

**Evaluación de la inducción de embriogénesis somática a partir de primordios  
foliares de curuba (*Passiflora tripartita* (Juss.) var. *mollissima* (Kunth) L.H Bailey)**

**Oscar José Parra Peñalosa**

**1.094.276.620**

Programa de Biología

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias Básicas

Universidad de Pamplona

Pamplona, Colombia

2019

**Evaluación de la inducción de embriogénesis somática a partir de primordios foliares de curuba (*Passiflora tripartita* (Juss.) var. *mollissima* (Kunth) L.H Bailey)**

**Trabajo de investigación para optar por el título de:**

**Biólogo**

Estudiante:

**Oscar José Parra Peñalosa**

1.094.276.620

Director:

**Dr. Giovanni Orlando Cancino Escalante**

Programa de Biología

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias Básicas

Universidad de Pamplona

Pamplona, Colombia

2019

## **Dedicatoria**

A mis padres y hermanas, por su apoyo incondicional y fuente de motivación en este proceso.

## **Agradecimientos**

Al Ph.D. Giovanni Orlando Cancino Escalante por su orientación y dirección en este trabajo de investigación

Al docente Emoelio Mantilla por su colaboración en el procesamiento histológico de las muestras.

A la docente Carmen Villamizar por su orientación en el análisis estadístico

A la Universidad de Pamplona por permitirme cumplir el sueño de ser profesional

## Tabla de contenido

Resumen.....	10
Abstract.....	11
1. Introducción.....	12
2. Marco de referencia.....	14
2.1 Familia Passifloraceae.....	14
2.2 Género <i>Passiflora</i> .....	15
2.3 Importancia de las Pasifloras.....	16
2.4 Curuba ( <i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollisima</i> ).....	17
2.5 Botánica.....	17
2.6 Taxonomía.....	18
2.7 Propagación.....	18
2.8 Propagación vegetativa <i>in vitro</i> como método de regeneración de Pasifloras.....	19
2.9 Embriogénesis somática.....	20
2.9.1 Reguladores de crecimiento usados en embriogénesis somática.....	21
2.9.2. Utilidad:.....	21
2.9.3. Fases de la embriogénesis somática:.....	22
2.10 Antecedentes.....	22
3. Objetivos.....	26

3.1 Objetivo general .....	26
3.2 Objetivos específicos .....	26
4. Metodología .....	27
4.1 Material vegetal.....	27
4.2 Germinación.....	27
4.3 Esterilización de explantes.....	28
4.4 Inducción de embriogénesis somática.....	28
4.5 Tratamientos.....	29
4.6 Diseño experimental.....	29
4.7 Evaluación del tratamiento.....	30
4.8 Cortes histológicos .....	31
4.9 Análisis estadístico.....	32
5. Resultados .....	33
5.1 Evaluación del protocolo de desinfección.....	33
5.2 Efecto de la orientación de siembra sobre el porcentaje de callo .....	35
5.3 Efecto de la orientación de siembra sobre los embriones totales.....	37
5.4 Efecto de las concentraciones hormonales sobre el porcentaje de callo.....	38
5.4.1 Efecto de las concentraciones hormonales sobre el porcentaje de callo en la orientación de siembra adaxial al medio.....	38
5.4.2 Efecto de las concentraciones hormonales sobre el porcentaje de callo en la orientación de siembra abaxial al medio.....	39
5.5 Efecto de las concentraciones hormonales sobre los embriones totales .....	40
5.7 Verificación de embriones somáticos mediante análisis histológicos .....	45
6. Discusión.....	48

6.1 Efecto de la orientación de siembra de los explantes.....	48
6.2 Efecto de las concentraciones hormonales.....	49
6.3 Análisis histológicos .....	51
7. Conclusiones y recomendaciones .....	53
7.1 Conclusiones .....	53
8. Bibliografía .....	55

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la Curuba .....	18
Tabla 2. Antecedentes de investigaciones en embriogénesis somática en varias especies del género Passiflora. ....	23
Tabla 3. Concentraciones hormonales y hormonas usadas en la inducción de embriogénesis somática.....	30

## Índice de figuras

Figura 1. Verificación de la presencia de contaminación en las unidades experimentales. ....	33
Figura 2. Presencia de oxidación en las unidades experimentales con relación a la orientación de siembra del explante.....	34
Figura 3. Presencia de contaminación en las unidades experimentales con relación a la orientación de siembra del explante.....	34
Figura 4. Formación de callo en los explantes foliares. ....	35
Figura 5. Efecto de la orientación de siembra sobre el porcentaje de callo generado por los explantes .....	36
Figura 6. Efecto de la orientación de siembra sobre los embriones totales generados por los explantes).....	37
Figura 7. Efecto de las concentraciones hormonales en la orientación de siembra axial al medio sobre el porcentaje de callo generado por los explantes.....	38
Figura 8. Efecto de las concentraciones hormonales en la orientación de siembra abaxial al medio sobre el porcentaje de callo generado por los explantes.....	40
Figura 9. Efecto de las concentraciones hormonales en la orientación de siembra axial al medio sobre el número de embriones generados por los explantes .....	41
Figura 10. Efecto de las concentraciones hormonales en la orientación de siembra abaxial al medio sobre el número de embriones generados por los explantes .....	42
Figura 11. Determinación de estadios embrionarios en explantes foliares. ....	44
Figura 12. Estadios embrionarios hallados en cada orientación de siembra de los explantes .....	45
Figura 13. Análisis histológico de la inducción de embriogénesis somática en explantes foliares de <i>P. mollissima</i> . .	47

## Resumen

La curuba (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*) es un frutal exótico de gran importancia económica tanto a nivel local como internacional. Esto es debido a su particular sabor y altos contenidos vitamínicos. La propagación sexual presenta varios inconvenientes a una escala productiva, debido a que no hay una germinación uniforme, los porcentajes de viabilidad de semillas suelen ser bajos en este género, se originan plantas con alta variabilidad genética, expresada en diferencias de crecimiento, vigor, rendimiento y calidad del fruto, expresado en pérdidas económicas para los productores, razón por la cual la propagación vegetativa, mediante cultivo de tejidos vegetales surge como una alternativa para la producción de este frutal, ya que esta garantiza uniformidad y viabilidad en el producto. Esta investigación se centró precisamente en una técnica de propagación vegetativa que hasta el momento no había sido aplicada en esta especie, conocida como embriogénesis somática, esto con el fin de garantizar una solución a la problemática propuesta. Se determinó el efecto de orientaciones siembra de los explantes, así como de las concentraciones de los reguladores de crecimiento usados. Se confirmó la presencia de tejido embrionario mediante cortes histológicos.

**Palabras claves:** Propagación vegetativa, embriogénesis somática, regulador de crecimiento

## **Abstract**

The “Curuba” (*Passiflora tripartite var. mollissima*) is an exotic fruit of great economic importance to both locally and internationally. This is due to its particular taste and high vitamin content. Sexual propagation presents several drawbacks at a productive level, because there is not a uniform germination, viability of seeds percentages tend to be low in this genre, originating plants with high genetic variability expressed in differences of growth, vigor, performance and quality of the fruit, expressed in economic losses for the producers, for which reason vegetative propagation that arises as an alternative to the production of this fruit tree, since this ensures uniformity and viability in the product. This research focused precisely on a technique of vegetative propagation which has so far not had been applied in this species, known as somatic embryogenesis, in order to secure a solution to the problem proposed. The effect of the orientation of the explants was determined, as well as the concentrations of growth regulators used. The presence of embryonic tissue by means of histological processing was confirmed.

**Key words:** Vegetative propagation, somatic embryogenesis, growth regulator

## 1. Introducción

En Colombia recientemente el área sembrada en frutas expresa una dinámica constante de crecimiento, un aumento en casi un 10% desde la década de 1970 hasta el 2005 en la disposición y participación en siembra indican un aumento para este sector. Esto constituye una estrategia exportadora a largo plazo con miras a incursionar con una oferta sostenida y de calidad en los mercados internacionales (Miranda Lasprilla, 2011).

Colombia es el país que presenta mayor diversidad de Pasifloráceas, dentro de las cuales se encuentra el género *Passiflora* siendo el más diverso de esta familia (Dhawan, Dhawan, & Sharma, 2004). El género *Passiflora* es el más grande de la familia Passifloraceae, abarcando más de 500 especies silvestres distribuidas en la región neotropical (Muschner, Zamberlan, Bonatto, & Freitas, 2012). Este género presenta una gran importancia ya que se le dan diversos a sus frutos. A nivel alimenticio este género aporta variedad de nutrientes y minerales al consumidor, así como sabores de alta preferencia y un alto contenido en fibra (Carvajal et al., 2014). A nivel terapéutico los usos son variados desde sus propiedades sedativas, antiespasmódicas y antibacteriales. Actuales investigaciones han permitido conocer el potencial farmacológico de ciertas especies de este género para la producción de fármacos ansiolíticos y sedantes que han sido usados para tratar la ansiedad el insomnio, la histeria, epilepsia, los espasmos y el dolor (Carvajal et al., 2011). En cuanto a su importancia económica se destaca por su potencial ornamental debido a la exuberancia de sus flores que muestran una gama de colores y formas exóticas, otorgándoles una belleza peculiar lo que ha propiciado la aparición de numerosos híbridos (Santos et al., 2012). Un último punto que hace importante este género son sus interesantes relaciones con otros organismos, como lo es con sus polinizadores ya sean

abejas, abejorros, colibrís y murciélagos, también con hormigas para la protección de la planta y la asociación que presenta con micorrizas, entre otras (Ocampo, 2013).

La curuba (*Passiflora tripartita var. mollissima*) es un frutal exótico de gran importancia económica tanto a nivel local como internacional. Esto es debido a su particular sabor y altos contenidos vitamínicos. Colombia es el país en que presenta la mayor área para el cultivo comercial de curuba, el cual para el año 2017 ocupaba 1.524 ha de área sembrada en 36 municipios del país (Minagricultura, 2018)

Las semillas juegan un papel importante en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas, siendo el principal órgano reproductivo de la mayoría de las plantas catalogadas como superiores (Doria, 2010). Los métodos de propagación realizados por semillas son conocidos como sexuales, debido a que se hace necesaria la presencia de sexos (masculino-femenino), que a través del proceso de polinización-fecundación se da la formación de esta (Irigoyen & Cruz, 2005). Este método presenta varios inconvenientes a una escala productiva, debido a que no hay una germinación uniforme, generada por factores de latencia intrínsecos de cada individuo (de Oliveira Prudente et al., 2017), aparte los porcentajes de viabilidad de semillas suelen ser bajos en este género. (Ozarowski & Thiem, 2013). Por último con este tipo de reproducción se originan plantas con alta variabilidad genética, expresada en diferencias de crecimiento, vigor, rendimiento y calidad del fruto (Moreno, Álvarez-Herrera, Balaguera-López, & Gerhard, 2009), lo cual no es el objetivo desde un punto de vista productivo, donde se busca uniformidad y mantenimiento características de interés económico.

Por lo tanto, la propagación vegetativa surge como una alternativa de producción de plantas con el mismo genotipo de la planta madre (Uribe *et al.*, 2011). La embriogénesis

somática es una técnica de propagación vegetativa que consiste en la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos. Este método se considera el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la estructura bipolar del embrión (raíz y brote) capaz de originar una planta completa (Seijo, 2003). Adicionalmente presenta ventajas frente a la micropropagación convencional como la generación de plántulas con meristemo apical y radicular simultáneamente, lo cual determina que no se requiere una etapa de enraizamiento posterior, además de la facilidad para su escalamiento, y menor probabilidad de variación genética (Khadke & Kuvalekar, 2013).

Han sido reportados trabajos de embriogénesis somática en varias especies del género *Passiflora*, como lo son en *Passiflora miniata* Vanderpl, *Passiflora speciosa* Gardner, *Passiflora edulis* Sims, *Passiflora cincinnata* Mast (de Oliveira Prudente et al., 2017), entre otras, pero aún no han sido reportados en *Passiflora tripartita* var. *mollissima*. Por lo tanto, se planteó como objetivo general en esta investigación el de evaluar la inducción de embriogénesis somática en hojas cotiledonáres de *Passiflora tripartita* var. *mollissima*.

## **2. Marco de referencia**

### **2.1 Familia Passifloraceae**

La familia Passifloraceae está compuesta por más de 500 especies dispuestas en 18 géneros (Corrêa *et al.*, 2016). Las especies de esta familia se caracterizan por ser lianas o enredaderas que trepan mediante zarcillos (Chaparro *et al.*, 2015), aunque no es una visión general ya que también suelen existir especies arbóreas o en forma arbustiva. Sus hojas se caracterizan por ser alternas y con estipulas. Los peciolos pueden o no presentar glándulas siendo

estas sésiles o estipitadas y casi siempre pareadas. Las laminas foliares por lo general son enteras o 2-3 lobadas. Las flores tienen un androginóforo prominente, con menos frecuencia solo ginóforo y en pocas especies el ovario es sésil. Presentan una corona extraestaminal bien desarrollada y sus frutos son bayas y raramente cápsulas (Hernandez & Bernal, 2000). Las especies de esta familia suelen ser muy llamativas por su importancia tanto ecológica como económica. En esta última se ve reflejado en el sector médico y ornamental, aunque especialmente presenta una mayor relevancia en el sector alimenticio. Actuales registros muestran la presencia de más de 500 especies en el neotrópico, siendo Colombia y Brasil las áreas con mayor diversidad de esta familia (Nardin, Bernacci, Shepherd, Bruno, & Plotze, 2015). Colombia es el país con la mayor riqueza de Passifloraceae, con aproximadamente 170 especies (Gutiérrez, Miranda, & Cárdenas, 2011), distribuidas en tres géneros, *Ancistrothyrsus*, *Dilkea* y *Passiflora*. Esta riqueza representa aproximadamente el 26 % de las especies registradas a nivel mundial, posicionando a Colombia como el país con mayor diversidad tanto de especies silvestres como cultivadas (Ocampo Pérez & Merlín Uribe, 2014).

## **2.2 Género *Passiflora***

El género *Passiflora* es el más grande dentro de la familia de las Passifloraceae abarcando alrededor de 500 especies (Delanoy, Van Damme, Scheldeman, & Beltran, 2006) con una distribución en las zonas templadas y tropicales del Nuevo Mundo, siendo escasas en Asia, Australia y África tropical (Carvajal et al., 2011). Este se distribuye desde el nivel del mar hasta altitudes mayores a 3000 metros sobre el nivel del mar (msnm), destacándose la mayor riqueza entre los 400 y 2000 msnm. Aproximadamente el 90% del total de las especies de este género

son originarias de América, las cifras para Colombia muestran 164 especies de las cuales 58 son consideradas endémicas (Marín Tangarife, Caetano, & Posada Tique, 2009).

### **2.3 Importancia de las Pasifloras**

Este género presenta una gran importancia a varias escalas debido a sus propiedades ecológicas, ornamentales, farmacológicas y sobre todos alimenticias (de Oliveira Prudente *et al.*, 2017). A nivel ecológico este género es un indicador de biodiversidad debido a la interacción que presenta con múltiples organismos, como polinizadores a gran escala y micorrizas a pequeña escala (Ocampo Pérez & Merlín Uribe, 2014). A nivel alimenticio este género aporta variedad de nutrientes y minerales al consumidor, así como sabores de alta preferencia y un alto contenido en fibra (Carvajal *et al.*, 2014). A nivel terapéutico los usos son variados desde sus propiedades sedativas, antiespasmódicas y antibacteriales. Actuales investigaciones han permitido conocer el potencial farmacológico de ciertas especies de este género para la producción de fármacos ansiolíticos y sedantes que han sido usados para tratar la ansiedad el insomnio, la histeria, epilepsia, los espasmos y el dolor (Carvajal *et al.*, 2011). En cuanto a su importancia económica destaca su gran potencial de exportación que ha incrementado en los últimos años así como el valor por tonelada, permitiendo de este modo un apoyo del estado para el mejoramiento de la cadena productiva (Ramírez & Salazar, 2012). En cifras el valor de exportación ha aumentado a un ritmo del 20 % al pasar de 4.908 toneladas en 2014 a 7.925 toneladas, siendo los principales consumidores países de la Unión Europea (Minagricultura, 2018). Una de las características por la cual se destaca este género radica en su potencial ornamental y principalmente a la exuberancia de sus flores que muestran una gama de colores y

formas exóticas, otorgándoles una belleza peculiar lo que ha propiciado la aparición de numerosos híbridos (Santos et al., 2012).

#### **2.4 Curuba (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*)**

Dentro de este género una especie que presenta una gran importancia económica es *Passiflora tripartita* var. *mollissima* o comúnmente conocida como curuba, parcha o tumbo la cual es originaria de los valles andinos (Lizarazo, Hernández, Fischer, & Gómez, 2013). Es un fruto tropical semiperenne que crece desde Venezuela hasta Bolivia entre los 1800 y 3600 msnm (Mayorga Cobos, 2016). Es un frutal exótico muy apreciado tanto en el mercado interno como en el externo debido a su particular sabor y altos contenidos vitamínicos. En Colombia el cultivo de curuba durante el periodo comprendido entre 2007-2015 mantuvo una producción anual de 20 mil toneladas, logrando una producción total para el tiempo comprendido en este periodo de 161 mil toneladas, siendo los departamentos con mayor producción Boyacá, Huila y Norte de Santander con un porcentaje de 26%, 21% y 15% respectivamente (Viuche Ducuara, 2017).

#### **2.5 Botánica**

Se caracteriza por ser una planta trepadora de tallo cilíndrico pubescente, de hojas obovadas, trilobuladas y aserradas en las márgenes, generalmente pubescente en ambas caras; su flor es péndula y presenta una bráctea cilíndrica de color verde pubescente trilobulada; el cáliz es tuberoso y glabro, los pétalos son blancos, rosado pálido o rosado intenso, oblongos con el ápice obtuso; presenta cinco estambres soldados en casi toda su longitud; las anteras son oblongas al igual que su ovario; presenta tres estilos y tres estigmas. El fruto es una baya oblonga u ovoide

con pericarpio coriáceo o blando, de color amarillo al madurar; semillas obovadas, con arilo anaranjado, succulento y comestible (Ocampo Gálvez & Hernández Fernández, 2014)

## 2.6 Taxonomía

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la Curuba

Clasificación taxonómica	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Viridiplantae
<b>Infrareino</b>	Streptophyta
<b>Superdivisión</b>	Embryophyta
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Subdivisión</b>	Spermatophytina
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Superorden</b>	Rosanae
<b>Orden</b>	Malpighiales
<b>Familia</b>	Passifloraceae
<b>Género</b>	<i>Passiflora</i> L.
<b>Sección</b>	<i>Tacsonia</i>
<b>Especie</b>	<i>Passiflora tripartita</i>
<b>Variedad</b>	<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollissima</i>

Adaptado de: ITIS report (“Integrated taxonomic information system. ITIS,” 2011)

## 2.7 Propagación

La propagación de plantas involucra la formación y desarrollo de nuevos individuos los cuales son usados en el establecimiento de nuevas plantaciones, esta puede ser de dos tipos: sexual, donde es necesario la fusión de gametos para generar un nuevo individuo (semilla) y asexual o vegetativa, la cual consiste en la generación de nuevas plantas a partir de fragmentos

de la planta madre donde tendrán la misma información genética. El primer tipo de propagación ofrece ventajas en contraste con otros métodos, debido a que con este es el único método de producción de nuevas variedades, es decir favorece la producción de individuos con alta variabilidad genética, lo que podría ser benéfico para combatir ciertas enfermedades, aparte que suele ser el de menor costo y el de mayor facilidad para producir en masa (Miranda et al., 2015). Mientras que con el segundo tipo de propagación la ventaja más representativa es el mantenimiento a través del tiempo de un genotipo específico (Park, 2002). Las formas más comunes de propagación vegetativa son por estacas y esquejes, por injertos, por acodos, por raíces y por cultivo de tejidos (Irigoyen & Cruz, 2005).

## **2.8 Propagación vegetativa *in vitro* como método de regeneración de Pasifloras**

Gran parte de las especies pertenecientes a esta familia suelen ser especies alógamas, es decir, que presentan una alta variedad genética, razón por la cual no se recomienda el uso de semillas para propagación debido a la heterogeneidad producida. Aparte que la mayoría de semillas de esta familia muestran variedad de casos de latencia exógena, lo cual hace más tedioso el proceso de extracción y preparación de semillas para su siembra (Miranda et al., 2015).

La propagación asexual presenta varias ventajas como lo es la generación de los mismos genotipos a través del tiempo; la flexibilidad para implementar clones adecuados con el objetivo de mejoramiento y condiciones ambientales; y la capacidad para gestionar la diversidad y ganancia genética en plantaciones (Park, 2002). El avance en técnicas de propagación asexual de plantas *in vitro*, ha servido para la regeneración vegetal y multiplicación clonal tomando como base explantes de diversos tipos (Criollo Escobar, 2013). En resumen, la propagación vegetativa

logra la estabilización de variedades híbridas, obteniendo de este modo mayores ganancias genéticas y una mejor uniformidad de los cultivos (Lelu-Walter, Teyssier, Guérin, & Pagues, 2016).

## **2.9 Embriogénesis somática**

Se conoce como embriogénesis somática al proceso por el cual células somáticas bajo ciertas condiciones adecuadas para su inducción, forman células embriogénicas, que atraviesan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, dando como resultado la producción de una estructura bipolar (ápices de tallo y raíz) que no presenta una conexión vascular con el tejido original (Bahadur, Rajam, Sahijram, & Krishnamurthy, 2015). Esto se fundamenta bajo el concepto de totipotencia celular, que plantea la capacidad de cualquier célula de dividirse y producir una planta completa y funcional (Nic Can et al., 2015). Inicialmente esto fue propuesto por el botánico alemán Haberlandt para la época de 1900, quien mencionaba que cualquier célula vegetativa de una planta podría inducir la formación de embriones (Dantu & Tomar, 2010). Pero no fue sino hasta 1958 que se demostró por primera vez la embriogénesis somática por Reinert y Steward, quienes trabajaron con suspensiones celulares de *Daucus carota*. (Von Arnold, Sabala, Bozhkov, Dyachok, & Filonova, 2002). y surgido como una vía de propagación de gran utilidad para la conservación *in vitro* de germoplasma como también para el mejoramiento genético de especies mediante selección artificial (Seijo, 2003). Este proceso no es del todo artificial, ciertos géneros de plantas como *Citrus* y *Mangifera* generan embriones adventicios a partir de células que están fuera del saco embrionario (Dantu & Tomar, 2010).

### **2.9.1 Reguladores de crecimiento usados en embriogénesis somática**

Los reguladores de crecimiento son compuestos naturales o sintéticos que afectan los procesos metabólicos o del desarrollo en plantas superiores, aparte están involucradas en muchos procesos, que permiten a las plantas reaccionar ante estímulos internos y externos. Estos pueden alterar el equilibrio de las hormonas vegetales en las plantas tratadas mediante la aplicación exógena de hormonas naturales o sus análogos sintéticos. Los reguladores mas conocidos y de mayor uso a nivel de cultivo de tejidos son las auxinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno (Rademacher, 2015).

En el proceso de embriogénesis somática los reguladores de crecimiento que mayor respuesta han obtenido y por ende su mayor uso, corresponden a las auxinas y citoquininas. Las auxinas han demostrado ser indispensables para la inducción del proceso embriogénico, donde varias han sido evaluadas siendo la de mayor uso debido a su efectividad, la hormona sintética “Ácido 2,4-diclorofenoxiacético” (2,4 D). Las citoquininas por su parte también han sido reportadas como indispensables en el proceso de embriogénesis somática debido a que inhibe el potencial embriogénico y promueve la división celular. Entre las de mayor uso y efectividad está la 6 Bencilaminopurina o benciladenina (BAP ó BA) (Dantu & Tomar, 2010).

**2.9.2. Utilidad:** Esta técnica ha surgido como una herramienta biotecnológica de gran aplicación a nivel industrial como académico. Uno de sus principales usos es para propagación clonal, ya que a partir de pocos explantes puede ser obtenida una gran cantidad de ejemplares con características similares a la planta madre, puesto que el genotipo será conservado en la siguiente generación. Esto con el objetivo de obtener plantas para pruebas, para masificar producción o para acortar el ciclo de reproducción de una especie de interés particular. Otro uso

de esta herramienta biotecnológica es la crioconservación mediante la cual es almacenado material biológico, que en este caso serían los embriones somáticos con el fin de conservar y disponer de estos a largo plazo (Celestino, Hernández, Carneros, López-Vela, & Toribio, 2005). Y por último, esta herramienta es de gran utilidad para estudios enfocados a transformación y mejora genética de alguna especie de interés (Horstman, Bemer, & Boutilier, 2017).

**2.9.3. Fases de la embriogénesis somática:** Durante el proceso de embriogénesis somática pueden diferenciarse varias etapas o fases, siendo la primera la inducción en la que las células del explante cambian su patrón de expresión y generan los primeros embriones somáticos, por lo general este cambio se debe a la presencia de un regulador de crecimiento en el medio de cultivo, seguidamente viene una fase de multiplicación donde los embriones somáticos ya inducidos, se multiplican por embriogénesis secundaria. Terminado esto prosigue una fase de diferenciación, que implica histogénesis para una posterior maduración y por último aparece la fase de conversión en planta, donde los embriones inician su germinación para transformarse en plántulas y así poder ser transferidas al suelo. (Celestino et al., 2005).

## **2.10 Antecedentes**

No han sido reportados en la literatura trabajos enfocados a la inducción de embriogénesis somática en esta especie (*Passiflora tripartita var. mollisima*) pero si han sido reportados trabajos en otras especies de este género tales como:

**Tabla 2.** Antecedentes de investigaciones en embriogénesis somática en varias especies del género *Passiflora*.

<b>Título</b>	<b>Año de Publicación</b>	<b>Autores</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Referencia</b>
<b>A novel regeneration system for a wild passion fruit species (<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos</b>	2009	Maurecilne Lemes da Silva, Daniela Lopes Paim Pinto, Miguel Pedro Guerra, Eny Iochevet Segal Floh, Cláudio Horst Bruckner, Wagner Campos Otoni	El objetivo de este trabajo fue lograr inducir la formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos para generar un protocolo reproducible de producción de embriones de <i>P. cincinnata</i> .	(M. L. da Silva et al., 2009a)
<b>Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. plants as assessed by flow cytometry</b>	2010	Daniela Lopes Paim Pinto, Beatriz de Almeida Barros, Lyderson Facio Viccini, Jose´ Marcello Salabert de Campos, Maurecilne Lemes da Silva, Wagner Campos Otoni	Esta investigación determinó la ploidia de las plantas de de <i>P. cincinnata</i> , regeneradas por embriogénesis somática con el fin de verificar la utilidad de este protocolo	(Paim et al., 2010)
<b>Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (<i>Passiflora edulis</i> Sims) genotypes</b>	2011	Daniela Lopes Paim Pinto, Ana Maria Rocha de Almeida, Mailson Monteiro Rego, Maurecilne Lemes da Silva, Evelyn Jardim de Oliveira,	En este trabajo se centraron especialmente en el desarrollo de un protocolo para la embriogénesis somática en <i>P. edulis</i> con el fin de generar un sistema más eficiente de transformación genética.	(Paim et al., 2011)

		Wagner Campos Otoni		
<b>Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species <i>Passiflora cincinnata</i> Masters: histocytological and histochemical evidences</b>	2012	Diego Ismael Rocha, Lorena Melo Vieira, Francisc o André Ossamu Tanaka, Luzimar Campos da Silva, Wagner Campos Otoni	Esta investigación tiene como principal objetivo mostrar cambios en la organización celular con un énfasis espacial y temporal durante la fase de embriogénesis somática en <i>P. cincinnata</i>	(Rocha, Vieira, Tanaka, da Silva, & Otoni, 2012)
<b>Morphogenetic potential of native passion fruit (<i>Passiflora gibertii</i> N. E. Brown.) calli</b>	2013	Milene Alves de Figueiredo Carvalho, Renato Paiva, Eduardo Alves, Rairys Cravo Nogueira, Vanessa Cristina Stein, Evaristo Mauro de Castro, Patricia Duarte de Oliveira Paiva, Daiane Peixoto Vargas	Este trabajo planteó como objetivo caracterizar el potencial morfo genético de <i>P. gibertii</i> , implicando procesos de embriogénesis	(de Figueiredo et al., 2013)
<b>Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in <i>Passiflora edulis</i> Sims (Passifloraceae)</b>	2015	Gizelly M. da Silva, Ana C. F. da Cruz, Wagner C. Otoni, Telma N. S. Pereira, Diego I. Rocha, Maurecilne L. da Silva	El objetivo de este trabajo fue demostrar mediante cortes histológicos sustancias de reserva durante el proceso de embriogénesis somática en <i>P.edulis</i> .	(G. M. Silva et al., 2015)
<b>Characterization of the formation of somatic embryos</b>	2017	Débora de Oliveira Prudente, Renato Paiva, Sebastien	Esta investigación busca desarrollar un protocolo eficiente <i>in vitro</i> para el proceso de embriogénesis	(de Oliveira Prudente et al., 2017)

<p><b>from mature zygotic embryos of <i>Passiflora ligularis</i> Juss.</b></p>		<p>Carpentier, Rony Swennen, Fernanda Carlota Nery, Luciano Coutinho Silva, Bart Panis.</p>	<p>somática en <i>P. ligularis</i>.</p>	
--	--	---	---	--

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo general

- Evaluar la inducción de embriogénesis somática en hojas cotiledonáres de *Passiflora tripartita* var. *mollisima*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Evaluar un protocolo de desinfección en hojas cotiledonáres de *Passiflora tripartita* var. *mollisima*.
- Evaluar el efecto de la orientación de siembra y la adición de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento sobre explantes foliares de *Passiflora tripartita* var. *mollisima*
- Verificar la inducción de embriogénesis somática mediante cortes histológicos

## **4. Metodología**

Este trabajo se llevó a cabo entre los meses de Julio del 2017 hasta octubre del 2018, en el laboratorio de Cultivos vegetales *in vitro* suscrito al programa de biología y a su vez a la facultad de Ciencias básicas de la Universidad de Pamplona.

### **4.1 Material vegetal**

Se recolectaron frutos maduros en el mercado principal del municipio de Pamplona, de *Passiflora tripartita* var. *mollissima* que presentaran buenas características fitosanitarias, es decir, un estado óptimo de madurez, sin la presencia de patógenos y con una forma y textura vigorosa. Esto con el fin de garantizar una producción con características de interés al consumidor.

### **4.2 Germinación**

Tras haber seleccionado los frutos con las características anteriormente mencionadas se recurrió a la extracción de las semillas del fruto, a estas se les removió totalmente el arilo que las recubría con el objetivo de evitar alteraciones en el proceso de germinación, para luego llevarlos secado durante 3 días. Estando las semillas ya listas se prosiguió a su respectiva siembra en bandejas de germinación, las cuales contenían sustrato orgánico que les otorgaba soporte y nutrición. Estas bandejas fueron llevadas al cuarto de incubación a una temperatura de 16 a 22 grados centígrados y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. El tiempo de germinación hasta llegar al estado de plántula duró aproximadamente 4 a 5 semanas.

### **4.3 Esterilización de explantes**

Al cabo de 4 semanas cuando las plántulas germinadas abrieron sus hojas cotiledonáreas, estas fueron cortadas e inmediatamente puestas en agua para evitar su oxidación. La metodología usada fue la propuesta por da Silva et al., 2009, y se le realizaron modificaciones en cuanto a los tiempos de exposición y tipos de soluciones usadas. Esta consistió inicialmente en realizar abundantes lavados con agua estéril, luego fueron pasados por hipoclorito de sodio al 2% durante 30 minutos en constante agitación; seguidamente se realizaron nuevamente lavados con agua estéril para posteriormente pasarlos por una solución de yodopovidona al 10% durante 30 minutos también en constante agitación, esto con el fin de minimizar la presencia de contaminantes; terminado este tiempo nuevamente se realizaron lavados con agua estéril para eliminar residuos presentes y quedar listos para su posterior siembra. Todo este proceso fue realizado en una cabina de flujo laminar para garantizar una mayor asepsia.

### **4.4 Inducción de embriogénesis somática**

Para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento, se prepararon 25 ml de medio de cultivo correspondiente al recipiente de vidrio donde se realizó la siembra. El medio de cultivo usado fue el MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado con vitaminas tales como tiamina (0,1% v/v), ácido nicotínico (0,01% v/v), piridoxina (0,01% v/v), y myo-inositol (0,1% v/v), también sacarosa al 3% y el agente gelificante Plant-agar (3%). Aparte, se le suministraron diferentes concentraciones del regulador de crecimiento Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) (4,5  $\mu$ M, 18,1  $\mu$ M y 27,1  $\mu$ M) y una concentración constante de Bencilaminopurina (BA) (4,5  $\mu$ M) (M. L. da Silva et al., 2009a). El medio se ajustó a pH 5.8 antes de ser autoclavado a 121 °C por 15 min.

Las siembras fueron llevadas al cuarto de incubación a una temperatura de  $16 \text{ a } 22^{\circ} \text{ C} \pm 2^{\circ} \text{ C}$  y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad durante aproximadamente 6 semanas.

#### **4.5 Tratamientos**

Se evaluó como primer tratamiento el efecto de la orientación del explante al momento de la siembra, este consistió en hallar una posible diferencia en las variables medidas con respecto a la orientación del explante, es decir, si había una mayor respuesta de las variables cuando el explante estaba ubicado de forma adaxial o abaxial al medio de cultivo. Como segundo tratamiento se evaluó el efecto de tres dosis del regulador de crecimiento ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre los explantes de *Passiflora tripartita* var. *mollissima*, donde se buscaba hallar una posible diferencia en las variables medidas con respecto a la concentración del regulador de crecimiento usado.

#### **4.6 Diseño experimental.**

Para la evaluación de los tratamientos se crearon 4 niveles que consistieron en la variación de la concentración del regulador de crecimiento 2,4 D y una concentración constante de  $4,5 \mu\text{M}$  del regulador de crecimiento BA. El nivel cero o control, el cual carecía de concentración alguna de estos reguladores de crecimiento, solo contenía las condiciones básicas explicadas anteriormente de un medio de cultivo; El nivel uno contenía una concentración de  $4,5 \mu\text{M}$  de 2,4 D; El nivel dos contenía una concentración de  $18,1 \mu\text{M}$  de 2,4 D y el nivel tres una concentración de  $27,1 \mu\text{M}$  de 2,4 D. Cada nivel contenía 8 unidades experimentales con 4 replicas respectivamente, para un total de 128 unidades experimentales totales.

Para la evaluación del efecto de la orientación del explante se usaron las mismas concentraciones anteriormente descritas e igual cantidad de unidades experimentales, con la diferencia que los explantes fueron sembrados con una orientación distinta, es decir, si en el tratamiento inicial los explantes estaban con la cara abaxial al medio en este tratamiento estaría con una orientación adaxial al medio, brindando las mismas condiciones y tiempos de incubación.

**Tabla 3.** Concentraciones hormonales y hormonas usadas en la inducción de embriogénesis somática

<b>Nivel</b>	<b>BA (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>2,4 D (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
0	0	0
1	4,5	4,5
2	4,5	18,1
3	4,5	27,1

#### **4.7 Evaluación del tratamiento**

Las variables evaluadas fueron las mismas para los dos tratamientos. Estas fueron porcentaje de callo formado por explante; Tipos de embriones formados y número total de embriones. Para la medición de la primera variable que fue la de porcentaje de callo formado, se recurrió al software de procesamiento de imagen digital ImageJ versión 1.8 (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012). El procedimiento consistió en tomar aleatoriamente cinco unidades

experimentales por nivel de tratamiento y observar si estas presentaban la formación de callo. Si la observación era positiva se recurría de una manera no destructiva a tomar una fotografía del explante con una respectiva escala, luego esta imagen se procesaría mediante el software anteriormente mencionado, el cual arrojaría el valor específico del área del explante que formó callo. Esta evaluación fue realizada cada tres días hasta que los explantes empezaran a presentar formación de embriones. Inmediatamente los explantes formaran embriones se suspendía la evaluación de callo y se proseguía con el conteo y clasificación de los mismos. Para la evaluación de la segunda variable se tomó cada unidad experimental de cada tratamiento y bajo el estereoscopio se realizó la clasificación y conteo de los embriones formados en estado Globular, Corazón, Torpedo, Cotiledonar y Maduro. Para la última variable se recurrió a sumar los embriones encontrados en las distintas fases con el fin de obtener los embriones totales por nivel de tratamiento.

#### **4.8 Cortes histológicos**

Se tomaron explantes que presentaran formación de embriones para evidenciar y verificar el tejido embrionario. Estos fueron fijados en formol al 10 % y lavados en etanol al 70 %, posteriormente se deshidrataron a través de una serie graduada de alcohol etílico y xylol para su seguida fijación en parafina. Se realizaron cortes delgados (8  $\mu\text{m}$ ) con ayuda de un micrótopo rotatorio y cuchillas de acero inoxidable para su posterior montaje en portaobjetos. El proceso de tinción fue tomado y adaptado de da Silva et al., 2009. Este consistió en agregar azul de Evans (0,5%) durante 3 minutos, seguido de orceína acético-láctica (2 %) y por último azul de Toluidina por 10 minutos. Tras la aplicación de cada tinte se realizaban abundantes lavados con

agua destilada con el objetivo de eliminar residuos de colorante. Estas placas fueron observadas bajo el microscopio donde se tomaron fotografías y se realizó su respectivo análisis.

#### **4.9 Análisis estadístico**

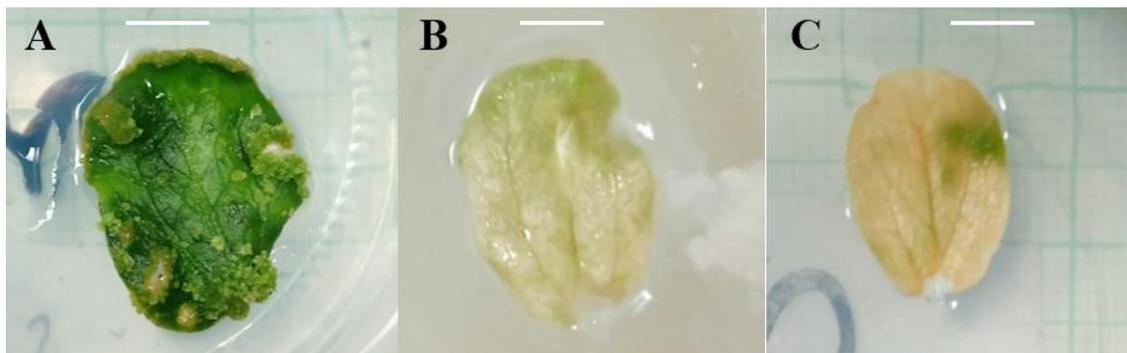
Todos los experimentos fueron desarrollados con un diseño completamente al azar con cuatro réplicas de 32 unidades experimentales en cada nivel de tratamiento. Las pruebas aplicadas correspondieron a pruebas de análisis no paramétrico debido a la distribución que presentaron los datos. De este modo, para determinar el efecto de la orientación de siembra sobre la variable de porcentaje de callo y embriones totales, se aplicó la prueba de comparación de dos muestras independientes de Mann-Whitney con un valor alfa de 0,05, y para la determinación del efecto de las concentraciones hormonales sobre las variables ya mencionadas se aplicó la prueba de análisis no paramétrico para muestras independientes de Kruskal-Wallis, con un valor alfa de 0,05.

## 5. Resultados

El tiempo de este experimento fue de 38 días, desde el momento de la siembra de los explantes foliares, hasta la verificación visual de la presencia de tejido embrionario o embriones somáticos.

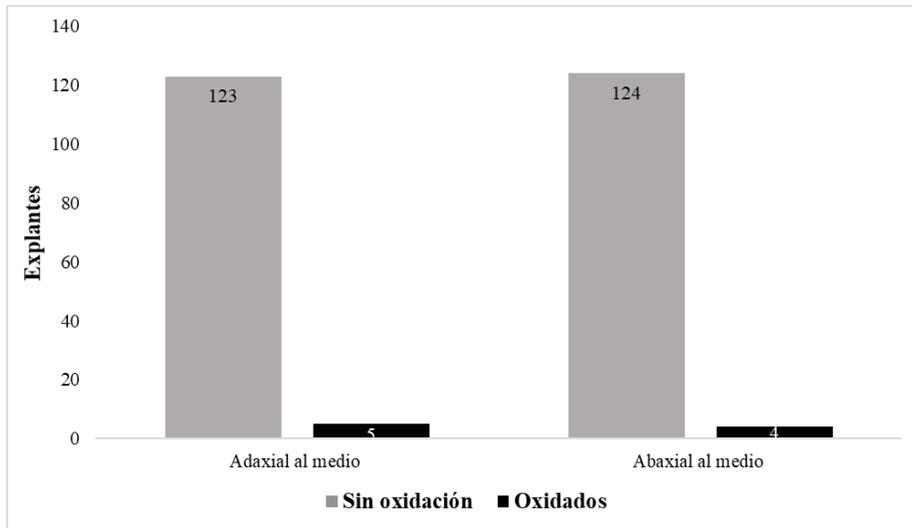
### 5.1 Evaluación del protocolo de desinfección

Al pasar los 38 días de siembra se realizó el conteo de los individuos que presentaron algún tipo de contaminación debido a la presencia de algún tipo de contaminante (levaduras, hongos o bacterias) o en estado de oxidación (Figura 1). Debido a que en el experimento se realizaron dos orientaciones de siembra de los explantes, los resultados relacionados a la evaluación del protocolo de desinfección serán mostrados por separado.



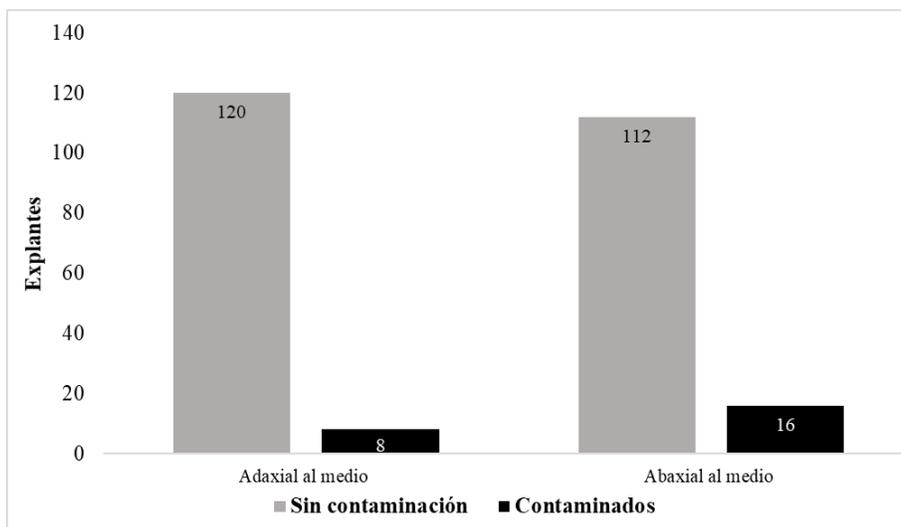
**Figura 1.** Verificación de la presencia de contaminación en las unidades experimentales. A. explante viable. B. explante contaminado. C. Explante oxidado. Barra=0,5 cm

De esta manera se obtuvo que en la siembra con orientación axial al medio del explante, el porcentaje de oxidación fue del 3,91%, y para la siembra con orientación abaxial al medio del explante se obtuvo un porcentaje de oxidación del 3,13 %. De manera general en todo el experimento el porcentaje de oxidación obtenido fue del 3,52 % (Figura 2).



**Figura 2.** Presencia de oxidación en las unidades experimentales con relación a la orientación de siembra del explante

Para la contaminación se obtuvo que en la siembra del explante con orientación axial al medio, el porcentaje de contaminación fue del 6,25 %, y para la siembra del explante con orientación abaxial al medio se obtuvo un porcentaje de oxidación del 12,5 %. De manera general en todo el experimento el porcentaje de contaminación obtenido fue del 9,38 % (Figura 3).

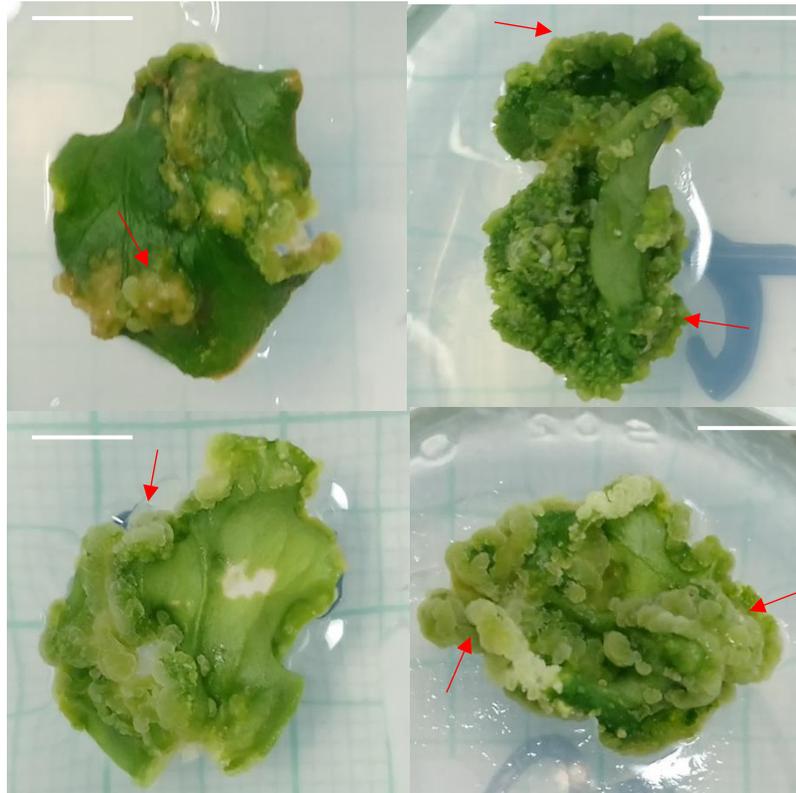


**Figura 3.** Presencia de contaminación en las unidades experimentales con relación a la orientación de siembra del explante

## 5.2 Efecto de la orientación de siembra sobre el porcentaje de callo

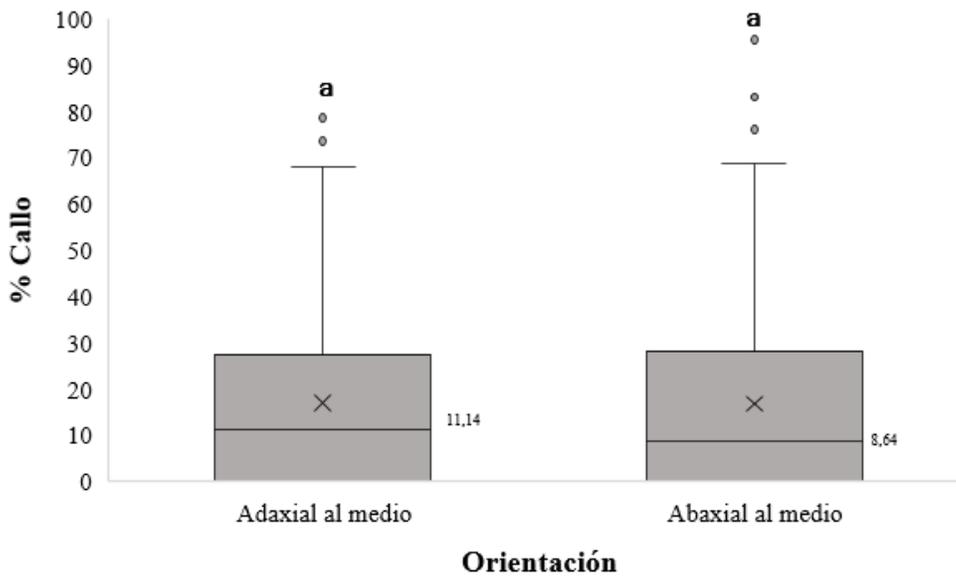
Para la evaluación del porcentaje de callo se tomaron en cuenta los datos obtenidos a partir del día 17 después de la siembra, ya que desde este instante se verificó visualmente que los explantes sembrados empezaron a mostrar una respuesta morfológica ante la presencia de las distintas concentraciones hormonales (Figura 4).

Se obtuvo que en la orientación de siembra con cara adaxial al medio la mediana de la variable porcentaje de callo fue de 11,14, mientras que la mediana obtenida para el porcentaje de callo en la orientación de siembra con cara abaxial al medio fue de 8,64.



**Figura 4.** Formación de callo en los explantes foliares. Presencia de callo en tejido foliar (indicado por las flechas). Barra=0,5 cm

La prueba para dos muestras independientes de Mann-Whitney aplicada para evaluar el efecto de la orientación de siembra del explante; con orientación de la cara axial al medio de cultivo o con orientación de la cara abaxial al medio de cultivo; sobre la variable de respuesta la cual es el porcentaje de callo, arrojó que no hay una diferencia estadísticamente significativa en este experimento, con un p valor de 0,618 (Figura 5).

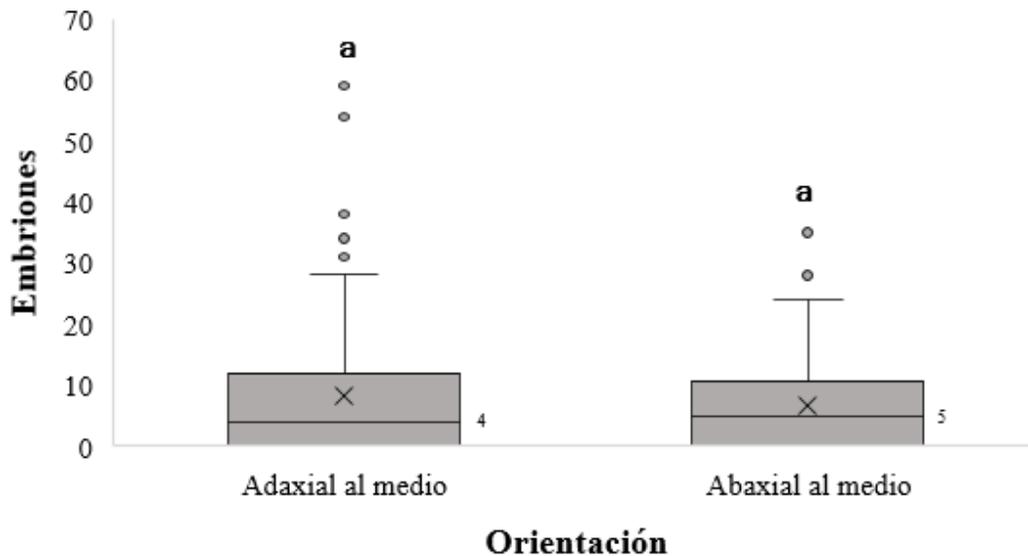


**Figura 5.** Efecto de la orientación de siembra sobre el porcentaje de callo generado por los explantes (barras con letras similares no presentaron diferencias estadísticamente significativas.  $\alpha=0,05$ )

Esto indica que la orientación con relación al medio a la cual sea sembrado el explante no influye significativamente sobre la variable referente a porcentaje de callo. A pesar de que la mediana de la variable de porcentaje callo fue mayor para la orientación de siembra axial al medio, esta diferencia no es significativa con relación a la orientación de siembra abaxial al medio.

### 5.3 Efecto de la orientación de siembra sobre los embriones totales

Se obtuvo en cuanto a la orientación de siembra de los explantes y su efecto sobre la variable de número de embriones, que cuando la siembra del explante fue realizada en orientación adaxial al medio la mediana de este valor fue de 4 mientras que cuando la orientación de siembra fue abaxial al medio la mediana presentada fue de 5 (Figura 6).



**Figura 6.** Efecto de la orientación de siembra sobre los embriones totales generados por los explantes (barras con letras similares no presentaron diferencias estadísticamente significativas.  $\alpha=0,05$ )

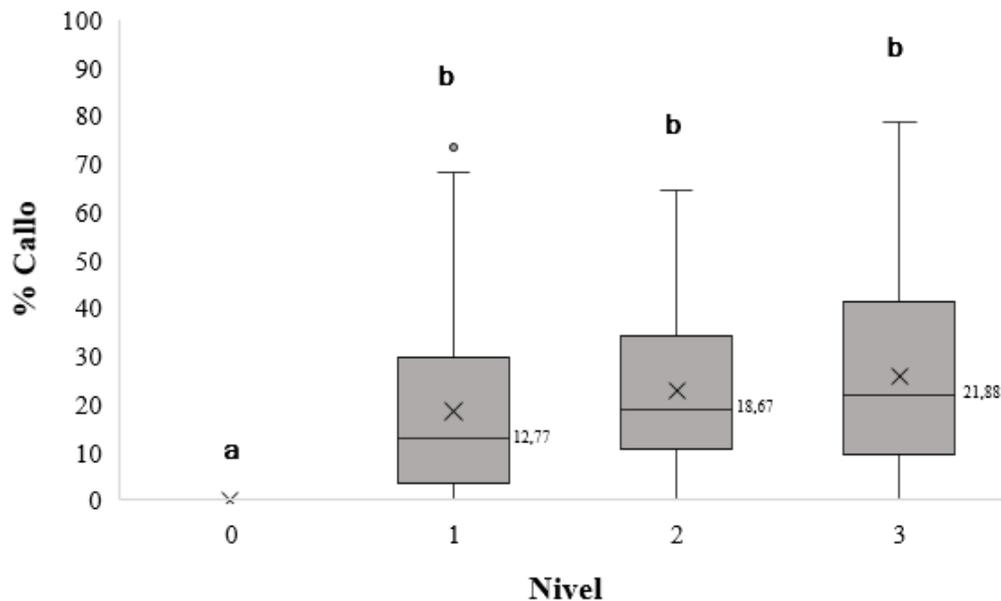
La prueba para dos muestras independientes de Mann-Whitney aplicada para evaluar el efecto de la orientación de siembra del explante sobre la variable de respuesta que en este caso es el número de embriones obtenidos, arrojó un p valor de 0,943, indicando que la orientación de siembra del explante no influye significativamente sobre la variable de número de embriones.

## 5.4 Efecto de las concentraciones hormonales sobre el porcentaje de callo

Para esta fase se buscaba determinar el efecto ejercido por las dosis hormonales agregadas al medio de cultivo y su respuesta ante el porcentaje de callo generado. Se evaluaron por separado el efecto de las concentraciones por cada orientación de siembra de los explantes.

### 5.4.1 Efecto de las concentraciones hormonales sobre el porcentaje de callo en la orientación de siembra adaxial al medio

En esta orientación de siembra de los explantes se obtuvo que los valores de la mediana para cada nivel del tratamiento 0, 1, 2 y 3, fueron 0 %, 12,77 %, 18,67 %, y 21,88 % respectivamente, de la variable evaluada correspondiente a presencia de callo (Figura 7).



**Figura 7.** Efecto de las concentraciones hormonales en la orientación de siembra adaxial al medio sobre el porcentaje de callo generado por los explantes (barras con letras similares no presentaron diferencias estadísticamente significativas.  $\alpha=0,05$ ) (0= Sin reguladores de crecimiento; 1= 4,5  $\mu\text{M}$  BA+4,5  $\mu\text{M}$  2,4D; 2=4,5  $\mu\text{M}$  BA+18,1  $\mu\text{M}$  2,4D; 3=4,5  $\mu\text{M}$  BA+27,1  $\mu\text{M}$  2,4D)

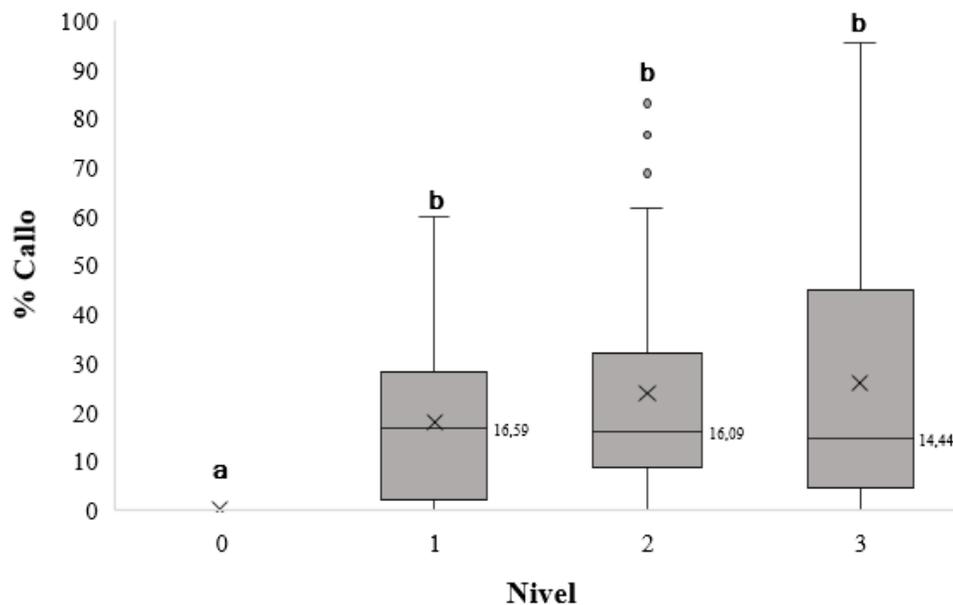
La prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes aplicada para observar el efecto de la dosificación hormonal con respecto al porcentaje de callo generado arrojó un p valor de 0,00 indicando que la concentración hormonal agregada si influye sobre la variable de respuesta.

En este caso se obtuvo que el nivel, al cual no fueron agregados reguladores de crecimiento, como no presentó formación de callo, fue aquel que presentó diferencias significativas con relación a los otros niveles hormonales. El mayor valor de porcentaje de callo fue obtenido en el nivel 3 de concentración hormonal, pero este no resultó ser estadísticamente diferente a los niveles 1 y 2 (Figura 7).

#### **5.4.2 Efecto de las concentraciones hormonales sobre el porcentaje de callo en la orientación de siembra abaxial al medio**

En esta orientación de siembra de los explantes se obtuvo que los valores de la mediana para cada nivel del tratamiento 0, 1, 2 y 3, fueron 0 %, 16,59 %, 16.09 %, y 14,44 % respectivamente, de la variable evaluada correspondiente a presencia de callo (Figura 8)

La prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes aplicada para observar el efecto de la dosificación hormonal con respecto al porcentaje de callo generado arrojó un p valor de 0,00 indicando que la concentración hormonal agregada si influye sobre la variable de respuesta. En este caso se obtuvo que el experimento control fue aquel que presentó diferencias significativas con relación a los otros niveles hormonales. El mayor valor de porcentaje de callo fue obtenido en el nivel 1 de concentración hormonal, pero este no resultó ser estadísticamente diferente a los niveles 2 y 3 (Figura 8).



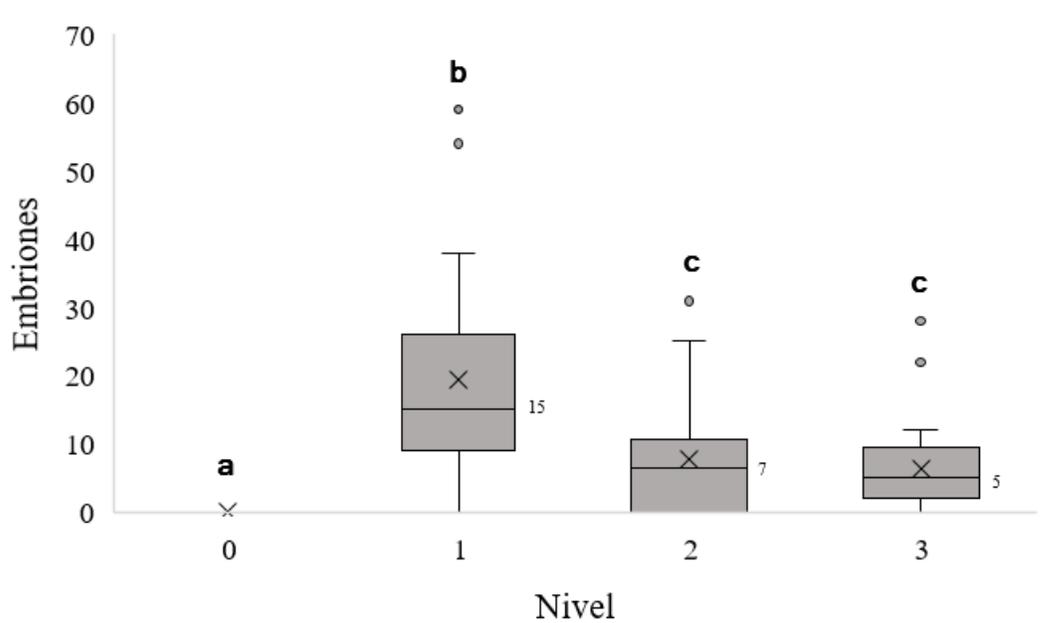
**Figura 8.** Efecto de las concentraciones hormonales en la orientación de siembra abaxial al medio sobre el porcentaje de callo generado por los explantes (barras con letras similares no presentaron diferencias estadísticamente significativas.  $\alpha=0,05$ ) (0= Sin reguladores de crecimiento; 1= 4,5  $\mu\text{M}$  BA+4,5  $\mu\text{M}$  2,4D; 2=4,5  $\mu\text{M}$  BA+18,1  $\mu\text{M}$  2,4D; 3=4,5  $\mu\text{M}$  BA+27,1  $\mu\text{M}$  2,4D)

### 5.5 Efecto de las concentraciones hormonales sobre los embriones totales

En esta fase se buscaba determinar el efecto ejercido por las dosis hormonales agregadas a los medios de cultivo y su respuesta ante los embriones generados. Se evaluaron por separado el efecto de las concentraciones por cada orientación de siembra de los explantes.

### 5.5.1 Efecto de las concentraciones hormonales en la orientación adaxial al medio

Para esta orientación de siembra los valores correspondientes a la mediana de la variable evaluada fueron 0, 15, 7 y 5, respectivamente para cada nivel de concentración hormonal (Figura 9).



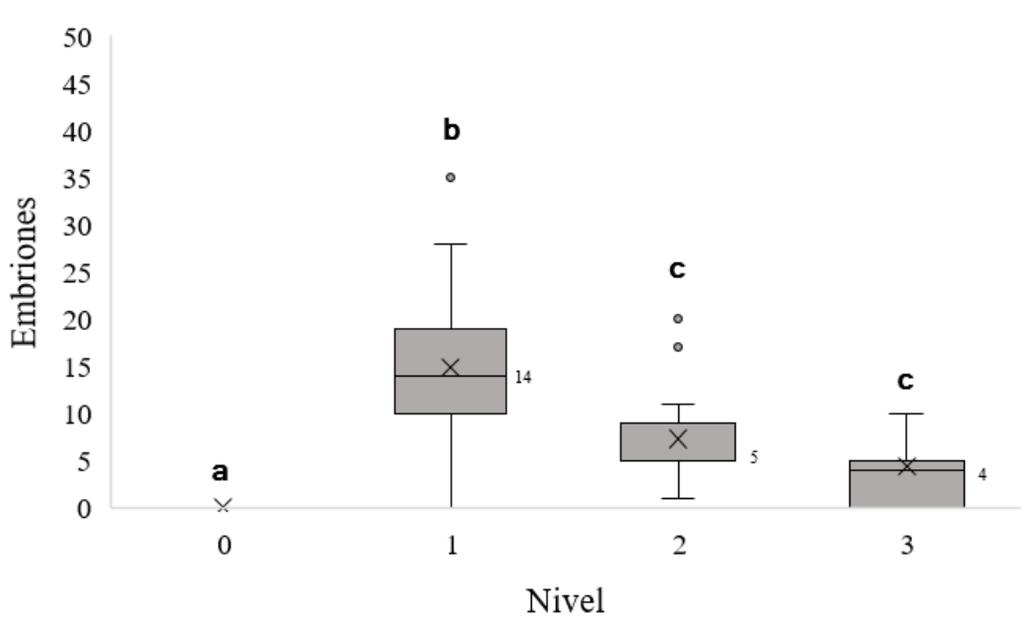
**Figura 9.** Efecto de las concentraciones hormonales en la orientación de siembra adaxial al medio sobre el número de embriones generados por los explantes (barras con letras similares no presentaron diferencias estadísticas significativas.  $\alpha=0,05$ ) (0= Sin reguladores de crecimiento; 1= 4,5  $\mu\text{M}$  BA+4,5  $\mu\text{M}$  2,4D; 2=4,5  $\mu\text{M}$  BA+18,1  $\mu\text{M}$  2,4D; 3=4,5  $\mu\text{M}$  BA+27,1  $\mu\text{M}$  2,4D)

La prueba de análisis para muestras independientes “Kruskal-Wallis” arrojó un p valor de 0,00 y determinó que la dosificación hormonal correspondiente al nivel 1 (4,5  $\mu\text{M}$  BA+4,5  $\mu\text{M}$  2,4D) fue la que presentó el mayor valor de número de embriones y estadísticamente diferente a los otros niveles del tratamiento. Las concentraciones usadas en los niveles 2 y 3 no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre ellas en cuanto al número de embriones producidos, mientras que el nivel 0 (Control) no presentó desarrollo embriogénico durante el

experimento. Esto indica que la variable de embriones totales no se ve favorecida por altas concentraciones de las hormonas usadas.

### 5.5.2 Efecto de las concentraciones hormonales en la orientación abaxial al medio

Para esta orientación de siembra los valores correspondientes a la mediana de la variable evaluada fueron 0, 14, 5 y 4, respectivamente para cada nivel de concentración hormonal (Figura 10).



**Figura 10.** Efecto de las concentraciones hormonales en la orientación de siembra abaxial al medio sobre el número de embriones generados por los explantes (barras con letras similares no presentaron diferencias estadísticamente significativas.  $\alpha=0,05$ ) (0= Sin reguladores de crecimiento; 1= 4,5  $\mu\text{M}$  BA+4,5  $\mu\text{M}$  2,4D; 2=4,5  $\mu\text{M}$  BA+18,1  $\mu\text{M}$  2,4D; 3=4,5  $\mu\text{M}$  BA+27,1  $\mu\text{M}$  2,4D)

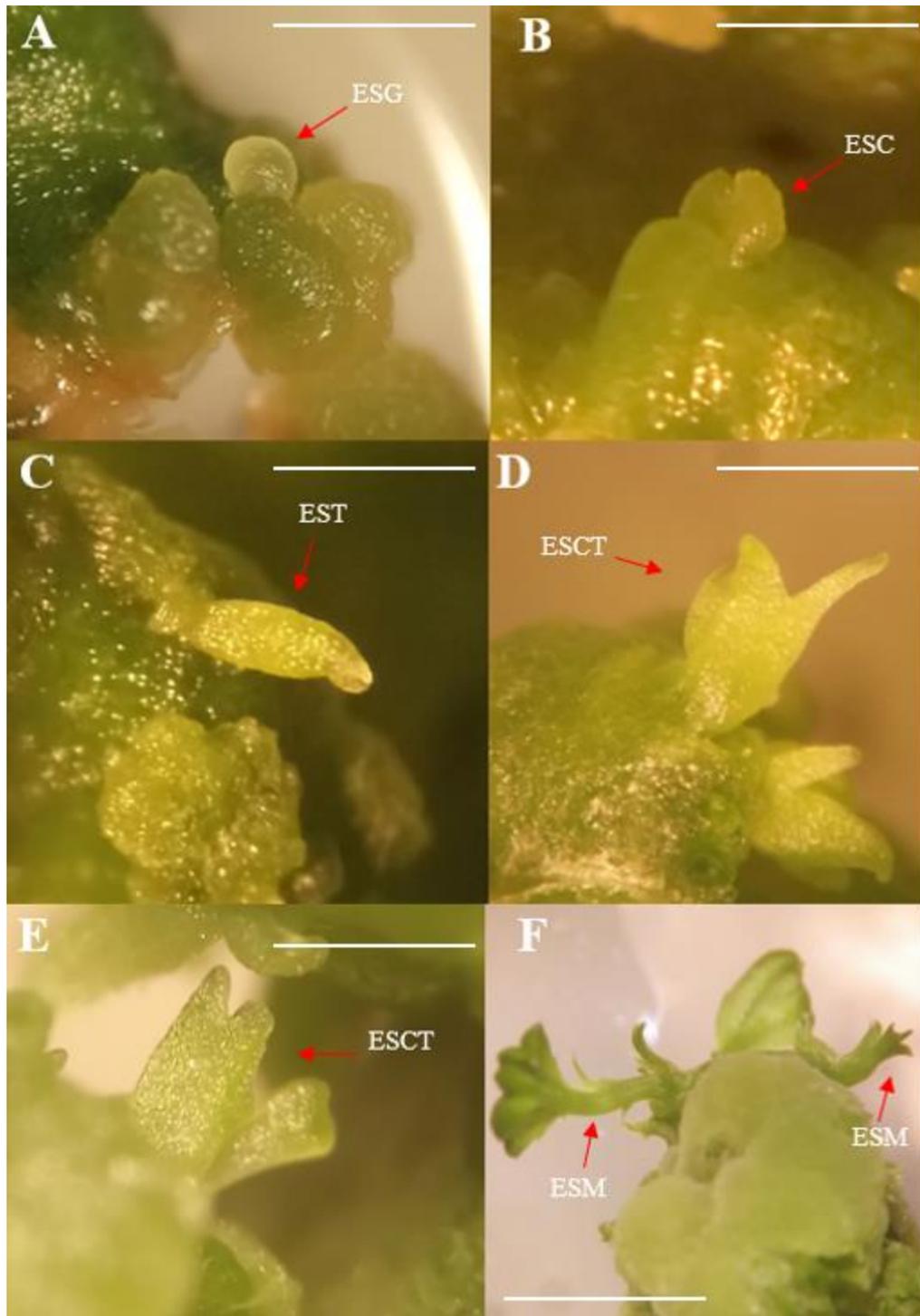
La prueba de análisis para muestras independientes “Kruskal-Wallis” arrojó un p valor de 0,00 y determinó que la dosificación hormonal, al igual que en la orientación de siembra anterior, correspondiente al nivel 1 (4,5  $\mu\text{M}$  BA+4,5  $\mu\text{M}$  2,4D) fue la que presentó el mayor valor de número de embriones y estadísticamente diferente a los otros niveles del tratamiento. Las

concentraciones usadas en los niveles 2 y 3 no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre ellas en cuanto al número de embriones producidos, mientras que el nivel 0 (Control) no presentó desarrollo embriogénico durante el experimento. Esto indica que dosificaciones altas de estas hormonas no favorecen la producción de embriones somáticos en estos explantes foliares.

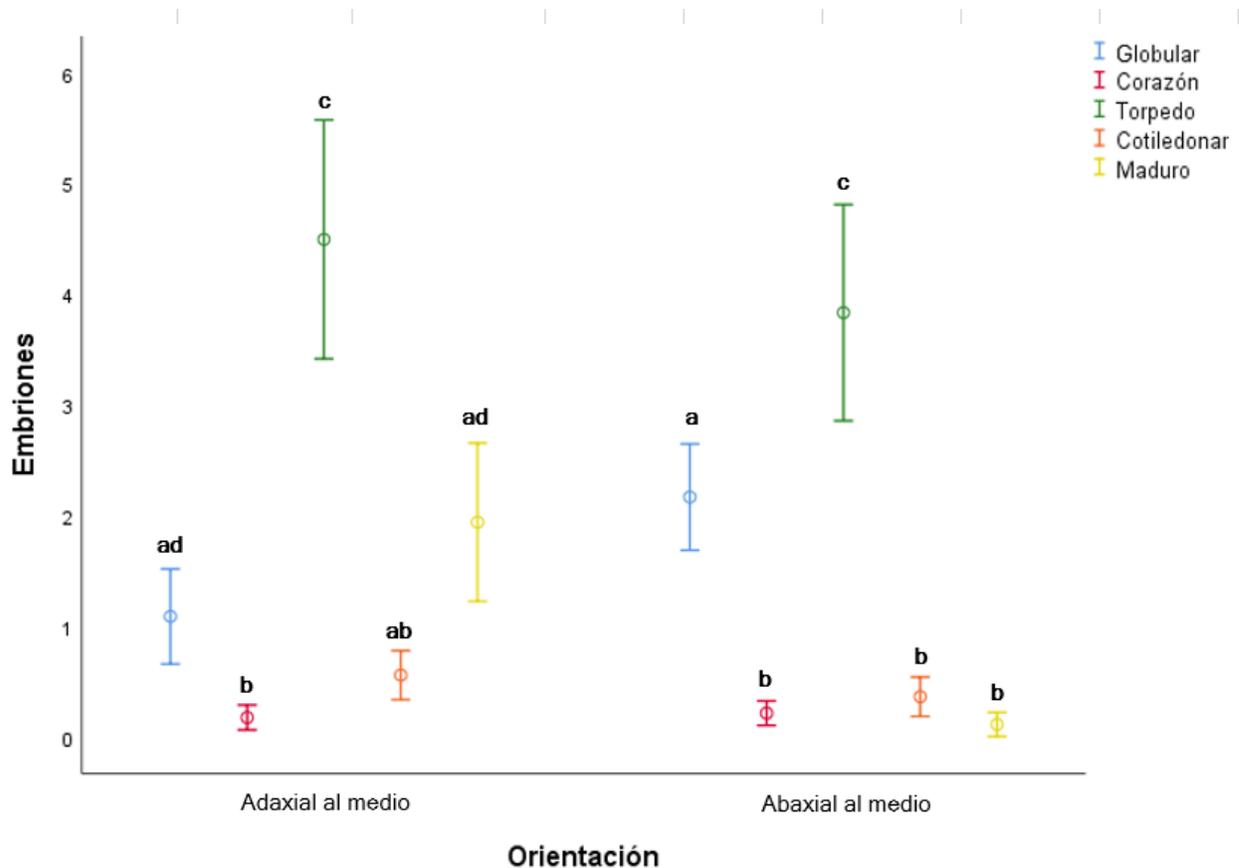
### **5.6 Determinación de estadios embrionarios**

Para esta fase final de la investigación se realizó un conteo de los embriones totales generados por cada unidad experimental y así mismo se realizó una clasificación de acuerdo al estado de desarrollo en el que se encontraban. Se lograron determinar embriones en estadios globular, corazón, torpedo, cotiledonar y maduro (Figura 11).

La prueba de análisis para muestras independientes “Kruskal-Wallis” determinó en la orientación de siembra adaxial al medio, que el estadio embrionario con mayor información corresponde al estadio de torpedo presentando diferencias estadísticamente significativas con el resto de los estadios embrionarios. Los estadios globular y maduro no presentaron diferencias significativas en sus valores, pero sí con los estadios corazón y cotiledonar. De igual forma en la orientación de siembra de los explantes con cara abaxial al medio se obtuvo que el estadio embrionario que presentó mayor información correspondió al estado de torpedo, presentando diferencias estadísticamente significativas con el resto de embriones. Los embriones en estado globular presentaron diferencias significativas con los demás estadios embrionarios, pero no fueron los que presentaron mayor información, mientras con los estadios corazón, cotiledonar y maduro no presentaron diferencias significativas entre ellos.



**Figura 11.** Determinación de estadios embrionarios en explantes foliares. **ESG.** Embrión somático globular. **ESC.** Embrión somático corazón. **EST.** Embrión somático torpedo. **ESCT.** Embrión somático cotiledonar. **ESM.** Embrión somático maduro. Barra= 0,3 cm (A-E); Barra=0,5 cm (F)



**Figura 12.** Estadios embrionarios hallados en cada orientación de siembra de los explantes (En cada orientación de siembra, barras con letras similares no presentaron diferencias estadísticamente significativas.  $\alpha=0,05$ ).

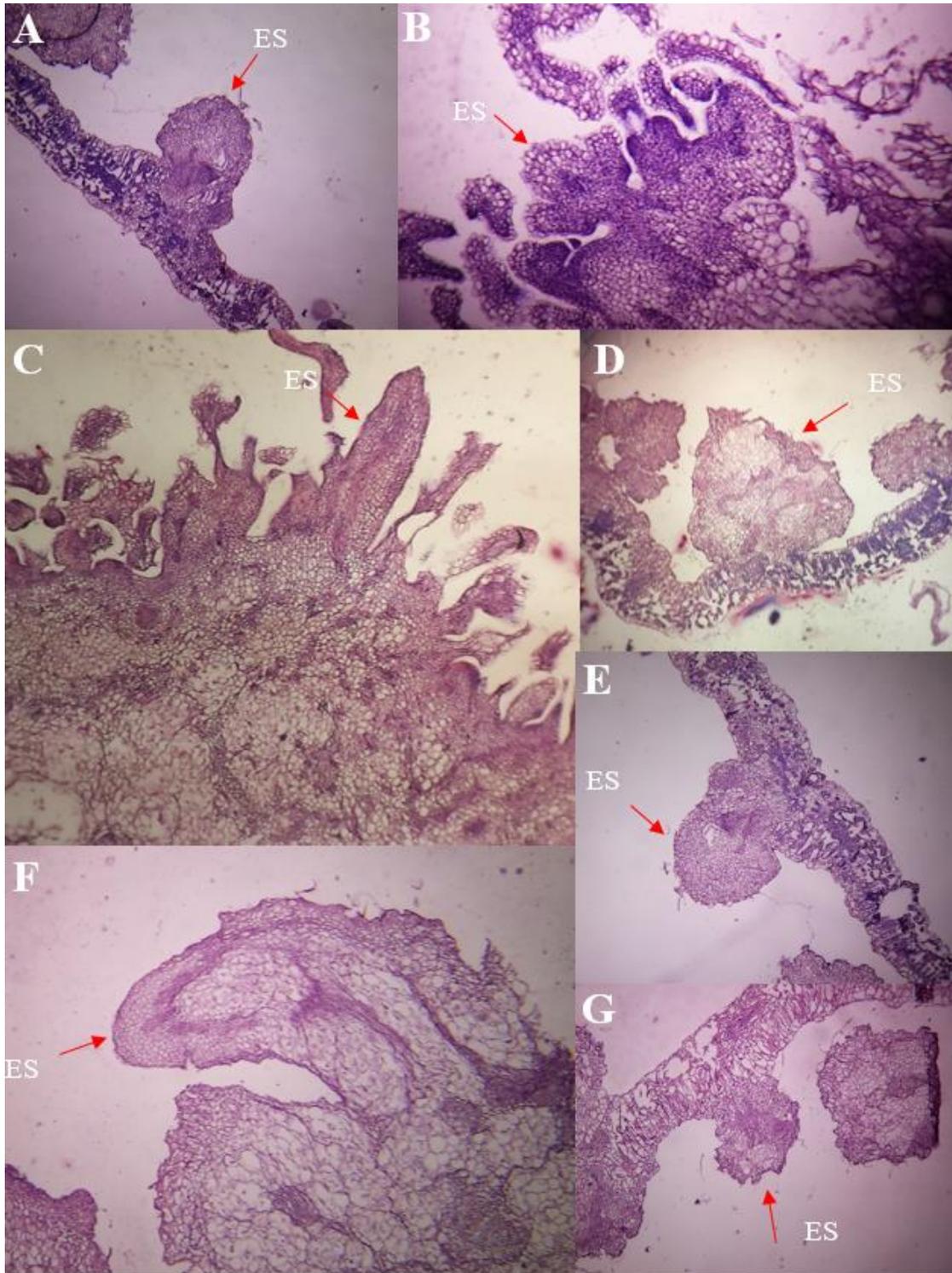
### 5.7 Verificación de embriones somáticos mediante análisis histológicos

En esta última fase de la investigación se buscaba verificar que el tejido formado por los explantes correspondiera a tejido embrionario y por ende afirmar la presencia de embriones somáticos.

Para esto se realizaron cortes histológicos de las unidades experimentales, seleccionando preferiblemente aquellas que presentaran una alta formación de callo y que en los recuentos finales tuviera el mayor número de embriones, además, se verificó la presencia de tejido

embrionario mediante la coloración del tejido, usando como tinte de verificación la orceína acetoláctica, la cual en presencia de tejido embrionario viraba a color rosado.

Los análisis histológicos mostraron la presencia de masas embriogénicas verificadas por la coloración tomadas por este tejido. Se hallaron y determinaron los estadios de los embriones somáticos (ES), observados en el análisis histológico, correspondiendo a estadios globulares (Figura 13a, 13d, 13e), así como al estadio torpedo (Figura 13c, 13f). De igual forma se encontraron masas proembriogénicas (Figura 13b) que aún no presentaban alguna diferenciación.



**Figura 13.** Análisis histológico de la inducción de embriogénesis somática en explantes foliares de *P. tripartita* var. *mollissima*. Embriones somáticos (ES). **A.** Embrión somático en estado globular (40x). **B.** Masa proembriogénica (40x). **C.** Embrión somático en estado torpedo (40x). **D.** Embrión somático en estado globular (40x). **E.** Embrión somático en estado globular tardío (40x). **F.** Embrión somático en estado torpedo (40x). **G.** Embrión somático en estado globular (40x).

## 6. Discusión

Esta investigación determinó el efecto de la orientación de siembra y de concentraciones hormonales sobre el desarrollo de tejido embrionario en explantes foliares de *Passiflora tripartita var. mollisima*.

### 6.1 Efecto de la orientación de siembra de los explantes

Para el primer tratamiento correspondiente a orientación de siembra del explante se determinó que no influye significativamente la orientación a la cual sean sembrados los explantes con relación a las variables medidas en esta investigación (Porcentaje de callo y embriones totales) (Figura 5 y 6). Esto se contrapone a lo expuesto por Colla, *et al.* 2011, quienes hallaron que la formación de embriones en cotiledones de semillas de *Phaseolus vulgaris*, se ve influenciada por la orientación de siembra de la muestra. Obtuvieron que cuando las muestras fueron sembradas con la cara adaxial al medio presentaron formación de embriones, mientras que cuando se realizó la siembra con cara abaxial al medio la formación de embriones fue nula (Collado et al., 2011). De igual forma lo concluyen Chen, Chang, 2012, quienes determinan que la orientación de siembra de los explantes influyen significativamente en la producción de embriones de *Oncidium*, en este caso determinaron que hubo una mayor respuesta de estos cuando los explantes eran sembrados en orientación abaxial al medio (Chen & Chang, 2002). Llegan a la misma conclusión Bermúdez *et al.*, 2010, quienes determinan que la orientación de siembra tiene un efecto significativo en la respuesta embriogénica en individuos de *Glycine max*, concluyendo que en la orientación de siembra abaxial al medio es donde mas numero de embriones se obtienen (Bermúdez et al., 2010). De igual forma concluyen Bathia *et*

al., 2005, quienes demuestran que la orientación de siembra abaxial al medio de los explantes de *Lycopersicon esculentum*, inducen una mejor regeneración tanto en número como forma de brotes (Bhatia, Ashwath, & Midmore, 2005). A la misma conclusión llegan, Asthana, Rai y Jaiswal en 2017, quienes mencionan que los explantes en contacto con la cara abaxial al medio se ven más favorecidos en cuanto a su respuesta de inducción y generación de callo, así como la formación de tejido embrionario y por ende un aumento en la frecuencia embriogénica (Asthana, Rai, & Jaiswal, 2017).

Como se observó, varios trabajos determinan que una orientación de siembra u otra favorecen la producción de callo o tejido embrionario dependiendo de la especie o genotipo con el cual se esté trabajando. En esta investigación a pesar de que los valores para el porcentaje de callo fueron mayores con la orientación de siembra adaxial al medio, y para el número de embriones, con orientación de siembra abaxial al medio, se determinó que no eran estadísticamente diferentes a los valores arrojados por las otras orientaciones de siembra de los explantes, razón por la cual se obtuvo que la orientación de siembra de los explantes de *Passiflora tripartita var. mollissima*, no influye significativamente sobre estas variables.

## **6.2 Efecto de las concentraciones hormonales**

Para el segundo tratamiento, correspondiente al efecto de varias concentraciones de los reguladores de crecimiento BA Y 2,4 D, se determinó que si hay un efecto de las concentraciones usadas sobre las variables medidas (Porcentaje de callo y embriones totales) (Figuras 7, 8, 9 y 10). Para la variable de porcentaje de callo se obtuvo que los niveles donde fueron agregados reguladores de crecimiento (1, 2 y 3), presentaron diferencias significativas en

comparación con la prueba control, mientras que entre ellos no hubo diferencias estadísticas (Figura 7 y 8). Para la variable de embriones totales se halló que la concentración que generó mayor número de estos y estadísticamente diferente a los otros niveles, corresponde a la usada en el nivel 1 (4,5  $\mu$ M BA+4,5  $\mu$ M 2,4D), mientras que las concentraciones usadas en los niveles 2 y 3 no presentaron diferencias estadísticas entre ellas. Al haber dos orientaciones de siembra de los explantes estos análisis fueron realizados por separado y expuestos de la misma forma, pero la respuesta de las concentraciones hormonales en relación a los embriones producidos por los explantes fue la misma tanto orientación de siembra adaxial como abaxial. En ambas orientaciones el nivel que presentó mayor número de embriones y con diferencias significativas al resto fue el nivel 1 (4,5  $\mu$ M BA+4,5  $\mu$ M 2,4D) (Figura 9 y 10). Resultados similares fueron obtenidos por Pinto *et al.*, quien determinó que las concentraciones más altas de reguladores de crecimiento no favorecían la producción de embriones somáticos en la mayoría de genotipos usados de *Passiflora edulis* (Pinto et al., 2011). Da Silva *et al.*, 2009 mencionan que la adición de reguladores de crecimiento (BA;2,4 D) al medio de cultivo tiene un efecto significativo sobre la formación de embriones de *Passiflora cincinnata*, para estos resultaron ser óptimas los rangos de concentraciones intermedias de 2,4 D en la formación de embriones y de callo (da Silva et al., 2009). De igual forma, los resultados expuestos por Bernal, *et al.*, 2018, mencionan que las concentraciones intermedias propuestas en su investigación son las que influyen significativamente en la formación de embriogénesis no cigótica en *Passiflora maliformis* (Bernal et al., 2018). Del mismo modo de Oliveira Prudente *et al.*, 2017, trabajando con embriones cigóticos de *Passiflora ligularis* demostraron que concentraciones bajas del regulador de crecimiento 2,4 D presentaron una mayor respuesta de porcentaje de embriones somáticos generados (de Oliveira Prudente et al., 2017).

Como se observó en esta investigación y trabajos similares, es esencial la combinación de estos reguladores de crecimiento (2,4 D + BA) para el proceso de inducción de embriogénesis somática, ya que estos presentan un rol principal en la regulación del ciclo, división y diferenciación celular (Pinto *et al.*, 2011), de igual forma es confirmado por Bernal *et al.*, 2018, quienes mencionan que la adición de estos reguladores de crecimiento por separado no influyen significativamente sobre la formación de embriones somáticos, mientras que si se combinan inducen a la formación de células embriogénicas, debido a la activación de genes específicos involucrados en la diferenciación celular, así como también pueden aumentar el número de poblaciones celulares mientras simultáneamente se suprime la diferenciación celular y se convierten en embriones.

Como se observó los rangos de concentraciones usadas del regulador 2,4 D son bastante variables en cada especie investigada, esto debido a factores específicos del organismo, como una mayor o menor sensibilidad a esta hormona, factores histológicos, genéticos, fisiológicos, entre otros (Pinto *et al.*, 2011).

### **6.3 Análisis histológicos**

Se verificó y determinó la presencia de tejido embrionario en los explantes foliares analizados. Esto se obtuvo mediante un procesamiento histológico de las muestras que comprendían por una parte la coloración de tejidos, que indicaban de acuerdo a la tonalidad que tomaran, si era o no tejido embrionario, y por otra, el análisis microscópico de las muestras obtenidas para la determinación de las placas obtenidas. Para la verificación de tejido embrionario se usó y modificó la metodología propuesta por da Silva *et al.*, 2009, allí se usaron

una gama de colorantes y modificando el tinte encargado de teñir el tejido embrionario, el cual fue la orceína acético-láctica, que indicaba la presencia de tejido embrionario cuando la muestra viraba a un color rosado, tal cual se obtuvo en los cortes realizados a las muestras seleccionadas. Allí gran parte de tejido fue teñido en este color (Figura 13), resultados similares fueron hallados por Gómez, Uribe, Ríos, & Manuel, 2006, quienes usaron este colorante para determinar y verificar la presencia de tejido embrionario en los callos analizados de *Eucalyptus globulus*. De igual forma se realizaron análisis histológicos por da Silva et al., 2009, para verificar la presencia de tejido embrionario inducido en embriones cigóticos de *Passiflora cincinnata*, estos determinaron la presencia de masas proembriónicas mediante el uso de carmín acético, el cual viró a color rojo intenso en presencia de tejido embrionario. Igualmente, Pinto *et al.*, 2011, hace uso de colorantes y específicamente del carmín acético para diferenciar las poblaciones celulares correspondientes a tejido embrionario. Del mismo modo de Oliveira Prudente *et al.*, 2017, hace uso de análisis histológicos para la verificación de tejido embrionario en la inducción de embriogénesis en *Passiflora ligularis* obteniendo proliferaciones celulares con estas características y precisamente obtiene estadios embrionarios, tales como el globular, correspondiente a una fase inicial en el proceso de formación de un embrión.

Estos trabajos apoyan los resultados obtenidos en la determinación de tejido embrionario en explantes foliares de *P. tripartita var. mollisima*, verificado por la coloración adquirida en las muestras, así como por las estructuras halladas tras el análisis histológico, recalando la presencia de embriones y su diferenciación en estadios globulares y torpedo (Figura 13A y 13C). No se conocen aun en la literatura trabajos direccionados a la inducción de embriogénesis somática en la especie analizada, siendo este uno de los primeros en abarcar en este proceso en *Passiflora tripartita var. mollisima*.

## 7. Conclusiones y recomendaciones

### 7.1 Conclusiones

La evaluación del protocolo de desinfección analizado resultó ser adecuado en la desinfección de explantes foliares de *Passiflora tripartita var. mollisima*, obteniendo valores inferiores al 10% de contaminación en esta investigación

La orientación de siembra de los explantes de *Passiflora tripartita var. mollisima* en el medio de cultivo MS no influyen significativamente tanto en la formación de callo de los explantes como en la formación de embriones.

Las concentraciones de los reguladores de crecimiento 2,4 D y BA, influyen significativamente sobre la formación de callo de los explantes y sobre todo en la formación de embriones somáticos, siendo la concentración de 4,5  $\mu$ M BA+4,5  $\mu$ M 2,4D la que mayor información presentó para estas variables.

La inducción de embriogénesis somática fue determinada mediante análisis histológicos, que constaban de la comprobación mediante coloración del tejido y mediante el análisis microscópico de las muestras.

## 7.2 Recomendaciones

Se hace necesario continuar con estudios orientados a optimizar el protocolo propuesto de inducción de embriogénesis somática en explantes foliares *Passiflora tripartita var. mollisima*, y específicamente a la fase de aclimatación de los embriones producidos.

Al ser uno de los primeros trabajos realizados en *Passiflora tripartita var. mollisima* se hace necesario evaluar el proceso de inducción en otro tipo de explantes y aplicar otro tipo de reguladores de crecimiento para verificar y comparar con los resultados obtenidos

Verificar la efectividad del Carbón activado agregándolo al medio de cultivo para disminuir la tasa de oxidación de las muestras.

## 8. Bibliografía

- Asthana, P., Rai, M. K., & Jaiswal, U. (2017). Somatic embryogenesis from sepal explants in *Sapindus trifoliatus*, a plant valuable in herbal soap industry. *Industrial Crops & Products*, *100*, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.02.034>
- Bahadur, B., Rajam, M. V., Sahijram, L., & Krishnamurthy, K. V. (2015). Plant biology and biotechnology: Volume II: Plant genomics and biotechnology. In *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology* (Vol. 4, pp. 1–768). <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5>
- Bermúdez, I., Blanco, T. D. S., Pérez, J., García, L., Veitía, N., & Collado. (2010). Efecto de la orientación y la longitud del cotiledón inmaduro sobre la formación de embriones somáticos en dos genotipos cubanos de soya, *10*(2), 121–128.
- Bernal, S., Duarte, L., Rodríguez, D., Bohórquez, M. D. L. A., Araque, E., & Pacheco, J. (2018). Embriogénesis no zigótica en *Passiflora maliformis* Nonzygotic Embryogenesis in *Passiflora maliformis*, *25*(August), 281–290.
- Bhatia, P., Ashwath, N., & Midmore, D. (2005). Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato., (August), 457–464. <https://doi.org/10.1079/IVP2005649>
- Carvajal, L., Turbay, S., Álvarez, L., Rodríguez, A., Álvarez, M., Bonilla, K., ... Parra, M. (2014). Propiedades funcionales y nutricionales de seis especies de pasifloras del departamento del Huila. *Caldasia*, *36*(1), 1–15.

- Carvajal, L., Turbay, S., Rojano, B., Álvarez, L., Restrepo, S., Álvarez, J., ... Sánchez, N. (2011). Algunas especies de Passiflora y su capacidad antioxidante. Some Passiflora species and their antioxidant capacity. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *16*(4), 354–363.
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D., & Toribio, M. (2005). La Embriogenesis Somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Invest Agrar: Sist Recur For*, *14*(November), 345–357. Retrieved from [http://www.inia.es/gcontrec/pub/CELESTINO-HERNANDEZ-CARNEROS\\_\(y\\_otros\)\\_\(SRF14-3\)\\_1162282779875.pdf](http://www.inia.es/gcontrec/pub/CELESTINO-HERNANDEZ-CARNEROS_(y_otros)_(SRF14-3)_1162282779875.pdf)
- Chaparro R., D. C., Maldonado C., M. E., Franco L., M. C., & Urango M, L. A. (2015). Características nutricionales y antioxidantes de la fruta curuba larga (*Passiflora mollissima* Bailey). Nutritional and antioxidant characteristics of banana passion fruit (*Passiflora mollissima* Bailey). Características nutricionais e antioxidantes da fruta , *13*(1), 120–128.
- Chen, J., & Chang, W. (2002). Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* “Gower Ramsey.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *69*, 41–44.
- Collado, R., García, L. R., Angenon, G., Torres, D., Romero, C., Bermúdez, I., & Autor, N. V. (2011). Formación de embriones somáticos a partir de cotiledones inmaduros en *Phaseolus vulgaris* cv . CIAP 7247, *11*(4), 235–240.
- Corrêa, R. C. G., Peralta, R. M., Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Bracht, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (passion fruit). *Trends in*

*Food Science and Technology*, 58, 79–95. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.006>

Criollo Escobar, H. A. (2013). Estudios orientados a la regeneración de plantas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) a través de la embriogénesis somática. *Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia*, 147. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/11375/>

da Silva, M. L., Pinto, D. L. P., Guerra, M. P., Floh, E. I. S., Bruckner, C. H., & Otoni, W. C. (2009a). A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99(1), 47–54. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9574-2>

da Silva, M. L., Pinto, D. L. P., Guerra, M. P., Floh, E. I. S., Bruckner, C. H., & Otoni, W. C. (2009b). A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99(1), 47–54. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9574-2>

Dantu, P. K., & Tomar, U. K. (2010). Somatic Embryogenesis. *Methods*, 2(6), 511–517. <https://doi.org/10.1007/b136454>

de Figueiredo, M., Paiva, R., Alves, E., Nogueira, R., Stein, V., de Castro, E., ... Vargas, D. (2013). Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown). *Brazilian Journal of Botany*, (36(2)), 141–151. <https://doi.org/10.1007/s40415-013-0015-4>

de Oliveira Prudente, D., Paiva, R., Carpentier, S., Swennen, R., Fernanda, N., Luciano, S., & Bart, P. (2017). Characterization of the formation of somatic embryos from mature zygotic embryos of *Passiflora ligularis* Juss. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 131(1), 97–105.

<https://doi.org/10.1007/s11240-017-1266-8>

- Delanoy, M., Van Damme, P., Scheldeman, X., & Beltran, J. (2006). Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey, *Passiflora tricuspidata* Mast. and *Passiflora nov sp.* seeds. *Scientia Horticulturae*, *110*(2), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.007>
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). *Passiflora*: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, *94*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción , conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, *31*(1), 74–85. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(98\)00035-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00035-X)
- Gómez, C., Uribe, M., Ríos, D., & Manuel, S. (2006). Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill. *Interciencia*, *31*(10), 734–738.
- 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 .) Effect of pre-germination treatments on the germination of seed. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, *5*(2), 209–219.
- Hernandez, A., & Bernal, R. (2000). Lista de Especies de Passifloraceae de Colombia. *Biota Colombiana*, *1*(3), 320–335. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21068/bc.v1i3.81>
- Horstman, A., Bemer, M., & Boutilier, K. (2017). A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*, (October), 201–216. <https://doi.org/10.1002/reg2.91>

- Integrated taxonomic information system. ITIS. (2011). Retrieved from [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=896794#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=896794#null)
- Irigoyen, J. N., & Cruz, M. A. (2005). Guía técnica de semilleros y viveros frutales. *Ministerio de agricultura y ganaderia. Programa nacional de frutas de El Salvador. COMUNIICA*. Retrieved from <http://repiica.iica.int/docs/B0507e/B0507e.pdf>
- Khadke, S., & Kuvalekar, A. (2013). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and stem explants of *Nothapodytes foetida*: a critically endangered plant species. *International Journal of Plant, Animal and Enviromental Sciences*, 3(1), 257–264.
- Lelu-Walter, M.-A., Teyssier, C., Guérin, V., & Pagues, L. E. (2016). Vegetative propagation of larch species : somatic embryogenesis improvement towards its integration in breeding programs. *Vegetative Propagation of Forest Trees*, (2016), 551–571. Retrieved from <http://www.iufro20902.org/Publications/index.html>
- Lizarazo, M. Á., Hernández, C. A., Fischer, G., & Gómez, M. I. (2013). Biomasa , parámetros foliares y sintomatología en respuesta a diferentes niveles de manganeso , zinc y boro en curuba ( *Passiflora tripartita* var . *mollissima* ) Biomass , foliar parameters and symptomatology in response to different levels of manganese ., *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(1), 31–45.
- Marin Tangarife, M. M., Caetano, C. M., & Posada Tique, C. A. (2009). Caracterización morfológica de especies del género *Passiflora* de Colombia. *Acta Agronómica, Universidad Nacional de Colombia*, 58(3), 117–125.

- Mayorga Cobos, M. J. (2016). *Caracterización ecofisiológica de curuba (Passiflora tripartita var. mollissima) en dos condiciones ambientales. Facultad de Ciencias agrarias, Universidad Nacional de Colombia*. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/56876/>
- Minagricultura. (2018). Pasifloras son buen ejemplo de aumento de exportaciones y sustitución de importaciones. Retrieved from <https://bit.ly/2mQDycW>
- Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Magnitskiy, S., Casierra, F., Piedrahita, W., & Florez, L. (2015). *Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: Maracuyá, Granadilla, Gulupa y Curuba. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas (Vol. 1)*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Miranda Lasprilla, D. (2011). Estado actual de fruticultura colombiana y perspectivas para su desarrollo. *Revista Brasileira de Fruticultura, E*, 199–205.
- Moreno, N. H., Álvarez-Herrera, J. G., Balaguera-López, H. E., & Gerhard, F. (2009). Propagación asexual de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en diferentes sustratos ya distintos niveles de auxina. *Agronomía Colombiana*, 27(3), 341–348.
- Muschner, V. C., Zamberlan, P. M., Bonatto, S. L., & Freitas, L. B. (2012). Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 SUPPL.), 1036–1043. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600019>
- Nardin, C. F., Bernacci, L. C., Shepherd, G. J., Bruno, O. M., & Plotze, R. O. (2015). Recognition and differentiation of species in the *Passiflora sidifolia* complex. *Botany*, 93(12), 809–824.

- Nic Can, G. I., Galaz Ávalos, R. M., De la Peña, C., Magaña, A. M., Wrobel, K., & Loyola, V. (2015). Somatic Embryogenesis : Identified Factors that Lead to Embryogenic Repression . A Case of Species of the Same Genus. *PLoS ONE*, 1–21.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126414>
- Ocampo, J. (2013). Diversity and Distribution of Passifloraceae in the Department of Huila in Colombia / Diversidad y distribución de las passifloraceae en el departamento del huila en colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(3), 511–516. Retrieved from  
<http://www.revista.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/download/38500/42437>
- Ocampo Gálvez, O. A., & Hernández Fernández, D. M. (2014). El cultivo de *Curuba larga* (*Passiflora mollissima*) en el departamento de Antioquia, y su manejo agronómico en la vereda Yarumal del municipio de Sonsón. *Universidad Nacional de Colombia*, 101.
- Ocampo Pérez, J., & Merlín Uribe, Y. (2014). *Passiflora* de Colombia. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 1(March), 7. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ozarowski, M., & Thiem, B. (2013). Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: A mini-review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*.  
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000600011>
- Paim, D., Barros, B., Viccini, L., Salabert, J., da Silva, M., & Otoni, W. (2010). Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast . plants as assessed by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, (103), 71–79.  
<https://doi.org/10.1007/s11240-010-9756-y>
- Paim, D., Rocha, A. maria, Monteiro, M., da Silva, M., de Oliveira, E., & Otoni, W. (2011).

- Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit ( *Passiflora edulis* Sims ) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, (107), 521–530. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0003-y>
- Park, Y. S. (2002). Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Annals of Forest Science, Springer Verlag/EDP Sciences*, 59, 651–656. <https://doi.org/10.1051/forest>
- Pinto, D. L. P., de Almeida, A. M. R., Rêgo, M. M., da Silva, M. L., de Oliveira, E. J., & Otoni, W. C. (2011). Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107(3), 521–530. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0003-y>
- Rademacher, W. (2015). Plant Growth Regulators : Backgrounds and Uses in Plant Production. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9541-6>
- Ramírez, L., & Salazar, F. (2012). Estado Actual de la Configuración de la Cadena productiva de Pasifloras en Colombia. *Ingenieria Industrial. Actualidad Y Nuevas Tendencias*, 3(9), 75–82. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4153.7764>
- Rocha, D. I., Vieira, L. M., Tanaka, F. A. O., da Silva, L. C., & Otoni, W. C. (2012). Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: Histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma*, 249(3), 747–758. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0318-x>
- Santos, E. A., Souza, M. M., Abreu, P. P., da Conceição, L. D. H. C. S., Araújo, I. S., Viana, A. P., ... de Freitas, J. C. O. (2012). Confirmation and characterization of interspecific hybrids

of *Passiflora L.* (Passifloraceae) for ornamental use. *Euphytica*, 184(3), 389–399.

<https://doi.org/10.1007/s10681-011-0607-7>

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671. JOUR. Retrieved from

<https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

Seijo, M. F. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4), 195–209.

Silva, G. M., Cruz, A., Otoni, W., Pereira, T., Rocha, D., & Da silva, M. (2015). Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims ( Passifloraceae

). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9699-4>

Uribe, M. E., Durán, R., Bravo, G., Mora, F., Cartes, P., & Delaveau, C. (2011). Propagación vegetativa de *Berberidopsis corallina* Hook.f., una especie en peligro de extinción,

endémica de Chile. *Gayana. Botánica*, 68(2), 135–140. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432011000200003>

Viuche Ducuara, A. (2017). Propuesta De Formulación De Estrategias Para La Exportación De Frutas De La Familia *Passiflora* En Colombia Con Base a Un Modelo Prospectivo.

*Universidad Militar Nueva Granada*. Retrieved from

<https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/10654/16271/1/ViucheDucuaraAngela2017.pdf>

Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental

pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233–249.

<https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>