

REGENERACIÓN DE PLANTAS DE PARCHITA (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) A PARTIR DEL CULTIVO *IN VITRO* DE DISCOS DE HOJAS

Victor Otahola¹

RESUMEN

La parchita amarilla, *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*, es una de las especies frutales de mayor importancia económica en América, Australia y África. Sus frutas son consumidas frescas o procesadas industrialmente como jugos. En Venezuela y especialmente en la zona oriental del país, constituye uno de los rubros frutales de mejores perspectivas de desarrollo agroindustrial; sin embargo, existen problemas tales como la presencia de plagas y enfermedades, entre otras, que limitan su productividad. Con el objetivo de determinar el mejor protocolo para la regeneración de plantas a partir de explantes foliares, de tal manera que favorezcan su utilización en programas de mejoramiento para resistencia a enfermedades se realizó este ensayo, donde se probaron diferentes concentraciones de BA (0; 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2 mg/L) en un medio MS con 30 g/L de sacarosa. Se utilizaron explantes foliares circulares de 1 cm de diámetro, provenientes de hojas de plantas de 4 meses de edad, colocando 10 explantes por cápsula. Se utilizó un diseño estadístico de bloques al azar con cinco repeticiones. Los explantes fueron colocados en completa oscuridad los primeros 15 días y luego colocados bajo 15 horas de luz diarias a una temperatura de 27 °C. Se encontraron diferencias estadísticas para los parámetros formación de callos a los 15, 25 y 35 días, así como la formación de yemas a los 25 y 35 días después de la inoculación. La mayor formación de yemas se presentó con la dosis de 0,6 mg/L de BA. Los brotes obtenidos fueron colocadas en medio MS sin hormonas en donde se obtuvo un enraizamiento promedio de cinco raicillas por brotes.

Palabras clave adicionales: Cultivo de tejido, biotecnología, frutales

ABSTRACT

Plant regeneration of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) through leaf disc *in vitro* culture

The yellow passion fruit, *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*, is one of the most economically important fruit species in America, Australia and Africa. Its fruits are eaten fresh or industrially as processed juice. In Venezuela, and especially in the east part of the country, it has become one of the fruits with the best agro-industrial projection; however, there are problems such as pests and diseases, among others that limit its productivity. This trial was performed with the objective of determining the best protocol to follow in the plant regeneration from leaf culture to be used in plant breeding programs for disease resistance. Different concentrations of BA were used (0, 0.3, 0.6, 0.9 and 1.2 mg/L) with a MS media + 30 g/L sucrose. Circular leaf explants of 1 cm diameter from 4 months plants were used, placing 10 explants per plate. A statistical design of random blocks was used with 5 repetitions. The explants were placed in the dark the first 15 days and then placed under 15 hours of light at 27 °C. Statistical differences were found for the characters: callus formation at 15, 25 and 35 days after inoculation; also for the bud formations at 25 and 35 days after inoculation. The greatest bud formation was found with 0.6 mg/L of BA. The shoots were placed in MS media without hormones for rooting, obtaining an average of five roots per shoot.

Additional key words: Tissue culture, biotechnology, fruit trees

INTRODUCCIÓN

La parchita pertenece a la familia Passifloraceae, la cual contiene 12 géneros. El género *Passiflora* es el de mayor importancia económica e incluye 400 especies de las cuales más de 350 se distribuyen en las regiones tropicales de Sur América. Algunas de ellas

presentan frutos comestibles y otras son de uso medicinal u ornamental (Martin y Nakasone, 1970).

En la actualidad el estado Monagas y otras regiones del país ofrecen ventajas comparativas para la producción y procesamiento de frutales, que al igual que la parchita tienen gran demanda como producto fresco o procesado. Sin embargo,

Recibido: Febrero 18, 1999

Aceptado: Mayo 16, 2000

¹ Laboratorio de Biotecnología. Escuela de Ingeniería Agronómica, Universidad de Oriente (UDO), Núcleo Monagas. Maturín. Venezuela. e-mail: votahola@etheron.net

existen problemas tales como la presencia de plagas y enfermedades, entre otros, que limitan considerablemente la producción y productividad de las plantaciones.

Algunas de las enfermedades que atacan el cultivo de parchita en Venezuela y otros países no presentan variabilidad genética dentro de esta especie, por lo cual la combinación de las técnicas de cultivo de tejido y la inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma pudiera ser una alternativa en el mejoramiento genético de la resistencia a dichas enfermedades. Por esta razón se puede considerar importante la propagación de la parchita a través de explantes foliares, ya que al irradiar los mismos se aumentaría la probabilidad de obtener mutantes netos debido a que es mayor la probabilidad de que los brotes desarrollados a partir de este tipo de explantes provengan de células únicas.

La regeneración de la parchita y de otras Pasifloras mediante el cultivo de tejidos ha sido realizado con éxito por diferentes investigadores, entre los que se pueden mencionar Bhojwani y Razdan (1983), Kantharajah y Dodd (1990), Drew (1991), Dornelas y Carneiro (1994), Desai y Mehta (1995) y Kawata (1995). Sin embargo, los resultados de estos estudios no han sido muy consistentes.

Este ensayo se realizó con el objeto de obtener una metodología sencilla para producir plantas de parchita a partir de la organogénesis directa de explantes foliares, de tal manera que favorezcan su utilización en programas de mejoramiento genético para resistencia a enfermedades mediante mutaciones inducidas y que aquellos mutantes con probadas características agronómicas y de buena adaptación a las condiciones agroecológicas del estado Monagas puedan utilizarse para aumentar la productividad de las siembras comerciales de la zona.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Núcleo de Monagas de la Universidad de Oriente, ubicado en la ciudad de Maturín, estado Monagas, durante los meses de enero a junio del año 1997.

Se utilizaron diferentes concentraciones de Benzil-amino-purina (BA) (0; 0,3; 0,6; 0,9 y

1,2 mg/L) en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 30 g/L de sacarosa y solidificado con 7 g/L de agar. Se utilizaron cápsulas de Petri de 12,5 cm de diámetro con 50 ml de medio de cultivo.

Los explantes utilizados fueron discos foliares de 1 cm de diámetro aproximadamente, provenientes de las hojas más jóvenes de plantas de parchita de la variedad Golden Star, originaria de Brasil y que ha sido cultivada con buenos resultados en el estado Monagas. Las plantas, de 4 meses de edad, se encontraban en umbráculo desde la germinación de las semillas.

Las hojas se desinfectaron colocándolas en solución acuosa de hipoclorito de sodio (4 % v/v) durante 20 minutos y enjuagadas tres veces en la cámara de flujo laminar con agua destilada estéril.

Los discos foliares fueron extraídos de la sección media de la hoja, siempre tomando parte de la nervadura central. Se colocaron 10 discos en cada cápsula de Petri con los diferentes tratamientos, teniendo cuidado de colocar la cara adaxial hacia el medio. Se utilizaron tres cápsulas por tratamiento para un total de 30 explantes por unidad experimental. El diseño estadístico fue de bloques al azar con cinco tratamientos y cinco repeticiones. Aunque se trató de utilizar hojas de igual tamaño y de igual procedencia filotáctica se decidió bloquear el ensayo para evitar el posible sesgo de los resultados al utilizar hojas de diferentes tamaños y características.

Una vez inoculados los explantes, las cápsulas se colocaron en oscuridad durante 15 días y luego colocados bajo un régimen de 15 horas de luz, con una intensidad de $32 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 9 horas de oscuridad por día a una temperatura de 27 °C.

Los parámetros evaluados fueron:

- Porcentaje de explantes con formación de callos, evaluados a los 15, 25 y 35 días después de la inoculación. Los mismos fueron observados a simple vista en cada una de las evaluaciones
- Porcentaje de explantes con formación de yemas a los 25 y 35 días después de la inoculación.

Los brotes presentes 45 días después de la inoculación fueron separados y colocados en tubos de ensayos de 2,5 cm de diámetro, con 10 mL de medio MS sin reguladores de crecimiento; los mismos fueron subcultivados cada 30 días hasta lograr el enraizamiento. Algunos problemas de amarillamiento y caída de las hojas se presentó en la fase de enraizamiento, siendo necesario el

cambio más frecuente de medio con una concentración incrementada a 1 ½ MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de callos

Los callos formados en todos los tratamientos y en las diferentes épocas de evaluación presentaron un color verde claro y una consistencia compacta, aparentemente desarrollados a partir del mesófilo del tejido foliar. Se formaron mayormente en el borde del explante, aunque también se encontraron en la superficie del mismo, sobre las nervaduras.

El análisis de los datos respectivos mostró diferencias estadísticamente significativas al 5 % de probabilidad para el porcentaje de explantes con formación de callos al ser evaluados a los 15, 25 y 35 días después de la inoculación. La prueba de medias (Cuadro 1) indica que para la primera y segunda fecha de evaluación el mayor porcentaje de explantes con formación de callos se presentó en los tratamientos donde se utilizó a 0,6 mg/L de BA, aunque en la primera fecha fue estadísticamente similar a la dosis de 0,3 mg/L.

Para la evaluación realizada 35 días después de la inoculación los mayores porcentajes de explantes con callos se presentaron en los tratamientos donde se utilizó 0,9 y 1,2 mg/L de BA.

Cuadro 1. Porcentaje de explantes foliares de parchita con formación de callos bajo diferentes concentraciones de BA, evaluados 15, 25 y 35 días después de la inoculación (DDI).

Dosis de BA (mg/L)	Porcentaje de explantes con callos		
	15 DDI	25 DDI	35 DDI
0,0	0,00 c	0,00 d	0,00 c
0,3	54,00 a	46,00 b	56,00 b
0,6	60,00 a	58,00 a	56,00 b
0,9	20,00 b	48,00 b	62,00 a
1,2	30,00 b	40,00 c	66,00 a

Prueba de ámbitos múltiples de Duncan al 5 % de probabilidad
Letras iguales indican similitud estadística dentro de cada columna

Al comparar las diferentes dosis de BA utilizadas contra el tratamiento testigo, se observó que el regulador de crecimiento estimuló la

formación de callos en los explantes, ya que sin la adición de BA no se produjeron callos en los explantes.

En los explantes colocados en los tratamientos donde se utilizaron las dosis de 0,3 y 0,6 mg/L de BA se detectó una rápida formación de callos, pero en algunos casos éstos se necrosaron, por esta razón se observan valores inferiores para el porcentaje de explantes con callos en la segunda y tercera evaluación. Al contrario, en los tratamientos donde se utilizaron las dosis de 0,9 y 1,2 mg/L de BA la formación de callos fue más lenta al inicio, pero se incrementaron en la segunda y tercera evaluación.

Formación de brotes

Se observó la formación de numerosos brotes en cada explante, los cuales se originaron principalmente en el borde de los explantes. En algunos tratamientos fue tan alto el número de brotes formados que se presentaron efectos de competencia entre los mismos, siendo necesario separarlos y subcultivarlos para favorecer su desarrollo posterior.

El análisis de los datos obtenidos para esta variable mostró diferencias estadísticamente significativas al 5 % de probabilidad para las dos fechas de evaluación. Las pruebas de medias para ambas fechas muestran que el mayor porcentaje de explantes con brotes se presentó en los tratamientos donde se utilizó la dosis de 0,6 mg/L de BA. Por otro lado, en la primera evaluación no se presentaron diferencias entre las dosis de 0,9 y 0,3 mg/L de BA y entre esta última y la dosis de 1,2 mg/L de BA. Para la segunda evaluación, los tratamientos donde se utilizaron las dosis de 0,3; 0,9 y 1,2 mg/L de BA no presentaron diferencias entre sí (Cuadro 2).

Se observó en muchos casos organogénesis directa en los explantes, fenómeno que fue común cuando se utilizó la mayor dosis de BA (1,2 mg/L). Esto es importante por el hecho de que al no desarrollarse los brotes a partir de los callos, se disminuye la posibilidad de variación somaclonal. Similarmente, Dornelas y Carneiro (1994), trabajando con diferentes tipos de explantes en varias especies de *Passiflora*, encontraron que el mayor porcentaje de regeneración en los explantes foliares se obtuvo con la dosis de 1,0 mg/L de BA.

Cuadro 2. Porcentaje de explantes foliares de parchita con formación de brotes bajo diferentes concentraciones de BA, evaluados 25 y 35 días después de la inoculación (DDI).

Dosis de BA (mg/L)	Porcentaje de explantes con brotes	
	25 DDI	35 DDI
0,0	0,00 d	0,00 c
0,3	28,00 bc	34,00 b
0,6	38,00 a	44,00 a
0,9	18,00 b	32,00 b
1,2	20,00 c	34,00 b

Prueba de ámbitos múltiples de Duncan al 5 % de probabilidad
Letras iguales indican similitud estadística dentro de cada columna.

Se observó que, en general, los brotes comenzaron a enraizar cuando alcanzaron una altura aproximada de 4 cm, emitiendo en promedio cinco raíces por brote. Seis semanas después estuvieron listos para iniciar la fase de aclimatación.

Resultados similares a los obtenidos en este ensayo obtuvo Kawata (1995), quien indica alta regeneración de plantas de parchita al utilizar explantes foliares en medio MS suplementado con 3% de sucrosa y 1 mg/L de BA, entre otros, indicando así mismo que al transferir los explantes a un medio sin hormonas se produjo un rápido enraizamiento.

Desai y Mehta (1995), por su parte, indican la posibilidad de obtener organogénesis directa utilizando explantes foliares en medio MS suplementado con BA y cinetina para la formación de brotes y de ácido naftalenacético con cinetina para la formación de raíces. Sin embargo, en el presente ensayo la regeneración se logró con una metodología más sencilla y económica.

CONCLUSIONES

La hormona BA, en todas las dosis utilizadas, indujo la formación de callos y brotes en los explantes foliares de parchita, sobresaliendo la dosis de 0,6 mg/L, la cual produjo mayor

formación de brotes en los explantes y se comportó estadísticamente superior a las demás dosis en todas las fechas de evaluación.

La dosis de 1,2 mg/L de BA favoreció la organogénesis directa en los explantes de parchita.

LITERATURA CITADA

1. Bhojwani, S. S. y M. K. Razdan. 1983. *Plant Tissue Culture, Theory and Practice*, Elsevier, New York.
2. Desai, H. V. y A. R. Mehta. 1995. Changes in polyamine levels during shoot formation, root formation and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs. *Journal of Plant Physiol.* 119: 45-54.
3. Dornelas, M. C. y M. L. Carneiro. 1994. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 211-217
4. Drew, R. A. 1991. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26: 23-27.
5. Kantharajah, A. S. y W. A. Dodd. 1990. *In vitro* micropopagation of *Passiflora edulis* (Purple passion fruit). *Ann. Bot.* 65: 337-339.
6. Kawata K. 1995. Micropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. *Journal of Plant Physiology* 147 (2): 281-284
7. Martin, W. M. y H. Y. Nakasone. 1970. The edible species of *Passiflora*. *Economic Botany* 24: 333-343.
8. Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497.