,4-D, se observó que esta hormona por sí sola promueve división celular que conduce a la formación de callo. En concentraciones de 0,5 mg/L, el callo fue de color blanquecino, con tejido friable en la superficie. Al aumentar el nivel de esta auxina a 1,0 ó 2,0 mg/L, hubo mayor crecimiento de callo para cada nivel, acompañado de cambios en la coloración a café claro. Los mayores callos se obtuvieron con el nivel de 4,0 mg/L, comparados con los demás tratamientos de este ensayo. Fueron de color blanco acuoso muy característico, con superficie

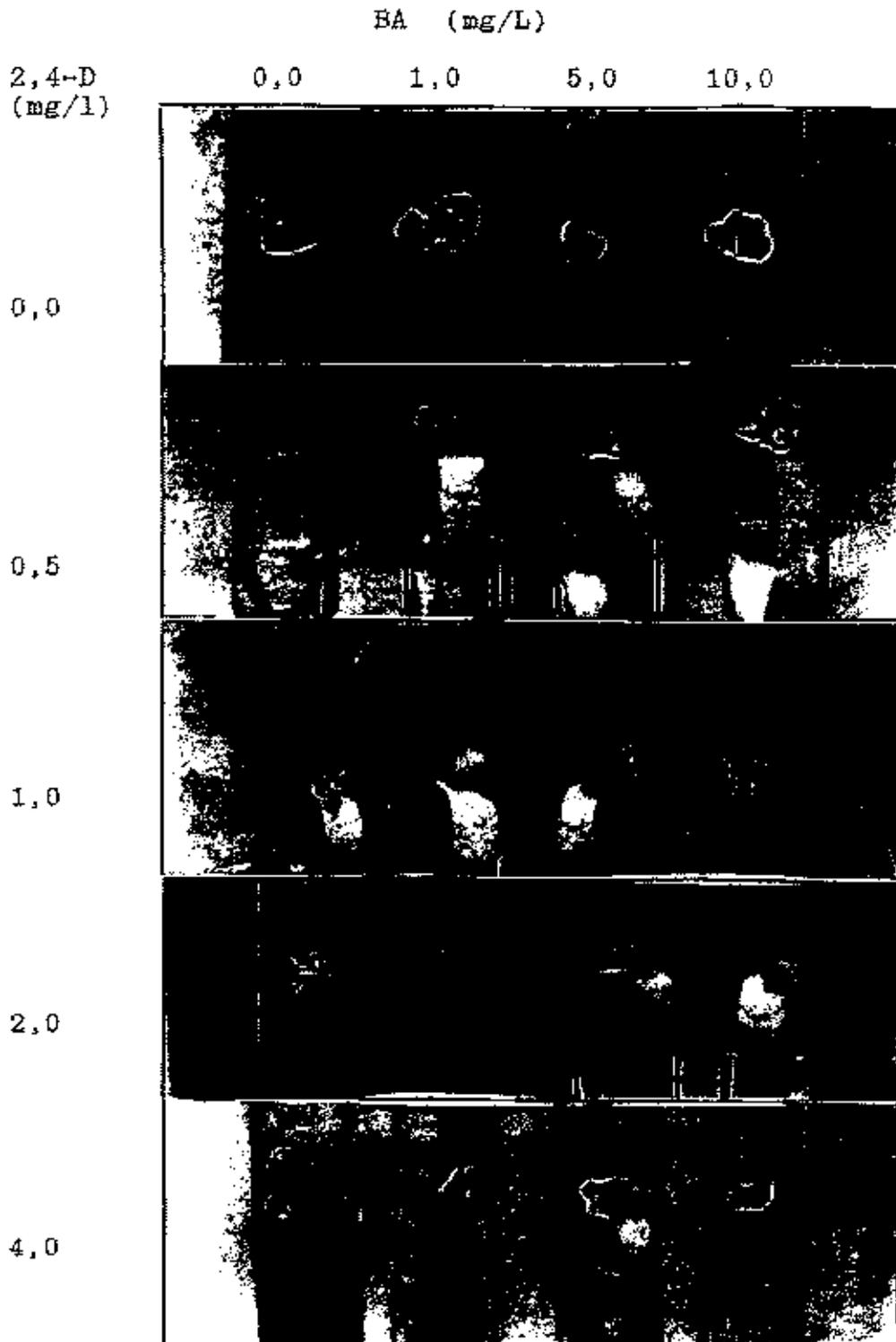


Fig. 1. Efectos de la aplicación de 2,4-D y BA en el crecimiento de explantes de hojas de *Passiflora quadrangularis* en el medio líquido de Nitsch. El Zamorano, febrero de 1989.

CUADRO 3. Efecto de la aplicación de 2,4-D y BA en el medio líquido de Nitsch, sobre el crecimiento de explantes de hojas de *P. quadrangularis*. El Zambrano, febrero de 1989.

Hormona		tamaño callo*	% callo	No. sobrev.	% callo + raíz.
2,4-D	+ BA				
0,0	+ 0,0	--	0	10	0
0,0	+ 1,0	+	30	10	0
0,0	+ 5,0	+	44	9	0
0,0	+ 10,0	+	77	9	0
0,5	+ 0,0	++	100	8	0
0,5	+ 1,0	+++	100	9	0
0,5	+ 5,0	++	100	9	0
0,5	+ 10,0	+++	100	9	0
1,0	+ 0,0	+	100	10	0
1,0	+ 1,0	+++	100	10	0
1,0	+ 5,0	++	100	10	0
1,0	+ 10,0	+++	100	7	0
2,0	+ 0,0	++	100	8	0
2,0	+ 1,0	+++	100	9	0
2,0	+ 5,0	++	100	9	0
2,0	+ 10,0	++	100	9	0
4,0	+ 0,0	++++	100	9	11
4,0	+ 1,0	+++	100	8	0
4,0	+ 5,0	+++	100	10	0
4,0	+ 10,0	++	100	10	0

* Ausencia de callo (--), callos muy pequeños (+), callos pequeños (++) , callos medianos (+++), callos grandes (++++).

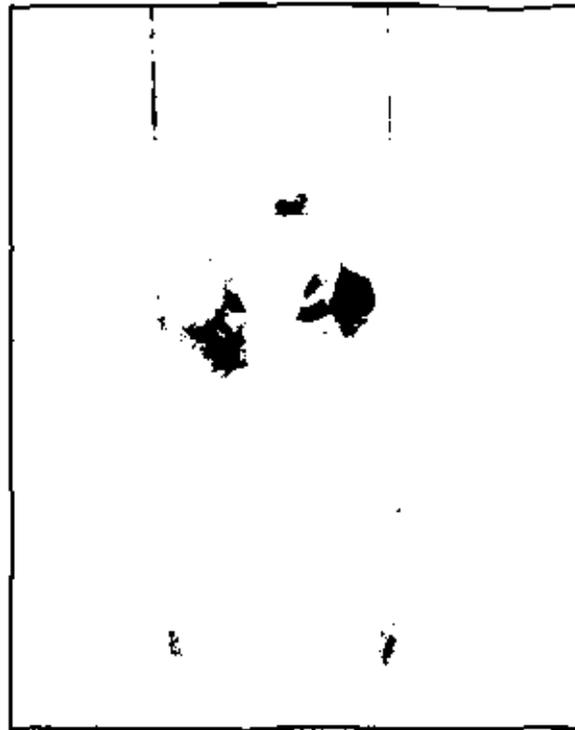


Fig. 2. Efecto de la aplicación de 4 mg/L de 2,4-D, sobre medio líquido de Nitsch, en el desarrollo de raíces adventicias (via callo), al cultivarse explantes de hojas de P. quadrangularis. El Zamorano, febrero de 1989.

muy friable. En estos callos se pudo observar rizogénesis en un 11% de los casos (Fig. 2, Cuadro 3).

La BA por sí sola tuvo un efecto pobre en la formación de callo, sin embargo, a medida que se aumentó la concentración de 1,0 a 5,0 y luego a 10,0 mg/L, el porcentaje de formación de callos aumentó. Tampoco se observó diferencia en la coloración verde característica de los callos como respuesta a los diferentes niveles de hormonas, ni tampoco en el tamaño muy pequeño de los mismos a las ocho semanas.

Como resultado de las interacciones de los diferentes niveles de 2,4-D y 1,0 mg/l de BA tanto el tamaño de los callos como el porcentaje de formación de estos fueron similares. Típicamente, fueron callos de color verde claro, de tamaño mediano y friables en la superficie. Luego, al aumentar las concentraciones de 2,4-D en combinación con BA, las tasas de crecimiento disminuyeron en los callos en todas las combinaciones posibles (Fig. 1, Cuadro 3); sin embargo, la coloración fue siempre verdosa.

2.- Efecto del AIA y la BA en el crecimiento de explantes de hojas de P. quadrangularis.

Al igual que en el ensayo anterior, no se observó crecimiento de callo en el tratamiento sin hormonas. Para los diferentes niveles de BA, y en ausencia de auxina, se observó la formación de callos pequeños de coloración verdosa (Fig. 3, Cuadro 4).

Para los tratamientos de los diferentes niveles de AIA sin BA, no se registró crecimiento de callo.

La interacción del AIA y la BA a niveles de 1,0 + 1,0 y 1,0 + 5,0 presentaron callos grandes y medianos, respectivamente, siendo los primeros los de mayor tamaño en este ensayo. En ambos casos, los callos fueron de color café

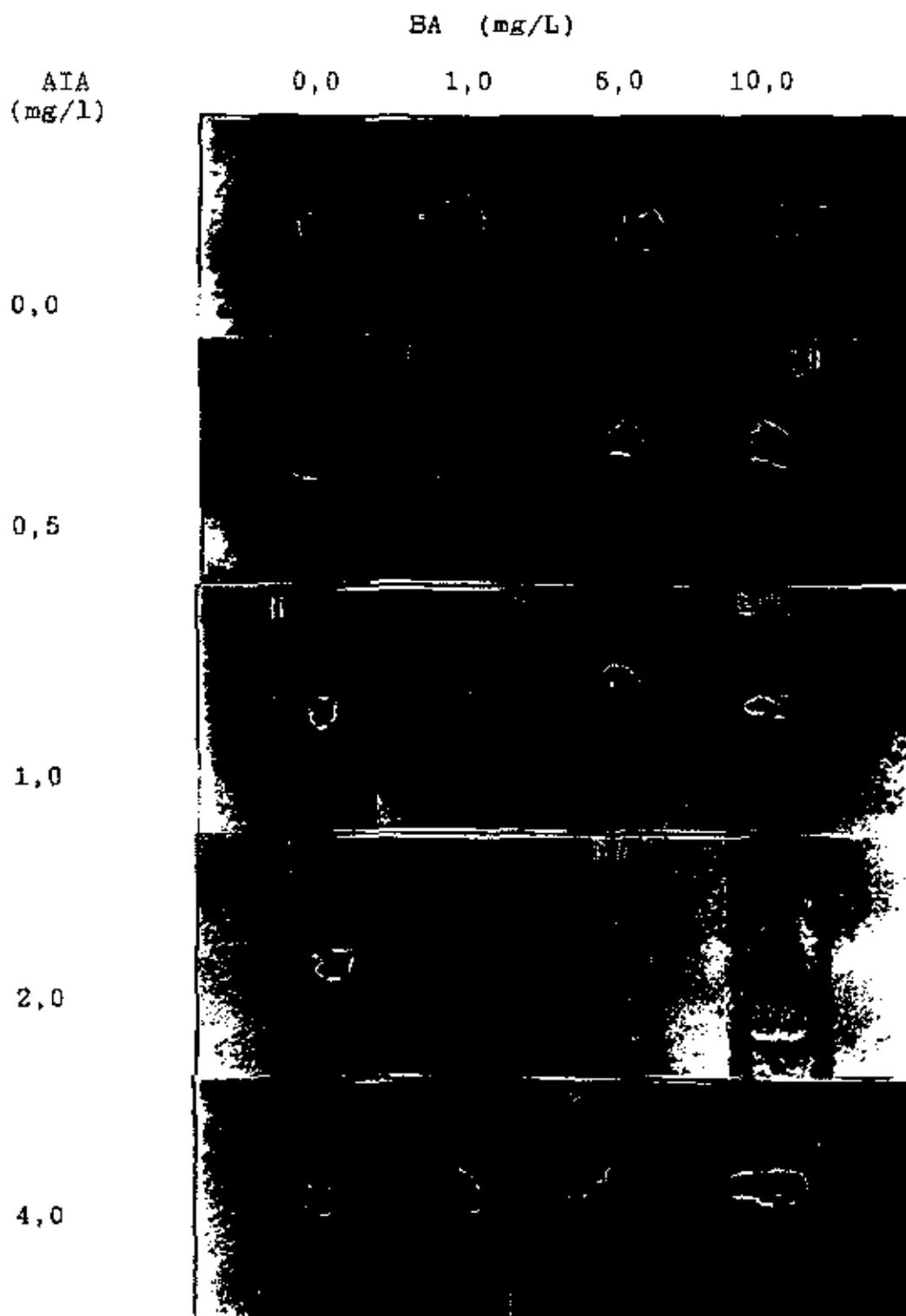


Fig. 3. Efectos de la aplicación de AIA y BA en el crecimiento de explantes de hojas de Passiflora quadrangularis en el medio líquido de Nitsch. El Zamorano, febrero de 1989.

CUADRO 4. Efecto de la aplicación de AIA y BA en el medio líquido de Nitsch, sobre el crecimiento de explantes de hojas de *P. quadrangularis*. El Zamorano febrero de 1989.

Hormona		tamaño callo*	% callo	No. sobrev.	% callo + raíz.
AIA	+ BA				
0,0	+ 0,0	--	0	10	0
0,0	+ 1,0	+	88	9	0
0,0	+ 5,0	+	100	9	0
0,0	+ 10,0	+	100	9	0
0,5	+ 0,0	--	0	8	0
0,5	+ 1,0	++	100	9	0
0,5	+ 5,0	++	100	9	0
0,5	+ 10,0	++	100	8	0
1,0	+ 0,0	--	0	10	0
1,0	+ 1,0	++++	100	10	0
1,0	+ 5,0	+++	100	8	0
1,0	+ 10,0	++	100	9	0
2,0	+ 0,0	---	0	8	0
2,0	+ 1,0	++	100	10	0
2,0	+ 5,0	++	100	8	0
2,0	+ 10,0	++	100	8	0
4,0	+ 0,0	---	0	10	0
4,0	+ 1,0	++	100	9	0
4,0	+ 5,0	++	100	9	0
4,0	+ 10,0	+	100	9	0

* Ausencia de callo (--), callos muy pequeños (+), callos pequeños (++) , callos medianos (+++), callos grandes (++++).

verdoso, con superficie friable. Para el resto de las interacciones hubo formación de callo muy pequeños, que tendían a disminuir al llegar a las concentraciones más elevadas de la dos hormonas, en especial de BA.

3.- Efecto del AIA y la K en el crecimiento de explantes de hojas de P. quadrangularis.

El Cuadro 5 muestra que no hubo crecimiento en el tratamiento sin hormonas. Para los tratamientos de los diferentes niveles de AIA sin K, no se registró crecimiento de callos. En cuanto a la K, para el nivel 1,0 mg/L de K sola, no se observó crecimiento de callo.

Si bien al aumentar la concentración de K, de 5,0 mg/L a 10,0 mg/L, se pudo observar formación de callo; el crecimiento fue muy pobre, y bajó el porcentaje en el nivel más elevado. En ambos casos, los callos fueron de color verde y poco friables. Para el nivel 5,0 mg/L de K combinado con los diferentes niveles de AIA, se observó un menor porcentaje de formación de callo, aunque el tamaño, en general, fue algo mayor que los obtenidos en las diferentes combinaciones del nivel 1,0 mg/L de K con el AIA.

Para las diferentes combinaciones, en los niveles más bajos, los callos que se formaron fueron de color café claro, mientras que en los niveles altos fueron verdes y de

CUADRO 5. Efecto de la aplicación de AIA y K en el medio líquido de Nitsch, sobre el crecimiento de explantes de hojas de *E. quadrangularis*. El Zamorano, febrero de 1989.

Hormona		tamaño callo*	% callo	No. sobrev.	% callo + raíz.
AIA	+ K				
0,0	+ 0,0	--	0	10	0
0,0	+ 1,0	--	0	10	0
0,0	+ 5,0	+	100	9	0
0,0	+ 10,0	+	77	9	0
0,5	+ 0,0	--	0	9	0
0,5	+ 1,0	+	55	9	0
0,5	+ 5,0	+	70	10	0
0,5	+ 10,0	++	100	10	0
1,0	+ 0,0	--	0	8	0
1,0	+ 1,0	++	100	7	0
1,0	+ 5,0	++	87	8	0
1,0	+ 10,0	++	100	8	0
2,0	+ 0,0	--	0	8	0
2,0	+ 1,0	+	100	9	0
2,0	+ 5,0	++	66	9	0
2,0	+ 10,0	++	100	10	0
4,0	+ 0,0	--	0	9	0
4,0	+ 1,0	+	100	10	0
4,0	+ 5,0	++	75	8	0
4,0	+ 10,0	+++	100	9	0

* Ausencia de callo (--), callos muy pequeños (+), callos pequeños (++), callos medianos (+++), callos grandes (++++).

tamaño mediano al llegar a la interacción del nivel 4,0 mg/L de AIA y 10,0 mg/L de K (Cuadro 5)

4.- Efecto del cambio de concentración de hormonas en los medios de cultivo para repiques de callo de P. quadrangularis.

Luego de realizados los repiques de los callos friables obtenidos de los cultivos iniciales, se incubaron dichos callos durante un periodo de ocho semanas, durante el cual, únicamente se pudo observar un aumento de tamaño en los diferentes callos.

DISCUSION

1.- Efecto de las auxinas en la formación de callo en explantes de hojas de P. quadrangularis.

En los explantes cultivados sin hormonas, no se observó crecimiento de callo, posiblemente por que en ausencia de reguladores de crecimiento, no hay un cambio en el metabolismo celular (síntesis de ácidos nucleicos y proteínas), sin lo cual no se iniciaría el proceso de división celular.

Al adicionarse 2,4-D, posiblemente se llegue a un equilibrio con los niveles endógenos celulares de citoquininas, en consecuencia, ocurre un cambio en el metabolismo celular y se produce la división, lo que explicaría la formación de callos mayores obtenidos al cultivarse los explantes sobre medios con 2,4-D en concentraciones de 4 mg/L. Bidwell (1979), indica que para el 2,4-D hay pocos sistemas enzimáticos, producidos en los tejidos de las plantas, capaces de degradarlo, lo que induce a mayores acumulaciones al ser aplicado sobre los tejidos. Posiblemente al llegar a las ocho semanas de cultivo, los niveles iniciales han disminuido y se encuentra en concentraciones endógenas que inducen la rizogénesis.

Si se compara el efecto del 2,4-D con el del AIA, la segunda, cuando se aplicó sola, no indujo la división celular, a lo mejor, porque nunca existió un equilibrio con los niveles endógenos de citoquininas. Además, si consideramos que el AIA es una hormona sintetizada en los tejidos vegetales, ésta puede ser inactivada o degradada por la acción enzimática de oxidasas y peroxidasas (Bidwell, 1979), por lo que no se mantiene una concentración adecuada en el tejido, lo que hace que se pierda el equilibrio con los niveles endógenos de citoquininas. En consecuencia, no se produce división celular.

2.- Efecto de las citoquininas en la formación de callo en explantes de hojas de P. quadrangularis.

La escasa formación de callo, producto de la poca división celular, para los diferentes niveles de las citoquininas BA y K, aplicados en los medios y en ausencia de auxinas exógenas, indican el desequilibrio en el que estuvieron con los niveles endógenos de auxinas existentes en los tejidos.

La BA siempre produjo callos muy pequeños, lo que no sucedió con la K en concentraciones de 1,0 mg/L, lo que parece indicar que la BA logra un mejor balance hormonal que la K, con las auxinas endógenas.

3.- La interacción de las auxinas con las citoquininas en la formación de callo en explantes de hojas de P. quadrangularis.

El mayor desarrollo de callo en las distintas combinaciones de BA con 2,4-D y BA con AIA, se obtuvieron cuando la citoquinina estaba a niveles de 1mg/L. En contraste con las respuestas a los diferentes niveles de 2,4-D con la BA a concentraciones de 1mg/L, donde, en todos los casos, se produjeron callos similares (de tamaño mediano). Únicamente la interacción de AIA a nivel de 1 mg/L con la BA a concentración similar, indujo el desarrollo de callos grandes.

La K, en concentraciones de 10 mg/L, al combinarse con el AIA a niveles de 4 mg/L, produjeron callos de tamaño mediano. Es de notarse que de todas las interacciones posibles de K con AIA, nunca se logró el desarrollo de callos grandes, a lo mejor porque no se llegó a los niveles necesarios de hormonas para entrar en equilibrio.

4.- Efecto del cambio de concentración de hormonas sobre el crecimiento de callos friable.

Se presume que el proceso de diferenciación puede llevarse a cabo in vitro, únicamente, cuando los niveles de auxinas y citoquininas llegan a un equilibrio adecuado en el tejido en cultivo (Bhojwani y Razdan, 1983). Dicho nivel

puede ser alcanzado por síntesis endógena del tejido, o por aplicaciones exógenas; el segundo caso es el más común para la inducción a organogénesis via callo. Es probable, en el caso presente, que los niveles de citoquininas aplicados fueran muy bajos para inducir la formación de brotes (Evans, 1981).

Si bien en los cultivos iniciales se observó rizogénesis al aplicar 4 mg/L de 2,4-D, se puede pensar que en los medios para repiques, los niveles de auxinas no fueron lo suficientemente elevados como para inducir la formación de raíces.

VI. CONCLUSIONES.

1.- La capacidad de las células vegetales maduras de revertirse hacia un estado meristemático, formando tejido dediferenciado (callo), ha podido observarse al cultivar explantes de hojas de P. quadrangularis.

2.- De las dos auxinas probadas, 2,4-D y AIA, únicamente la primera, por sí sola, indujo el desarrollo de callo.

3.- Las citoquininas por sí solas son capaces de inducir la formación de callo en P. quadrangularis.

4.- Para las diferentes combinaciones probadas entre auxinas y citoquininas , el mejor resultado se obtuvo cuando el AIA interactuó con la BA.

5.- Posiblemente, los niveles endógenos de auxinas y de citoquininas son bajos en los tejidos de hojas de P. quadrangularis, en relación con los niveles de hormonas que normalmente se usan en los trabajos in vitro.

VII. RECOMENDACIONES.

- 1.- Continuar con los trabajos in vitro de Passiflora quadrangularis, para determinar el proceso de micropropagación.
- 2.- Probar medios de cultivos más completos como son el MS (Murashige y Skoog) o el SH (Shenk y Hildebrandt).
- 3.- Probar nuevas combinaciones de auxinas y citoquininas diferentes a las utilizadas en el presente ensayo.
- 4.- Probar diferentes explantes a los usados en el presente ensayo tales como meristemas o yemas.

XIII. LITERATURA CITADA

- 1.- ALAN, J.J. 1979. Tissue culture storage of sweet potato germoplasm. Tesis, Ph. D. University of Birmingham, Birmingham, Inglaterra. p. 85 - 118.
- 2.- ARAQUE, R. 1963. La parcha granadina. Consejo de Bienestar Rural. Venezuela. 16 p.
- 3.- BERTHOULY, M.; GUZMAN, N. 1987. Sinopsis histórica y fundamentos del cultivo de tejidos. *In* Memoria II Curso de cultivo de tejidos. Abril de 1987, CATIE, Turrialba, Costa Rica. p. 11 - 13.
- 4.- BHOJWANI, S.; RAZDAN, M. 1983 Plant tissue culture: theory and practice. Amsterdam (Hol.), Elsevier 502 p.
- 5.- BIDWELL, R. 1979. Acción de las hormonas y reguladores de crecimiento. *En* Fisiología vegetal. Trad. al español por M. Rojas y G. Cano y Cano. Mexico, DF. (Mex.), AGT. p. 599 - 625.
- 6.- BOXUS, Ph.; QUODIRIN, N.; LAINE, J. 1977. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. *In* Plant cell, tissue and organ culture. Ed. by J. Reinert y Y.P. Bajaj. Berlin (Alem.), Springer - Verlag. p. 130 - 143.
- 7.- CARVELLI, R. 1987. *In vitro* propagation of Acanitum noveboracense and Acanitum napellus. Hort Science 22 (2): 304 - 305.
- 8.- DREW, R. 1988. Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field-grown trees. Hort Science 23 (3): 609 - 611.
- 9.- EVANS, D.; WILLIAM, S.; FLICK, C. 1981. Growth and behavior of cell cultures: embriogenesis and organogenesis. *In* Plant tissue culture methods and aplicaciones in agriculture. Ed. by T. Thorpe. New York (EEUU), Academic Press. p. 45 - 113.
- 10.- GAMBORG, O.; SHYLUK, J. 1981. Nutrition media and characteristics of plants cell and tissue cultures. *In* Plant tissue culture methods and aplicaciones in agriculture. Ed. by T. Thorpe. New York (EEUU), Academic Press. p. 21 - 44.

- 11.- HARBAGE, J.; STIMART, D. 1987. Adventitious shoots regeneration from in vitro subcultures callus of Rhododendron exbury hybrids. Hort Science 22 (6): 1314 - 1325.
- 12.- IBPGR. 1986. Genetic resources of tropical and subtropical fruits and nuts (excluding Musa). Rome (Italy), IBPGR, p. 88 - 91.
- 13.- KEE YOEUP PEAK.; CHANDLER, S.; THORPE, T. 1987. In vitro propagation of chinese cabbage from seedling shoot tips. Journal American Society Horticultural Science 112 (5): 841 - 845.
- 14.- LEON, J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. San José, Costa Rica, IICA. p. 442 - 446. Serie: Textos y materiales de enseñanza No.18.
- 15.- MACKAY, W.; KITTO, S. 1988. Factors affecting in vitro shoot proliferation of french tarragon. Journal American Society Horticultural Science 113 (2): 282 - 287.
- 16.- MARTIN, F.; NAKASONE, H. 1970. The edible species of Passiflora. Economic Botany 24: 333- 340.
- 17.- MORAN, M. 1978. Multiplication végétative in vitro des bourgeons axillaires de Passiflora edulis var. flavicarpa DEGENER et de P. mollissima BAILEY. Fruits 33 (10): 693 - 99.
- 18.- MORAN, M. 1979. Potentiel morphogénétique de entrenoeuds de Passiflora edulis var. flavicarpa Deneger et P. mollissima Bailey en culture " in vitro ". Fruits 29 (3): 224 - 228.
- 19.- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annual Review Plant Physiology (E.E.U.U.) 25: 135 - 166.
- 20.- MURASHIGE, T. 1979. Plant tissue culture and its importance to agriculture. In Practical Tissue Culture Applications. Ed. by K. Maramorosch y H. Hirumi. New York (E.E.U.U.), Academic Press. p. 27 - 43.

- 21.- NAKAYAMA, F. 1966. Cultivo in vitro de tejidos de Passiflora caerulea. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Plata 42: 63 - 74.
- 22.- NARAYANASWAMY, S. 1977. Regeneration of plants from tissue culture. In Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Ed. by J. Reinert y Y.P.S. Bajaj. Berlin (Ale.), Springer - Verlag. p. 179 - 206.
- 23.- NITSCH, J.; NITSCH, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science (N.Y.) 163: 85 - 87.
- 24.- PURSEGLOVE, J. 1968. Passifloraceae. In Tropical Crops. Dicotyledons 2. Londres (Ingl.), Longmans. p. 420-429.
- 25.- RANJIT, M.; KESTER, D.; MICKE, W. 1988. Micropropagation of cherry rootstocks. I. Response to culture. Journal American Society Horticultural Science. 113 (1): 146 - 149.
- 26.- REINERT, J; BAJAJ, P.; ZBELL, B. 1977. Aspects of organization.- Organogenesis, embryogenesis, cytodiferentiation. In Plant Tissue and Cell Culture. 2 ed. Ed by H.E. Street. Botanical Monographs. Volume 11. Oxford (Engl.), Blackwell Scientific Publication. p. 389 - 427.
- 27.- ROMERO, R. 1956. Plantas de valor comercial del género Passiflora: granadilla, curuba, badea y otra. Agricultura Tropical (Bogotá) 12: 403 - 407.
- 28.- THOMAS, E. ; DAVEY, M. 1975. The culture of plant cells. In From single cells to plants. Londres (Ingl.), Wykeham Publications p. 50 - 70.
- 29.- THORPE, T.A. 1982. Callus organization and de novo formation of shoots, roots and embryos in vitro. In Application of plant cell and tissue culture to Agriculture and Industry. Guelph (Can.), University of Guelph. p. 115 - 138.
- 30.- TISSERAT, B. 1985. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In Plant cell culture a practical approach. Ed. por R. Dixon, Oxford (Ingl.), Information Printing. p. 79 - 105.

IX. ANEXO

Anexo 1. Composición del medio de Nitsch.

<u>Constituyentes</u>	<u>mg/l</u>
Inorgánicos	
macronutrientes	
NH_4NO_3	720
KNO_3	950
CaCl_2	166
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185
KH_2PO_4	68
micronutrientes	
H_3BO_3	10
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
Orgánicos	
Inositol	100
Acido nicotínico	5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.5
Glicina	2
Acido fólico	0.5
Biotina	0.05
Sacarosa	2 %

DATOS BIOGRAFICOS DEL AUTOR

Nombre: Sucre Nicolás Rodríguez Navarrete

Lugar de Nacimiento: Guayaquil, Ecuador

Fecha de Nacimiento: 24 de junio de 1967

Nacionalidad: Ecuatoriano

Educación:

Primaria: I.P.A.C. (Guayaquil)

Secundaria: Liceo Naval (Guayaquil)

Superior: Escuela Agrícola Panamericana

Título Recibidos: Agrónomo (Diciembre de 1987)