

EFFECTO DE LA BENCIL AMINO PURINA EN LA INDUCCIÓN DE BROTES
DE *Passiflora maliformis* L. (CHOLUPA)



DIEGO MAURICIO VASQUEZ ALBA

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
PAMPLONA

2016

EFFECTO DE LA BENCIL AMINO PURINA EN LA INDUCCIÓN DE BROTES
DE *Passiflora maliformis* L. (CHOLUPA)



Estudiante

DIEGO MAURICIO VASQUEZ ALBA

Informe final trabajo de grado (modalidad pasantía de investigación) como
requisito para optar al título de Biólogo

Director

GIOVANNI ORLANDO CANCINO ESCALANTE
PhD.

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
PAMPLONA

Diciembre 5 de 2016

TABLA DE CONTENIDO

	pág
RESUMEN.....	10
INTRODUCCION.....	11
CAPITULO I.....	14
PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	14
1.1 Título.....	14
1.2 Planteamiento del problema.....	14
1.3 Formulación del Problema.....	14
1.4 Objetivos.....	15
1.4.1 Objetivo general.....	15
1.4.2 Objetivos específicos.....	15
1.5 Justificación.....	15
CAPITULO II.....	17
MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....	17
2.1 Antecedentes.....	17
2.2. Marco Teórico.....	20
2.2.1 Familia <i>Passifloraceae</i>	20
2.2.2 Biotecnología.....	21
2.2.3 Micropropagacion.....	22

2.2.4 Etapas de la micropropagación desde el cultivo de tejido vegetal..	22
2.2.4.1 Selección del explante madre.	22
2.2.4.2 Establecimiento aséptico del explante.	22
2.2.4.3 Callo.	22
2.2.4.4 Enraizamiento.	22
2.2.4.5 Aclimatación.	23
2.2.5 Cultivo <i>in vitro</i> .	23
2.2.6 Cultivos <i>in vitro</i> para la conservación de especies.	24
2.3 Marco legal.....	25
CAPITULO III	26
METODOLOGÍA	26
3.1 Tipo de Investigación	26
3.2 Población y Muestra.....	26
3.2.1 Población.....	26
3.2.2 Muestra.....	26
3.3 Hipótesis.....	26
3.3.1 Hipótesis Nula.	26
3.3.2 Hipótesis Alterna.....	26
3.4 Variables.....	27
3.4.1 Independientes.	27
3.4.2 Dependientes.....	27
3.4.3 Intervinientes.....	27
3.5 Fases de la Investigación.....	27

3.5.1 Fase 0 etapa preparativa.	27
3.5.2 Fase I protocolo de desinfección óptimo.	29
3.5.3 Fase II inducción a brotes foliares.	29
3.5.4 Fase III comportamiento morfogenético.	30
3.6 Técnicas de análisis de procesamiento de la información.....	30
CAPITULO IV.....	32
RESULTADOS Y ANALISIS.....	32
4.1 Material vegetal.	32
4.1.1 Desinfección.	33
4.2 Análisis estadísticos.	42
4.2.1 Primera parte "brotes".....	43
4.2.1.1 Análisis del experimento.	43
4.2.1.2 Descriptivos "brotes".	43
4.2.1.3 Comparación medias.	46
4.2.1.4 Estudio de efectos sobre las varianzas.	48
4.2.2 Segunda parte "laminar".	50
4.2.2.1 Análisis del experimento.	50
4.2.2.2 Descriptivos "laminar".	50
4.2.2.3 Comparación de medias.	53
4.2.2.4 Estudio de efectos sobre las varianzas.	55
4.2.3 Tercera parte "peciolar".	57
4.2.3.1 Análisis del experimento.	57

4.2.3.2 Descriptivos "peciolar".	57
4.2.3.3 Comparación de medias.	60
4.2.3.4 estudio de efectos sobre las varianzas.	62
4.3. Discusión.	64
4.4. Conclusiones.	66
4.5 Recomendaciones.	68
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	69

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Distribución de los tratamientos de desinfección	29
Tabla 2. Distribución de los tratamientos Citoquininas	30
Tabla 3. Distribución de los tratamientos de desinfección adaptada	34
Tabla 4. Brotes inducidos con el regulador de crecimiento BAP	38
Tabla 5. Promedios en la inducción de brotes	39
Tabla 6. Resumen de los estadísticos descriptivos para la variable dependiente “brotes”	44
Tabla 7. Comportamiento del Sesgo y la Curtosis	44
Tabla 8. Test de Fisher para brotes	45
Tabla 9. Anova para brotes por concentración	45
Tabla 10. Pruebas de múltiples rangos para brotes por concentración	46
Tabla 11. Diferencias significativas para los tratamientos	46
Tabla 12. Anova para residuos por concentración	49
Tabla 13. Resumen de los estadísticos descriptivos para la variable dependiente “numero de brotes según su origen”	51
Tabla 14. Comportamiento del sesgo y la curtosis estandarizados	51
Tabla 15. Prueba de kruskal-wallis para brotes laminares por concentración	52
Tabla 16. Test de Fisher para brotes laminares	52
Tabla 17. Anova para brotes laminares por concentración	53
Tabla 18. Pruebas de múltiples rangos para brotes laminares por concentración	53
Tabla 19. Diferencias significativas para los tratamientos laminares	54
Tabla 20. Anova para residuos laminares por concentración	56
Tabla 21. Resumen de los estadísticos descriptivos para la variable dependiente “numero de brotes según su origen”	58

Tabla 22. Comportamiento del Sesgo y la Curtosis estandarizados	58
Tabla 23. Prueba de kruskal-wallis para brotes peciolares por concentración	59
Tabla 24. Test de Fisher para brotes peciolares	59
Tabla 25. ANOVA para brotes peciolares por concentración	60
Tabla 26. Pruebas de múltiples rangos para brotes peciolares por concentración	60
Tabla 27. Diferencias estimadas entre cada par de medias	60
Tabla 28. ANOVA para residuos peciolar por concentración	63

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Flujograma de las fases de la investigación	28
Figura 2. Germinación de la semilla <i>P. maliformis</i>	32
Figura 3. Porcentaje de contaminación inicial	33
Figura 4. Resultado del porcentaje de contaminación adaptada	34
Figura 5. Formación de brotes en segmentos foliares	36
Figura 6. Proceso de inducción de brotes	36
Figura 7. Muestra de la contaminación del material para la germinación de <i>P. maliformis</i>	37
Figura 8. Promedios en la inducción de brotes	39
Figura 9. Establecimiento y elongación de los brotes	40
Figura 10. Porcentaje de supervivencia de brotes obtenidos de <i>P. maliformis</i> en los 2 mejores tratamientos	41
Figura 11. Supervivencia del los brotes formados de <i>P. maliformis</i> desarrollandose unos mas que otros	42
Figura 12. Diferencias mínimas significativas de brotes	47
Figura 13. Gráfico de residuos para brotes	48
Figura 14. Medias de los intervalos LDS para residuos de brotes	50
Figura 15. Medias de los intervalos LSD	54
Figura 16. Gráfico de residuos para brote laminar	55
Figura 17. Medias de los intervalos LSD para residuos de brotes laminares	57
Figura 18. Gráfico de medias de los intervalos LSD	61
Figura 19. Gráfico de residuos para brotes peciolares	62
Figura 20. Medias de los intervalos LSD para residuos de brotes peciolares	63

RESUMEN

La *Passiflora maliformis* es una especie frutícola promisoría, siendo una especie poco estudiada, y con problemas de producción comercial a gran escala. En la presente investigación se evaluó el regulador de crecimiento Bencilamono purina (BAP) con el fin de inducir brotes en segmentos foliares de *P. Maliformis*. Estableciendo 4 segmentos foliares en cada medio de cultivo para la inducción de brotes, compuesto de las sales de Murashige y Skoog con el 3% de sacarosa, y adicionando 0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 mg/L de BAP para los diferentes tratamientos. Los mejores resultados en la inducción de brotes se observaron en los tratamientos con 0.3 y 0.6 mg/L de BAP con 6 y 7 brotes para cada medio respectivamente. Los mejores resultados en la inducción dependiendo del lugar donde se originó el brote, lo obtuvo la parte peciolar del explante induciendo 4 brotes por medio en los tratamientos 0.3 y 0.6 mg/L de BAP. El número más bajo de brotes se observó en los tratamientos con mayor concentración de BAP mostrando un efecto negativo. Aportando de esta manera un procedimiento para el establecimiento *in vitro* de segmentos foliares y la inducción de brotes mediante reguladores de crecimiento, con el fin de desarrollar a futuro la metodología de micropropagación para la especie *P. maliformis* que permita la propagación masiva de la especie y así ofrecer materiales seleccionados a los productores de esta especie de *Passiflora* promisoría.

INTRODUCCIÓN

Nuestro país cuenta con una enorme diversidad biológica demostrada en la variedad de flora y fauna, esta diversidad ha permitido que se empleen en una gran gama de productos agropecuarios, muchos de estos considerados exóticos, siendo más atractivos para los mercados internacionales. Desde hace 50 años venimos comprendiendo el desarrollo de la biotecnología, esencialmente en la propagación de especies vegetales, conocida como micropropagación, que tiene como base principal el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, técnica trascendental para la producción masiva de plantas de interés económico o biológico. (Salgado, 2016)

En la familia *Passifloraceae* se conocen 17 géneros con alrededor de 650 especies distribuidas a través del trópico con variabilidad climática desde el nivel del mar hasta aproximadamente los 4200 metros, la mayoría cultivadas por sus frutos comestibles, mientras que otras son usadas como plantas ornamentales. La explicación, es que posee condiciones agroecológicas favorables para el desarrollo de una amplia y variada gama de productos frutícolas, hay disponibilidad de tierras, diferentes pisos térmicos con bajo grado de aprovechamiento y buena localización respecto a los mercados. (Ocampo, Rodríguez, Puentes, Molano, y Parra, 2015)

El género *passiflora* posee una de las frutas promisorias e industrializables en Colombia la *P. maliformis* (Cholupa), debido a que nuestro país la produce con alrededor de 1.112 toneladas para el año 2012. Existiendo una demanda potencial local de 2.672 toneladas para el mercado en fresco local, al incrementar la demanda nacional permite observar el déficit para abastecer nuevas plantaciones y así proyectarla como una fruta promisoriosa para los mercados nacionales y de exportación. (Garay, 2012)

Las condiciones agroecológicas del cultivo de *P. maliformis* permiten cultivar esta fruta en diversas regiones de nuestro país; en Norte de Santander se favorece de lo anterior ya que posee diversidad de climas, y la implementación de este frutal permitirá fortalecer la Cadena Productiva de Frutas a nivel nacional y sobre ellas desarrollar las diferentes actividades y proyectos para el sector Frutícola contando con la participación activa de todos los actores de la cadena productiva con el fin de mejorar su calidad de vida. (Acuerdo de competitividad cadena productiva frutícola, 2006)

Por lo tanto un desarrollo frutícola en un país como Colombia debe estar sustentado con un aporte importante de innovación tecnológica, sin embargo en la actualidad se ha estudiado el comportamiento vegetal de otras especies de *Passiflora* como maracuyá, Curúba etc. bajo técnicas *in vitro* (Becerra, 2003). No obstante se desconoce un procedimiento para cholupa, de esta manera el presente trabajo de investigación pretende inducir brotes a partir de segmentos de hojas evaluando un regulador de crecimiento hormonal que estimulen el mayor porcentaje de brotes bajo condiciones ambientales controladas con el fin de establecer un antecedente de investigación que servirá como alternativa para la propagación masiva de este frutal con calidad fitosanitaria y de esta manera lograr posicionar el cultivo en la región del Norte de Santander.

La *P. maliformis*, también conocida como la granadilla de hueso, granadilla de piedra, calabacito de indio, cholupa, entre otras, es una fruta nativa que se ofrece en el mercado nacional, por sus características propias y su inigualable sabor. Esta es una especie que demanda se genere estudios de mejoramiento que permitan propagar material seleccionado mediante las técnicas de micropropagación.

En esta investigación modalidad pasantía, se evaluó el establecimiento e inducción de brotes, creando la primera parte del procedimiento para la propagación *in vitro* y masiva de la

especie. Evaluando la inducción de brotes en segmentos foliares de *P. maliformis*, tomando el material de plantas germinadas en el invernadero, planteando inicialmente la evaluación de dos reguladores del crecimiento, Bencil aminopurina (BAP) y Kinetina (KIN) Siembargo ante las dificultades por contaminación en el establecimiento de segmentos foliares provenientes de material de invernadero, no se efecto la evaluación con el regulador Kinetina.

El proyecto se desarrolló en cuatro fases, que van desde la fase invernadero, hasta la formación del brote. Por tanto la investigación es de tipo cuantitativa, exploratoria y descriptiva, debido a que busco obtener un conocimiento en la medida en que se observaba el comportamiento de los explantes a través de la evaluación de diferentes concentraciones hormonales que permiten el establecimiento *in vitro* de brotes de *P.maliformis*.

CAPITULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Título

Efecto de la bencil amino purina en la inducción de brotes de *passiflora maliformis* l. (cholupa)

1.2 Planteamiento del problema

Entre las especies frutales promisorias de nuestro país se encuentra la *P. maliformis* L (Cholupa) especie que pertenece a la familia de las pasifloráceas, dentro de sus cualidades presenta un potencial rico para la producción agroindustrial, ornamental y otras propiedades medicinales, tiene también caracteres genotípicos que la hacen atractivas a los mercados internacionales por lo que fomentar su propagación enriquece los mercados regionales y contribuye al crecimiento económico de nuestro país.

Dentro de las técnicas de propagación de especies vegetales esta la micropropagación en donde se plantean procedimientos para el manejo de los explantes provenientes de diferentes tejidos de la planta a propagar, los cuales son sometidos a un medio nutricional selectivo, bajo condiciones controladas de fotoperiodo, humedad relativa y temperatura. Sin embargo no se registran estudios específicos a la fecha para la micropropagación de *P. maliformis*, constituyéndose en un vacío de conocimiento que limita su mejoramiento genético. Sin embargo para otras especies (*P. edulis*, *P. mollissima*, *P. ligularis* etc.) del genero *Passiflora* existen variados estudios en micropropagación.

1.3 Formulación del Problema

¿Cuál es el efecto del regulador de crecimiento Bencil amino purina (BAP) para la inducción de brotes en segmentos foliares de *P. maliformis*?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general. Evaluar el efecto de la citoquinina BAP para la inducción de brotes en segmentos foliares de *P. maliformis* (Cholupa).

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar diferentes tratamientos para la desinfección superficial de segmentos foliares de *P. maliformis* (Cholupa).
- Evaluar diferentes concentraciones de BAP en un medio basal para la inducción de brotes foliares de *P. maliformis* (Cholupa).
- Determinar la supervivencia de los brotes inducidos en los segmentos foliares de *P. maliformis* (Cholupa).

1.5 Justificación

Colombia cuenta con 170 especies registradas es el país con mayor diversidad de la familia *Passifloraceae*, tanto en formas silvestres como cultivadas. (Ocampo, 2013)

Con relación a la variedad de frutas promisorias del género *Passiflora* en Colombia son pocos los cultivos que cuentan con semillas certificada de alta calidad fitosanitaria y estabilidad genética; debido a que no se propagan de materiales seleccionados, limitando así su potencial agrícola. Para el caso puntual de la *P. maliformis* (Cholupa), las áreas cultivadas son limitadas debido a que es muy poco estudiada. Por tal razón y considerando esta problemática, la micropropagación de esta especie permitiría en un futuro cercano, propagar de manera masiva materiales seleccionados y de excelente calidad fitosanitaria.

Por lo tanto es importante destacar que la micropropagación permite obtener masivamente plantas seleccionadas con una variabilidad genética determinada. Estas técnicas de propagación

han sido utilizadas con éxito en diversas especies vegetales de interés agrícola tales como las hortícolas, frutales, ornamentales y leñosas, también han sido empleadas en los programas de conservación de las especies vegetales en vías de extinción o en aquellas en donde sus mecanismos de propagación no son las mejores. Aunque son diversos los trabajos desarrollados en especies comerciales del genero *Passiflora*.

Así mismo la micropropagación presenta una ventaja sobre los sistemas de propagación convencional, dentro de estos tenemos una mayor producción de plantas con un genotipo determinado obtenidas de una planta madre seleccionada con características específicas, el tiempo de multiplicación es más corto, permite multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, y un bajo costo, y permite controlar la sanidad del material que se propaga.

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este estudio es evaluar: el establecimiento *in vitro* de segmentos foliares y la inducción de brotes mediante reguladores de crecimiento, con miras a desarrollar a futuro la metodología de micropropagación que permita la propagación masiva de la especie y así ofrecer materiales seleccionados a los productores de esta especie de *Passiflora* promisoría.

CAPITULO II

MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 Antecedentes

El presente estudio tiene como propósito aportar al poco conocimiento que existe para la especie *P. maliformis* en relación a la micropropagación tomando como antecedentes las siguientes investigaciones.

Salgado (2016) en su escrito “La propagación de plantas *in vitro*, un éxito biotecnológico” anota que “Desde hace 50 años se ha demostrado el avance en el desarrollo de la biotecnología vegetal, principalmente en la propagación de especies vegetales. Para este propósito existe toda una tecnología biológica en grandes laboratorios e invernaderos de diferentes países, que reditúa ganancias en miles de millones de pesos. A este sistema de propagación se le conoce como micropropagación, que tiene como base principal el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, una de las más importantes aplicaciones para la producción masiva de plantas de interés económico o biológico.

Otahola (2000) en su estudio titulado “Regeneración de la plantas de parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de segmentos de hojas” concluye que al implementar una metodología sencilla para la producción de plantas de parchita a partir de organogénesis directa de explantes foliares, con el fin de utilizarlas para el mejoramiento genético, ensayo realizado en el laboratorio de Biotecnología del Núcleo de Monagas, donde se emplearon diferentes concentraciones de BAP (0; 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2 mg/l) en un medios basal MS (Murashige y Skoog, 1962), se lograron emplear segmentos foliares de aproximadamente 1cm de diámetro, donde se demostró que la hormona de crecimiento BAP, en las dosis evaluadas

indujeron a la formación de callos, predominando la concentración 0,6mg/L con un comportamiento superior en porcentaje, a las demás dosis, no obstante la concentración de 1,2 mg/L de BAP favoreció de manera directa la organogénesis en los explantes de parchita.

Por otra parte, Becerra (2003) en su estudio titulado “Efecto del origen del material y la edad sobre la capacidad morfogénica de dos especies de *passiflora* cultivadas *In Vitro*” afirma que la capacidad morfogénica de estas dos especies de pasifloras cultivadas en condiciones *in vitro*, bajo los componentes nutricionales del medio de cultivo propuesto por Murashige & Skoog (1962) y con los reguladores de crecimiento BAP y Kinetina, donde para su estudio se sembraron segmentos foliares, con ello, se evaluó la respuesta morfogénica, obteniendo resultados donde un mayor número de brotes a partir de los 2 a 3 meses, se pudo reportar que sólo presentaron raíces espontáneas aquellas micropropagadas a partir de los segmentos foliares.

Por su lado, Leal (2003) en su proyecto titulado “Organogénesis *in vitro* a partir de discos de hojas de *passiflora mollissima* hbk bailey (curúba) infectados con *Agrobacterium tumefaciens*” realizó un estudio práctico y completo de la Unidad de Biotecnología Vegetal, allí se evaluaron diferentes concentraciones de citoquininas Benzilaminopurina (BAP) y Kinetina (KIN) a partir de discos de hojas infectadas con la cepa *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, con el vector binario pBI 121, en este proyecto de investigación se lograron obtener plantas genéticamente transformadas, las cuales se emplearon el medio de cultivo Nitch empleando cefotaxine 250 mg/L como antibiótico, este con el fin de controlar lo relacionado con el crecimiento bacteriano. Por otra parte, los brotes iniciales presentaron elongación de tallo y desarrollo de raíces al cultivarlos en el medio Nitsch sin reguladores de crecimiento.

Pérez, Escala, Tillett (2005) en su estudio titulado “Anatomía de la cubierta seminal en ocho especies de *passiflora* l., subgénero *passiflora*”. Halló las características que permiten

distinguir especies que contribuyen a resolver problemas taxonómicos presentes en este género.

En esta investigación se tuvieron en cuenta 8 patrones atómicos, donde las características predominantes fueron: grosor de la cubierta seminal, número de capas, tipo de capa y tipo de alargamiento radial de las células. En los resultados arrojados en dicho estudio, se destacó la presencia de algunas células obliteradas en todas las especies estudiadas.

En el estudio realizado por Ramírez, Vargas, García (2009), titulado “Cultivo de microesquejes de parchita (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg)”, se evaluó el efecto de la Benciladenina (BA) y de agentes diferentes agentes como los gelificantes sobre el brote de microesquejes, para dicho estudio se emplearon 60 plántulas de parchita de cuatro meses de edad las cuales fueron cultivadas controladamente.

En esta investigación se obtuvieron 91,3 % de explantes viales, libres de contaminación y sin problemas de fenolización, donde todos y cada uno de los tratamientos lograron 100% de explantes brotados y enraizados. No obstante se logró concluir en este estudio que el cultivo de microesquejes de parchita en medio nutritivo MS con 2 mg/L de BA permitió a los 30 días *In vitro* 100% de explantes brotados y enraizados y 5,9 brotes por explantes. Los microesquejes presentaron la respuesta de brote, lo que demuestra el potencial de este explante para el establecimiento de un sistema de propagación clonal *in vitro* de la parchita, y así mismo uso en la microinjertación.

Para Otahola, y Díaz (2012) en su investigación titulada “Regeneración *in vitro* de *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa* y *Passiflora quadrangularis* utilizando dos tipos de explantes provenientes de plantas adultas y Bencilaminopurina”. Se realizaron diferentes ensayos en el laboratorio de biotecnología, donde se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones de BAP, empleando como explantes discos foliares y yemas axilares obteniendo los siguientes resultados:

Se presentaron más números de brotes por explantes en la concentración de 1,5 y 2.0 mg/ L de BAP con promedios de 6,1 y 7,4 brotes por explante en *Passiflora quadrangularis*, mientras en *Passiflora edulis* el mayor número de brotes por explantes se obtuvo con las dosis 0.5 mg/L de BAP, con un promedio de 3,0 brotes por explantes, también se resalta que hubo formación de callogénesis en la especie *Passiflora quadrangularis*, en cambio la otra especie indujo a organogénesis directa.

Teniendo en cuenta la parte agrícola la recopilación titulada “Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulúpa y Curúba”, Miranda, Fischer, Carranza, Magnitskiy, Casierra, Piedrahita y Flórez (2009) actualizaron los principales avances científicos y tecnológicos, en los diferentes componentes de los sistemas productos existentes como lo son: los recursos genéticos los cuales están disponibles en todas las regiones del país, su ecofisiología, los sistemas de producción del material de propagación y de sus semillas, los métodos de establecimiento de estos cultivos y las técnicas de manejo integrado, la recolección, poscosecha, comercialización y las tendencias de los mercados de exportación, su temática está organizada con un enfoque específico de esa cadena productiva que se inicia desde la reproducción hasta la comercialización y exportación de la producción.

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Familia *Passifloraceae*. . La familia en Colombia está representada por 170 especies inventariadas y pertenecientes a tres géneros *Ancistrothyrus* (2), *Dilkea* (4) y *Passiflora* (164) esta diversidad representa el 26% de las especies registradas de la familia a nivel mundial ubicándonos con el mayor porcentaje de biodiversidad tanto en formas silvestres como cultivadas. La distribución geográfica de la Familia *Passifloraceae*, es tropical y subtropical, es una familia de plantas con tamaño medio, que pueden encontrarse generalmente en forma de

lianas o enredaderas herbáceas con zarcillos axilares, hasta árboles bajos y arbustos. (Ocampo & Merlin 2014)

Dentro del género *Passiflora* se encuentra la especie *P. maliformis* L, que es un bejuco o arbusto trepador, el cual se ramifica cuando adquiere su mayor edad, además, se aferra mediante zarcillos axilares, resultante de hojas profundamente modificadas, sus raíces son Fasciculadas, superficiales y tienen aproximadamente una profundidad de 30 a 40 cm y una longitud de 1.70 metros, también poseen hojas alternas, pecioladas, sencillas lobuladas. Su llamativa flor es de color violeta, pasionaria y rojo en las bases transversales de corona externa y con el receptáculo el cual es ampliamente desarrollado, presenta 5 estambres, 5 pétalos, 3 brácteas verdes, 5 sépalos verdes por fuera y blancos por el haz. Respecto a su fruto es de forma redonda, y tiene de cinco a nueve centímetros de diámetro, su peso fluctúa entre 30 a 100 gramos, su color es anaranjado, amarillo y matizado, su sabor dulce y comestible, con cascara cariáceas y dura resiste la presión de 23.5 Lbs. / pulg². (Hernández & García 2006)

2.2.2 Biotecnología. La biología trata del estudio de todo ser vivo y la tecnología trata de resolver y proporcionarnos lo que necesitamos, de esta manera podemos pensar que la biotecnología utiliza todo ser vivo para producir lo que necesitamos, utilizando procesos biológicos para producir bienes y servicios que incluirían alimentos, combustibles y medicamentos por parte de bienes, y servicios como el tratamiento de residuos, control de contaminaciones, utilizando células vivas o productos sintetizados por estas, como las enzimas, pudiendo proceder de plantas o animales conocidos o microorganismos como son las levaduras y bacterias.(Romero, 2008)

2.2.3 Micropropagación. La propagación clonal, es de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro* es el conjunto de técnicas que consisten en la propagación de

plantas asexualmente, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, generando una descendencia uniforme con la misma genética de la planta madre denominado clones, haciendo el proceso eficiente, en grandes cantidades y en un lugar limitado conservando las características deseadas en condiciones asépticas. (Manzanilla, 2004)

2.2.4 Etapas de la micropropagación desde el cultivo de tejido vegetal. Las etapas que son descritas a continuación, son las que abarca la micropropagación desde el cultivo de tejido vegetal.

2.2.4.1 Selección del explante madre: En esta etapa, se seleccionan y acondicionan plantas, las cuales serán utilizadas para el establecimiento *In vitro*, en este caso, es recomendable mantener dichas plantas, en excelentes condiciones, para lograr un control exacto en cuanto a la nutrición y el riego, logrando así un crecimiento adecuado. (Rivero, 2011).

2.2.4.2 Establecimiento aséptico del explante: Luego de seleccionar la planta madre, se selecciona el explante que se quiera utilizar: hojas, raíces, tallos, entre otros, los que deben ser desinfectados para poder eliminar los contaminantes externos y establecerlos en condiciones asépticas. (Rivero, 2011)

2.2.4.3 Callo. Inmediatamente después de colocar el explante en condiciones asépticas, y su medio nutritivo se regulará la propagación a partir de los mismos explantes que se hayan establecido, es entonces cuando se consigue la desdiferenciación celular y posteriormente numerosos brotes a partir de las pequeñas fracciones de tejido. (Rivero, 2011)

2.2.4.4 Enraizamiento. En esta etapa, el objetivo principal es lograr los brotes obtenidos anteriormente y que estos queden de manera individual de tal manera que cada uno se alargue, e independientemente forme su raíz y se constituya en una plántula, con tal de favorecer su posterior aclimatación a las condiciones *Ex vitro*. Entonces, con tal de favorecer cada una de los

brotes, se deben emplear citoquininas en medios nutritivos los cuales actuarán como reguladores de crecimiento, mientras que para promover el enraizamiento de los brotes se emplean auxinas. (Rivero, 2011)

2.2.4.5 Aclimatación. Existen diferentes condiciones atmosféricas las cuales pueden favorecer o dañar de alguna manera las plantas, no obstante para que los cultivos puedan ser manejados en un ambiente no apto para ellos, se incuban provocando que las plantas regeneradas por cultivo de tejidos presenten ciertas anomalías las cuales pueden ser anatómico-fisiológicas y ocasionar que estas no pueden adaptarse a las condiciones *ex vitro* y lleguen a morir. Entonces, se vuelve necesario, adaptar las plantas al medio externo disminuyendo progresivamente la humedad relativamente e incrementando la intensidad de luz según sea necesario. (Morgan, 2000)

2.2.5 Cultivo *in vitro*. Un cultivo de tejidos puede ser definido como ciertas técnicas que permiten el desarrollo del mismo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células empleando medios nutritivos artificiales; así pues el cultivo de tejido vegetal fue desarrollado a partir de investigaciones de diferentes botánicos y fisiólogos vegetales desde el año 1950. Este por su parte se ha logrado transformar a través de los años llegando a ser hoy en día una herramienta internacional de suma importancia en la selección, cruzamiento, control fitosanitario y producción en masa de plantas, no obstante involucra diferentes especies en agricultura, horticultura, forestales, entre otras.

Entonces, la ciencia del cultivo *in vitro*, debe su inicio al estudio realizado a las hormonas que controlan el crecimiento y el desarrollo vegetal, donde se combina este conocimiento con las

técnicas básicas de microbiología logrando que los microorganismos se extienden en medios estériles para su posible producción e identificación.

Teniendo en cuenta estas dos fuentes, resultaron las técnicas mediante las cuales las plantas u órganos de plantas se pueden multiplicar en masa, o controlar su crecimiento individual, haciendo crecer pequeños trozos de tejido vegetal con un procedimiento preciso de nutrientes en un recipiente estéril.

Así pues la Totipotencialidad celular es donde las células de un individuo vegetal poseen la capacidad necesaria para su división permitiendo el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo completo, sin que en esto medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos. Esta capacidad es denominada totipotencialidad celular, y es una de las características principales de lo que conocemos como un grupo de células vegetales llamadas células meristemáticas, presentes en los distintos órganos de la planta. (Segretín, 2013)

2.2.6 Cultivos *in vitro* para la conservación de especies. La micropropagación, es una herramienta biotecnológica del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, y a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones.

El cultivo de tejido vegetal que ofrece un amplio panorama de posibilidades en el futuro. Una de estas posibilidades es su utilidad para rescatar especies en peligro de extinción. Por la particularidad de esta técnica, es decir, su rápida propagación y el número de plantas que se pueden establecer a partir de una planta madre, el cultivo *in vitro* es una alternativa para el rescate de estas especies amenazadas.

2.3 Marco legal

El presente proyecto empleo material vegetal directamente comprado en la plaza de mercado de la ciudad de Neiva, ya que esta planta es nativa de nuestro país y se encuentra actualmente como un cultivo de producción local en departamento del Huila. En esta medida su manipulación dentro de este proyecto está respaldada por las normas y leyes vigentes de nuestro país.

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1 Tipo de Investigación

El proyecto se desarrolló como una investigación de tipo cuantitativo, explorativo y descriptivo, ya que se buscó obtener un conocimiento en la medida en que se observó el comportamiento de los explantes a través de la evaluación de diferentes concentraciones hormonales que permitan el establecimiento *in vitro* de brotes de *P. maliformis*. Se empleará el software STATGRAPHICS con un nivel de confianza del 95%. El proyecto de grado modalidad pasantía se desarrolló en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad de Pamplona.

3.2 Población y Muestra

3.2.1 Población. Estuvo conformada por una cantidad indeterminada de plantas en etapa de vivero obtenidas a través de la germinación previa de la semilla de Cholupa (*P. meliformis* L.) en etapa de vivero.

3.2.2 Muestra. Se representó por los segmentos foliares de Cholupa (*P. maliformis* L.) dentro de un medio de cultivo con una misma edad fenológica.

3.3 Hipótesis

3.3.1 Hipótesis Nula. La respuesta morfogénica en los segmentos foliares de Cholupa (*P. maliformis* L.) Fue independiente de los tratamientos en cuanto a sustancias promotoras de crecimiento y las condiciones *In vitro* del cultivo.

3.3.2 Hipótesis Alterna. La respuesta morfogénica en los segmentos foliares de Cholupa (*P. maliformis* L.). Estuvo influenciada por los tratamientos en cuanto a sustancias promotoras de crecimiento y las condiciones *In vitro* del cultivo.

3.4 Variables

3.4.1 Independientes. Entre las cuales se encuentran los tratamientos, procedimientos de desinfección y medios de cultivo.

3.4.2 Dependientes. Tiempo en respuesta morfogénica, número de brotes por explantes y grados de Fenolización.

3.4.3 Intervinientes. Contaminación, asepsia, temperatura, fotoperiodo y humedad.

3.5 Fases de la Investigación

El proceso se realizó en cuatro fases, de acuerdo a los objetivos propuestos como se muestra en la figura 1, de la siguiente página.

3.5.1 Fase 0. Etapa preparativa. En esta fase inicial se pretendió mantener una búsqueda continua de la documentación, protocolos y procedimientos actualizados para el desarrollo de la investigación. Así mismo mientras se enriquece el marco teórico, en esta fase también se iniciará la selección del material vegetal que se será utilizado durante toda la investigación.

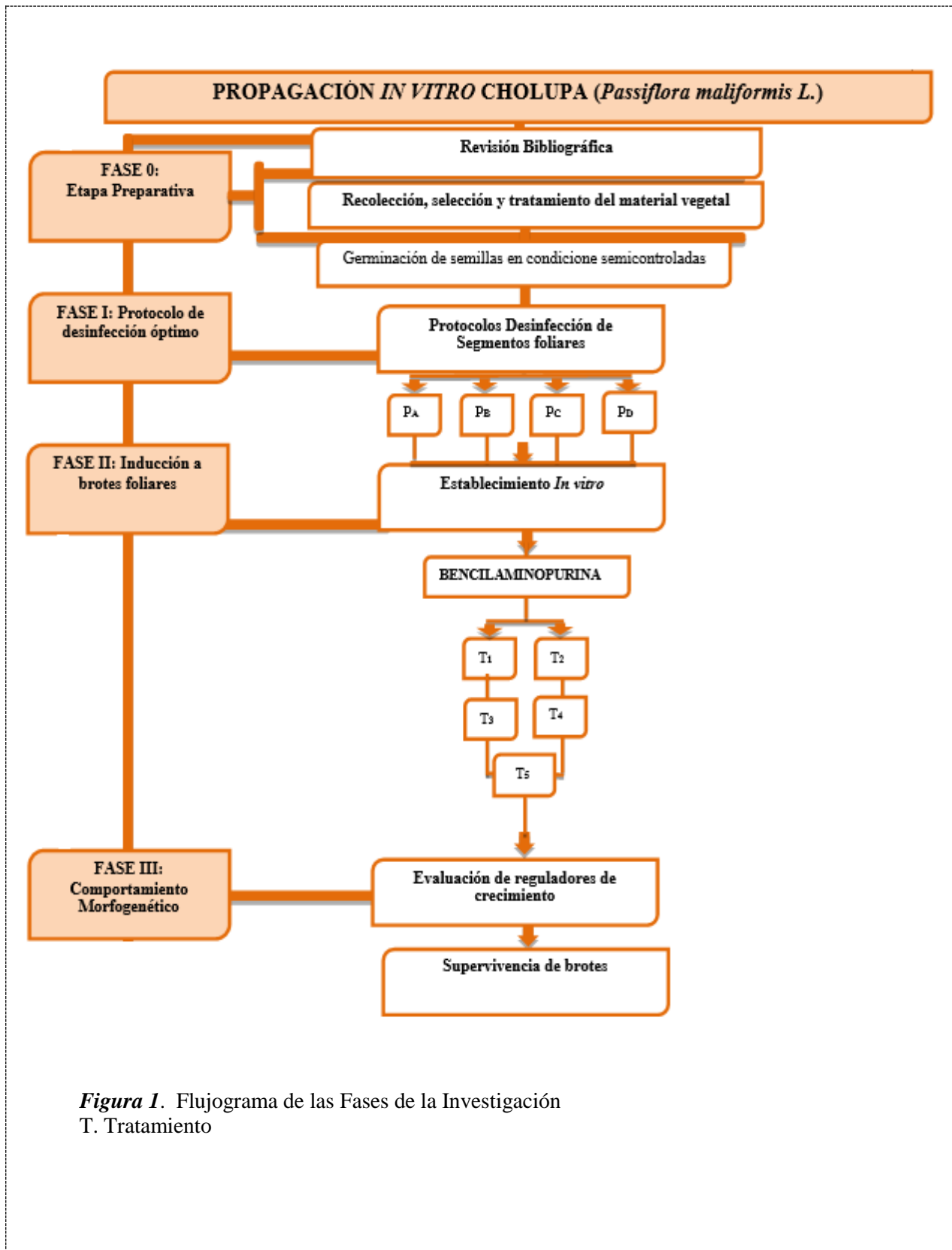


Figura 1. Flujograma de las Fases de la Investigación
T. Tratamiento

Para este caso con el fruto de Cholupa (*P. maliformis* L.) se determinarán los procedimientos para la fase de vivero incluyendo el tratamiento e higienización de las semillas y las condiciones para su germinación, esto con el fin de garantizar condiciones sanitarias antes del proceso de laboratorio.

3.5.2 Fase I. Protocolo de desinfección óptimo. En esta fase se pretendió determinar el protocolo de desinfección más adecuado para los explantes a utilizar, por ello se evaluaron cuatro protocolos de desinfección utilizando una solución fungicida y una solución desinfectante a diferentes porcentajes y tiempos de exposición, aplicando enjuagues con agua destilada estéril entre cada solución. Véase tabla 1.

Tabla 1. Distribución de los Tratamientos de Desinfección

Protocolo A	Protocolo B
Fungicida 2% por 60 min.	Fungicida 2% por 30 min.
NaOCl 3% por 08 min	NaOCl 3% por 12 min
Protocolo C	Protocolo D
Fungicida 1% por 60 min.	Fungicida 1% por 30 min.
NaOCl 2.5% por 08 min	NaOCl 2.5% por 08 min

El protocolo de desinfección que permita disminuir el % de contaminación y sobrevivencia del explante manteniendo las condiciones asépticas será empleado para la fase II.

3.5.3. Fase II. Inducción a brotes foliares. En esta fase los explantes sembrados se establecieron para inducir la formación de brotes, para esto se probó un medio de cultivo basal con dos citoquininas, la Kinetina (KIN) y la Bencilaminopurina (BAP), a diferentes concentraciones como se muestra en la (tabla 2).

Tabla 2. Distribución de los Tratamientos citoquininas

CITOQUININAS	CONCENTRACIÓN				
	0.0 mg/L	0.3 mg/L	0.6mg/L	0.9mg/L	1.2mg/L
Bencilaminopurina (BAP)	T1	T2	T3	T4	T5

Fuente: El Autor

Cada concentración hormonal se evidencia como un tratamiento, de los cuales se sembraron tres repeticiones con las mismas unidades experimentales y manteniéndose un control en las condiciones ambientales como fotoperiodo y temperatura llevándose un registro de los datos obtenidos en una tabla diseñada específicamente para esta fase.

3.5.4. Fase III. Comportamiento morfogénético. En esta fase se pretendió llevar un seguimiento a los tratamientos de la fase anterior evaluando los hayan obtenido los mejores rendimientos con respecto a la respuesta morfogénética para esto se realizó una observación de los medios, cuantificando el número de brotes, teniendo en cuenta que se mantuvieran condiciones ambientales controladas como fotoperiodo y temperatura.

3.6 Técnicas de análisis de procesamiento de la información

La recolección de los datos se hizo por medio de observaciones periódicas durante la experimentación, y la información registrada en tablas diseñadas específicamente con el fin de obtener datos cuantitativos, al ser porcentajes se utilizó el programa Excel y se aplicó un diseño experimental con un análisis descriptivo al número de brotes a nivel laminar y a nivel peciolar, con el fin de validar los datos obtenidos determinando si existen diferencias significativas en el número de brotes, se trataron los datos con un análisis de varianza (ANOVA), siendo un método estadístico para comparar dos o más medias y de esta manera aprobar o rechazar las

hipótesis, usando el software STATGRAPHICS CENTURION XVI con un nivel de confianza del 95%.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y ANALISIS

4.1 Material vegetal

Se obtuvieron las plantas madre para el proyecto a través de semillas obtenidas de frutos frescos maduros comprados en plazas de mercado del departamento del Huila con el fin de iniciar la siembra y germinación de las semillas en el invernadero de la Universidad de Pamplona, durando 10 semanas las semillas para germinar, y utilizando las plantas madre con una edad fenólica de 18 semanas para iniciar con los segmentos foliares la desinfección y posterior establecimiento para la formación de los brotes.

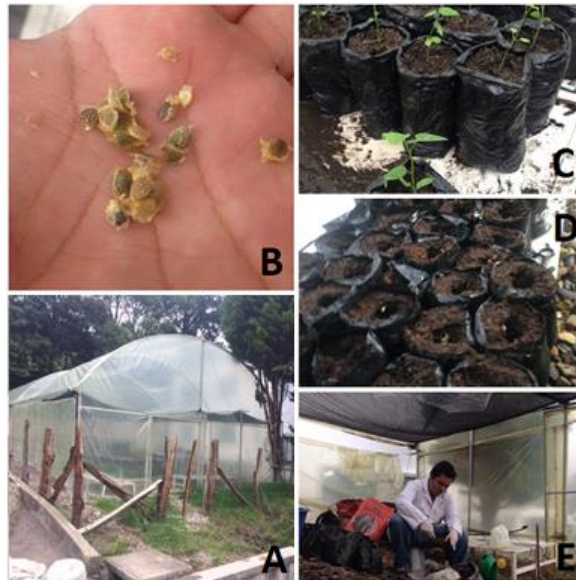


Figura 2, Germinación de la Semilla (*P. maliformis*) A: invernadero par la germinación de las semilla, B: semillas de *P. maliformis*, E y D: siembra de las semillas de *P. maliformis* C: Plántulas de *P. maliformis*

4.1.1 Desinfección

Para determinar el protocolo con el menor porcentaje de contaminación de los cuatro (4) descritos (tabla 1). Se determinó con la siembra de 10 medios para cada uno de los protocolos observándolos en la fase de establecimiento durante 30 días, evidenciando que los protocolos B y C fueron los que obtuvieron el menor porcentaje de contaminación igualados a 30%. (Figura 3).

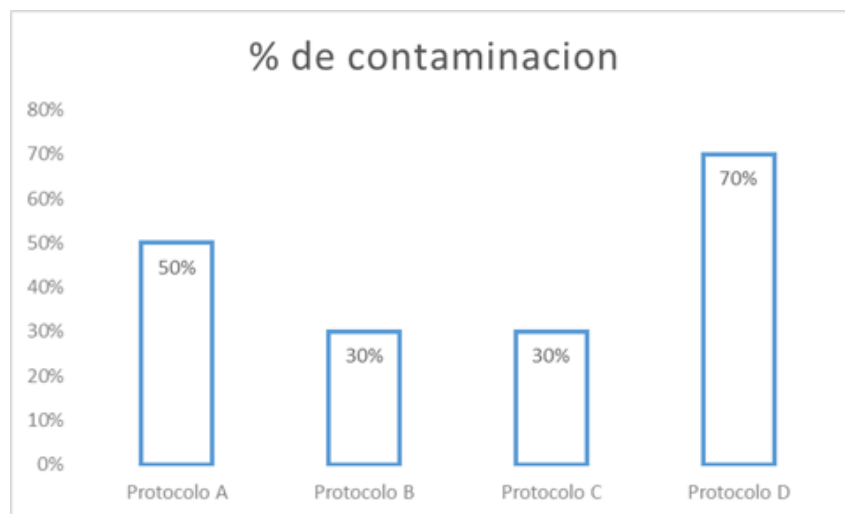


Figura 3. Porcentaje de Contaminación Inicial

Teniendo en cuenta que los protocolos B y C se mantuvieron en el mismo grado de contaminación, se decidió repetir el experimento incluyendo dos protocolos adaptados, (Tabla 3), descartando los protocolos A y D que fueron los que mayor contaminación mostraron, se establecieron durante los mismos treinta días (30) observando que el protocolo B se ha mantenido con el menor grado de contaminación igualándolo el protocolo ajustado F. (figura 4), determinando de esta manera que el protocolo B sería el más idóneo para la desinfección superficial de los segmentos foliares de la *P. maliformis* aplicándole al protocolo escogido un par de gotas de tween 20 para eliminar la tensión superficial, y de esta manera se genera con el

protocolo B un menor riesgo de afectar al explante debido a las concentraciones y tiempos implementados.

Tabla 3. Distribución de los tratamientos de desinfección adaptada

Protocolo B	Protocolo C
Fungicida 2% por 60 min.	Fungicida 2% por 30 min.
NaOCl 3% por 08 min	NaOCl 3% por 12 min
Protocolo E	Protocolo F
Fungicida 2% por 60 min.	Fungicida 3% por 60 min.
NaOCl 3% por 12 min	NaOCl 3% por 16 min

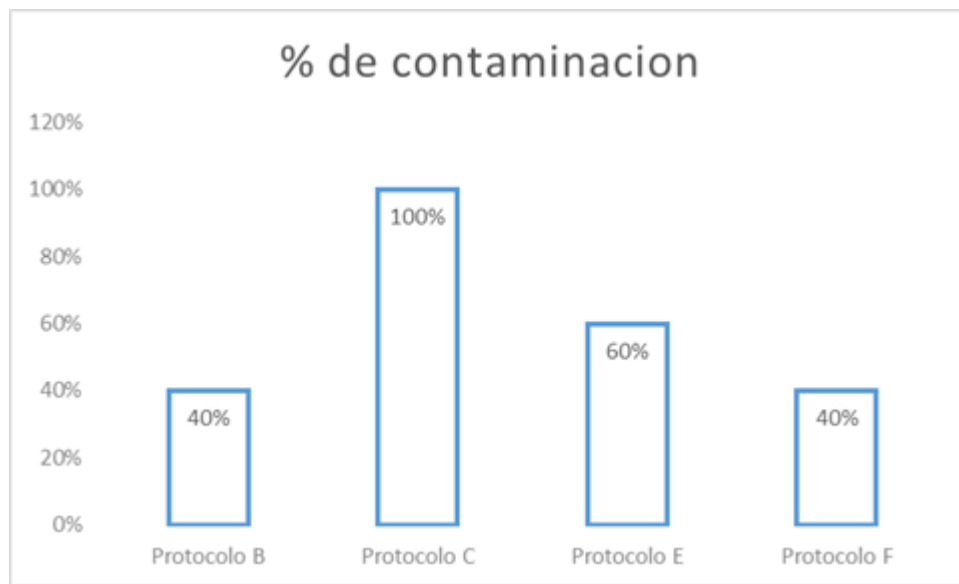


Figura 4, Resultado del Porcentaje de Contaminación adaptado

Se determinó la formación de brote cuando se lograban ver las primeras hojas o primordios foliares, (Figura 5) para la inducción de brotes en los segmentos foliares se cuantificaron los cuatro diferentes tratamientos con concentraciones de 0.3mg/L, 0.6mg/L, 0.9mg/L, 1.2mg/L regulados con la hormona de crecimiento BAP obteniendo en 7

semanas 35 réplicas para cada uno de los tratamientos, ver (Tabla.4), determinando por la cantidad de brotes inducidos en los segmentos foliares el tratamiento más eficiente, evidenciándose el T3 como el más óptimo con 257 brotes inducidos, involucrando brotes tanto de origen laminar como de origen peciolar y el tratamiento con menor número de brotes inducidos en los segmentos foliares es el T5 con 138 brotes. Ver (Figura 8). Podemos identificar en los datos registrados para el origen del brote tanto laminar como peciolar el tratamiento que se destaca es el T3 con mayor número de brotes inducidos ver (Figura 8). Para confirmar lo anterior se validaran los datos con un análisis de varianza (ANOVA).



Figura 5. Formación de brotes en segmentos foliares, observados al estereoscopio

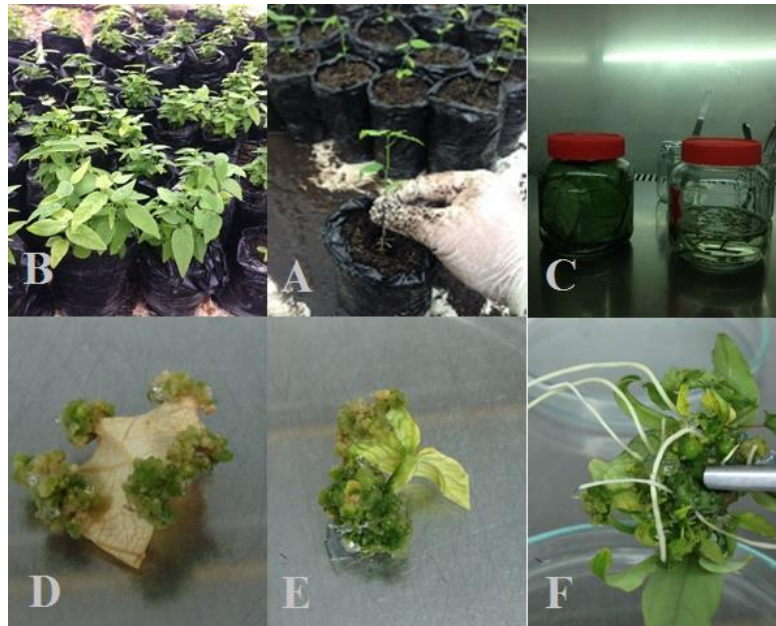


Figura 6. Proceso de Inducción de Brotes B: germinación de las semillas de *P. maliformis*, A: individualización de las plántulas, C: desinfección superficial para el establecimiento, D y E: formación de callo embrionario, F: formación de brotes

La inducción de brotes en segmentos foliares (Figura 6), para los tratamientos con el regulador de crecimiento KIN no se alcanzó a desarrollar la parte experimental ya que no se pudo volver a germinar semillas de *P. maliformis* para el desarrollo de esta parte del experimento (Figura 7), y generar hojas que tuvieran la misma edad fenológica de 6 meses, por lo cual se tomaron hojas de las plantas ya establecidas para el experimento con BAP y con una edad fenológica mayor a un (1) año, no lográndose establecer el material debido al control de la contaminación imposibilitando cuantificar la cantidad de brotes inducidos en los segmentos foliares.

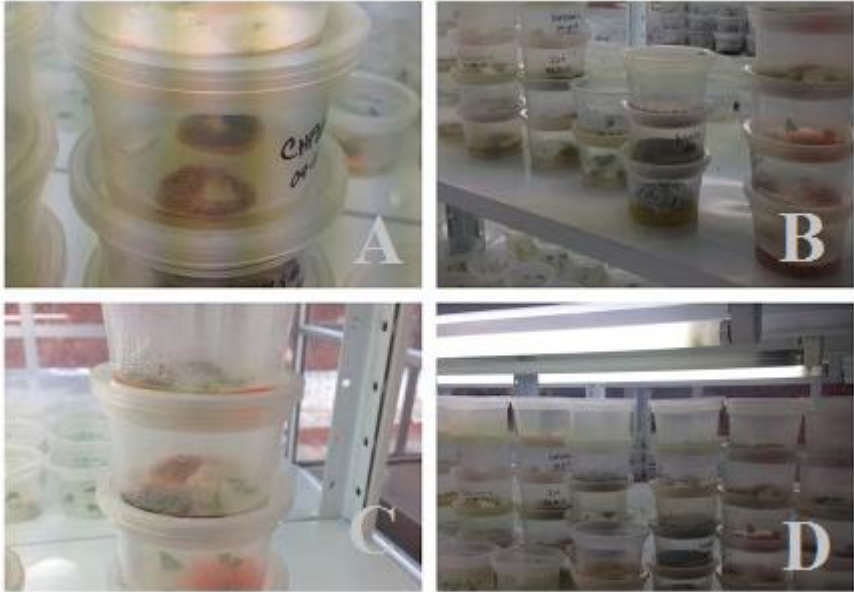


Figura 7. Muestra de la Contaminación del Material Para la Germinación de *P. maliformis* A,B,C Y D: medios de cultivo contaminados

Tabla 4. Brotes inducidos con el Regulador de Crecimiento BAP

	# DE BROTES				BROTE LAMINAR				BROTE PECIOLAR			
	T2	T3	T4	T5	T2	T3	T4	T5	T2	T3	T4	T5
S1	9	9	8	7	4	3	2	2	5	6	6	5
	5	6	6	4	2	3	2	2	3	3	4	2
	1	17	7	4	1	8	3	3	0	9	4	1
	4	15	1	5	0	6	0	3	4	9	1	2
	5	16	12	4	3	7	0	3	2	9	12	1
S2	16	4	4	4	4	0	1	1	12	4	3	3
	14	16	5	5	4	6	2	4	10	10	3	1
	10	4	11	5	6	2	4	3	4	2	4	2
	9	14	5	7	3	1	0	1	6	13	5	6
	12	7	2	8	4	3	0	5	8	4	2	3
S3	5	9	6	5	1	0	2	3	4	9	4	2
	5	4	8	7	1	0	4	4	4	4	4	3
	3	14	8	7	0	5	3	3	3	9	5	4
	13	1	7	6	2	0	4	4	11	1	3	2
	6	1	3	5	2	0	1	2	4	1	2	3
S4	15	1	6	1	10	0	4	1	5	1	2	0
	8	10	3	8	1	3	0	5	7	7	3	3
	11	14	3	3	4	11	2	2	7	3	1	1
	9	3	1	1	4	0	0	0	5	3	1	1
	2	15	1	2	1	11	1	2	1	4	0	0
S5	1	4	5	4	0	1	2	2	1	3	3	2
	5	2	2	1	5	1	1	0	0	1	1	1
	8	2	1	3	6	2	0	1	2	0	1	2
	5	7	5	5	4	7	3	4	1	0	2	1
	1	3	3	4	0	1	3	2	1	2	0	2
S6	6	6	7	3	0	6	4	2	6	0	3	1
	3	4	2	3	1	0	2	2	2	4	0	1
	3	4	2	1	1	1	0	0	2	3	2	1
	6	3	2	2	0	2	2	1	6	1	0	1
	5	7	6	2	2	7	3	2	3	0	3	0
S7	6	4	3	4	3	0	2	1	3	4	1	3
	7	14	6	2	3	7	2	0	4	7	4	2
	4	3	7	1	0	0	2	1	4	3	5	0
	8	3	1	1	6	0	1	0	2	3	0	1
	6	11	3	4	3	2	1	3	3	9	2	1
Total	236	257	162	138	91	106	63	74	145	151	96	64

Tabla 5. Promedios en la Inducción de Brotes

Concentración BAP	Brotes Totales	Brotes Laminares	Brotes Peciolares
T2	6,742857143	2,6	4,142857143
T3	7,342857143	3,028571429	4,314285714
T4	4,628571429	1,8	2,742857143
T5	3,942857143	2,114285714	1,828571429

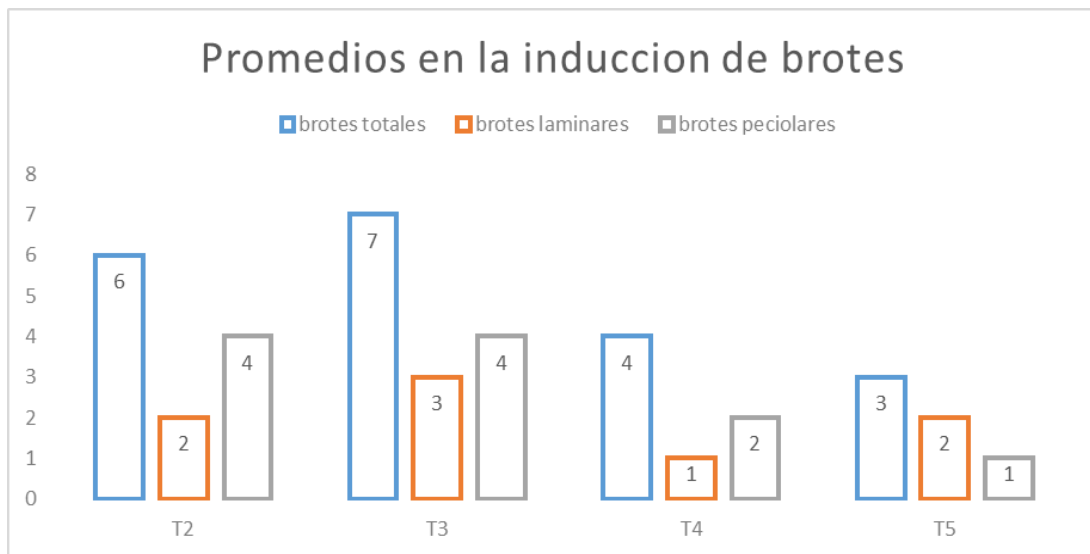


Figura 8. Promedios en la Inducción de Brotes

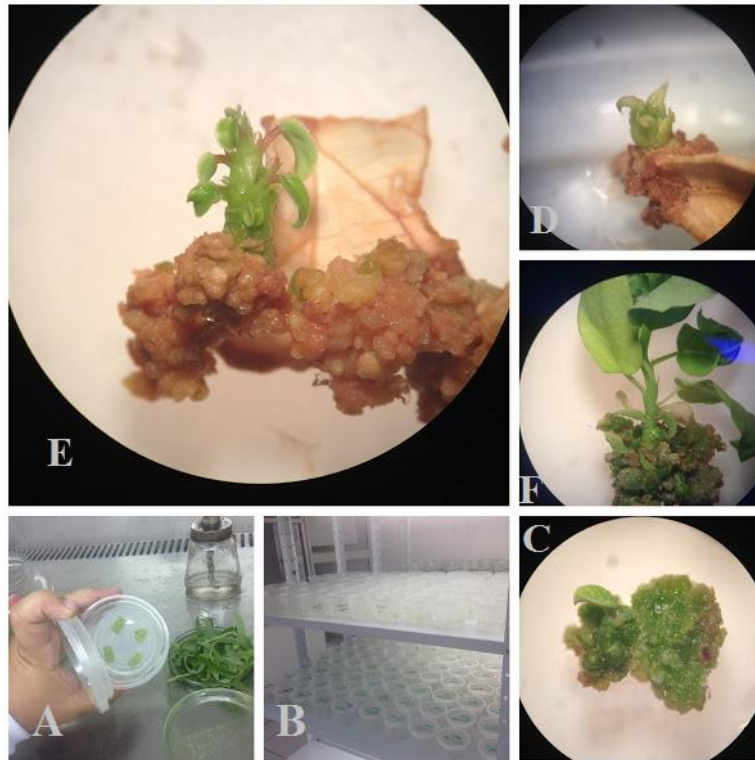
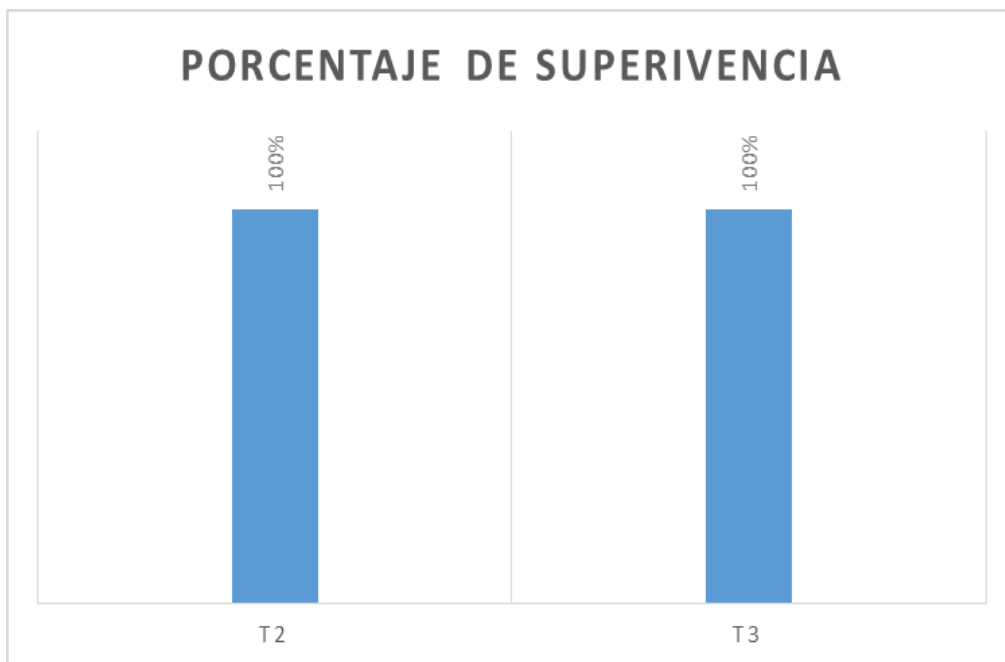


Figura 9. Establecimiento y elongación de los brotes A: Siembra para el establecimiento de los segmentos foliares en los medios de cultivo, B: Establecimiento de los segmentos foliares, C: Formación del callo embrionario con 2 semanas después del establecimiento, D: Formación del brote después de 4 semanas, E: Elongación del brote con 8 semanas y F: Elongación del brote con 12 semanas

El porcentaje de supervivencia de los brotes inducidos se determinó observando los 10 mejores medios para los tratamientos con mayor respuesta, registrándose con mayor número de brotes formados el tratamientos 2 (0.3mg/L BAP) y el tratamiento 3 (0.6mg/L BAP) definiendo el porcentaje de supervivencia con los medios que lograran mantener vivos los brotes y aumentaran su tamaño. (Figura 9).

De esta manera se evidencio que en ambos tratamientos mantuvieron vivos los brotes en su totalidad. (Figura 10) identificando también que unos brotes crecieron más que otros dentro del mismo medio demostrándose de esta manera que presentaron competencia entre ellos.

(Figura 11)



(Figura 10) porcentaje de supervivencia de brotes obtenidos de *P. maliformis* en los 2 mejores tratamientos.



(Figura 11) supervivencia del los brotes formados de *P. maliformis* desarrollandose unos mas que otros.

4.2 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en la fase III se analizaron en tres partes descriptivas y la concentración de la hormona BAP, con cinco variantes distribuidos así:

T1: 0,0 miligramos/Litro de concentración de la hormona BAP

T2: 0,3 miligramos/Litro de concentración de la hormona BAP

T3: 0,6 miligramos/Litro de concentración de la hormona BAP

T4: 0,9 miligramos/Litro de concentración de la hormona BAP

T5: 1,2 miligramos/Litro de concentración de la hormona BAP

La media de la variable respuesta en este caso es el número de brotes.

Numero de réplicas: se realizaron 35 réplicas de cada tratamiento

Para las tres partes de análisis el T1 era el asociado al efecto control encontrándose en todas las mediciones que no hubo respuesta alguna, es decir, todas las mediciones siempre produjeron valor de cero, por ello para la aplicación del análisis de varianza o ANOVA sólo se consideraran los tratamientos que tienen alguna concentración de la hormona en estudio.

4.2.1 Primera parte “brotes”

4.2.1.1 Análisis del experimento.

Factor: Concentración de la hormona BAP

Variantes: T1, ..., T5

Variable Respuesta: Número de brotes

Objetivo: ¿Existen diferencias entre el número de brotes promedios en los diferentes tratamientos?

4.2.1.2 Descriptivos “brotes”

Antes de iniciar los respectivos análisis de comparación de tratamientos, es conveniente revisar el comportamiento de los datos ello con el fin de identificar posibles datos atípicos o valores extremos que distan de la distribución y que pueden afectar los siguientes procesos a realizar. Por ello se presenta el resumen de los estadísticos descriptivos para la Variable Dependiente “Brotes” que corresponde al número de brotes que se han generado de cada uno de los explantes objeto de investigación. Véase (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de los estadísticos Descriptivos para la Variable Dependiente “Brotes”

Concentración	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
0,3	35	674,286	392,835	582594%	1	16
0,6	35	734,286	519,583	707603%	1	17
0,9	35	462,857	286,033	617973%	1	12
1,2	35	394,286	211,358	536053%	1	8

Dado que los coeficientes de variación son valores altos, se podría pensar que existe mucha dispersión en los datos lo que implica que los mismos no provienen de una distribución normal, en cuyo caso se requeriría de hacer algún tipo de transformación a ellos. Es por eso que a continuación analizamos el comportamiento del sesgo y la curtosis estandarizados. (Tabla 7).

Tabla 7. Comportamiento del Sesgo y la Curtosis

Concentración	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0,3	15	17,006	-0,0284125
0,6	16	139,998	-14,044
0,9	11	156,065	0,0102837
1,2	7	0,622754	-0,93578

La tabla 7 muestra diferentes datos estadísticos de Brotes para cada uno de los 4 niveles de Concentración. La intención principal del análisis de varianza de un factor es la de comparar las medias de los diferentes niveles. Los valores de sesgo estandarizado y curtosis estandarizada, de todos los tratamientos, se encuentran dentro del rango -2 a +2, lo que indica que los datos tienen una Distribución Normal.

Tabla 8. Test de Fisher para brotes

Origen Variación	Suma Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F- calculado	F-tabla(3,136) 0,05	0,01
Factor	280,59	3	93,53	6,79	2,68	3,95
Residual	1872,63	136	13,77	-----		
Total	2153,22	139	-----	-----		

(Tabla 8). Dado que el F-calculado es mayor al F-tabla tanto al 5% como al 1% de significancia, es evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula o lo que es equivalente, afirmar que existen diferencias significativas entre el número de brotes obtenidos con la aplicación de las diversas concentraciones de la hormona BAP, es decir, que al menos uno de los cuatro tratamientos tiene un número de brotes medio diferente a las de los otros.

Tabla 9. Anova para Brotes por Concentración.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	280,593	3	93,531	6,79	0,0003
Intra grupos	1872,63	136	137,693		
Total (Corr.)	2153,22	139			

(Tabla 9). La tabla ANOVA permite calcular el Valor-P de la prueba-F que en nuestro caso es menor que 0,05, luego se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Brotes entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95% de confianza. Con el fin de identificar qué medias son diferentes se procede a continuación a realizar un análisis de Comparación de Medias.

4.2.1.3 Comparación de medias.

Tabla 10. Pruebas de Múltiples Rangos para Brotes por Concentración

Método: 95% LSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1,2	35	394,286	X
0,9	35	462,857	X
0,3	35	674,286	X
0,6	35	734,286	X

Tabla 11. Diferencias significativas para los tratamientos

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0,3 - 0,6		-0,6	175,416
0,3 - 0,9	*	211,429	175,416
0,3 - 1,2	*	2,8	175,416
0,6 - 0,9	*	271,429	175,416
0,6 - 1,2	*	3,4	175,416
0,9 - 1,2		0,685714	175,416

* indica una diferencia significativa

(Tabla 10–11): Las tablas anteriores aplican un procedimiento de Comparación Múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95% de confianza. En la primera tabla, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher.

Con el fin de identificar cuál de las concentraciones de la hormona BAP es significativamente diferente en cuanto al número de brotes que se originan, se recurre al cálculo de los intervalos **LSD (Least Significant Difference)**. Se aclara que estos intervalos no son intervalos de confianza, ya que su utilización es sólo con fines comparativos de las medias: A continuación se presenta el gráfico de medias de los intervalos LSD obtenidos con el fin de corroborar lo afirmado en hasta el momento.

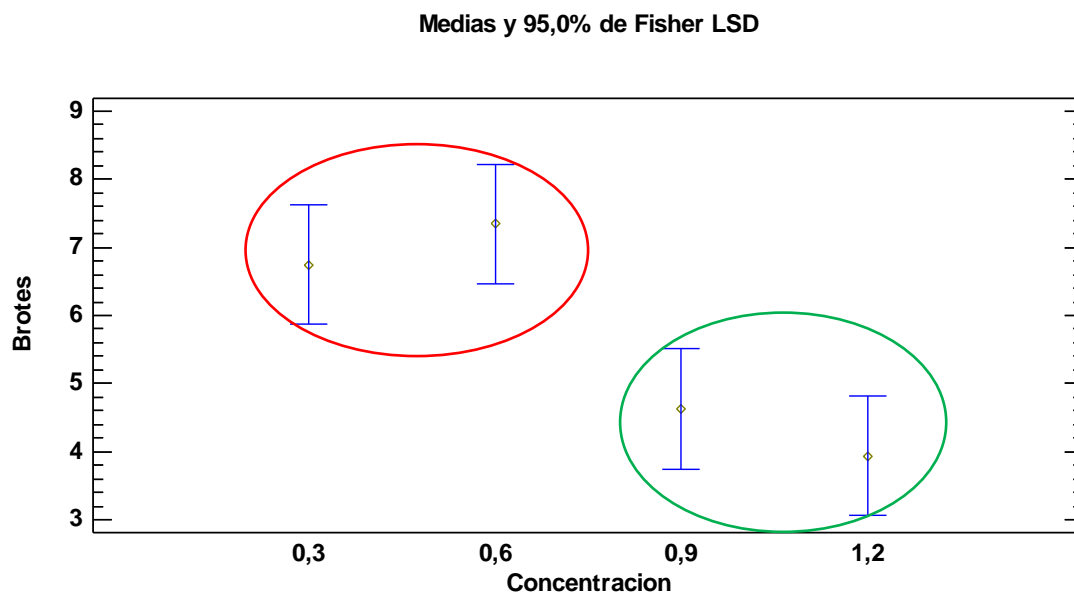


Figura 12. Diferencias Mínimas Significativas de Brotes

(Figura 12). Como ya se había mencionado, existen dos grupos que ofrecen condiciones similares en cuanto al número de brotes que se producen. Con alto número de brotes están los tratamientos 2 y 3 cuyas concentraciones de la hormona son las más bajas, y en caso de concentraciones más altas de la hormona producen niveles más bajos de producción de brotes, luego en caso de tomar una decisión, se podría afirmar que si el costo de la hormona no es muy alta el mejor tratamiento es aquel cuya concentración es del 0,6 miligramos por litro. Pero en

caso de ser elevado dicho valor, se podría trabajar con una concentración de 0,3% miligramos por litro que no existirían diferencias significativas en cuanto al rendimiento de la misma.

4.2.1.4 Estudio de efectos sobre las varianzas.

Este es un análisis complementario que permite determinar si existen diferencias entre las varianzas de las diferentes concentraciones de la hormona BAP. A continuación se muestra el gráfico de Residuos para cada tratamiento con el fin de analizar su comportamiento.

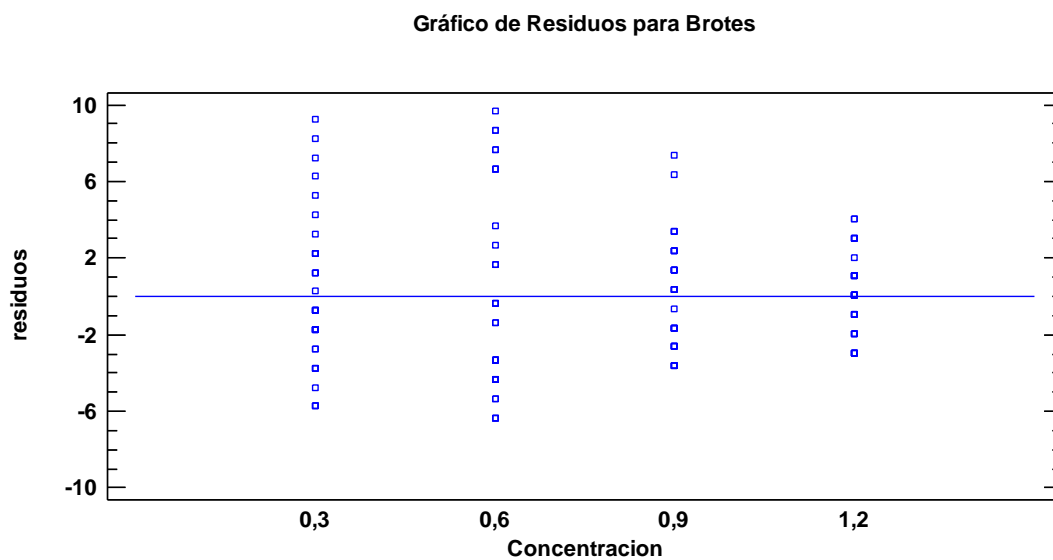


Figura 13. Gráfico de Residuos para Brotes.

(Figura 13). Permite evidenciar que los dos primeros niveles de concentración de la hormona BAP (quienes resultaron ser los mejores) presentan mayor variabilidad que los dos niveles con mayor concentración de la hormona, luego la pregunta sería, ¿estas diferencias en la variabilidad son significativas?

Para responder a este interrogante debemos afirmar que la media de los residuos al cuadrado es ligeramente inferior a la varianza y tienden a ser iguales si se tienen tamaños de muestra grandes. Luego se puede realizar un análisis de varianza con el fin de comparar las medias residuales en cada tratamiento.

Tabla 12. Anova Para res^2 por Concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9759,24	3	3253,08	11,32	0,0000
Intra grupos	39077,4	136	287,334		
Total (Corr.)	48836,6	139			

(Tabla 12). La tabla ANOVA permite evidenciar que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, luego existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Res^2 entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95% de confianza.

Con el fin de identificar en cuál de los tratamientos se presenta mayor o menor varianza nos apoyamos en los gráficos LSD, el cual nos permite verificar que el tratamiento cuya concentración de la hormona BAP es de 0,6 miligramos por litro presenta mayor varianza lo que de cierta forma permite dudar de su efectividad.

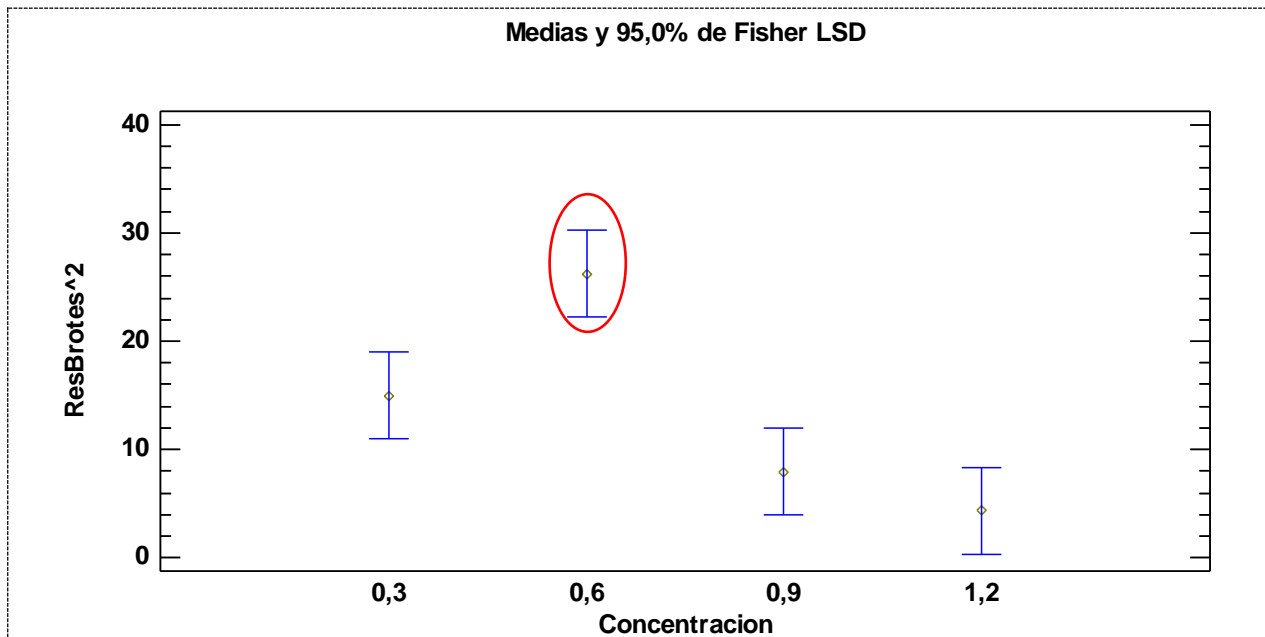


Figura 14. Medias de los Intervalos LSD para Residuos de Brotes

4.2.2 Segunda parte “laminar”

4.2.2.1 Análisis del experimento.

- Factor: Concentración de la hormona BAP
- Variantes: T1,..., T5
- Variable Respuesta: Número de brotes

Objetivo. ¿Existen diferencias entre el número de brotes promedios en los diferentes tratamientos a nivel laminar?

4.2.2.2 Descriptivos “lamiar”

Antes de iniciar los respectivos análisis de comparación de tratamientos, es conveniente revisar el comportamiento de los datos ello con el fin de identificar posibles datos atípicos o valores extremos que distan de la distribución y que pueden afectar los siguientes procesos a

realizar. Por ello se presentan el resumen de los estadísticos descriptivos para la Variable Dependiente “Número de Brotes según su origen” que corresponde al número de brotes que se han generado a nivel **laminar** de cada una de las muestras objeto de investigación (Tabla 13).

Tabla 13. Resumen de los Estadísticos descriptivos para la Variable Dependiente “Número de Brotes según su origen”

Concentración	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
0,3	35	2,6	227,777	876065%	0	10
0,6	35	302,857	330,317	109067%	0	11
0,9	35	1,8	134,602	747788%	0	4
1,2	35	211,429	140,945	666633%	0	5

Dado que los coeficientes de variación son valores altos, se podría pensar que existe mucha dispersión en los datos lo que implica que ellos no provienen de una distribución normal, en cuyo caso se requeriría de hacer algún tipo de transformación. Es por eso que a continuación analizamos el comportamiento del sesgo y la curtosis estandarizados (tabla 14).

Tabla 14. Comportamiento del Sesgo y la Curtosis Estandarizados

Concentración	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0,3	10	257,513	205,781
0,6	11	234,382	-0,0696326
0,9	4	0,378148	-120,363
1,2	5	0,613241	-0,698293

(Tabla 14). Dado que el sesgo estandarizado y/o la curtosis estandarizada se encuentra fuera del rango de -2 a +2 para los 2 niveles de *Concentración*. Esto indica algo de no normalidad significativa en los datos, lo cual viola el supuesto de que los datos provienen de distribuciones normales. Con el fin de validar la normalidad de los datos se aplica la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas en lugar de las medias.

Tabla 15. Prueba de Kruskal-Wallis para Brotes Laminares por Concentración

Concentración	Tamaño Muestra	Rango Promedio
0,3	35	753,286
0,6	35	723,143
0,9	35	635,857
1,2	35	707,714

Estadístico = 1,63451 **Valor-P = 0,651587**

(Tabla 15). La prueba de Kruskal-Wallis evalúa la hipótesis de que las medianas de **Brotes Laminares** dentro de cada uno de los 4 niveles de **Concentración** son iguales. Puesto que el Valor-P es mayor que 0,05, se concluye no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95% de confianza. Determinando de esta manera que al menos una de las concentraciones tiene una producción diferente en el número de brotes que las demás concentraciones evaluadas rechazando o aceptando la hipótesis nula.

Tabla 16. Test de Fisher para brotes laminares

Origen Variación	Suma Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F-calculado	F-tabla(3,136)	
					0,05	0,01
Factor	30,66	3	10,22	2,05	2,68	3,95
Residual	676,51	136	4,97	-----		
Total	707,17	139	-----	-----		

(Tabla 16). Dado que el F-calculado es menor al F-tabla tanto al 5% como al 1% de significancia, es evidencia suficiente para aceptar la hipótesis nula o lo que es equivalente, afirmar que no existen diferencias significativas entre el número de brotes obtenidos a nivel laminar con la aplicación de las diversas concentraciones de la hormona BAP.

Tabla 17. ANOVA para Brotes Laminares por Concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	306,571	3	10,219	2,05	0,1092
Intra grupos	676,514	136	497,437		
Total (Corr.)	707,171	139			

4.2.2.3 Comparación de medias.**Tabla 18.** Pruebas de Múltiples Rangos para Brotes Laminares por Concentración
Método: 95% LSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0,9	35	1,8	X
1,2	35	211,429	X X
0,3	35	2,6	X X
0,6	35	302,857	X

En la (tabla 18), se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla 19. Diferencias significativas para los tratamientos laminares

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0,03 - 0,06		-0,428571	105,434
0,03 - 0,09		0,8	105,434
0,03 - 1,2		0,485714	105,434
0,06 - 0,09	*	122,857	105,434
0,06 - 1,2		0,914286	105,434
0,09 - 1,2		-0,314286	105,434

*** indica una diferencia significativa.**

En la tabla anterior (Tabla 19), se muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95% de confianza.

A continuación se presenta el gráfico de medias de los intervalos LSD obtenidos con el fin de corroborar lo afirmado en hasta el momento. (Figura 15).

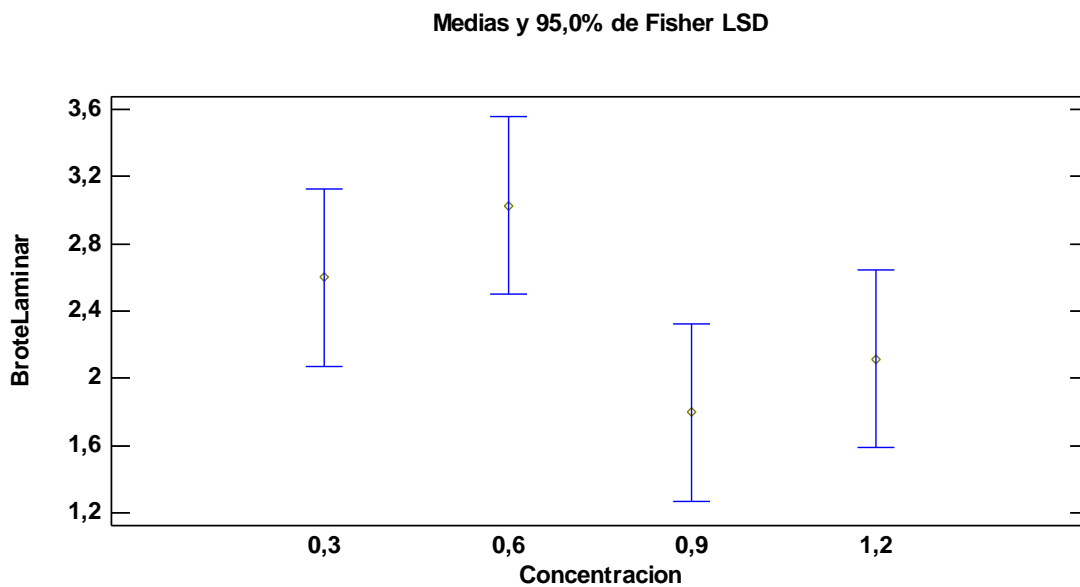


Figura 15. Medias de los intervalos LSD

(Figura 15), Finalmente y como ya se ha mencionado y comprobado no hay diferencias significativas entre el número de brotes a nivel laminar con la aplicación de las diversas concentraciones de la hormona BAP, puesto que el rango en que está variando el número de brotes es entre 2 y 4.

4.2.2.4 Estudio de efectos sobre las varianzas.

Este es un análisis complementario que permite determinar si existen diferencias entre las varianzas de las diferentes concentraciones de la hormona BAP. A continuación se muestra el gráfico de Residuos para cada tratamiento con el fin de analizar su comportamiento.

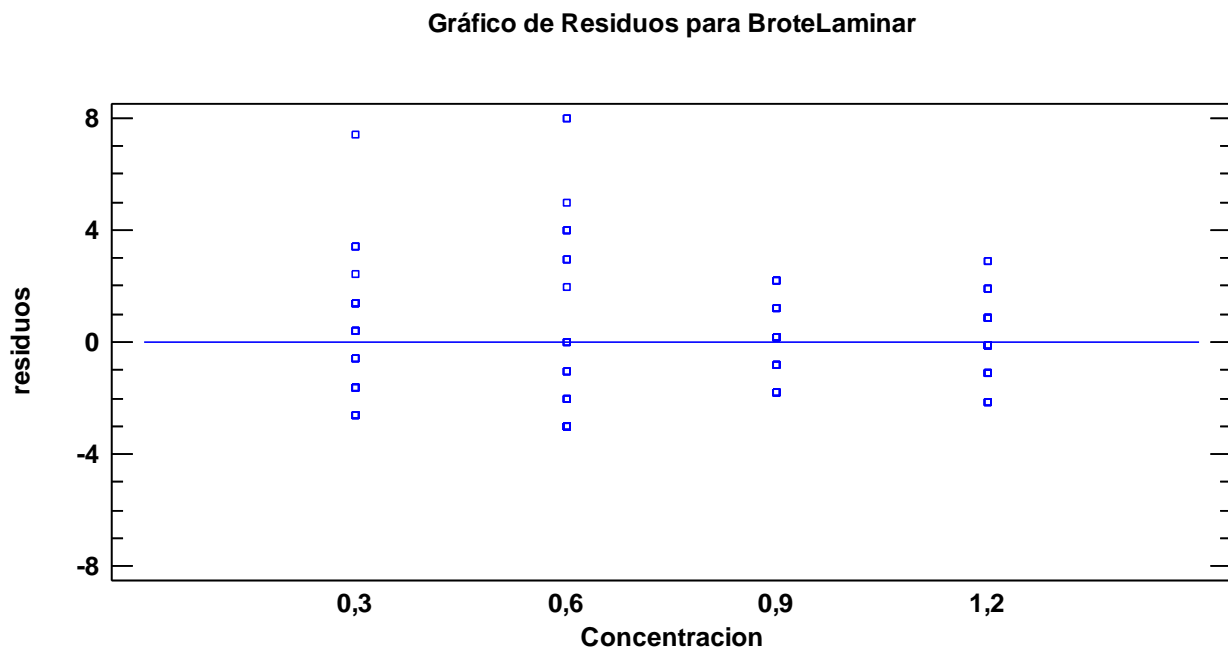


Figura 16. Gráfico de Residuos para Brote Laminar

La gráfica anterior (Figura 16), permite evidenciar que los dos primeros niveles de concentración de la hormona BAP (quienes resultaron ser los mejores) presentan mayor

variabilidad que los dos niveles con mayor concentración de la hormona, luego la pregunta sería, ¿estas diferencias en la variabilidad son significativas?

Para responder a este interrogante debemos afirmar que la media de los residuos al cuadrado es ligeramente inferior a la varianza y tienden a ser iguales si se tienen tamaños de muestra grandes. Luego se puede realizar un análisis de varianza con el fin de comparar las medias residuales en cada tratamiento.

Tabla 20. Anova para reslaminar² por concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1790,73	3	596,909	7,94	0,0001
Intra grupos	10229,5	136	75,217		
Total (Corr.)	12020,2	139			

La ANOVA (tabla 20), permite evidenciar que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, luego existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de ResLaminar² entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95% de confianza.

Con el fin de identificar en cuál de los tratamientos se presenta mayor o menor varianza nos apoyamos en los gráficos LSD, el cual nos permite verificar que el tratamiento cuya concentración de la hormona BAP es de 0,6 miligramos por litro presenta mayor varianza lo que de cierta forma permite dudar de su efectividad.

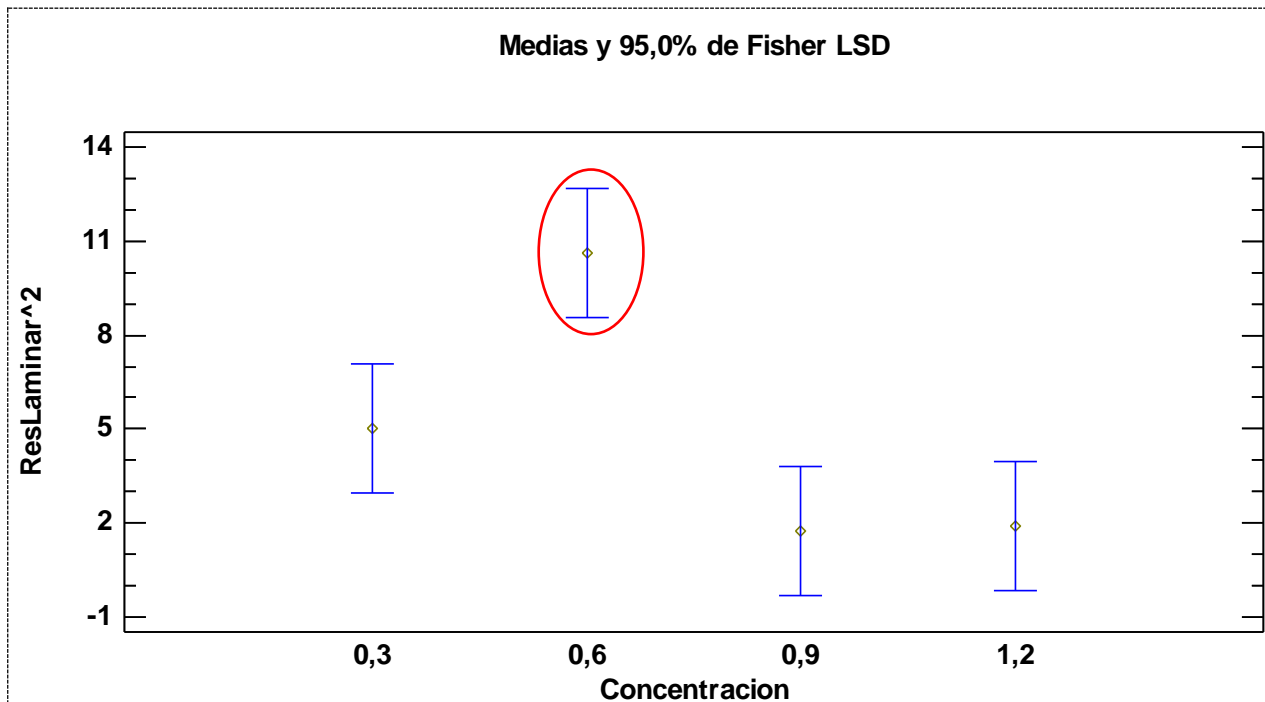


Figura 17. Medias de los Intervalos LSD para Residuos de Brotes laminares

4.2.3 Tercera parte “peciolar”

4.2.3.1 Análisis del experimento.

- Factor: Concentración de la hormona BAP
- Variantes: T1,..., T5
- Variable Respuesta: Número de brotes

Objetivo. ¿Existen diferencias entre el número de brotes promedios en los diferentes tratamientos a nivel peciolar?

4.2.3.2 Descriptivos “peciolar”

Antes de iniciar los respectivos análisis de comparación de tratamientos, es conveniente revisar el comportamiento de los datos ello con el fin de identificar posibles datos atípicos o

valores extremos que distan de la distribución y que pueden afectar los siguientes procesos a realizar. Por ello se presentan el resumen de los estadísticos descriptivos para la Variable Dependiente “Número de Brotes según su origen” que corresponde al número de brotes que se han generado a nivel **peciolar** de cada una de las muestras objeto de investigación.(Tabla 21)

Tabla 21. Resumen de los Estadísticos descriptivos para la Variable Dependiente “Número de Brotes según su origen”

Concentración	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de		
				Variación	Mínimo	Máximo
0,3	35	4,14286	2,92195	70,53%	0	12
0,6	35	4,31429	3,47065	80,45%	0	13
0,9	35	2,74286	2,30527	84,05%	0	12
1,2	35	1,82857	1,36092	74,43%	0	6

Dado que los coeficientes de variación son valores altos, se podría pensar que existe mucha dispersión en los datos lo que implica que ellos no provienen de una distribución normal, en cuyo caso se requeriría de hacer algún tipo de transformación. Es por eso que a continuación analizamos el comportamiento del sesgo y la curtosis estandarizados (tabla 22).

Tabla 22. Comportamiento del Sesgo y la Curtosis Estandarizados

Concentración	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0,3	12	2,44772	1,08299
0,6	13	1,72249	-0,516813
0,9	12	4,53234	7,87266
1,2	6	2,76674	2,06727

(Tabla 22) Dado que el sesgo estandarizado y/o la curtosis estandarizada se encuentra fuera del rango de -2 a +2 para los 2 niveles de *Concentración*. Esto indica algo de no normalidad significativa en los datos, lo cual viola el supuesto de que los datos provienen de

distribuciones normales. Con el fin de validar la normalidad de los datos se aplica la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas en lugar de las medias.(Tabla 23)

Tabla 23. Prueba de Kruskal-Wallis para Brotes Peciolares por Concentración

Concentración	Tamaño Muestra	Rango Promedio
0,3	35	85,5286
0,6	35	82,1
0,9	35	65,5429
1,2	35	48,8286

Estadístico = 18,5926 **Valor-P = 0,00331889**

La prueba de Kruskal-Wallis (tabla 23), evalúa la hipótesis de que las medianas de **Brotes Peciolares** dentro de cada uno de los 4 niveles de **Concentración** son iguales. Puesto que el Valor-P es menor que 0,05, se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95% de confianza, determinando de esta manera que al menos una de las concentraciones tiene una producción diferente en el número de brotes que las demás concentraciones evaluadas rechazando o aceptando la hipótesis nula.

Tabla 24. Test de Fisher para brotes peciolares

Origen Variación	Suma Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F-calculado	F-tabla(3,136)	
					0,05	0,01
Factor	147,26	3	49,09	7,08	2,68	3,95
Residual	943,49	136	6,94	-----		
Total	1090,74	139	-----	-----		

(Tabla 24), Dado que el F-calculado es mayor al F-tabla tanto al 5% como al 1% de significancia, es evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula o lo que es equivalente, afirmar que existen diferencias significativas entre el número de brotes obtenidos a nivel peciolar con la aplicación de las diversas concentraciones de la hormona BAP

Tabla 25. ANOVA para Brotes peciolares por Concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	147,257	3	49,0857	7,08	0,0002
Intra grupos	943,486	136	6,93739		
Total (Corr.)	1090,74	139			

4.2.3.3 Comparación de medias

Tabla 26. Pruebas de Múltiple Rangos para Brotes peciolares por Concentración
Método: 95% LSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0,9	35	1,82857	X
1,2	35	2,74286	X
0,3	35	4,14286	X
0,6	35	4,31429	X

En la (tabla 26), se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher.

Tabla 27. Diferencias Estimadas entre Cada Par de Medias

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0,3 - 0,6		-0,171429	1,24512
0,3 - 0,9	*	1,4	1,24512
0,3 - 1,2	*	2,31429	1,24512
0,6 - 0,9	*	1,57143	1,24512
0,6 - 1,2	*	2,48571	1,24512
0,9 - 1,2		0,914286	1,24512

*** indica una diferencia significativa.**

En la (tabla 27) se muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 4 pares, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95% de confianza.

A continuación se presenta el gráfico de medias de los intervalos LSD obtenidos con el fin de corroborar lo afirmado en hasta el momento. (Figura 18)

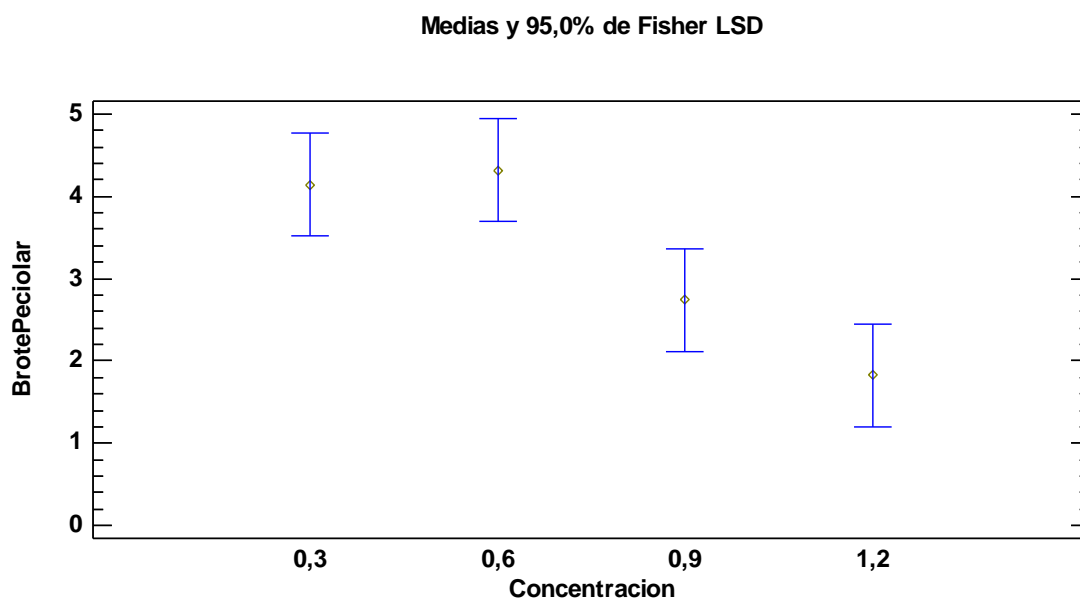


Figura 18. Gráfico de medias de los intervalos LSD

Finalmente, como ya se ha mencionado y comprobado hay diferencias significativas entre el número de brotes a nivel peciolares con la aplicación de las diversas concentraciones de la hormona BAP, presentando un mayor número de brotes en las concentraciones de 0,3 y 0,6 miligramos por litro de la hormona BAP.

4.2.3.4 Estudio de efectos sobre las varianzas

Este es un análisis complementario que permite determinar si existen diferencias entre las varianzas de las diferentes concentraciones de la hormona BAP. A continuación se muestra el gráfico de Residuos para cada tratamiento con el fin de analizar su comportamiento.

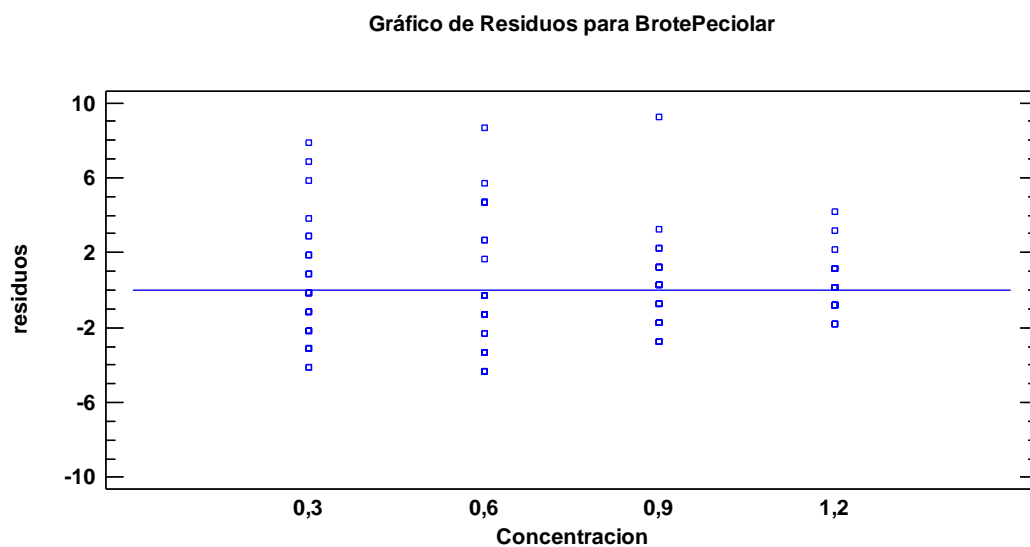


Figura 19. Gráfico de Residuos para Brote Peciolar

La anterior (Figura 19) permite evidenciar que los dos primeros niveles de concentración de la hormona BAP (quienes resultaron ser los mejores) presentan mayor variabilidad que los dos niveles con mayor concentración de la hormona, luego la pregunta sería, ¿estas diferencias en la variabilidad son significativas?

Para responder a este interrogante debemos afirmar que la media de los residuos al cuadrado es ligeramente inferior a la varianza y tienden a ser iguales si se tienen tamaños de muestra grandes. Luego se puede realizar un análisis de varianza con el fin de comparar las medias residuales en cada tratamiento.

Tabla 28. ANOVA para ResPeciolar² por Concentración

Concentración	Tamaño Muestra	Rango Promedio
0,3	35	85,5286
0,6	35	82,1
0,9	35	65,5429
1,2	35	48,8286

La (tabla 28) ANOVA permite evidenciar que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, luego existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de ResPeciolar² entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95% de confianza.

Con el fin de identificar en cuál de los tratamientos se presenta mayor o menor varianza nos apoyamos en los gráficos LSD, el cual nos permite verificar que los tratamientos cuya concentración de la hormona BAP es de 0,03 y 0,06 miligramos por litro presentan mayor varianza lo que de cierta forma permite dudar de su efectividad.

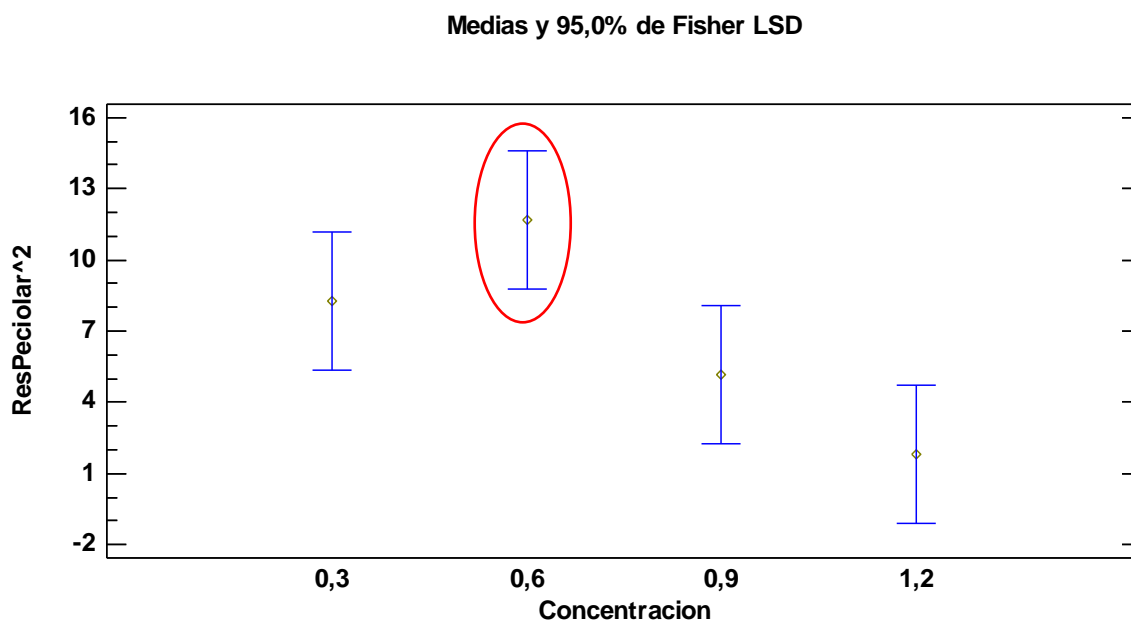


Figura 20. Medias de los Intervalos LSD para Residuos de Brotes Peciolares

4.2 Discusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son una base importante para la realización de futuras investigaciones tendientes a la propagación masiva y al mejoramiento genético de la especie.

Para el establecimiento de segmentos foliares en condiciones *in vitro* fue necesario tomar los explantes de material de invernadero, para lo cual fue necesario un proceso de desinfectación, el cual permitió evaluar la acción conjunta de sustancias desinfectantes y observar el poder morfogénico de los segmentos foliares. La desinfectación de explantes es un paso necesario ya que aunque estos provengan de material de invernadero, no están exentos de tener contaminantes superficiales (Bonga, 1982, Carrisoza 1994 y Villamizar-Galvis 2005).

La acción conjunta de las sustancias desinfectantes no consiguió eliminar totalmente la contaminación. El Tween 20 actuó como surfactante suave, el cual precedido al hipoclorito, permitieron probablemente reducir la tensión superficial de los segmentos foliares. Los fungicidas evaluados posibilitaron la eliminación de hongos pero no en su totalidad. (Pedrosas manrique 2008)

Siendo este el primer trabajo en el que se evalúa la inducción de brotes en segmentos foliares para la especie *P. maliformis* con la citoquinina BAP, mostrando respuesta en la proliferación de callos y la inducción de brotes en el establecimiento de los segmentos foliares regulados con diferentes concentraciones, teniendo una respuesta positiva como lo observado por Zarate, R., Cantos, M y Troncoso, A (1997), viéndose afectado directamente por la concentración del regulador.

Demostrando en esta investigación que a menor concentración de la citoquinina BAP hay mayor producción de brotes, siendo el tratamiento 3 el que demuestra este hecho, caso contrario en el tratamiento 5 que tiene una menor producción de brotes. Coherente con lo reportado en otros trabajos de (Otahola, 2000) confirmando que las dosis con menor concentración de la citoquinina BAP da mayor efectividad en la formación de brotes en segmentos foliares como en otras *passifloras*.

En la investigación de la regeneración de plantas de parchita a partir de cultivo *in vitro* de discos de hoja (Otahola, 2000) tiene como objetivo determinar el mejor protocolo para regeneración de plantas a partir de explantes foliares, de tal manera que favorezcan su utilización en programas de mejoramiento, donde probó diferentes concentraciones de BAP en un medio MS con 30g/L de sacarosa utilizando explantes foliares de 1 cm de diámetro, obteniendo similares resultados a los encontrados con la *P. maliformis* y corroborando que en todas las dosis utilizadas con la hormona BAP indujo la formación de callos y brotes en los explantes foliares en ambas *pasifloras* sobre saliendo la dosis 0.6 mg/L, la cual produjo mayor formación de brotes y se comportó estadísticamente superior a las demás dosis evaluadas.

Desde el punto de vista del origen del brote se observó que el mayor número de brotes se dio en el origen peciolar, similar a la de origen laminar pero en esta no hay una diferencia significativa entre los cuatro tratamientos evaluados. Quedando el interrogante sobre si la hormona BAP tendrá la mayor eficacia entre las hormonas comerciales.

4.3 Conclusiones

- Se evidencio el protocolo B como el mejor de los protocolos evaluados con un porcentaje del 40% de contaminación para la desinfección superficial de los segmentos foliares demostrando el menor porcentaje de contaminación.
- Los resultados obtenidos aportan para el proceso de propagación *in vitro* de esta especie afirmando la capacidad para la inducción de callos y brotes de los segmentos foliares de la *P. Maliformis* regulados con la citoquinina BAP.
- A nivel general y analizando la totalidad de la información recolectada, se puede observar que el tratamiento 3 presenta mayor número de brotes inducidos, y el tratamiento 2 produce una cantidad similar de brotes inducidos en comparación al tratamiento 3 pero con menor gasto del regulador, se puede afirmar que el tratamiento 2 con 0.3mg/L BAP es el más eficiente, Sin importar el origen de los brotes.
- A nivel de origen laminar existe una similar producción de brotes inducidos para los diferentes tratamientos evaluados, demostrando que el T3 posee mayor producción de brotes laminares, y como no hay diferencia significativa entre todos los tratamientos, no importaría que tratamiento utilizar si se quieren obtener brotes laminares.
- La supervivencia de los brotes inducidos en los segmentos foliares de la *P. maliformis* dependió básicamente del establecimiento del explante, logrando una supervivencia del 100%, aunque en los explantes que tuvieron un alto número de brotes formados presentaron efectos de competencia entre los mismos.

4.4 Recomendaciones

- Implementar tratamientos de desinfección con diferentes tipos de fungicidas, para controlar más eficientemente el riesgo de contaminación en los segmentos foliares de la *P. maliformis*.
- No utilizar plantas adultas siendo este un factor importante para lograr el establecimiento *in vitro* de la *P. maliformis* (cholupa).
- Los tratamientos que forman un alto número de brotes y presentan efectos de competencia entre los mismos es necesario separarlos y subcultivarlos para favorecer su desarrollo posterior.
- Comparar el efecto obtenido de la hormona de BAP con otras citoquininas para establecer el mejor efecto sobre la inducción de brotes en segmentos foliares para *P. maliformis*.
- Probar la inducción de brotes con concentraciones cercanas a 0.6mg/L BAP para corroborar si hay una concentración más eficiente en cuanto al número de brotes formados para la hormona BAP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuerdo de Competitividad (2006). Huila Unido. Cadena Productiva Frutícola. Recuperado de:
http://www.huila.gov.co/documentos/A/acuerdo_regional_fruticola_2008.pdf
- Becerra, D. (2003). Efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad morfogénica de dos especies de *Passiflora* (*Passiflora mollissima* H.B.K Bailey y *Passiflora edulis* var. *Flavicarpa*) (Tesis de pregrado). Pontificia universidad javeriana, Bogotá –Colombia. Recuperado de <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis48.pdf>
- Bonga, J. (1980) Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. In: plant cell culture: results and perspectives (F. sala, B. parisi, R. cell y O. ciferrieds). Elsevier / North Holland Biomedical. Press. 264 p.
- Congreso de colombia. (23 de diciembre de 1993). Ley general de Desarrollo Agropecuario y Pesquero. [ley 101 de 1993]. DO 41.149/ Recuperado de:
<http://www.ica.gov.co/getattachment/03157617-c629-47dd-a2ff-be9ff1dcf2b5/1993L101.aspx>
- Garay, J. (2012). Anuario estadístico agropecuario Recuperado de:
http://www.huila.gov.co/documentos/agricultura/OBSERVATORIO%20DE%20TERRITORIOS%20RURALES/ANUARIO_ESTADISTICO_AGROPECUARIO_HUILA_2012.pdf
- González, O. (2013). Germinación y longevidad de semillas de genotipos de pitahaya (*Hylocereus* spp) y pitaya (*stenocereus* ssp). (Tesis de pregrado). Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Montecillo, Texcoco, estado de México. Recuperado

de:

http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/10521/2170/1/Gonzalez_Hernandez_O_MC_Fisiologia_Vegetal_2013.pdf

Gutiérrez, M. I, Miranda, D., Cárdenas, J. F. (2011). Efecto de tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y cholupa (*Passiflora maliformis* L.). REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS, Vol. 5 (No. 2) pp. 209-219.

Hernández, A., García. N. (2006). Las pasifloras Pp.583-657. En: Garcia, N. & G. Galeano (eds.). Libro Rojo de Plantas de Colombia. Volumen 3: Las bromelias, las labiadas y las pasifloras. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Bogota, Colombia. Instituto Alexander von Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

Leal, C. (2003). Organogénesis *In vitro* a partir de discos de hoja de *Passiflora molissima* HBK Bailey (Curúba) Infectados con *Agrobacterium tumefaciens*. (Tesis pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. Recuperado de:
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis44.pdf>
list for conservation. Biota Colombiana. Vol. 8 núm. (1), 1-45.

Pedrosas Manrique, P. (2008) Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones in vitro. Universidad Distrital Francisco Jose de Caldas. 348p

Manzanilla, M. (2004). Induccion de embriogenesis somatica de tejido nuclear de tres variedades de mango (*Mangifera indica* L.) (Tesis de pregrado). Universidad de colima, Mexico. Recuperado de:
http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Miguel_Angel_Manzanilla_R.PDF

- McCain, R. (1993). Goldenberry, passionfruit, and white sapote: potential fruits for cool subtropical areas. pp. 479-486. En: Janick, J. y J.E. Simon (eds.). New crops. Wiley, Nueva York, Recuperado de: <https://hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1993/V2-479.html#Passifloras>
- Menzel, C.M., Simpson, D.R. & Links. C.W. (1987). Effect of temperature on growth, flowering and nutrient uptake of three passionfruit cultivars under low irradiance. *Scientia Horticulturae*. Volumen (31), 259-266.
- Ministerio de Agricultura Y Desarrollo Rural. (2004). "I Censo nacional de 10 frutas agroindustriales y promisorias." Recuperado de. http://www.google.com.co/url?url=http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/jspui/bitstream/11348/4459/1/033.1.pdf&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ved=0ahUKEwirndK6haXMAhWEWT4KHQI4DgEQFggTMAA&sig2=wAwcpADmxIVt3Yp3wacySw&usg=AFQjCNFaTwXNIrWqqzWkw-20U1h_oWWmeA.
- Ministerio de Agricultura y desarrollo rural. (2006). Resolución número 187. Recuperado de: <http://www.minvivienda.gov.co/ResolucionesAgua/0187%20-%202006.pdf>.
- Miranda, D; Fischer, G; Carranza, C; Magnitskiy, S; Casierra, F; Piedrahita, W; Flórez, L (2009). cultivo poscosecha y comercializacion de las pasifloraceas en colombia: maracuya, granadilla, gulupa y curuba, 5 -55.
- Morgan, W.M. (2000). Cultivo de tejido vegetal. (Vegetal tissue culture), International Plant Laboratories, Baltonsborough, UK.
- Ocampo J, Coppens D'Eeckenbrugge G, Jarvis A. (2010). Distribution of the genus *Passiflora L* diversity in Colombia and its potential as an indicator for biodiversity management in the. *Coffee Growing Zone. Diversity*. Vol. 2 nùm. (11), 158-1180.

- Ocampo J. (2013). Diversidad y distribución de las Passifloraceae en el departamento del Huila en Colombia. *Acta biol. Colomb.*18(3):511-516.
- Ocampo y merlin (2014). Colombia, *passiflora* de Colombia. Version (1). 1-7. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/John_Ocampo/publication/260510981_Passiflora_de_Colombia_Passifloraceae/links/00b7d53174619600ac000000.pdf?origin=publication_list
- Ocampo, J., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Restrepo, M., Jarvis, A., Salazar, M. y Caetano. C. (2007). Diversity of Colombian *Passifloraceae*: biogeography and an updated
- Ocampo, J.A., Rodríguez, A., Puentes, A., Molano, Z. y Parra, M. (2015). El cultivo de la Cholupa (*Passiflora maliformis* L.): Una alternativa para la fruticultura colombiana. Corporación Centro de Desarrollo Tecnológico de las Pasifloras de Colombia – Cepass. Neiva (Huila), Colombia.
- Otahola, V. (2000). Regeneración de Plantas de Parchita (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. *Bioagro*. Vol. 12, núm. (3), 71-74.
- Otahola, V; Díaz, M. (2012). Regeneración *in vitro* de *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa* y *Passiflora quadrangularis* utilizando dos tipos de explantes provenientes de plantas adultas y Bencilaminopurina. *Revista científica UDO agrícola*. Vol. 10 núm. (1), 23-28. Recuperado de: <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/45549>
- Pérez, S; Escala, M; Tillett, S. (2005). Anatomía de la cubierta seminal en ocho especies de *Passiflora* L. subgénero *passiflora*. *Acta botánica venez.* Vol. 28 núm (2).
- Ramírez, M., Vargas T, & García, E. (2009). Cultivo de microesquejes de parchita (*Passiflora edulis* Sims f. *Flavicarpa* Deg.). *Revista científica UDO agrícola*. Vol. 9, núm (2). 337-332. Recuperado de: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg09042>

Rivero, M.M. (2011). Cultivo de Tejidos Vegetales. Recuperado de

http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/2011_2%20Cultivo%20de%20Tejidos%20I.pdf

Romero, G. (2008). Biotecnología: generalidades, riesgos y beneficios. Recuperado de:

<http://www2.uned.es/experto-biotecnologia-alimentos/TrabajosSelecc/GloriaRomero.pdf>

Salgado, G. R. (2016) La propagación de plantas *in vitro*, un éxito biotecnológico. Recuperado

de: <http://www.sabermas.umich.mx/archivo/secciones-anteriores/articulos/75-numero-10/153-la-propagacion-de-plantas-in-vitro-un-exito-biotecnologico.html>

Segretín, M. (2013). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales).

Recuperado de: [file:///D:/Downloads/Cultivos-celulares-II-Euge%20\(1\).pdf](file:///D:/Downloads/Cultivos-celulares-II-Euge%20(1).pdf).

Whiley, A.W. y C. Searle. (1996). Ecophysiology of tropical fruit crops and its impact on production systems. International Conference on Tropical Fruits. 3-14.

Winks, C.W., Menzel, C.M. & Simpson, D.R. (1988). Passionfruit in Queensland. Botany and cultivars. Queensland. vol. 2 núm. (114), 217-224.

Zarate, R., Cantos, M y Troncoso, A (1997). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento en la inducción de brotes múltiples y enraizamiento de *Atropa baetica*. CSIC, IRNAS Sevilla. Apdo 1052.41080 Sevilla