

**EVALUACION *in vitro* DEL POTENCIAL MORFOGENICO EN TEJIDO
FOLIAR DE *Passiflora incarnata* L.**

ANDREA JIMENA PULIDO RENDÓN

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2010**

**EVALUACION *in vitro* DEL POTENCIAL MORFOGENICO EN TEJIDO
FOLIAR DE *Passiflora incarnata L.***

ANDREA JIMENA PULIDO RENDÓN

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Bióloga

Director:

OSCAR DARÍO BERMÚDEZ ZAMBARANO M.Sc.

Asesor:

ANDRÉS JULIÁN MENESES, Biólogo

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2010**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Oscar Darío Bermúdez M.Sc
DIRECTOR.

Gisela Mabel Paz M.Sc
JURADO.

Giovanni Varona M.Sc
JURADO.

Fecha de sustentación, Popayán 18 de Agosto del 2010.

Infinitas gracias te doy mi señor por permitirme formar y crecer como persona, al lado de gente tan maravillosa como son mis familiares y amigos.

Dedico este trabajo a todas las personas que me brindaron su apoyo y colaboración, especialmente a mi madre, por ser mi guía y mi amiga incondicional. A mi padre y mi hermano por su comprensión durante este arduo proceso. A mi sobrina, quien con su sonrisa alegra cada momento de mi vida. A mi abuelita que desde el cielo me da animo para seguir adelante. A mis tías por sus oraciones. A Julián por su paciencia y demostrarme que solo quien persevera logra grandes triunfos, finalmente a mis amigos y a todas las personas que contribuyeron para que este trabajo se llevara a cabo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios quien me dio sabiduría e inteligencia para llevar a cabo este trabajo. Quiero agradecer al M.Sc. Oscar Darío Bermúdez, por su colaboración y respaldo en la realización del proyecto, al M.Sc Jose Luis Hoyos, quien facilito el espacio en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, al Biólogo Andrés Julián Meneses por su ayuda incondicional y orientación en el área del cultivo *in vitro*.

A los jurados Gisela Mabel paz y Giovanni Varona por su colaboración en la revisión final del documento y por sus sugerencias.

A mi familia, que estuvo presente en los momentos más difíciles.

Finalmente a todas las personas que me brindaron su amistad y contribuyeron para que se realizara este trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	14
2. JUSTIFICACION	17
3. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS	19
3.1.OBJETIVO GENERAL	19
3.2.OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
4. ANTECEDENTES	20
5. MARCO TEORICO	23
5.1. Familia Passifloraceae	23
5.1.1. Género <i>Passiflora</i>	24

5.2. Especie <i>Passiflora incarnata</i> L	24
5.2.1. Origen y distribución	24
5.2.2. Descripción	25
5.2.3 Identificación de la especie	26
5.2.4 Fenología	26
5.2.5 Multiplicación	26
5.2.5.1 Sexual	26
5.2.5.2 Asexual	27
5.3 Plagas y enfermedades	27
5.3.1 Plagas	27
5.3.2 Enfermedades	27
5.4 Constituyentes responsables de la actividad biológica	28
5.5 Acciones farmacológicas	29
6. METODOLOGIA	31
6.1. Área de estudio y selección del material vegetal	31
6.2. Condiciones ambientales del cultivo <i>in vitro</i>	31
6.3. Preparación y desinfección del material vegetal	31

6.4. Establecimiento in vitro del material vegetal, inducción de brotes desarrollo de vástagos.	32
6.5. Enraizamiento de vástagos.	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1. Métodos de desinfección de explantes	37
7.2. Inoculación de explantes.	38
7.3. Establecimiento in vitro del material vegetal, inducción de brotes y desarrollo de vástagos.	38
7.3.1. Primer experimento	40
7.3.2. Segundo experimento	40
7.3.2.1. Análisis estadístico.	45
7.3.2.1.1. Promedio de brotes	45
7.3.2.1.2. Número de Vástagos Obtenidos.	47
7.4. Enraizamiento de vástagos.	48
7.4.1. Análisis Estadístico.	49
8. CONCLUSIONES	51
9. RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFIA.	

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Métodos evaluados para la desinfección en el cultivo <i>in vitro</i> de secciones foliares de <i>Passiflora incarnata</i> L.....	32
Tabla 2. Tratamientos correspondientes al primer experimento para inducir la formación de brotes y desarrollo de vástagos <i>in vitro</i> a partir de secciones de tejido foliar de <i>Passiflora incarnata</i> L.....	33
Tabla 3. Tratamientos correspondientes al segundo experimento para inducir la formación de brotes y desarrollo de vástagos <i>in vitro</i> a partir de secciones de tejido foliar de <i>Passiflora incarnata</i> L.....	33
Tabla 4. Tratamientos empleados para promover el desarrollo <i>in vitro</i> de raíces en vástagos de <i>Passiflora incarnata</i> L.....	35
Tabla 5. Porcentaje de contaminación en diferentes métodos de desinfección propuestos para el establecimiento en cultivo <i>in vitro</i> de <i>Passiflora incarnata</i> L a partir de secciones foliares.....	37
Tabla 6. Respuesta de secciones foliares de <i>Passiflora incarnata</i> L cultivadas <i>in vitro</i> en medio MS, 1962 suplementado con diferentes fitoreguladores.....	40
Tabla 7. Promedio de brotes obtenidos mediante cultivo <i>in vitro</i> de secciones foliares de <i>Passiflora incarnata</i> L en medio MS, 1962 suplementado con BAP y ANA, dos, cuatro y seis semanas después de la inoculación de los explantes.....	45
Tabla 8. Análisis de varianza, para número de brotes producidos por semana mediante cultivo <i>in vitro</i> de secciones foliares de <i>Passiflora incarnata</i> L.....	46
Tabla 9. Análisis de varianza para número de vástagos obtenidos mediante cultivo <i>in vitro</i> de secciones foliares de <i>Passiflora incarnata</i> L.....	47
Tabla 10. Prueba de Tukey para evaluar el mejor medio de cultivo para la obtención <i>in vitro</i> de vástagos de <i>Passiflora incarnata</i> L a partir de secciones foliares.....	47
Tabla 11. Porcentaje de vástagos de <i>Passiflora incarnata</i> L enraizados en medio MS, 1962, provisto y desprovisto de fitoregulador.....	49

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. <i>Passiflora incarnata L.</i> en la que se puede observar hojas, flores y fruto.....	25
Figura 2. Secciones de tejido foliar de <i>Passiflora incarnata L</i> cultivadas <i>in vitro</i> en medio MS, 1962 suplementado con 1.2 mg / L de BAP inoculadas después de (A) Ocho días, (B) Diez días, (C) Quince días y (D) Veinte días.....	39
Figura 3. Secciones de tejido foliar de <i>Passiflora incarnata L</i> cultivadas <i>in vitro</i> en medio MS, 1962 suplementado con 1.2 mg / L de KIN. (A) Diez días después de la inoculación y (B) Quince días después de la inoculación.....	39
Figura 4. Callos de <i>Passiflora incarnata L</i> , obtenidos a partir del cultivo <i>in vitro</i> de secciones foliares, utilizando medio MS, 1962 suplementado con BAP 1.2 mg/L y ANA 1.2 mg/L. (A) Doce días y (B) Quince después de la inoculación.....	42
Figura 5. Secciones de tejido foliar de <i>Passiflora incarnata L</i> , cultivadas <i>in vitro</i> en medio MS, 1962 suplementado con 0.8 mg/L de BAP y 1 mg/L, de ANA, quince días después de su inoculación.....	42
Figura 6. Secciones de tejido foliar de <i>Passiflora incarnata L</i> , cultivadas <i>in vitro</i> en medio MS, 1962 suplementado con 0.6 mg/ L de BAP y 0.8 mg/L de ANA, cinco días después de su inoculación.....	43
Figura 7. Vástagos de <i>Passiflora incarnata L</i> , obtenidos mediante cultivo <i>in vitro</i> de secciones foliares en medio MS, 1962 suplementados con 0.6 mg/L de BAP y 0.8 mg/L de ANA, inoculados después de (A) Ocho días, (B) diez días. (C) Doce días, (D, E) quince días, (F, G), veinte días y (H, I) treinta días después de su inoculación.....	44
Figura 8. Promedio de brotes obtenidos mediante cultivo <i>in vitro</i> de secciones foliares de <i>Passiflora incarnata L</i> en medio MS, 1962 suplementado con BAP y ANA, dos, cuatro y seis semanas después de la inoculación de los explantes.....	46

- Figura 9.** Plántulas de *Passiflora incarnata* L en la fase de enraizamiento, obtenidas mediante cultivo *in vitro* de secciones foliares, 30 días después de la inoculación en medio MS, 1962 desprovisto de fitoregulador.....48
- Figura 10.** Porcentaje de vástagos de *Passiflora incarnata* L enraizados en medio MS, 1962, provisto y desprovisto de fitoregulador.....49

RESUMEN

Passiflora incarnata L es originaria del sureste de América del Norte y Centroamérica, esta planta, sintetiza algunos metabolitos que la hacen promisoría en el campo medicinal, investigativo y comercial. Sin embargo esta especie es afectada por diversos virus y su cultivo presenta algunas limitaciones, lo cual dificulta la obtención masiva de germoplasma.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial morfogénico de secciones foliares de *Passiflora incarnata* L cultivada *in vitro*, bajo las siguientes condiciones ambientales, temperatura de 25 ± 1 °C, pH 5.7 y un fotoperiodo de 16h.

La inducción de brotes y formación de vástagos se realizó utilizando medio Murashige y Skoog (MS, 1962), suplementado con 100mg/L de ácido ascórbico, 300 mg/L de caseína hidrolizada, 2.5 mg/L de ácido pantoténico, 2.2 g/L de Phytigel y los fitoreguladores ANA (0.8, 1.0 y 1.2 mg/L), KIN (0.4, 0.8, 1.2 y 2.0 mg/L) y BAP (0.4, 0.6, 0.8 y 1.2 mg/L). Para el enraizamiento los vástagos fueron subcultivados en MS, 1962 desprovisto de fitoregulador y suplementado con AIB (0.5 mg/L) y ANA (0.5 mg/L).

En el cultivo *in vitro* de *Passiflora incarnata* L, ocurrió organogénesis directa, utilizando 0.6 mg/L de BAP y 0.8 mg/L de ANA, permitiendo la formación de vástagos, lo cual es favorable, puesto que en otros casos se presenta la formación de callo, que implica un incremento en el tiempo de regeneración, variación somaclonal y un mayor costo de producción. El enraizamiento de vástagos se logró en medio desprovisto de fitoregulador.

Finalmente, este trabajo permitió la regeneración *in vitro* de plántulas de *Passiflora incarnata* L a partir de tejido foliar, lo cual representa un gran aporte en el campo científico y productivo, beneficiando a pequeños y grandes productores.

ABSTRACT

Passiflora incarnata L is native of the southeast of North America and Central America, this kind of plant produce some metabolites that are made it profitable, in medical, commercial and research field. However this specie is affected for several viruses and its crop presents some limitations which cause difficulty to obtain big quantities of germoplasm.

The aim of this study was evaluate the response of morphogenic potential in leaves section of *Passiflora incarnata* L maintained on *in vitro* culture at following environmental conditions 25 ± 1 °C of temperature, pH 5.7 and photoperiod of 16 hours.

The induction of buds and shoots forming, were realized, using Murashige and Skoog medium (MS, 1962), adding 100mg/L ascorbic acid, 300 mg/L hidrolized casein, 2.5 mg/L pantotenic acid, 2.2 g/L Phytigel and phyto regulators as ANA (0.8, 1.0 y 1.2 mg/L), KIN (0.4, 0.8, 1.2 y 2.0 mg/L) y BAP (0.4, 0.6, 0.8 y 1.2 mg/L). To the rooting shoots were undercultivated in MS, 1962 without regulators, adding AIB (0.5 mg/L) and ANA (0.5 mg/L).

On *in vitro* culture of *Passiflora incarnata* L occurred direct organogenesis using 0.6 mg/L BAP and 0.8 mg/ L ANA, allowing the shoots formation which is favorable because in other cases is presented a callus formation that implies an increasing in the time of regeneration, somaclonal variation and major costs of production. The rooting of shoots was possible in medium without phyto regulator.

Finally, this work allows *in vitro* regeneration plants of *Passiflora incarnata* L, beginning with tissues of leaves, which can represent a great result in the scientific and productive field, and also an advantage to micro and macro producers.

INTRODUCCION

La familia Passifloraceae está constituida por 23 géneros y 600 especies originarias de regiones tropicales, subtropicales de América y África; al género *Passiflora* pertenecen alrededor de 450 especies, la gran mayoría americanas que habitan desde Centroamérica hasta Argentina. Para Colombia, se reportan 135 especies, siendo así el país con la mayor diversidad de *Passifloras* en el mundo. En la región Andina las especies del género *Passiflora* se distribuyen desde el nivel del mar hasta los 2.400 msnm aproximadamente (Escobar, 1991).

La familia Passifloraceae, se destaca principalmente por su valor económico, medicinal y ornamental; sólo algunas especies son cultivadas, pues la mayoría son silvestres y sus frutos son consumidos localmente. Desde hace mucho tiempo, estas plantas han sido ampliamente utilizadas como sedantes y para disminuir acciones depresivas; además estudios han demostrado que son numerosos los usos que estas plantas ofrecen. (Guzzo et al., 2004).

La especie estudiada, *Passiflora incarnata* L, forma parte de la familia Passifloraceae y fue descubierta en América, por misioneros españoles. En 1610 Jack Boccio publicó en Europa dibujos sobre esta especie y una referencia en donde se presentaba como el mejor descubrimiento de la naturaleza. Desde entonces y hasta la fecha es considerada como medicinal, y se reporta como droga oficial en las farmacopeas y formularios nacionales de muchos países. (Fuentes et al., 2000).

Passiflora incarnata L, es conocida comúnmente como pasiflora, maypop o pasionaria y unas de las características que la hacen promisoria son las propiedades medicinales, de su follaje se elabora un extracto fluido que produce una acción sedante sobre el sistema nervioso, además tiene efecto contra cólico, epilepsia, neuralgia, neurosis, ansiedad, insomnio moderado y tos nerviosa; a causa de su actividad relajante y espasmolítica, es también indicada en los trastornos gastrointestinales nerviosos, mialgias, contracturas

musculares, dismenorrea, distonías neurovegetativas asociadas al climaterio, migrañas y vértigo (Wichtl, 1994; Ramos et al., 1996).

Entre los componentes de la planta está un glicósido cianógeno denominado cianocarcina, además se han encontrado alcaloides y flavonoides, responsables del efecto sedante. También, se ha reportado la presencia de ácido hidrocianico, cítrico, málico, pantoténico y tánico (Parra et al., 2002).

Por otro lado, el fruto de *Passiflora incarnata* L es también muy utilizado, es comestible cuando está maduro y es una fuente de vitamina C, éste es empleado en la industria de conservas y refrescos. Los extractos acuosos de la raíz son empleados para el tratamiento de úlceras y hemorroides (Fuentes et al., 2000; Kamaldeep et al., 2001).

Una característica que resalta a ésta especie, es que sus extractos no ocasionan efectos secundarios, por lo que *Passiflora incarnata* L es comercializada como el remedio popular y tradicional Europeo; en otros países como Estados Unidos es usado para el insomnio, ansiedad y como sedante; en Brasil la planta ha sido utilizada como analgésico, antiespasmódico, antiinflamatorio; en Turquía para la dismenorrea, epilepsia, insomnio, neurosis y neuralgia; en Polonia para tratar la histeria y neurastenia; en América para la diarrea, quemaduras, hemorroides y en el sistema tradicional de medicina en la India para disminuir la adición a la morfina (Vasudev, 1955; Handler, 1962; Bergner, 1995; Taylor, 1996; Lad, 2000).

A pesar de las características benéficas de los componentes activos de las plantas del género *Passiflora*, estas especies presentan algunas limitaciones que impiden aprovechar al máximo sus propiedades medicinales dentro del actual mercado; es el caso de *Passiflora incarnata* L, especie que ha sido poco cultivada en la zona tropical, dificultándose la obtención de material vegetal, para la producción industrializada de biocompuestos de importancia medicinal (Mingozi et al., 2003).

Adicionalmente, las plantas pertenecientes al género *Passiflora*, poseen una serie de dificultades para el establecimiento de su cultivo, la mayor parte de estas son propagadas

vegetativamente, debido a que sus semillas exhiben dormancia que impide una elevada germinación. Esta característica constituye una barrera para la explotación comercial de estas especies, además estudios realizados revelan que las semillas deshidratadas del género *Passiflora*, pueden tardar desde meses hasta años en germinar (Vanderplank et al., 2001; Severin et al., 2004).

Otra posibilidad para la obtención de material vegetal es mediante reproducción asexual, por estaca, acodo, o injerto (Gouveia, 1987; Chacon, 1991). Estas formas de propagación presentan ciertas desventajas como son: bajos niveles de producción, un desarrollo de la planta lento y además la posibilidad de estar propagando material que tenga problemas endógenos a nivel sanitario (Braidg, 1991).

Actualmente, la demanda de componentes activos provenientes de plantas medicinales se ha incrementado notablemente tanto a nivel nacional como internacional, es por esto que la producción a gran escala de *Passiflora incarnata* L es importante, dado a su utilidad industrial y a las propiedades medicinales de sus compuestos activos. La ausencia de un método eficaz para el cultivo de *Passiflora incarnata* L, ha impedido obtener de forma masiva plantas con el propósito de aprovechar sus propiedades que además de brindar un valor agregado, permiten la producción libre de patógenos, la bioconversión y producción de compuesto útiles. Es por esta razón que los procesos biotecnológicos de micropropagación *in vitro* existen como una posible alternativa de producción. (Roca y Mroginski, 1983).

El presente trabajo tiene como fin evaluar el comportamiento de *Passiflora incarnata* L en condiciones *in vitro*, mediante el cultivo de secciones foliares, lo cual podría representar un gran aporte en el campo de la investigación y producción agrícola, que beneficie a pequeños y grandes productores.

2. JUSTIFICACION

De acuerdo a las propiedades presentes en los extractos de *Passiflora incarnata* L, esta es de gran utilidad en el campo medicinal, esto se evidencia en trabajos realizados que demuestran la acción sedante sobre el sistema nervioso, su efecto contra cólicos, epilepsia, neuralgia, neurosis, ansiedad, insomnio, tos nerviosa, trastornos gastrointestinales nerviosos, mialgias, contracturas musculares, dismenorrea, migrañas, vértigo y actividad antimicrobiana (Anesini y Pérez, 1993; Wichtl, 1994; Rafaelli et al., 1994; Ramos et al., 1996). Adicionalmente, estudios manifiestan que sus extractos no ocasionan ningún tipo de toxicidad o contraindicación, razón por la cual es conocida como “safe herbal sedative” por la Federation drugs of America (Felter y Lloyd, 1983). Por otro lado, el fruto de esta especie, crudo o cocido es comestible, preparándose a partir de este, jarabes, mermeladas y jaleas, también se utiliza como forraje para algunos animales domésticos (Ijjász y Eموke, 1999).

Sin embargo, las plantas del género *Passiflora* son infectadas por diversos grupos de virus, de los cuales los potyvirus representan el mayor riesgo para los cultivos, al afectar su apariencia, composición y uniformidad, entre ellos se destaca “Passionfruit Woodiness Virus” (PWV), que es transmitido por inoculación mecánica, por medio de insectos de la familia Aphididae como son *Aphis gossypii* y *Mizus persicae*. (Gongora et al., 1992; Brunt et al., 1996).

De igual forma las limitaciones que presenta su cultivo, dificultan los procesos de obtención masiva de germoplasma. El sistema de producción utilizado comercialmente es la reproducción sexual, donde se seleccionan las mejores características agronómicas; no obstante este método presenta ciertas desventajas, puesto que las plantas no son uniformes, debido a la alta variabilidad genética, aspecto común en la familia Passifloraceae, lo que se acentúa por causa de las frecuentes hibridaciones interespecificas que se presentan en el medio natural (Braidg, 1991; Cancino y Hodson, 1994).

De acuerdo a lo anterior, el cultivo *in vitro* de *Passiflora incarnata* L es una alternativa de conservación de germoplasma y obtención masiva de material vegetal, pues evita agotar los pocos ejemplares existentes en su hábitat natural (Roca y Mroginski, 1983; Hartmann et al., 1997; Kumar et al., 1998).

Finalmente, con el fin de incrementar las posibilidades de mercado y proporcionar un soporte científico y tecnológico, que permita el cultivo y producción de esta especie, el presente trabajo busca evaluar la respuesta de *Passiflora incarnata* L en condiciones *in vitro*. Una tecnología que resulte exitosa, permitirá la producción a gran escala, y generará posibilidades para futuras investigaciones.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Evaluar en *Passiflora incarnata* L. el potencial morfogénico del tejido foliar cultivado *in vitro*.

3.2 ESPECIFICOS

- Establecer en condiciones *in vitro* secciones de tejido foliar de *Passiflora incarnata* L.
- Promover el desarrollo de vástagos a partir de secciones de tejido foliar de *Passiflora incarnata* L cultivadas *in vitro*.
- Inducir *in vitro* la formación de raíz en vástagos de *Passiflora incarnata* L.

4. ANTECEDENTES

En Colombia se cuenta con varios trabajos que describen taxonómicamente ejemplares pertenecientes a la Familia Passifloraceae, así como algunos aspectos de su cultivo, ecología, distribución y clasificación preliminar de las especies existentes en el país.

No obstante, los trabajos que se han realizado hasta el momento en el área de cultivo *in vitro* de tejidos en especies de *Passiflora*, realmente son pocos en comparación con otros géneros. (Guzzo et al., 2004)

Algunos de los trabajos en cultivo *in vitro*, realizados en especies de *Passiflora* son los siguientes:

En el año 1980 Scorza y Janick reportan regeneración *in vitro* de *Passiflora suberosa*, a partir de tallos, hojas y zarcillos jóvenes, empleando medio MS, 1962, suplementado con 0.1mg/L de BAP.

Posteriormente en el año 1990 Kantharajah y Dodd, describieron una técnica de propagación *in vitro* para *Passiflora edulis*, a partir de discos de hojas inmaduras y segmentos nodales, observando que la formación de brotes a partir de segmentos nodales es significativa en medio MS, 1962 suplementado con 8.9 μ M de BAP.

En 1991, Drew observó que en un híbrido entre *Passiflora edulis* y *P. mollissima*, los brotes jóvenes crecían rápidamente en MS, 1962 con 10 μ M de KIN y 5 μ M de AIA.

Por otro lado, Amugune et al., 1993, obtuvieron formación directa de brotes, utilizando secciones de hojas inmaduras de plantas adultas de *Passiflora edulis* var *flavicarpa* en medio MS, 1962 con una concentración de 8.9 μ M de BAP y 2.32 μ M de KIN.

Dornelas y Carneiro en 1994, en un experimento con diferentes especies de *Passiflora* (*P. mollissima*, *P. giberti*, *P. maliformis*, y *P. amethystina*) obtuvieron organogénesis directa,

utilizando como explante discos foliares y solo BAP en medio MS, 1962. Según estos autores utilizar concentraciones muy altas de auxina pueden inhibir la formación de brotes debido a los altos niveles de auxinas endógenas encontrados en los explantes.

En 1999 Appezzato, et al., realizaron un estudio con *Passiflora edulis Sims*, utilizando como explante discos foliares, obteniendo organogénesis directa, al emplear medio MS, suplementado con 1 mg/ L de BAP.

Boffino et al., 2000 regeneraron *in vitro* plantas de *Passiflora suberosa*, cultivando discos foliares en medio MS, 1962. Al utilizar 0.5 mg/L de BAP hubo formación de callo; luego se inocularon en un medio con 1mg/L de GA₃, en donde se formaron yemas.

Otahola, en el año 2000 regeneró *in vitro* plantas de parchita (*Passiflora edulis Flavicarpa*), a partir del cultivo de discos de hojas en medio MS, 1962 empleando como fitoregulador BAP (0, 0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 mg/L).

Becerra, 2003 cultivó *in vitro* discos foliares de *Passiflora mollissima* y *Passiflora edulis*, observando que para la primera especie no es un método de regeneración eficiente, no obstante para *P. edulis*, se logró obtener plantas completas por organogénesis directa e indirecta, utilizando medio MS, 1962 suplementado con 1 mg/L de BAP y 0.5mg/L de KIN.

En el año 2007, Pacheco et al., lograron regenerar plantas de *Passiflora cincinata* mediante organogénesis indirecta a partir del cultivo *in vitro* de discos foliares, utilizando medio MS, 1962 y 6 mg/L de BAP.

Bussilacchi et al., 2008, cultivaron *in vitro* discos de hoja de *Passiflora careulea* L, en medio MS, 1962 suplementado con 1 mg/L de BAP, concluyendo que la regeneración se produce por organogénesis directa.

De acuerdo a lo que reporta la literatura, los estudios realizados en *Passiflora incarnata* L son aun más limitados y sólo se registran estudios de cultivo *in vitro* en semillas y tejidos embrionarios, de los cuales los más representativos son:

En el año 2003, Mingozi et al., utilizaron como explante semillas y tejidos embrionarios de *Passiflora incarnata* L para ser cultivados *in vitro*, obteniéndose callos, los cuales fueron llevados a medio MS, 1962 suplementado con BAP y 2,4 D; posteriormente con IBA, obteniendo un numero considerable de plántulas enraizadas.

Mas adelante, Guzzo et al., en el 2004, realizaron un trabajo de cultivo *in vitro* de semillas maduras en varias especies de *Passiflora*, incluyendo *P. incarnata* L, utilizando medio MS, 1962 suplementado con KIN, ANA, obteniendo la formación de callos, a partir de los cuales se pudo regenerar plántulas de esta especie.

5. MARCO TEÓRICO

El nombre de *Passiflora* fue asignado por L. Plukenet en 1696 y es derivado de las palabras latinas “*flor passionis*” flor de la pasión (Escobar, 1988; Vecchia, 2000). Inicialmente, la flor fue la que llamó la atención, tanto de expertos botánicos como de coleccionistas por su gran belleza, sin embargo sus frutos se fueron consolidando poco a poco como alimento muy apetecido por su valor nutricional y medicinal tanto en Europa como en América del Norte (Ijjász y Eموke, 1999).

5.1 Familia Passifloraceae

La distribución geográfica de la familia Passifloraceae es casi exclusiva de la zona tropical y subtropical, siendo constituida por aproximadamente 23 géneros, de los cuales 16 están distribuidos en el viejo mundo; el resto de los géneros se hallan distribuidos en América, siendo *Passiflora* uno de los mas grandes de la familia (Escobar, 1991).

Los ejemplares de la familia Passifloraceae son de tamaño medio, los cuales pueden hallarse en forma de liana o enredadera con zarcillos axilares, pequeños arboles y arbustos. Taxonómicamente los individuos presentan siempre hojas alternas, pecioladas con pequeñas estipulas a veces caedizas, generalmente ovaladas, bilobuladas o hasta con 3 a 5 lóbulos, a menudo con nectarios en el haz, el cáliz floral en forma de copa, campanulado o tubular en cuyo vértice se ubica el perianto y una corona de filamentos y órganos reproductores sobre una columna central; fruto en baya, con semillas de testa dura y endospermo carnosos, las cuales están rodeadas por un arilo (Killip, 1938; Uribe, 1972; Cronquist, 1978; Heywood, 1985; Escobar, 1988).

5.1.1 Género *Passiflora*

El género *Passiflora* es el más importante de la familia Passifloraceae, está conformado por 450 especies, la mayoría se encuentran en el trópico y son frecuentes los endemismos, se destacan por su valor económico, medicinal y ornamental. Solo algunas especies son cultivadas, la mayor parte son silvestres cuyos frutos son consumidos localmente. En virtud de la variedad de hábitats que exhibe Colombia, se reportan 135 especies, por lo cual es el país con la mayor diversidad de Passifloras en el mundo. En la región Andina por encima de los 1.800 msnm se concentran las especies del subgénero *Tacsonia* (curubas), las especies del subgénero *Passiflora* (granadillas, badea, chulupa) se distribuyen desde el nivel del mar hasta los 2.400 msnm aproximadamente (Escobar, 1991).

5.2 Especie *Passiflora incarnata* L

Passiflora incarnata L es comúnmente conocida como flor de la pasión, pasionaria, pasiflora (Acosta y Granada, 1985). Es escasamente cultivada por la población, por lo que pocas personas pueden identificarla con facilidad.

5.2.1 Origen y distribución

La especie es originaria del sureste de América del Norte y Centroamérica, actualmente esta especie es cultivada en Cuba donde toda la multiplicación se ha realizado vegetativamente (Svanidze et al., 1978).

En Colombia, de acuerdo a colectas botánicas realizadas, ésta planta se encuentra en estado silvestre en el Resguardo Indígena La Paila, Municipio de Buenos Aires, Cauca.

5.2.2 Descripción

Liana rastrera, trepadora, de 6-10 m, glabra o con pocos tricomas; provista de zarcillos, muy ramificada; ramas finas y algo leñosas. Estípulas setáceas, deciduas, 2-3 mm de largo. Hojas alternas, 3-lobuladas, profundamente divididas, 3-nervadas, de 6-15 cm a lo largo del nervio medio, y de 5-12 cm a lo largo de los nervios laterales; pecíolo de 8 cm, con 2 glándulas sésiles en el ápice. Flores axilares, por lo general, solitarias, de color blanco y malva o lila, de 7-9 cm de diámetro; brácteas oblongas, con 2 glándulas en la base, de 4-8 mm de largo y de 2,5-4 mm de ancho; sépalos oblongo-lanceolados, de 3 cm de largo, blancos o lilas internamente, de color verde externamente con quilla y arista de 3 mm de largo; filamentos de la corona en varias series, morados, los externos de 1,5-2 cm, los interiores de 2-4 mm. Fruto en baya, ovoide, carnoso, de unos 6 cm de diámetro, de cubierta lisa y brillante, de color verde-amarillento al madurar (Figura 1). Semillas numerosas, de testa punteada y cubiertas por un arilo mucilaginoso (Fuentes et al., 2000).



Figura 1. *Passiflora incarnata* L. en la que se puede observar hojas, flores y fruto. (Ted Bodner. www.botanik-fotos.com).

5.2.3 Identificación de la especie

La especie es difícil de identificar, y frecuentemente es confundida con otras especies del mismo género. Generalmente, se suelen cultivar en Cuba, bajo el nombre común de pasiflora, 2 especies que no están aprobadas por el Ministerio de Salud Pública (MINSAP) para su empleo en el Sistema Nacional de Salud: *Passiflora edulis* Sims, frutal conocido también como maracuyá, cuyas hojas, empleadas como planta medicinal, pueden provocar serios daños en hígado y páncreas y *Malvabiscus arboreus*, arbusto perteneciente a la familia *Malváceas*, que posee flores rojas que siempre permanecen cerradas (Fuentes et al., 2000).

5.2.4 Fenología

La especie florece abundantemente pero fructifica muy poco. En los primeros días de Diciembre y de Marzo, las plantas se mantienen con un follaje muy escaso o nulo. Pero con la primavera comienza una fuerte emisión de brotes aéreos (Fuentes et al., 2000).

5.2.5 Multiplicación

5.2.5.1 Sexual

La especie puede ser propagada mediante semillas, pero estudios reportan que sus semillas exhiben dormancia, lo que afecta su germinación, a tal grado que las semillas deshidratadas del género *Passiflora* pueden tardar desde meses hasta años en germinar.

Si la multiplicación se logra a través de semillas, es aconsejable que una vez las plántulas tengan unos 15 cm de altura, se realice el trasplante a una distancia de 90 x 20 cm. El resto de las actividades de cultivo, se realizan igual que cuando se procede a emplear la multiplicación asexual para el establecimiento de plantaciones (Fuentes et al., 2000; Vanderplank et al., 2001; Severin et al., 2004).

5.2.5.2 Asexual

La multiplicación asexual, que se emplea para el establecimiento de las plantaciones, puede hacerse mediante estacas provistas de talón, o simplemente, con raíces, que resulta lo más adecuado.

Las raíces que servirán de material de propagación, una vez extraídas, y sin ser cortadas, pueden almacenarse en un lugar sombreado, cubiertas por una tela húmeda. En esas condiciones pueden permanecer hasta 14 días sin perder su capacidad de brotación. Al momento de ser plantadas, las estacas se cortan a una longitud de 20 cm, y deben ser completamente cubiertas con suelo al momento de realizar la plantación (Lemes y Rodríguez, 1994).

5.3 Plagas y enfermedades

5.3.1 Plagas

Las larvas de *Agraulis vanillae insularis*, que se alimentan de las hojas, pueden provocar daños en cualquier época del año. Igualmente las larvas del lepidóptero *Diones vanillae*, deterioran notablemente las hojas si no son controladas efectivamente. También se ha referido el ataque del ácaro rojo (*Tetranychus tumidus* Banks), que principalmente durante los meses de verano, provoca el amarillamiento del follaje. Se ha reportado el ataque del nemátodo *Meloidogyne incognita* Kofoid and White. Babosas no identificadas taxonómicamente, suelen atacar el cultivo y provocan daños en las hojas. (Pendás, 1983).

5.3.2 Enfermedades

Algunos hongos provocan afecciones en las hojas, que no llegan a ser muy severas: *Alternaria sp*; *Cercospora passiflorae* Müller et Chup; *Gloesporium sp* y *Phyllosticta sp* (Projorov y Fornet, 1984; Fornet, 1985).

5.4 Constituyentes responsables de la actividad biológica

La mayoría de los estudios sobre composición química realizados en la familia Passifloraceae hacen referencia casi exclusivamente a *Passiflora incarnata* L. En esta especie se encuentran presentes alcaloides indólicos (0,03 - 0,1%): harmano o pasiflorina (el más abundante), harmina, harmanol, harmol y harmalina. Todos ellos serían derivados de la beta-carbolina. En la mayoría de especies del género *Passiflora* los alcaloides sólo se presentan en trazas. (Perry et al., 1991; Rehwald et al., 1995; Soulimani et al., 1997; Schwartz, 2005).

Flavonósidos (hasta 2,5%): Forman C-heterósidos de flavonoles, como ejemplo se tiene la vitexina, isovitexina, saponarina, kampferol, quercetina, apigenina, crisina, neohesperidina, luteolol, schaftósido e isoschaftósido. Su concentración en hojas y flores alcanza entre 1,5 y 2,1% dependiendo de la época de recolección. (Perry et al., 1991; Rehwald et al., 1995; Soulimani et al., 1997; Schwartz, 2005).

Esteroles (10,1%): estigmasterol, sitosterol, cumarinas: escopoletina y umbeliferona (raíz). Otros: maltol, etilmaltol, pasicol (poliacetileno), trazas de heterósidos cianogénicos, lignanos, aminoácidos, ácidos grasos, glúcidos, polisacáridos, trazas de aceite esencial, taninos, ácido fórmico, ácido butírico y ácido p-cumárico. (Perry et al, 1991; Rehwald A. et al, 1995; Soulimani et al, 1997; Schwartz, 2005).

Componentes del fruto: ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, agua, beta-caroteno, calcio, catalasa, etil-butirato, etil-caproato, fenolasa, fibra, fósforo, grasas, hierro, niacina, potasio, proteínas, riboflavina, sodio, tiamina, etc. (Perry et al., 1991; Rehwald et al., 1995; Soulimani et al., 1997; Schwartz, 2005).

5.5 Acciones farmacológicas

La principal actividad de la pasionaria está vinculada a su efecto ansiolítico, destacando en segunda instancia su acción espasmolítica sobre músculo liso (Lutomski, 1975). Su follaje del cual se elabora el extracto fluido produce una acción sedante sobre el sistema nervioso. Otras propiedades son su efecto contra cólicos, epilepsia, neuralgia, neurosis, ansiedad, insomnio moderado y tos nerviosa. A causa de su actividad relajante y espasmolítica, es también indicada en los trastornos gastrointestinales nerviosos, mialgias, contracturas musculares, dismenorrea, distonías neurovegetativas asociadas al climaterio, migrañas y vértigo (Ramos, et al., 1996; Wichtl, 1994).

El efecto sedante atribuido por la medicina popular a *Passiflora incarnata* L tuvo suficiente aval científico a fines de la década del 60' y principios del 70'. Entre las primeras experiencias realizadas con la fracción flavónica de *Passiflora incarnata* L, se demostró que en estos principios activos radicaría la acción sedativa, ya que disminuían el estado de excitación en animales experimentales (Von Eiff M et al., 1994).

En 1991, Maluf et al., realizaron un estudio en *P. edulis*, para verificar la eficacia en la producción de efectos sedativo e hipnótico en humanos. El estudio clínico demostró la efectividad de *P. edulis*, pero también demostró signos de hepatotoxicidad y pancreatotoxicidad. No obstante estos resultados, no han reportado daño hepático o del páncreas con el uso de *Passiflora incarnata* L.

Luego de varios estudios realizados, con diferentes especies de *Passiflora*, se pudo determinar que el flavonoide crisina sería el principal responsable del efecto ansiolítico, ya que su estructura química es propia de las sustancias afines a los receptores GABA-A, de esta manera ejercería un efecto sedante similar al del diazepam, aunque diez veces menor, no ejerciendo acciones miorelajantes (Medina et al., 1990; Paladini, 1996).

La pasionaria presenta la cualidad de generar un sueño similar al fisiológico acompañado de un despertar rápido, sin borrachera matinal, además su efecto ansiolítico es evidente a los 30 minutos de administrado el producto. Un ensayo clínico a ciegas de pasionaria por vía oral demostró al cabo de unas pocas semanas, mejorar la forma física en pacientes de tercera edad, sin alterar los niveles de tensión arterial (Von Eiff M. et al., 1994).

De igual forma, un estudio llevado a cabo con pacientes obesos para determinar el beneficio que puede aportar la actividad ansiolítica de la pasionaria sobre el control del estrés y nerviosismo que acompañan al seguimiento de un régimen dietético, determinó que en la primer semana de tratamiento, la administración de extractos de *P. incarnata* L por vía oral lograban resultados satisfactorios (Moro y Basile, 2000).

Otro tipo de trabajos han reportado actividad antituberculosa de las semillas de *Passiflora incarnata* L, extractos de las partes aéreas revelaron acción antimicótica frente a *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* y *Microsporum cookei*; y antibacteriana contra *Streptomyces olivaceus* y *Streptococcus a*, en estas acciones posiblemente jueguen un papel importante las cumarinas. Por su parte la planta entera ha demostrado tener actividad *in vitro* frente a *Mycobacterium smegmatis*. (Nicolls et al., 1973)

En cuanto a los lignanos, presentes en las Passifloras, el ácido cafeico presenta acción antiséptica y el ácido ferúlico sería antiagregante plaquetario, antiespasmódico y analgésico. Ambos han demostrado poseer efecto hepatoprotector y antihepatotóxico (Duke y Foster, 1990).

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Área de estudio y selección del material vegetal.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca, en la ciudad de Popayán, Colombia. El material vegetal de *Passiflora incarnata* L. fue seleccionado a partir de plantas provenientes del resguardo indígena La Paila NAYA, localizado en el municipio de Buenos Aires, Cauca.

6.2. Condiciones ambientales del cultivo *in vitro*.

Todos los bioensayos correspondientes a este trabajo se realizaron a una temperatura de 25 ± 1 °C, un pH de 5.7 y un fotoperiodo de 16 h, proporcionado por lámparas de 1700 lux.

6.3. Preparación y desinfección del material vegetal.

El material vegetal que se utilizó para el cultivo *in vitro* fue previamente lavado con suficiente agua y jabón antibacterial para retirar cualquier agente contaminante, luego fue sumergido diez segundos en alcohol etílico al 70% y finalmente en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante 10 minutos.

Posteriormente se tomaron secciones foliares con diámetro de 5mm y se evaluaron cinco métodos de desinfección según Pierik, 1990 (Tabla 1).

Las secciones de tejido foliar fueron tomadas cuidadosamente con pinzas estériles e inoculadas en el medio nutritivo, de modo que el haz permaneció en contacto con el medio (Pacheco et al., 2007).

Tabla 1. Métodos evaluados para la desinfección de secciones foliares de *Passiflora incarnata* L cultivadas *in vitro*.

Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
<ul style="list-style-type: none"> • Alcohol etílico 70% (1 minuto). • NaClO 1% y dos gotas de Tween 20 (3 minutos). • Agua destilada (2 enjuagues). 	<ul style="list-style-type: none"> • NaClO 3% y dos gotas de Tween 20 (2 minutos). • NaClO 2% y dos gotas de Tween 20 (1 minuto). • NaClO 1% y dos gotas de Tween 20 (15 segundos). • Agua destilada (1 enjuague). 	<ul style="list-style-type: none"> • Alcohol etílico 70% (1 minuto). • NaClO 2% y dos gotas de Tween 20 (2 minutos). • NaClO 1% y dos gotas de Tween 20 (30 segundos). • Agua destilada (1 enjuague). 	<ul style="list-style-type: none"> • NaClO 2% y dos gotas de Tween 20 (1 minuto). • NaClO 1% y dos gotas de Tween 20 (2 minutos). • Agua destilada (2 enjuagues). 	<ul style="list-style-type: none"> • Alcohol etílico 70% (1 minuto). • NaClO 2% y dos gotas de Tween 20 (1 minuto). • NaClO 1% y dos gotas de Tween 20 (1 minuto). • Agua destilada (1 enjuague).

Los métodos de desinfección evaluados fueron asignados a 30 unidades experimentales en un diseño completamente al azar y se distribuyeron en 150 frascos.

Para seleccionar el mejor método de desinfección, la variable evaluada fue porcentaje de explantes contaminados (Tabla 5).

6.4. Establecimiento *in vitro* del material vegetal, inducción de brotes y desarrollo de vástagos.

La composición del medio de cultivo utilizado fue: Medio basal Murashige y Skoog, 1962 (MS, 1962) suplementado con 100mg/L de ácido ascórbico, 300 mg/L de caseína hidrolizada, 2.5 mg/L de ácido pantoténico y 2.2 g/L de Phytigel.

Se realizaron dos experimentos con el fin de establecer en condiciones *in vitro* secciones de tejido foliar de *Passiflora incarnata* L, utilizando como fitoreguladores 6-benzil

aminopurina (BAP), kinetina (KIN) y ácido naftalénacético (ANA), como se ilustra en la tabla 2 y 3.

Tabla 2. Tratamientos correspondientes al primer experimento para inducir la formación de brotes y desarrollo de vástagos *in vitro* a partir de secciones de tejido foliar de *Passiflora incarnata* L.

Medio de Cultivo	Fitoregulador	Concentraciones
MS 1962	BAP	0.4 mg/L, 0.8 mg/L, 1.2 mg/L
MS 1962	KIN	0.4 mg/L, 0.8 mg/L, 1.2 mg/L
MS 1962	BAP y KIN	0.8 mg/L y 0.8 mg/L
MS 1962	Desprovisto de fitoregulador	

Tabla 3. Tratamientos correspondientes al segundo experimento para inducir la formación de brotes y desarrollo de vástagos *in vitro* a partir de secciones de tejido foliar de *Passiflora incarnata* L.

Medio de Cultivo	Fitoregulador	Concentraciones
MS 1962	KIN	2 mg/L
MS 1962	BAP y ANA	0.6 mg/L, 0.8 mg/L
MS 1962	BAP y ANA	0.8 mg/L, 1 mg/L
MS 1962	BAP y ANA	1.2 mg/L, 1.2 mg/L
MS 1962	BAP y KIN	0.4 mg/L, 0.8 mg
MS 1962	BAP y KIN	0.8 mg/L, 0.4 mg/L
MS 1962	BAP y KIN	0.8 mg/L, 1.2 mg/L
MS 1962	Medio desprovisto de fitoregulador	

Los tratamientos (tabla 2, 3) fueron asignados a 20 unidades experimentales en un diseño completamente al azar y se distribuyeron en 160 frascos.

El material vegetal de *Passiflora incarnata* L, fue dispuesto en anaqueles y se hicieron subcultivos cada treinta días para garantizar que el medio no se agotara. Las observaciones se realizaron diariamente, durante dos meses. (Pacheco, et al., 2007 y Busilacchi, et al., 2008).

En el cultivo *in vitro* de secciones foliares de *Passiflora incarnata* L, el análisis estadístico se realizó solamente en el segundo experimento, donde los explantes formaron brotes y se desarrollaron a vástagos.

Inicialmente se evaluó la capacidad de supervivencia de los explantes (Tabla 6), las variables evaluadas en los tratamientos (BAP 1.2 mg/L - ANA 1.2 mg/L; BAP 0.8 mg/L - ANA 1 mg/L y BAP 0.6 mg/L – ANA 0.8mg/L) donde los explantes se mantuvieron vivos, fueron promedio de brotes y número vástagos desarrollados.

Para conocer si existen diferencias significativas entre tratamientos en cuanto al promedio de brotes producidos y el número de vástagos desarrollados se realizó un análisis de varianza y para determinar el mejor medio de cultivo en la obtención de vástagos una prueba de Tukey (Tabla 7, 8, 9 y 10).

6.5. Enraizamiento de vástagos.

Con el fin de inducir enraizamiento de vástagos se empleó el medio basal MS, 1962 enriquecido con 100mg/L de ácido ascórbico, 300 mg/L de caseína hidrolizada, 2.5 mg/L de ácido pantoténico, 2.2 g/L de Phytigel y los fitoreguladores ácido naftalenacético (ANA), ácido indol butírico (AIB) y un medio desprovisto de fitoregulador como se ilustra en la Tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos empleados para promover el desarrollo *in vitro* de raíces en vástagos de *Passiflora incarnata* L.

Medio de Cultivo	Fitoregulador	Concentración
MS 1962	ANA	0.6 mg/L
MS 1962	AIB	0.6 mg/L
MS 1962	Desprovisto de fitoregulador	

La variable evaluada fue el porcentaje de vástagos enraizados, para lo cual se realizó un análisis de contingencia. (Tabla 11, Figura 10).

En el cultivo *in vitro* de *Passiflora incarnata* L, se parte del principio de totipotencialidad de las células que se mantiene en el tejido evaluado, debido a la presencia de células parenquimáticas que permiten regenerar toda una planta a partir de un pequeño grupo de células de la sección foliar. Además, se tuvo en cuenta que la diferenciación celular en hojas inicia en el ápice, por la presencia de meristemas apicales, luego continua hacia la base por la acción de meristemas intercalares que después formaran el tejido parenquimático, haciendo que lo último que se diferencie en la hoja sea el peciolo (Martin y Juniper, 1970).

De acuerdo a lo anterior, se aislaron explantes de la base de la hoja, lugar donde se encuentran células con potencial morfogénico. Las células localizadas en la región basal, tienen capacidad de reanudar multiplicación celular, luego de un proceso de corte o herida, promoviendo de esta manera procesos de rediferenciación, formación de tejidos y órganos nuevos (Kantharajah y Dodd, 1990; Owens, 1992; De Klerk, 1992; Lane, 1998; Taiz, 1998; Forero, 1999; Shrivastava, 1999).

El presente estudio coincide con lo que reporta Hodson et al., 1994 y Apezato et al., 1999 en el cultivo *in vitro* de *P. edulis*, quienes observaron que a partir de explantes de la región basal de lamina foliar, nervadura media y peciolo se produce formación de brotes y desarrollo de vástagos, debido a la alta actividad meristemática de las células del parénquima.

Por otro lado en el cultivo *in vitro* de secciones foliares se pudo observar una gran exigencia de nutrientes para mantener el tejido vivo, así como en la mayoría de cultivos *in vitro*. Además la consistencia del medio debe ser ideal para un buen soporte de los explantes, pero también debe permitir una adecuada absorción de los nutrientes procurando su desarrollo normal (Roca y Mroginski, 1983).

7.1. Métodos de desinfección de explantes.

Inicialmente se realizaron ensayos preliminares de desinfección de explantes con el fin de obtener material aséptico, sin embargo se presentaron dificultades puesto que al cabo de cinco días de la inoculación se observó contaminación en la superficie de todos los explantes, siendo esto una evidencia para determinar que el método de desinfección inicial no fue eficiente, razón por la cual se propusieron cinco métodos basados en reportes bibliográficos (Pierik, 1990).

Al evaluar los métodos de desinfección propuestos, sólo se presentó un bajo porcentaje de contaminación, correspondiente al 10% en el método numero 2: Inmersión de los explantes en hipoclorito de sodio al 3% con dos gotas de Tween 20 como agente surfactante durante dos minutos, luego en una solución de hipoclorito de sodio al 2% con dos gotas de Tween 20 durante 1 minuto, después en una solución de hipoclorito de sodio al 1% con dos gotas de Tween durante 15 segundos y finalmente enjuague con agua destilada estéril. En los demás métodos de desinfección evaluados se presentó un alto porcentaje de contaminación (Tabla 5).

Establecer un método de desinfección eficiente es uno de los requerimientos básicos para el éxito en cultivo de tejidos vegetales, puesto que estos se mantienen libres de microorganismos contaminantes.

Tabla 5. Porcentaje de contaminación en diferentes métodos de desinfección propuestos para el establecimiento en cultivo *in vitro* de *Passiflora incarnata* L a partir de secciones foliares.

Métodos de desinfección	*Porcentaje de contaminación
Método 1	100%
Método 2	10%
Método 3	70%
Método 4	90%
Método 5	90%

* El porcentaje fue calculado con base a 30 unidades experimentales.

7.2. Inoculación de explantes.

En la inoculación del explante se tuvo en cuenta que la superficie del haz estuviera en contacto con el medio de cultivo permitiendo la regeneración de la planta, esto puede ser explicado por la presencia de meristemo adaxial que solo se encuentra en dicotiledóneas, localizado exactamente debajo de la epidermis del haz, sobretodo hacia la región del peciolo y del nervio principal. En trabajos realizados por Otahola, 2000 en *Passiflora edulis*, como en el presente trabajo, se obtuvo buenos resultados al poner la superficie adaxial de la sección foliar en contacto con el medio de cultivo.

7.3. Establecimiento *in vitro* del material vegetal, inducción de brotes y desarrollo de vástagos.

En trabajos de cultivo *in vitro* realizados en *Passiflora incarnata* L se ha tomado como explante semillas y tejidos embrionarios (Mingozzi et al., 2003; Guzzo et al., 2004) pero hasta el momento no se han publicado estudios con secciones foliares como explante, por lo cual en el presente estudio los tratamientos propuestos inicialmente estuvieron basados en trabajos realizados en otras especies pertenecientes al género *Passiflora*, entre las cuales están *P. mollisima*, *P. edulis* var. *Flavicarpa*, *P. Caerulea*, *P. ligularis* juss y *P. edulis* var. *Sims* (Flores et al., 1998; Otahola, 2000; Becerra, 2003; Severin et al., 2004; Guzzo et al., 2004).

7.3.1. Primer experimento.

El análisis de los resultados muestra que en el primer experimento solo respondió el 20% de los explantes inoculados en los tratamientos con fitoreguladores KIN 1.2 mg/L y BAP 1.2 mg/L, pero su respuesta no fue óptima, esto debido a que los brotes obtenidos no formaron vástagos y con el transcurso del tiempo no se observó su desarrollo (Figura 2 y 3), esto muestra que el uso solamente de BAP y KIN en el medio para cultivo *in vitro* de secciones foliares de *Passiflora incarnata* L no promueve la formación de brotes y desarrollo de vástagos.

En contraste Hodson et al., 1994 lograron regenerar plantas de *Passiflora edulis* mediante cultivo *in vitro* de secciones foliares en medio MS, 1960 con fitoreguladores BAP en un rango de 4.4 – 13.3 μ M y KIN 4.6 – 9.3 μ M. Por lo anterior se puede observar que a pesar de que *Passiflora incarnata* L y *Passiflora edulis* pertenecen al mismo género, la respuesta en cultivo *in vitro* de secciones foliares es diferente para cada especie.

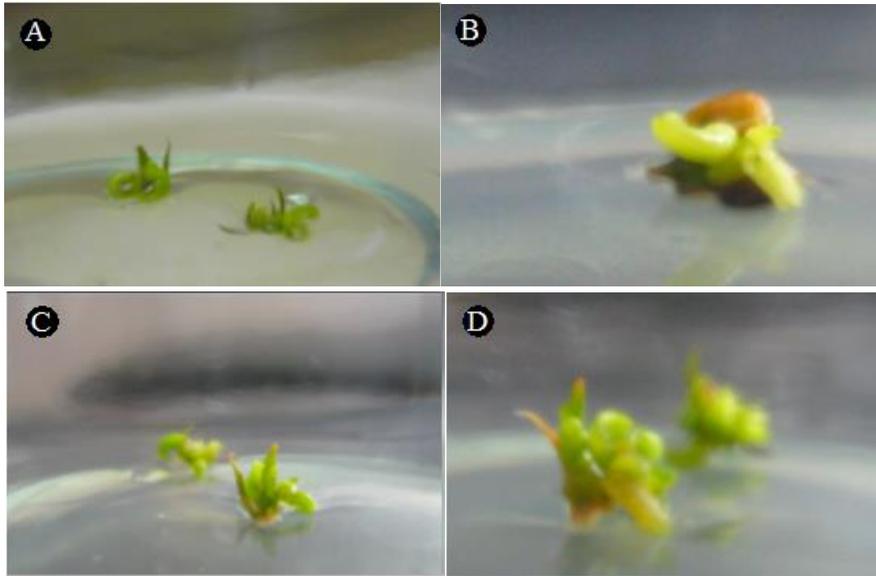


Figura 2. Secciones de tejido foliar de *Passiflora incarnata* L cultivadas *in vitro* en medio MS, 1962 suplementado con 1.2 mg / L de BAP, inoculadas después de (A) Ocho días, (B) Diez días, (C) Quince días y (D) Veinte días.

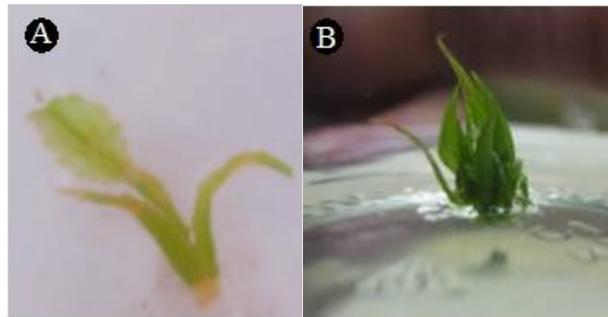


Figura 3. Secciones de tejido foliar de *Passiflora incarnata* L cultivadas *in vitro* en medio MS, 1962 suplementado con 1.2 mg / L de KIN. (A) Diez días después de la inoculación y (B) Quince días después de la inoculación.

7.3. 2. Segundo experimento.

Según el comportamiento observado en la producción de brotes en el primer experimento y con el objetivo de obtener vástagos totalmente desarrollados, se planteó un segundo experimento, donde se modificaron las concentraciones de las citoquininas KIN, BAP y se adicionó una auxina (ANA).

Inicialmente, se evaluó la capacidad de supervivencia de los explantes en los ocho tratamientos propuestos, solo en tres de estos los explantes permanecieron vivos, en los demás se pudo observar una mortalidad del 100% (Tabla 6).

Tabla 6. Respuesta de secciones foliares de *Passiflora incarnata* L cultivadas *in vitro* en medio MS, 1962 suplementado con diferentes fitoreguladores.

TRATAMIENTO	*PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA
KIN 2 mg/L	0%
BAP 1.2 mg/L, ANA 1.2 mg/L	40%
BAP 0.8 mg/L, ANA 1 mg/L	70%
BAP 0.6 mg/L, ANA 0.8 mg/L	80%
BAP 0.4 mg/L , KIN 0.8 mg/L	0%
BAP 0.8 mg/L, KIN 0.4mg/L	0%
BAP 0.8 mg/L , KIN 1.2 mg/L	0%
Control	0%

*El porcentaje se calculo teniendo en cuenta que n= 20.

De acuerdo a lo anterior, la respuesta de los explantes en los tratamientos propuestos fue diferente, observándose que en el medio de cultivo con BAP 1.2 mg/L y ANA 1.2 mg/L hubo formación de callos, en el medio de cultivo con BAP 0.8 mg/L y ANA 1 mg/L se presentó formación de brotes y diferenciación de vástagos con forma irregular, en el medio de cultivo con BAP 0.6 mg/L y ANA 0.8mg/L se obtuvo brotes y vástagos totalmente

desarrollados y en el resto de los tratamientos los explantes no muestran ninguna respuesta (figura 4,5,6 y 7).

La obtención de estos resultados se debió a la adición de una auxina (ANA) al medio de cultivo; dado que el balance auxina/citoquinina es importante, porque determina la morfogénesis del tejido cultivado *in vitro* (Barcelo et al., 2001). Esto se aprecia en las diferentes respuestas de los explantes en los tratamientos propuestos, de tal manera que se produjo callos, brotes y vástagos, dependiendo de la concentración de auxina o citoquinina utilizada, adicionalmente en los medios de cultivo en los que hubo solamente presencia de citoquininas los explantes no tuvieron respuesta.

En el cultivo *in vitro* de *Passiflora incarnata* L es importante destacar la precisión en la concentración de los fitoreguladores utilizados, pues estos determinan la vía que seguirá la morfogénesis en los explantes. Una concentración elevada de fitoreguladores puede producir alteraciones en el desarrollo de los tejidos, haciendo que el explante presente formación de callo o células indiferenciadas, volviendo más complejo el proceso de diferenciación de vástagos; por otro lado las concentraciones muy bajas no son suficientes para estimular el desarrollo del tejido, impidiendo la regeneración de la planta; en este sentido algunos trabajos realizados reportan que los altos niveles de citoquininas, son inhibidores de la organogénesis, lo cual indica que las concentraciones usadas deben ser moderadas (Bhatt y Dhar, 2000; Echeverrigaray et al., 2000).

La utilización de los fitoreguladores BAP y ANA en una concentración de 1.2 mg/L en el cultivo *in vitro* de *Passiflora incarnata* L favoreció la formación de callos (Figura 4), esto puede ser atribuido a los niveles endógenos de auxinas y citoquininas que pueden estar presentes en las secciones foliares de plantas del género *Passiflora* (Zimmerman y Scorza, 1994; Dornelas y Vieira, 1994; Hodson et al., 1994 y Babu et al., 2000). Un aspecto para tener en cuenta es que concentraciones superiores a 0.8 mg/L de BAP y ANA en el cultivo *in vitro* de secciones foliares de *Passiflora incarnata* L, producen el efecto mencionado anteriormente, haciendo más difícil la regeneración, pues el proceso de diferenciación a partir de un callo representa más tiempo, incremento en el costo de obtención de plántulas y mayor posibilidad de variación somaclonal (Otahola, 2000).

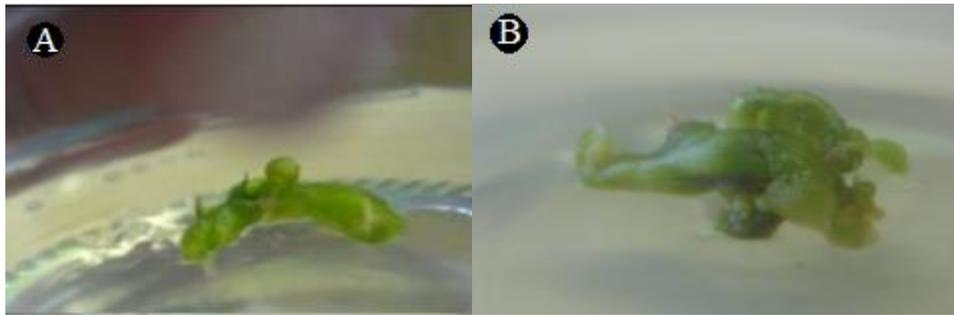


Figura 4. Callos de *Passiflora incarnata L*, obtenidos mediante cultivo *in vitro* de secciones foliares, utilizando medio MS, 1962 suplementado con BAP 1.2 mg/L y ANA 1.2 mg/L. (A) Doce días y (B) Quince después de la inoculación.

Cuando se disminuyó la concentración de fitoreguladores, es decir cuando el medio de cultivo contenía BAP 0.8 mg/L y ANA 1mg/L, pudo observarse una respuesta morfológica anormal, pues a pesar de obtener brotes, estos no lograron desarrollarse en vástagos (Figura 5).



Figura 5. Secciones de tejido foliar de *Passiflora incarnata L*, cultivadas *in vitro* en medio MS, 1962 suplementado con 0.8 mg/L de BAP y 1 mg/L, de ANA, quince días después de su inoculación.

Al utilizar una concentración menor de fitoreguladores, BAP 0.6 mg/L y ANA 0.8 mg/L, los brotes obtenidos, se diferenciaron totalmente en vástagos, continuando su desarrollo normal, por la vía de la organogénesis directa (figuras 6 y 7).

La relación entre la concentración de fitoreguladores que fue utilizada para conseguir esta respuesta, puede explicarse porque el BAP promueve la multiplicación celular induciendo la formación de brotes y el ANA promueve la elongación celular, permitiendo la diferenciación de vástagos (Martin y Juniper, 1970).

Trabajos realizados en especies del mismo género difieren del presente estudio en cuanto a la concentración de fitoreguladores utilizados para inducción de organogénesis directa en secciones foliares cultivadas *in vitro*, por ejemplo en *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. molissima*, *P. giberti*, *P. maliformis* y *P. amethystina*, la organogénesis tuvo lugar a los 28 días de cultivo *in vitro* en medio MS, 1962 con una concentración de 1.0 mg /L de BAP. Por otro lado, la mejor respuesta organogénica para *P. cincinnata*, fue obtenida en medio de cultivo MS, 1962 con 0.5 mg / L de BAP (Dornelas y Vieira, 1994).

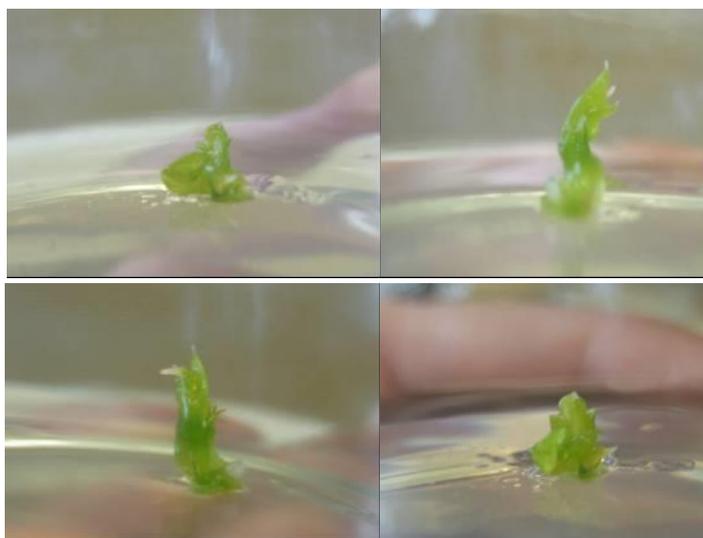


Figura 6. Secciones de tejido foliar de *Passiflora incarnata* L, cultivadas *in vitro* en medio MS, 1962 suplementado con 0.6 mg/ L de BAP y 0.8 mg/L de ANA, cinco días después de su inoculación.

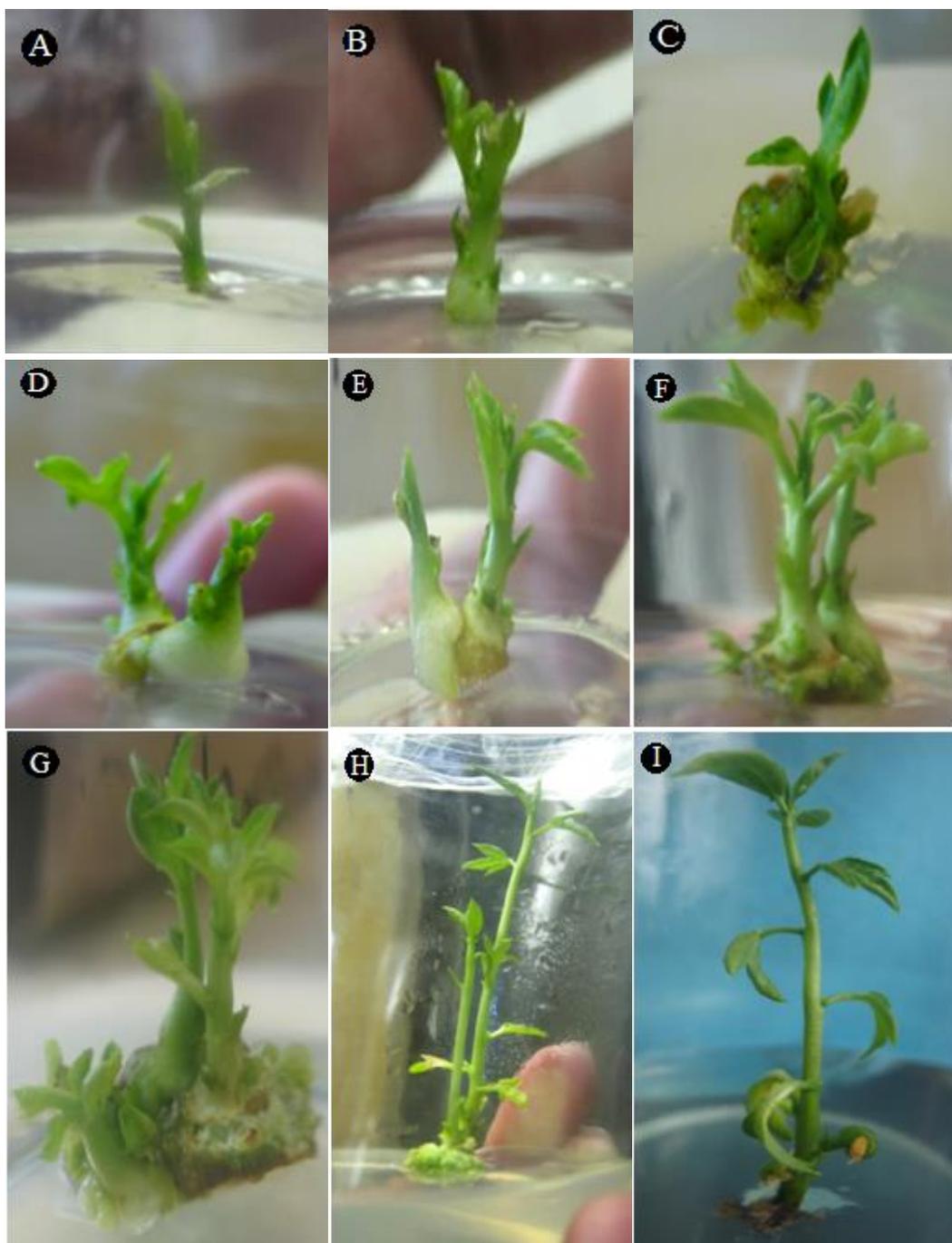


Figura 7. Vástagos de *Passiflora incarnata L.*, obtenidos mediante cultivo *in vitro* de secciones foliares en medio MS, 1962 suplementado con 0.6 mg/L de BAP y 0.8 mg/L de ANA, (A) Ocho días, (B) diez días, (C) Doce días, (D, E) quince días. (F, G) veinte días y (H, I) treinta días después de su inoculación.

7.3.2.1. Análisis Estadístico.

7.3.2.1.1. Promedio de brotes.

El promedio de brotes obtenidos correspondiente al segundo experimento en *Passiflora incarnata* L en los tratamientos donde los explantes se mantuvieron vivos, se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Promedio de brotes obtenidos mediante cultivo *in vitro* de secciones foliares de *Passiflora incarnata* L en medio MS, 1962 suplementado con BAP y ANA, dos, cuatro y seis semanas después de la inoculación de los explantes.

	Tratamiento	Media	N
Numero de brotes segunda semana	BAP 1.2 mg/L ANA 1.2 mg/L	0,6	20
	BAP 0.6 mg/L ANA 0.8 mg/L	1,65	20
	BAP 0.8 mg/L ANA 1 mg/L	0,1	20
Numero de brotes cuarta semana	BAP 1.2 mg/L ANA 1.2 mg/L	0,65	20
	BAP 0.6 mg/L ANA 0.8 mg/L	2,,3	20
	BAP 0.8 mg/L ANA 1 mg/L	0,15	20
Numero de brotes sexta semana	BAP 1.2 mg/L ANA 1.2 mg/L	0,8	20
	BAP 0.6 mg/L ANA 0.8 mg/L	3,1	20
	BAP 0.8 mg/L ANA 1 mg/L	0,15	20

El análisis de varianza (ANOVA), permitió determinar que existen diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto al número de brotes de *Passiflora incarnata* L producidos por semana (Tabla 8).

De acuerdo al promedio de brotes obtenidos en los tratamientos durante las semanas 2, 4 y 6 se observó una mejor respuesta en el medio que contiene los fitoreguladores BAP 0.6 mg/L y ANA 0.8 mg/L (Figura 8).

Tabla 8. Análisis de varianza para número de brotes producidos por semana mediante cultivo *in vitro* de secciones foliares de *Passiflora incarnata L.*

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Semanas*Nº de brotes	Inter-grupos	9,075	1	9,075	41,46	***
	Intra-grupos	0,025	1	0,025	0,348	
Semanas*Tratamiento	Inter-grupos	10,950	2	5,475	25,01	***
	Intra-grupos	0,050	2	0,025	0,348	

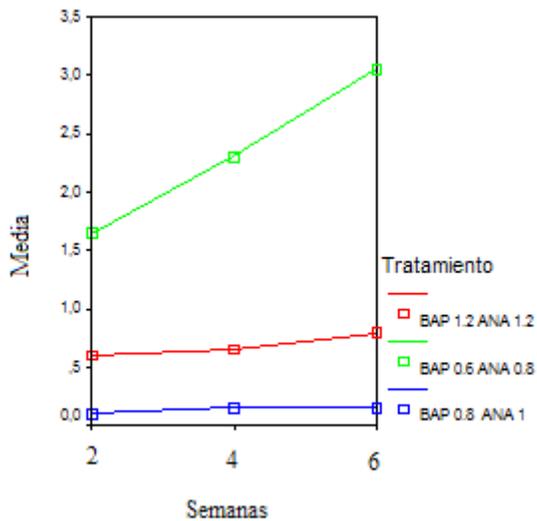


Figura 8. Promedio de brotes obtenidos mediante cultivo *in vitro* de secciones foliares de *Passiflora incarnata L* en medio MS, 1962 suplementado con BAP y ANA, dos, cuatro y seis semanas después de la inoculación de los explantes.

7.3.2.1.2. Número de vástagos obtenidos.

Dado que los datos se ajustan a una distribución normal y son paramétricos se realizó un análisis de varianza (ANOVA), esta prueba indicó diferencias altamente significativas entre los tratamientos, en cuanto al número de vástagos obtenidos (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de varianza para número de vástagos obtenidos mediante cultivo *in vitro* de secciones foliares de *Passiflora incarnata* L.

	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F	Significancia
Inter-grupos	28,033	2	14,017	14,540	***
Intra-grupos	54,950	57	0,964		
TOTAL	82,983	59			

Para saber en cual de los tres tratamientos la producción de vástagos de *Passiflora incarnata* L es más eficiente, se realizó la prueba de Tukey (Tabla 10).

Tabla 10. Prueba de Tukey para evaluar el mejor medio de cultivo para la obtención *in vitro* de vástagos de *Passiflora incarnata* L a partir de secciones foliares.

Medias armónicas			
Tratamiento	N	A	B*
BAP 1.2 mg/L ANA 1.2 mg/L	20	0,0	
BAP 0.8 mg/L ANA 1 mg/L	20	0,0	
BAP 0.6 mg/L ANA 0.8 mg/L	20		1,45
Sig.		1,000	1,000

*Indica el tratamiento que presenta diferencias estadísticamente significativas.

La prueba de Tukey permitió determinar que no existen diferencias significativas en la producción de vástagos en los medios de cultivo que contienen los fitoreguladores BAP 1.2 mg/L - ANA 1.2 mg/ y BAP 0.8 mg/L - ANA 1 mg/L, por el contrario el medio que contiene los fitoreguladores BAP 0.6 mg/L ANA 0.8 mg/L presenta diferencias significativas, lo que permite afirmar que es el más eficiente en la producción *in vitro* de vástagos de *Passiflora incarnata* L con respecto a los demás tratamientos.

7.4. Enraizamiento de vástagos.

Los vástagos obtenidos fueron inoculados en tres tratamientos, ANA 0.6 mg/L, AIB 0,6 mg/L y un medio desprovisto de fitoregulador para evaluar la formación de raíces.

Transcurridos quince días de inoculados los vástagos, se observó que sólo en medio de cultivo desprovisto de fitoregulador ocurre formación de raíces (figura 9); en tanto que en los otros tratamientos se observó solo elongación de los vástagos en la zona caulinar.



Figura 9. Plántulas de *Passiflora incarnata* L en la fase de enraizamiento, obtenidas mediante cultivo *in vitro* de secciones foliares, 30 días después de la inoculación de los vástagos en medio MS, 1962 desprovisto de fitoregulador.

7.4.1. Análisis Estadístico.

El análisis estadístico indicó que el 50% de los vástagos obtenidos enraizaron en medio de cultivo desprovisto de fitoregulador, mientras que en los tratamientos con fitoreguladores ANA 0.6 mg/L y AIB 0.6 mg/L, los vástagos no enraizaron (Tabla 11 y Figura 10).

Tabla 11 Porcentaje de vástagos de *Passiflora incarnata L* enraizados en medio MS, 1962, provisto y desprovisto de fitoregulador.

			VASTAGOS ENRAIZADOS
TRATAMIENTO	CONTROL	Recuento	50%
		% de TRATAMIENTO	
ANA 0.6 mg/L		Recuento	0%
		% de TRATAMIENTO	
AIB 0.6 mg/L		Recuento	0%
		% de TRATAMIENTO	

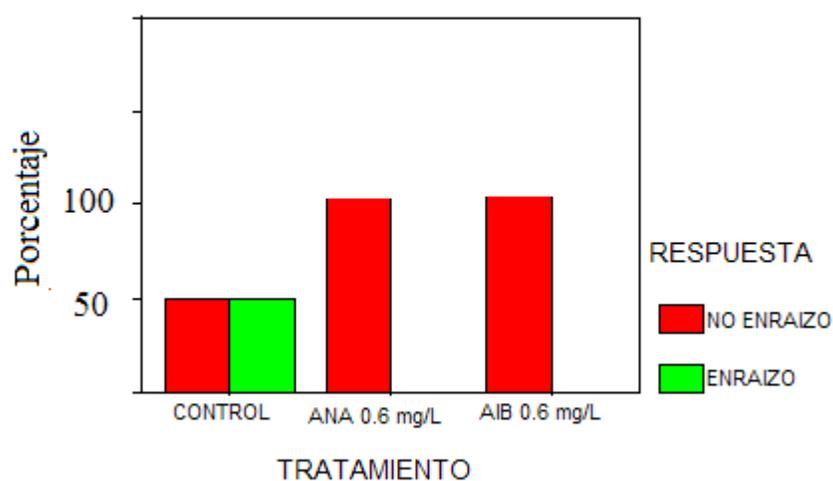


Figura 10. Porcentaje de vástagos de *Passiflora incarnata L* enraizados en medio MS, 1962, provisto y desprovisto de fitoregulador.

Los resultados para enraizamiento *in vitro* de vástagos de *Passiflora incarnata* L, utilizando medios de cultivo sin fitoreguladores, son similares a los reportados en *Passiflora edulis* f. Flavicarpa (Kawata et al., 1995; Otahola, 2000), esto se debe probablemente a que los niveles endógenos de auxina son suficientes para promover esta respuesta morfogénica (Dornelas y Vieira, 1994; Forero, 1999).

Finalmente, haber obtenido los resultados deseados, es el principal aporte de este trabajo, porque se propuso una metodología para el establecimiento *in vitro* de secciones foliares de *Passiflora incarnata* L, logrando la diferenciación de vástagos, su enraizamiento y por tanto la regeneración de plántulas, de igual manera el presente estudio ofrece la posibilidad de aplicar la técnica a mayor escala de producción, permitiendo estudios mas complejos, que contribuyan al mejoramiento de la calidad y productividad en este tipo de planta, que puede ser cultivada con fines tanto investigativos como comerciales.

8. CONCLUSIONES.

- Se optimizó un método de desinfección eficiente, lo cual fue esencial para el éxito en el establecimiento del cultivo *in vitro* de secciones foliares de *Passiflora incarnata* L.
- El uso solamente de citoquininas (BAP y KIN) como fitoreguladores en el medio de cultivo *in vitro* para secciones foliares de *Passiflora incarnata* L, no promueve la formación de brotes y desarrollo de vástagos.
- Los fitoreguladores BAP 0.6 mg/ L y ANA 0.8 mg /L, determinaron la vía morfogénica en secciones foliares de *Passiflora incarnata* L cultivadas *in vitro* induciendo el desarrollo de vástagos por organogénesis directa.
- Concentraciones de fitoreguladores BAP y ANA superiores a 0.8 mg/ L, promueven la formación de callos o un desarrollo anormal de vástagos en secciones foliares de *Passiflora incarnata* L cultivadas *in vitro*.
- La rizogénesis en vástagos de *Passiflora incarnata* L se logra en un medio de cultivo desprovisto de fitoreguladores, por tal razón se puede decir que esta planta posee niveles endógenos de auxina, que son los responsables de este proceso.
- La capacidad morfogénica de secciones foliares de *Passiflora incarnata* L, se evidencia en la producción de brotes y la obtención de vástagos, que finalmente por el proceso de rizogénesis permiten la regeneración de plántulas.

9. RECOMENDACIONES.

Para el cultivo *in vitro* de secciones foliares de *pasiflora incarnata* L se recomienda lo siguiente:

1. Si se elige como agente gelificante el Phytigel ®, se debe adicionar ácido pantoténico al medio de cultivo, de lo contrario se presentan dificultades para su polimerización.
2. Realizar subcultivos frecuentemente, pues la disponibilidad de nutrientes en el medio utilizado, permite que el material permanezca viable y pueda alcanzar su mayor grado de desarrollo.
3. Para promover el desarrollo de vástagos se debe utilizar medio MS, 1962 suplementado con los fitoreguladores BAP y ANA en concentraciones 0.6 mg/L y 0.8 mg/L respectivamente.
4. El enraizamiento de vástagos se logra en medio de cultivo desprovisto de fitoregulador.

BIBLIOGRAFIA.

ACOSTA, L., GRANADA, M. Apuntes sobre el cultivo de plantas medicinales en Cuba *Passiflora incarnata* L. Revista Cubana Farm 19; (2): 301-304. 1985

AMUGUNE, N., GOPALAN, H., BYTEBIER, B. Leaf Disc Regeneration of Passion fruit. African Crop Science Journal. 1 (2): 99 – 104.1993.

ANESINI, C. y PEREZ, C. Screening of plants used in argentine folk medicine for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology. (39): 119-128. 1993.

APPEZZATO, B., CARNEIRO, M., DORNELAS, M. Anatomical studies of in vitro organogenesis induced in leaf – derived explants of Passionfruit. Pesq. Agropec. 11 (34): 2007-2013. 1999.

BABU, K., ANU, A., REMASHREE, A., PRAVEEN, K. Micropropagation of curry leaf tree. Plant cell, Tissue and Organ Culture (61): 199 – 203. 2000.

BARCELO, P., RASCO-GAUNT, S., THORPE, C., LAZZERI, P. Transformation and gene expression. Advances in botanical research, Biotechnology of cereals. Academic Press ed. London, (34): 59–126. 2001.

BECERRA, D. Efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad morfogenética de dos especies de *Passiflora* (*Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey y *Passiflora edulis*, var *Flavicarpa*) cultivadas *in vitro*. Tesis de grado. Universidad Javeriana. Bogotá. 2003.

BERGNER, P. Passionflower. Medical Herbalism (7): 1995.13–14p.

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

BOFFINO, A., TOKIO, G., JANUZZI, B., MARTINELLI, A. Regeneracao in vitro de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. Scientia Agricola 3 (57): 571-573.2000.

BRAIDG, H. Otras *Passifloras* promisorias. Memorias. Primer simposio Internacional de *Passifloras*. Palmira. Colombia. 1991. 240 – 241p.

BRUNT, A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M., GIBBS, A. 1996. Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version 20 Plant viruses [on line] Tomado de la world wide web <http://biology.anuedu.au/Groups/Mes/vide/>.

BUSILACCHI, H., SEVERIN, C., GATTUSO, M., AGUIRRE, A., DISAPIO, O., GATTUSO, S. Field cultura micropropagated *Passiflora caerulea* L. Histological and chemical studies. *Plant Med Aromaticas* 7(5): 257- 263. 2008.

CANCINO, G. y HODSON, E. Cultivo de tejidos y micropropagación en Maracuyá. *Passiflora edulis* var. *Flavicarpa*. Degener. *Revista del convenio Andrés Bello*. 18 (47): 81 – 83. 1994.

CHACON, C. Passion fruit, *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener, cultivation in Colombia. Simposio Internacional de Passifloras, Palmira (Colombia). Fundación, Centro Frutícola Andino. Palmira. 1991. 147 – 152p.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. Allen Press. New York Botanical Garden U.S.A. 1978. 396p.

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

DORNELAS M. y VIEIRA, M. Plant Regeneration from Protoplast Cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, and *P. cincinnata*, Mast. *Plant Cell Reports*. (13): 103-106. 1994.

DORNELAS M., y CARNEIRO M. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant cell, Tissue and organ Culture*. (36): 211- 217. 1994.

DUKE. J. A. y FOSTER. S. A Field Guide to Medicinal Plants. Eastern and Central N. America. Houghton Mifflin Co. 1990.

DREW, R. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (26): 23- 27. 1991.

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

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

ESCOBAR L. La sistemática y evolución de las *Passifloras*. Memorias del Primer Simposio Internacional de *Passifloras*. Centro Frutícola Andino. Cali, Colombia. 1991. 51-54p.

FELTER, H. and LLOYD, J. King's American Dispensatory Reprint by Eclectic Medical Publications, Portland. 1983.

FLORES, D., BRENES, J., GUZMÁN, A. Propagación por estacas y estudio preliminar del establecimiento *in vitro* de granadilla (*Passiflora ligularis*, juss). Tecnología en Marcha. (18). 1998.

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

FORNET, E. Micoflora de plantas medicinales III. Plant Med (5):87-95. 1985.

FUENTES, V., HERNANDEZ, L., RODRIGUEZ C., SANCHEZ, P., MENDEZ, G. Instructivo técnico del cultivo de *Passiflora incarnata* L. REVISTA CUBANA PLANT MED 5 (3): 118 – 22. 2000.

GONGORA, G., CANCINO, G., HODSON, E. Programa de Biotecnología en especies frutales, promisorias. III congreso. La investigación en la universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. 1992. 565 – 570p.

GOUVEIA, J. El cultivo de Maracuyá. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. FAO. Resumen de las conferencias dictadas durante la reunión celebrada en Manizales. Colombia. 1987. 79 – 90p.

GUZZO, F., CEOLDO, S., ANDREETTA, F., LEVI, M. *In vitro* Culture From Mature Seeds of *Passiflora* species. Agric. (Piracicaba, Braz.), 1 (61): 108-113. 2004.

HANDLER, N. The First Hahnemann Symposium. Lea and Febiger, Philadelphia. Psychomimetic Medicine. 1962.

HARTMANN, H., KESTER, D., DAVIES, F. Plant Propagation. Principles and practices. Sixth edition. Prentice Hall. New Jersey. USA. 1997. 770p.

HEYWOOD, V. Plantas con Flores edición en español. Editorial Reverte S.A. España. 1985. 98 – 99p.

HODSON, E., GONGORA, G., CANCINO, G., OTONI, W., DAVEY, J. Plan of regeneration of explants of *Passiflora edulis* var *flavicarpa*. Degener. Unidad de

Biotecnología Vegetal. In Memories: International Symposium of Plant Genetic engineering. La Habana, Cuba. 1994.

IJJASZ, I. y EMOKE, S. Maracuyá (Fruto de la pasión). Editorial panamericana. Santa fe de Bogotá. Colombia. 1999. 48p.

KAMALDEEP, D., SURESH K., ANUPAM S. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. Fitoterapia (72): 922- 926. 2001

KANTHARAJAH, A. y DODD, W. In vitro of micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruits). Annals of Botany. (65): 337- 339. 1990.

KAWATA, K., USHIDA, C., KAWAY, F., KANAMORI, M., KURIYAMA, A. Micropropagation of Passion Fruit from Subcutured Multiple Shoot Primordia. J. Plant Physiol. (174): 281 – 284. 1995.

KILLIP, E. The American Species of passifloraceae. Field museum of natural History. Vol 19 Part 1 and 2. Chicago USA. 1938. 613p.

KUMAR, S., SARKAR, A., KUNHIKANNAN, C. Regeneration of plants from leaflet explants of tissue cultured raised safed siris. Plant cell tissue and organ culture. (54): 137 – 143. 1998.

LAD, V., 2000. Lad's Ayurvedic Institute Ayurveda Herba Materia Medic. [on line] Tomado de la world wide web. <http://www.ayurvedacom>.

LANE, W., IKETANI, H., y HAYASHI, T. Shoot regeneration from culture Leaves of Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia*). Plant Cell Tissue and Organ Culture. (54):9- 14.1998.

LEMES, C. y RODRIGUEZ., C. El cultivo de *Passiflora incarnata* L. En las condiciones de Cuba. Resúmenes IX Congreso internacional de Medicina Tradicional. Ciudad de la Habana. 1994.

LUTOMSKI, A. Pharmacological investigations of raw materials of the genes *Passiflora*. The comparision of contents of alkaloids in some harmans raw materials. Planta Med. 27(4): 381-6. 1975.

MALUF, E., BARROS, H., FROCHTENGARTEN, M. Sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis*. Food Chem (85): 189-94. 1991.

MARTIN, J., y JUNIPER, B. The Cuticles of Plants. Editorial Edward Arnold, England London. 1970.

MEDINA J., PALADINI A., WOLFMAN C., LEVI-DE-STEIN, M., CALVO, D., DIAZ, L., PENA, C.. Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. *Biochem-Pharmacol.* 40(10): 2227-31. 1990.

MINGOZZI, M., LUCCHESINI, M., MENSUALI-SODI, A. La propagacion in vitro de *Passiflora incarnata* L. *Culture Protette* (9): 139- 144. 2003

MORO, C. y BASILE, G. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata* L. Obesity and medicinal plants. *Fitoterapia* (71) Supplement 1, 73-82. 2000.

NICOLLS, J., BIRNER, J., FORSELL, P. Passicol, an antibacterial and antifungal agent produced by *Passiflora* plant species: qualitative and quantitative range of activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* (3): 110-117. 1973

OTAHOLA, V. Regeneracion de plantas de Parchita (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. *Bioagro.* 12 (3): p.71-74.2000.

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

PACHECO, L., DA SILVA PASSOS, R., STOLF, M., APPEZZATO-DA-GLORIA, B. *In vitro* Shoot regeneration from roots and leaf Disc of *Passiflora cincinnata* Mast. *Biology an Techlogy.* (50): 239 -247. 2007.

PALADINI, A. Cómo se descubre o inventa un medicamento. *Ciencia Hoy* 6 (34): 32-43. 1996.

PARRA, A., RAMOS, A., BETANCOURT, J., GARCÍA, A., PILOTO, J., DÉCALO, M. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) *Passiflora incarnata* L. y *Senna alata* L. Estudio toxicogenético que emplea 2 sistemas de ensayos a corto plazo *REVISTA CUBANA PLANT MED.* 7(1):27-31. 2002.

PENDAS, F. Lista descriptiva de insectos que atacan a las plantas medicinales. *Bol Reseñas Plant Med.* (5):29. 1983.

PERRY, N., ALBERTSON, G., BLUNT J., COLE, A., MUNRO, M., WALTER, J. 4-hydroxi-2- cyclopentenone: an anti – pseudomonas and citotoxic component from pasiflora tetrandia. *Planta medica,* (57): 129 -131. 1991.

PIERIK, R. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundiprensa. España. 1990. p 15-126.

PROJOROV, V. y FORNET, E.. Sobre la micoflora de plantas medicinales L. Rev Plant Med. (4):89 – 95. 1984.

RAFFAELLI, A., MONETI, M., MERCATI, V., TOJA, E. Journal of chromatography. 1(777): 223-231. 1994.

RAMOS, A., DE LA TORRE, R., ALONSO, N., VILLAESCUSA, A., BETANCOURT, J., VIZOSO, A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. J Ethnopharmacol. 52 (3): 123-7. 1996.

REHWALD, A., STICHER, O., MEIEV, B. Trace analysis of harman alkaloids in *Passiflora incarnata* L by reverse phase high performance liquid chromatography. Phytochemical Analysis. (6): 96-100. 1995.

ROCA, W.M. y MROGINSKI, L. A Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT, Cali, Colombia. 1983, 20 p.

SCHWARTZ, S. Psychoactive Herbs in Veterinary Behavior Medicine. Publicado por Blackwell Publishing. 2005. 400 p.

SCORZA, R., JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. Journal of the American Society for Horticultural Science, Geneva, (105): 892-897. 1980.

SEVERIN, C., SALINAS, A., GATTUSSO, S., GATTUSSO, M., BUSILACCHI, H., GIUBILEO, G., AGUIRRE, A. Estimulación de la Germinación de semillas de *Passiflora carulea* L. cultivadas *in vitro*. Revista de investigaciones de la facultad de ciencias agrarias. Número VI. 2004.

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

SOULIMANI, R., YOUNOS, C., JARMOUNI, S., BOUSTA, D., MISSLIN, R., MORTIER, F.. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol the mouse. Journal of Ethno pharmacology. 1(57):11-20 1997.

SVANIDZE, N., SANCHEZ, A., LANOVENKY, B., SOLER, P., RODRIGUEZ, A., SUAREZ, G. Resultados de la introducción y estudios farmacognósticos de la *Passiflora incarnata* L. Rev Cubana. Farm. 8 (3): 309 – 14. 1978.

TAIZ, L., Y ZEIGER, E. Plant Physiology. Second Edition. Sinauer Associates. Inc. Publishers. Sunderland. Massachusetts. USA. 1988. 792p.

TAYLOR, L. Maracuya, Herbal Secrets of the Rainforest. Prime Publishing Inc., Austin. 1996.

URIBE, L. Catalogo ilustrado de plantas de Cundinamarca. Universidad Nacional, Instituto de Ciencias Naturales. Bogotá. Colombia 1972. (15)165p.

VANDERPLANK, S., VANDERPLANK, J., DOUGLAS, A., KHAN, I., SCHEFFLER, B. Phylogenetic Relationships in Passiflora (Passifloraceae), Investigated using the Internal Transcribed Spacers nrDNA. Interim Symposium on Botanicals and Dietary Supplements. Monterey, California, USA. 2001.

VASUDEV, V. Dhanwantri Banoshdhi Visheshank. Gurukul Kangri Prakashak, Haridwar, India. 1955. 364–366p.

VECCHIA, M. 2000. Genere Passiflora. [on line] Tomado de la world wide web. <http://www.Passiflora.it/>. 7p.

VON-EIFF, M., BRUNNER, H., HAEGELI, A., KREUTER, U., MARTINA, B., MEIER, B., SCHAFFNER, W. Passion flower extract and improvement in physical exercise capacity of patients with dyspnoea class II of the NYHA functional classification. Acta, Therapeutica. 1-2 (20): 47-66. 1994.

WICHTL, M. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. Ed. Max Wichtl, traducción N. Bisset. Medpharm Scientific Publisher. CRC Press. 1994.

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

Passiflora incarnata L. [on line] Tomado de la world wide web www.botanik-fotos.de