

Estandarización de un protocolo de micropropagación de *Passiflora maliformis* L (PASSIFLORACEAE) a partir de semillas y segmentos nodales

Standardization of a micropropagation protocol of *Passiflora maliformis* L (PASSIFLORACEAE) from seeds and nodal segments

Ana Milena Castrillón Toscano*, César Augusto Hernández Rendón**, Elena Paola González Jaimes***, Luis Fernando Restrepo-Betancur****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v26n2.115691

RESUMEN

En Colombia, la producción frutícola ha avanzado debido a la creciente demanda de frutas tropicales, entre las cuales se destaca la cholupa (*Passiflora maliformis* L.), una especie endémica con potencial comercial. Sin embargo, la falta de información agronómica y material vegetal uniforme, ha limitado su expansión en el mercado. Este estudio, se centró en establecer un protocolo de propagación *in vitro* para la cholupa, utilizando semillas y segmentos nodales. Se realizaron tres tratamientos de desinfección de semillas, resultando el tratamiento 3 con etanol 70% por 2 minutos y NaClO 2.5% por 15 minutos con 2 gotas de Tween 20® con la mayor efectividad (77%). Para los segmentos nodales, el tratamiento 2 con 2 g L⁻¹ de Benomyl® por 15 minutos, Isodine® 3%, NaClO 2% por 10 minutos y 2 gotas de Tween 20® mostró un 67% de efectividad, destacando el uso de Benomyl® para el control de hongos. En la etapa de establecimiento, tanto las semillas como los segmentos nodales se sembraron en el medio de cultivo MS (1962). La germinación de semillas fue del 100% para el tratamiento sin hormonas y para los tratamientos con 1 mg/L⁻¹ de BAP y con 1 mg/L⁻¹ K, observándose más brotes con K. Los segmentos nodales mostraron un 80% de efectividad en crecimiento con 1 mg/L⁻¹ de K. Ambos, semillas y segmentos nodales, demostraron buena capacidad de regeneración y respuesta a la propagación *in vitro*. Este protocolo, establece una base para la obtención de material vegetal homogéneo y de alta calidad, contribuyendo a la valorización y expansión comercial de la cholupa en Colombia y potencialmente en mercados internacionales.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, pasifloras, reguladores de crecimiento, organogénesis, germinación.

* Ingeniera Agropecuaria. Politécnico colombiano Jaime Isaza Cadavid, Carrera 48 # 7-151. ana_castrillon86191@elpoli.edu.co

** MSc en Biotecnología, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Carrera 58 No 27B- 125, cahernandez@elpoli.edu.co, <https://orcid.org/0009-0007-2477-2602>

*** PhD en Producción vegetal, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid Carrera 48 #7-151. epgonzalez@elpoli.edu.co

****Especialista en Estadística y Biomatemáticas. Docente Universidad de Antioquia. Carrera 75 No 65- 87, frbstatistical@yahoo.com.es, lfernando.restrepo@udea.edu.co. <http://orcid.org/0000-0002-8583-5028>.

ABSTRACT

In Colombia, fruit production has advanced due to the growing demand for tropical fruits, among which the cholupa (*Passiflora maliformis* L.) stands out, an endemic species with commercial potential. However, the lack of agronomic information and uniform plant material has limited its expansion in the market. This study focused on establishing an *in vitro* propagation protocol for the cholupa, using seeds and nodal segments. Three seed disinfection treatments were carried out, resulting in treatment 3 with 70% ethanol for 2 minutes and 2.5% NaClO for 15 minutes with 2 drops of Tween 20® with the highest effectiveness (77%). For the nodal segments, treatment 2 with 2 g L-1 of Benomyl® for 15 minutes, 3% Isodine®, 2% NaClO for 10 minutes and 2 drops of Tween 20® showed 67% effectiveness, highlighting the use of Benomyl® for fungal control. At the establishment stage, both seeds and nodal segments were sown in the MS (1962) culture medium. Seed germination was 100% for the treatment without hormones and for the treatments with 1 mg/L-1 BAP and 1 mg/ L-1 K, with more buds observed with K. The nodal segments showed 80% of effectiveness in growth with 1 mg/L-1 of K. Both seeds and nodal segments demonstrated good regeneration capacity and response to *in vitro* propagation. This protocol establishes a basis for obtaining homogeneous and high-quality plant material, contributing to the valorization and commercial expansion of cholupa in Colombia and potentially in international markets.

Keywords: *In vitro* culture, passionflowers, growth regulators, organogenesis, germination.

Recibido: julio 10 de 2024 **Aprobado:** octubre 20 de 2024

INTRODUCCIÓN

En Colombia, la producción frutícola ha experimentado un proceso de tecnificación significativo en los últimos años, impulsado por la creciente demanda tanto a nivel nacional como internacional de frutas tropicales exóticas. (Ocampo *et al.*, 2015). Entre las pasifloras se encuentran especies como maracuyá (*Passiflora edulis* L.), granadilla (*Passiflora ligularis*), gulupa (*Passiflora edulis f. edulis*), cholupa (*Passiflora maliformis*) y curuba (*Passiflora tripartita*), todas de importancia en el sector agrícola nacional y en la comercialización de los mercados internacionales (Viuche 2017).

Las pasifloras se encuentran distribuidas en 24 departamentos y 422 municipios de Colombia, con un área cultivada que supera las 19.000 ha para el año 2020. Estas áreas están mayoritariamente representadas por pequeños productores, quienes, en conjunto con sus familias, realizan las labores generales del cultivo, generando un promedio de 4 empleos directos por ha, y en épocas productivas, entre 8 y 10 empleos, dependiendo de la especie cultivada. La producción nacional alcanzó 220.920 toneladas, con un rendimiento promedio de 13,3 toneladas por ha (Triana y de Pasifloras 2020). Los departamentos de Huila y Antioquia se destacan en la producción de pasifloras, representando más del 20% de la producción nacional; Huila lidera en área sembrada, mientras que Antioquia se destaca en la producción total (Orrego *et al.*, 2021).

El Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural en el año 2019, identificó unos 5.511 productores, distribuidos

mayormente en los departamentos de Antioquia, Valle, Huila, Boyacá y Meta. Las especies priorizadas por el organismo nacional fueron el maracuyá, la gulupa, la granadilla, la curuba, la cholupa y la badea. Hacia el año 2021, en el departamento del Huila, FedePasifloras (Federación Colombiana de Productores de Pasifloras), reportó un área cosechada de cholupa de 289 ha, con una producción de 2074 ton y un rendimiento promedio de 8 ton/ha, (Orrego *et al.*, 2021). Otras fuentes reportaron rendimientos entre 30 y 50 ton/ha, con una estimación de rendimiento para el primer año de 7.2 ton, para el segundo de 20.4 ton y para el tercero de 20.4 ton. Desde el año 2007, el departamento del Huila cuenta con el sello de Denominación de Origen Protegida para la cholupa (Resolución 43536 de 2007), debido a la tradición de más de 30 años de cultivo de la especie en la región. A pesar de su denominación, este cultivo sigue siendo poco conocido entre los consumidores debido a la limitada difusión de conocimientos técnicos, lo cual ha impedido su reconocimiento como una especie con alto potencial para los mercados nacionales e internacionales. Esta fruta exótica tropical podría representar una alternativa viable para los agricultores, especialmente en el contexto del posconflicto y el desarrollo rural integral que se está impulsando en la actualidad en el país (Lalinde 2021).

La especie *Passiflora maliformis* L más conocida como cholupa, es un bejuco o arbusto trepador, posee hojas alternas, pecioladas, sencillas lobuladas. Sus pétalos exteriores suelen ser de un color blanco o crema, mientras que los filamentos centrales de la corona presentan una mezcla de colores, que puede incluir tonos púrpura,

azul, y blanco. La combinación de estos colores crea un efecto visual vibrante y característico de las flores del género *Passiflora*, es de sabor dulce, con cáscara cariácea y dura (Betancur *et al.*, 2006; Ocampo *et al.*, 2015).

P. maliformis es una especie endémica de Colombia, lo que le confiere adaptaciones particulares para crecer en su ambiente nativo. Sus características organolépticas y de resistencia a enfermedades, la convierten en una especie promisoría para su valoración a nivel nacional e internacional (Vargas y Díaz 2017). Sin embargo, es poco conocida a pesar de contar con una denominación de origen en el departamento del Huila (Barragán 2010).

Es fundamental implementar métodos y herramientas biotecnológicas que promuevan la conservación y valoración de especies endémicas, particularmente en la región Andina, como el cultivo de tejidos (Segretín, 2013). Existen evidencias de investigaciones sobre la propagación *in vitro* de las especies de *Passiflora*, más relevantes en Colombia desde un punto de vista económico y comercial, como la gulupa, la maracuyá, la granadilla y la curuba (Manjarrés y Perea 2012); Gutiérrez *et al.*, 2011), sin embargo, estos estudios se han enfocado principalmente en maracuyá (Bernal *et al.*, 2018), mientras que especies como la cholupa han sido menos investigadas y cuentan con escasa información disponible.

En este estudio se establecieron las bases para un protocolo de propagación *in vitro* a partir de semillas y segmentos nodales de *cholupa* (*Passiflora maliformis* L), con el objetivo de ser utilizado en futuros estudios orientados a la obtención de material vegetal sano, homogéneo y de alta calidad genética, destinado al mercado nacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio

Este estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, adscrito al Centro de Laboratorios y Experimenta-

ción (CLE), ubicado en el municipio de Bello, Barrio Cañas, Medellín, Colombia.

Obtención del material vegetal

El material vegetal se recolectó en un predio familiar ubicado en el barrio La Doctora, municipio de Sabaneta, departamento de Antioquia, Colombia, con posición a 6°08'31.0"N 75°36'48.2"W, a 1551 msnm.

Los explantes fueron seleccionados a partir de una planta madre de *Passiflora maliformis* L (cholupa), de la cual se recolectaron segmentos nodales y semillas provenientes de frutos maduros. Las semillas extraídas de los frutos maduros recolectados en campo, fueron colocadas en un beaker con agua desionizada estéril para imbibición durante cuatro días, eliminando aquellas que no se precipitaron. Posteriormente, las semillas fueron lavadas con agua corriente y friccionadas contra un tamiz para remover el arilo. Luego, se secaron sobre papel absorbente a temperatura ambiente durante dos días, y finalmente, fueron almacenadas en un frasco plástico bajo condiciones de refrigeración a 8°C.

Desinfección de semillas

De acuerdo con la metodología descrita por Parrado (2023), antes de la desinfección, las semillas se sometieron a un tratamiento pregerminativo con ácido giberélico (AG₃) durante 24 horas. Para facilitar la germinación y superar la impermeabilidad de la testa, las semillas fueron escarificadas manualmente (Miranda *et al.*, 2009). Posteriormente, se realizó un despunte basal de la testa, y las semillas se sumergieron durante 5 minutos en agua desionizada para rehidratar los tejidos.

Una vez realizado el pretratamiento, se llevó a cabo el proceso de desinfección utilizando tres tratamientos diferentes, cada uno con 26 semillas. En todos los casos, las semillas fueron inicialmente sumergidas en etanol 70%, seguido por hipoclorito de sodio (NaClO) 2.5%, con tiempos de exposición variables según el tratamiento. Además, se añadieron 2 gotas de Tween 20® por cada 100 ml de solución desinfectante para mejorar la acción

Tabla 1. Tratamientos realizados para la desinfección de semillas de *Passiflora maliformis* L.

Tratamientos	Desinfectantes	No. de semillas utilizadas
1	1 min etanol 70%, 20 min NaClO al 2.5% + 2 gotas Tween 20®	26
2	1.5 min etanol 70%, 25 min NaClO al 2.5% + 2 gotas Tween 20®	26
3	2 min etanol 70%, 15 min NaClO al 2.5% + 2 gotas Tween 20®	26

Tabla 2. Tratamientos realizados para la desinfección de segmentos nodales de *Passiflora maliformis* L.

Nº Tratamiento	Dosis	Nº segmentos nodales evaluados
1	Isodine® al 3% y NaClO al 1% por 15 min, etanol al 70 % por 1 min.	54
2	2 g L ⁻¹ Benomyl® a 150 rpm x 15 min, Isodine® al 3% y NaClO 2% por 10 min + 2 gotas Tween 20®.	54
3	Ridomil® a 150 rpm x 4 horas + 40 gotas de Isodine®, etanol al 70% x 1 min, NaOCl al 1% x 15 min + 2 gotas Tween 20®	54

de los agentes. De acuerdo con el procedimiento de Bernal *et al.* (2018), tras la desinfección, las semillas fueron enjuagadas cinco veces con agua desionizada estéril.

El número de semillas contaminadas y el porcentaje de contaminación fueron evaluados a los 3, 5, 7, 10 y 15 días posteriores a la siembra. Los distintos tratamientos de desinfección realizados se resumen en la Tabla 1.

Desinfección de segmentos nodales

Los segmentos nodales fueron colectados a partir de estacas jóvenes de 8- 10 cm de ramas secundarias apicales aparentemente sanas, vigorosas y productivas, sin daños mecánicos y libres de enfermedades; estas ramas fueron envueltas en papel absorbente húmedo y llevadas en nevera refrigerada hasta el laboratorio.

Se obtuvieron segmentos nodales de 2 cm de longitud, cada uno con una yema, a partir de las estacas. Para la desinfección, se tomaron como referencia los métodos descritos por Manjarrés y Perea (2012) y Vázquez (2017), introduciendo modificaciones en los tiempos de exposición y la adición de desinfectantes específicos.

Posteriormente, bajo condiciones estériles en cámara de flujo laminar, cada segmento nodal fue sembrado en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962). Cada

Tabla 3. Combinación de reguladores de crecimiento en mg L⁻¹ utilizados para la germinación de semillas de *Passiflora maliformis* L.

TRATAMIENTOS			
K mg L ⁻¹	BAP mg L ⁻¹		
	0	1.0	1.5
0	0/0 ⁽¹⁾	1.0/0 ⁽²⁾	1.5/0 ⁽³⁾
0.5	0/0.5 ⁽⁴⁾	1.0/0.5 ⁽⁵⁾	1.5/0.5 ⁽⁶⁾
1.0	0/1.0 ⁽⁷⁾	1.0/1.0 ⁽⁸⁾	1.5/1.0 ⁽⁹⁾

Entre paréntesis se encuentra el número del tratamiento.

tratamiento estuvo compuesto por 54 segmentos nodales (54 repeticiones por tratamiento). El seguimiento de los explantes se realizó cada ocho días durante un período de dos meses. Los diferentes tratamientos realizados se detallan en la Tabla 2.

Obtención de plántulas a partir de semillas y segmentos nodales

Las semillas y los segmentos nodales se sembraron bajo condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar en el medio MS, suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹) y Phytigel® (2.8 g L⁻¹), con un pH de 5.8. Posteriormente se esterilizó el medio de cultivo en autoclave a 15 psi y 121 °C por 20 minutos. El medio de cultivo para las semillas y los segmentos nodales se suplementó con Benclaminopurina (BAP) y Kinetina (K) en diferentes concentraciones y combinaciones, como se muestra en las tablas 3 y 4. Para cada tratamiento, se utilizaron 10 semillas y 10 segmentos nodales, los cuales fueron cultivados en la cámara de flujo laminar. Para las semillas se evaluaron las variables número de brotes y longitud del tallo en cm y para los segmentos nodales se evaluó el número de hojas y la longitud de las hojas en cm a los 8, 15, 30, 45 y 60 días respectivamente.

Las condiciones de incubación de las semillas fueron bajo oscuridad durante 30 días para acelerar el proceso de germinación (Gutiérrez *et al.*, 2011), y luego se pasaron a un fotoperiodo de 12 horas de luz, suministrada por lámparas LED con una intensidad de 2000 luxes; los segmentos nodales se colocaron bajo condiciones de 12 horas de luz, ambos explantes estuvieron expuestos a una temperatura de 22± 1°C. En los ensayos, tanto con semillas como con segmentos nodales, cada tratamiento incluyó un total de 10 repeticiones.

Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente aleatorizado de efecto fijo balanceado con medidas repetidas en el tiempo, mediante el MODELO LINEAL GENERAL con base en la técnica multivariada MANOVA con contraste canónico de tipo ortogonal, anotando que se utilizó trans-

formación de datos por medio de la familia BOX-COX a fin de validar los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas, independencia entre errores experimentales y aleatoriedad en los términos de perturbación. Se empleó el paquete estadístico SAS University.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección de las semillas

Alvarado *et al.*, (1993, 1977) afirman que en la técnica del cultivo *in vitro*, los contaminantes más comunes son los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras, los cuales generan pérdidas considerables desde el punto de vista investigativo y económico. La contaminación puede tener dos orígenes: a. microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y b. microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio (Thorpe *et al.*, 1991).

En este estudio se evaluaron tres tratamientos de desinfección de semillas de cholupa, evaluando en cada uno de ellos la presencia o ausencia de microorganismos, principalmente hongos, bacterias y levaduras, como indicadores del porcentaje de contaminación. No obstante, no se realizó un análisis detallado de la morfología ni de la taxonomía de dichos microorganismos.

Se encontró que el tratamiento 3, presentó el índice más bajo de contaminación, con una efectividad del 77% y la más alta germinación de las semillas comparado con el tratamiento 1, que presentó una efectividad del 42% y el tratamiento 2 con una efectividad del 62 %.

Manjarrés y Perea (2012), trabajando con *Passiflora edulis* SIMS, obtuvieron un protocolo efectivo de asepsia superficial de las semillas, sin embargo, los tratamientos empleados para la germinación, no permitieron obtener la cantidad de material vegetal necesaria para continuar con las etapas siguientes, caso contrario a lo encontrado en este trabajo.

Tabla 4. Combinación de reguladores de crecimiento en mg L⁻¹ utilizados para el establecimiento de segmentos nodales de *Passiflora maliformis* L.

TRATAMIENTOS			
K mg L ⁻¹	BAP mg L ⁻¹		
	0	1.0	1.5
0	0/0 ⁽¹⁾	1.0/0 ⁽²⁾	1.5/0 ⁽³⁾
1.0	0/1.0 ⁽⁴⁾	1.0/1.0 ⁽⁵⁾	1.5/1.0 ⁽⁶⁾
2.0	0/2.0 ⁽⁷⁾	1.0/2.0 ⁽⁸⁾	1.5/2.0 ⁽⁹⁾

Entre paréntesis se encuentra el número del tratamiento.

Valencia (2022), evaluó diferentes protocolos de desinfección en semilla de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* para establecimiento *in vitro* y encontró que la desinfección con hipoclorito de sodio al 5% por 5 minutos tuvo una efectividad del 80%, lo cual es muy similar a los resultados encontrados en este estudio, igualmente observó que con hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos fue nulo el tratamiento, con yodo al 5% el porcentaje de desafección fue del 30% y con yodo al 3% fue nula la desinfección de los explantes.

En este estudio se encontró que la principal fuente de contaminación fueron bacterias de diferentes tipos pero que no fueron identificadas; además se observó que la incidencia de hongos en los diferentes tratamientos fue bastante baja.

Desinfección de los segmentos nodales

Cuando los explantes primarios se originan de plantas adultas, el establecimiento y la proliferación *in vitro* presentan dificultades, debido a la alta susceptibilidad de los cultivos a contaminaciones exógenas y endógenas, así como a la baja capacidad de respuesta de los tejidos adultos para la obtención de vitroplantas (Manjarrés y Perea 2012).

Uribe *et al.* (2008), indican que, en la etapa de establecimiento, el tratamiento de desinfección aplicado, es el factor limitante para la supervivencia y viabilidad de los explantes. Según Pedroza *et al.* (2007), la obtención de explantes para iniciar actividades de cultivo *in vitro*, necesariamente implica causar cortes o heridas en los tejidos, los cuales facilitan la entrada de nutrientes y fitohormonas, pero favorecen también la exudación de compuestos relacionados con la cicatrización y defensa contra agentes externos (principalmente patógenos), estos compuestos generalmente de estructura fenólica, son rápidamente oxidados, causando el oscurecimiento del medio de cultivo y de los tejidos, haciendo que estos se necrosen y mueran.

Rodríguez *et al.* (2008), indican que los contaminantes más comunes durante el establecimiento *in vitro* de los entrenudos procedentes de plantas adultas, son los hongos y las bacterias que habitan de manera normal en el cultivo de las mismas en condiciones naturales.

En este trabajo se encontró que el tratamiento 2, presentó el mayor porcentaje de efectividad de desinfección para el control de hongos con un 67%, comparado con el tratamiento 3 que tuvo un porcentaje de desinfección del 20%, mostrando una relación positiva entre la efectividad del tratamiento y la viabilidad de los explantes. Esto

sugiere que los componentes utilizados en la desinfección, como es el uso de Benomyl® y especialmente la mayor concentración y menor tiempo de inmersión en NaClO, resultaron eficaces para limpiar el material de manera más efectiva tanto de hongos como de bacterias.

El Benomyl ha sido reportado por Villalobos *et al.* (1999), como un fungicida utilizado como desinfectante de explantes *in vitro* que permite obtener menores porcentajes de contaminación. El Benomyl actúa por contacto y a través de su acción sistémica, es eficaz en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades fúngicas en plantas. La acción fungicida de Benomyl se basa en su capacidad para interferir con la síntesis de la membrana celular de los hongos, lo que resulta en la muerte del patógeno (Santos y Zambrano 2021). Además, el Benomyl también tiene propiedades de prevención, lo que significa que puede proteger las plantas contra futuras infecciones fúngicas (Gupta *et al.*, 2004). En la actual investigación se pudo evidenciar que este fungicida sistémico, disminuyó los porcentajes de contaminación por



Figura 1. Germinación a partir de semilla de *Passiflora maliformis* L a los 15 días en el tratamiento 1.

hongos en los segmentos nodales, al ser expuestos a éste durante 15 minutos.

El hipoclorito de sodio es usado con frecuencia para desinfección de material *in vitro* debido a su mecanismo de acción que permite eliminar los microorganismos endógenos mediante el daño de la membrana celular, provocando finalmente su lisis (Mariña 2020). En estudios previos sobre la estandarización de protocolos con especies de la familia Pasifloraceae, Manjarrés y Perea

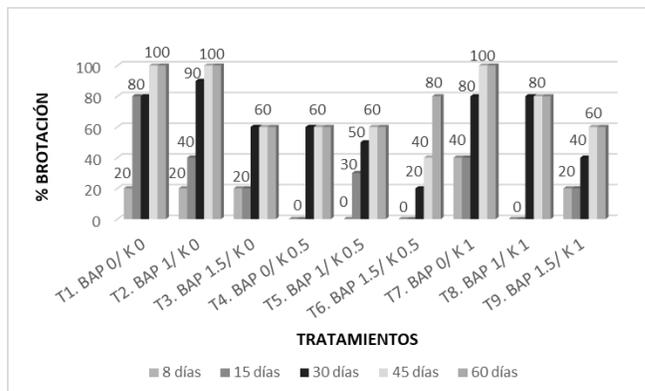


Figura 2. Porcentaje de germinación de semillas de *Passiflora maliformis* L. a los 8, 15, 30, 45 y 60 días, bajo diferentes concentraciones de BAP y K.

(2012) encontraron que, en la gulupa (*Passiflora edulis f. edulis*), el tratamiento de los explantes con hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones del 1% y 2%, resultó efectivo para la desinfección de entrenudos. De manera similar Ortiz (2009), observó en maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) que un aumento en la concentración de NaClO, junto con una reducción en el tiempo de exposición de los explantes, permitió disminuir significativamente el porcentaje de contaminación. Estos hallazgos son muy similares a los resultados obtenidos en el presente estudio sobre la desinfección de los explantes.

Efecto del BAP y la K en la germinación de semillas de *Passiflora maliformis*

Los tratamientos utilizados para estimular la germinación de las semillas, tuvieron resultados contrastantes, se observó que el tratamiento 1 o tratamiento control (sin reguladores de crecimiento), presentó una respuesta más rápida a los 15 días con el 80% de germinación, seguido por los tratamientos 2 y 7 que presentaron el 40% respectivamente (Figura 1).

A los 45 días después de realizada la siembra, los tratamientos 1, 2 y 7, mostraron un 100% de germinación. Sin embargo, es muy importante resaltar que estos tres tratamientos a los 60 días, mostraron un crecimiento y número de brotes muy similar a lo observado en el día 45 (Figura 2).

Al realizar una evaluación simultánea de las variables relacionadas con la germinación de las semillas, tales como el número de brotes, la longitud del tallo y la presencia de germinación, se identificaron diferencias altamente significativas entre los niveles del factor K. Los resultados más favorables en todas las variables evaluadas se observaron en los factores de K y BAP de manera independiente. Este

Tabla 5. Análisis multivariado de la varianza MANOVA relacionado con la germinación de semillas de *Passiflora maliformis* L.

MANOVA factor K.										
PRUEBA		F		Valor P		Comparación canónica de niveles				
Wilks' Lambda		23.4		<0.0001		0 a				
Pillai's Trace		23.2		<0.0001		0.5 b				
Hotelling-Lawley Trace		23.5		<0.0001		1 b				
Roy's Greatest Root		31.6		<0.0001		Letras distintas indican diferencia estadística.				
MANOVA factor BAP.										
PRUEBA		F		Valor P		Comparación canónica de niveles				
Wilks' Lambda		14.81		<0.0001		0 a				
Pillai's Trace		14.06		<0.0001		1 b				
Hotelling-Lawley Trace		15.58		<0.0001		1.5 c				
Roy's Greatest Root		31.05		<0.0001		Letras distintas indican diferencia estadística.				
MANOVA general.										
PRUEBA		VALOR		F		VALOR P				
Wilks' Lambda		0.4077		17.66		<0.0001				
Pillai's Trace		0.7403		16.59		<0.0001				
Hotelling-Lawley Trace		1.1143		18.66		<0.0001				
Roy's Greatest Root		0.7362		37.27		<0.0001				
Análisis canónico.										
	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP
Niveles	0 0	0 1	0 1.5	0.5 0	0.5 1	0.5 1.5	1 0	1 1	1 1.5	1 1.5
Letra	a	a	d	b	b	b	a	e	e	e
Días	8		15		30		45		60	
	c		b		b		a		a	

Letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

mismo patrón se repitió en el tratamiento sin adición de BAP y K, donde la ausencia del regulador promovió una mejor respuesta en las variables de germinación. Al comparar los distintos tratamientos derivados de la combinación de los niveles de los factores K y BAP, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tal como se muestra en la Tabla 5.

De acuerdo con los análisis estadísticos realizados mediante contraste canónico ortogonal (Tabla 5), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, las cuales fueron atribuibles a las combinaciones de los niveles de los factores K y BAP. Los resultados más favorables se obtuvieron con la combinación de 0 mg L⁻¹ de BAP y 0 mg L⁻¹ de K, así como con dosis independientes de 1 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de K ($p < 0.05$). Al comparar los días de evaluación, se identificaron diferencias estadísticas a partir del día 45, con los mejores resultados observados en los días 45 y 60.

Bohórquez *et al.* (Sin año), reportaron una germinación del 90% en semillas de embriones de *Passiflora maliformis* var. *Pubescens* en medio MS sin reguladores de crecimiento. Estos resultados coinciden con los del presente estudio, en el cual el tratamiento control sin hormonas alcanzó un 100% de germinación a partir de las semillas. Estos hallazgos indican que las semillas no necesariamente requieren aditivos hormonales para la germinación y crecimiento *in vitro*, ya que poseen reguladores de crecimiento endógenos que facilitan estos procesos (Alcantara *et al.*, 2019).

Bernal *et al.* (2018), reportaron altos porcentajes de regeneración de semillas en *Passiflora maliformis* L. al emplear 1 mg L⁻¹ de BAP. En el presente estudio, se obtuvieron resultados similares en el tratamiento 2, donde la adición de BAP en ausencia de K mostró el mejor rendimiento en términos de número de brotes y longitud del tallo (Tabla 8). Investigaciones previas, como las de Huh *et al.* (2017), identificaron que concentraciones de BAP



Figura 3. Obtención de plántulas de *Passiflora maliformis* L. a los 45 días a partir del cultivo de segmentos nodales con el tratamiento 4.

entre 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ pueden inducir una cantidad significativa de brotes en *Passiflora edulis*. Vargas (2020) sugieren que la concentración óptima de BAP puede variar según la especie y el objetivo específico del cultivo.

La kinetina, aunque es menos utilizada que el BAP, también juega un papel importante en la micropropagación. La kinetina ha mostrado ser efectiva para la inducción de brotes en algunas especies de passifloras, aunque generalmente en menor medida que el BAP. Mathew y Philip (2014), observaron en *Passiflora suberosa*, que la kinetina a 1.5 mg L⁻¹ fue efectiva para la formación de brotes, aunque la tasa de propagación fue menor comparada al utilizar BAP.

Aroucha *et al.* (2009), encontraron en la micropropagación de *Passiflora cincinnata* que la combinación de 1.0 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de kinetina, produjo una mayor cantidad de brotes en comparación con el uso individual de estos reguladores de crecimiento. La combinación de BAP y Kinetina, puede resultar en una mayor tasa de proliferación de brotes debido a la sinergia entre ambas citoquininas, que potencialmente maximiza la actividad mitótica en los tejidos vegetales, sin embargo, en este trabajo se encontró que con el uso de BAP, se obtuvo un porcentaje mayor de inducción de la germinación y crecimiento longitudinal del tallo, que con el uso de la Kinetina.

Los tratamientos con las dosis más altas de BAP y K presentaron los porcentajes más bajos de germinación, esto

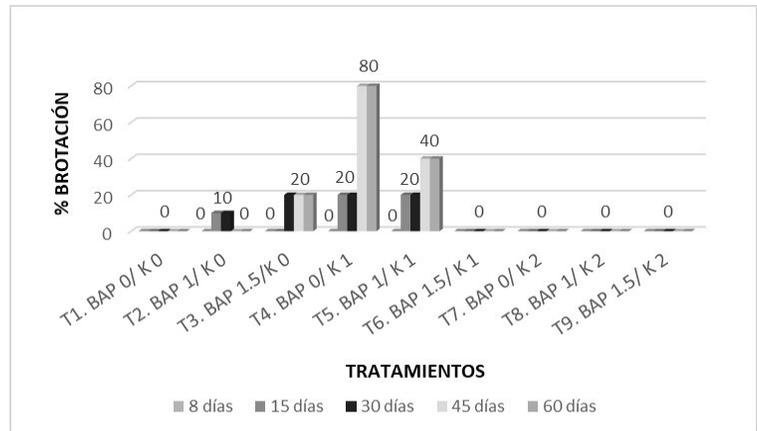


Figura 4. Porcentaje de brotación de segmentos nodales de *Passiflora maliformis* L. a los 8, 15, 30, 45 y 60 días, bajo diferentes concentraciones de BAP y K.

pone en evidencia el efecto negativo de las concentraciones altas de estos dos reguladores de crecimiento, dado que pueden causar alteraciones hormonales que impidan una óptima germinación y estas hormonas, son fundamentales para la organogénesis vegetal induciendo a la germinación de semillas y formación de estructuras vegetales (Werner *et al.*, 2001). En conjunto, dichas observaciones, explican cómo altas dosis de fitohormonas afectan negativamente en desarrollo tanto en cantidad como en calidad de los brotes, resultando así en un efecto inhibitorio. Por el contrario, las bajas concentraciones de BAP y K utilizadas en este estudio, resultaron en la formación de la mayor cantidad de brotes y longitud del tallo.

Efecto del BAP y la K en el establecimiento de segmentos nodales

En relación con la combinación de reguladores de crecimiento aplicada a los segmentos nodales, el tratamiento 4 mostró una respuesta óptima, con un 80% de efectividad en la aparición de hojas a los 45 días de cultivo. Este resultado fue seguido por el tratamiento 5, que alcanzó un 40% de efectividad en la misma variable (Figuras 3 y 4).

En los tratamientos 2 y 3, se observó la aparición de hojas con porcentajes del 10% y 20% respectivamente. A diferencia de estos, los demás tratamientos no presentaron brotación durante el periodo de evaluación. Se determinó que los explantes, respondieron de manera más favorable a la suplementación con bajas concentraciones de K y con la ausencia o bajas concentraciones de BAP. Cabe destacar que, a los 60 días, tanto el creci-

Tabla 6. Efecto de los factores relacionados con la germinación de segmentos nodales de *Passiflora maliformis* L.

MANOVA factor K.									
PRUEBA	F		Valor P		Comparación canónica de niveles				
Wilks' Lambda	19.22		<0.0001		0 b				
Pillai's Trace	18.00		<0.0001		0.5 a				
Hotelling-Lawley Trace	20.47		<0.0001		1 b				
Roy's Greatest Root	40.39		<0.0001		Letras distintas indican diferencia estadística.				
MANOVA factor BAP.									
PRUEBA	F		Valor P		Comparación canónica de niveles				
Wilks' Lambda	6.14		<0.0001		0 a				
Pillai's Trace	6.06		<0.0001		1 b				
Hotelling-Lawley Trace	6.24		<0.0001		1.5 b				
Roy's Greatest Root	11.57		<0.0001		Letras distintas indican diferencia estadística.				
MANOVA general.									
PRUEBA	VALOR		F		VALOR P				
Wilks' Lambda	0.5772		10.16		<0.0001				
Pillai's Trace	0.4377		8.65		<0.0001				
Hotelling-Lawley Trace	0.7065		11.83		<0.0001				
Roy's Greatest Root	0.6684		33.84		<0.0001				
Análisis canónico.									
	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP	K BAP
Niveles	0 0	0 1	0 1.5	1 0	1 1	1 1.5	2 0	2 1	2 1.5
Letra	c	c	c	a	b	c	c	c	c
Días	8		15		30		45		60
	c		c		c		b		a

Letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

miento como el número de hojas fue muy similar al observado a los 45 días (Figura 4).

El análisis multivariado de la varianza (**MANOVA**), basado en las variables relacionadas con la brotación de los segmentos nodales, reveló diferencias significativas en los niveles del factor K, donde la concentración de 1 mg L⁻¹ arrojó los mejores resultados. Para el factor BAP, la omisión de su aplicación resultó en el rendimiento más óptimo. Al evaluar las combinaciones de niveles de los factores, se determinó que el tratamiento más efectivo fue 1 mg L⁻¹ de K y 0 mg L⁻¹ de BAP. Los mejores resultados estadísticos se observaron a los 60 días, específicamente en las variables asociadas al desarrollo del segmento nodal (presencia de brotes, longitud y número de hojas) ($p < 0.05$), como se detalla en la Tabla 6.

En esta investigación se observó una tendencia hacia una mayor formación de hojas a partir de segmentos nodales en el tratamiento 4, donde el medio de cultivo fue suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de K y sin la adición de BAP (Tabla 6).

Guzmán *et al.* (2005), encontraron que la Kinetina a una concentración de 1.5 ppm permitía la inducción de brotes en *Passiflora popenovii*, observándose una brotación efectiva a partir de segmentos nodales y formación de callo. Estos mismos autores encontraron que los segmentos nodales de *Passiflora edulis* mostraron una mayor respuesta en cuanto a desarrollo y elongación de los segmentos nodales, cuando no se adicionaron reguladores de crecimiento al medio de cultivo o se emplearon bajas concentraciones de K. Los tratamientos con altas concentraciones de K, tendieron a inducir la formación

de callo, lo cual es muy similar a lo observado en el presente estudio.

Isutsa (2004), logró establecer la regeneración de plantas mediante el empleo de yemas apicales de *Passiflora edulis* Sims. en el medio MS (1962) con adición de 22,2 μM de BAP y 11,6 μM de AG_3 . Manjarrés y Perea (2012) obtuvieron la propagación por segmentos nodales de gulupa en el medio MS (1962) con adición de 8,88 μM de BAP y 4,65 μM de Kinetina, obteniendo el desarrollo de plántulas en un tiempo de 16 semanas. Según Ortiz (2009), la proliferación de brotes y elongación se observó con la adición de 3 mg L^{-1} de tiamina, 0,58 μm de AG_3 , 4,44 μm de BAP y 4,65 μm de kinetina.

Otahola y Díaz (2010), utilizaron diferentes dosis de BAP para la regeneración de las plantas a partir de segmentos nodales en *Passiflora edulis f. flavicarpa*, obteniendo mayor número de brotes en concentraciones de 0,5 mg L^{-1} de BAP.

Estos resultados coinciden con los de Baskaran y Jayabalan (2005) y Cárdenas *et al.* (2012), quienes observaron un aumento del número de brotes con el incremento de las concentraciones de Kinetina, al evaluar el efecto de estas dos citoquininas (BAP y K) para la obtención de plantas *in vitro* en sorgo.

En este estudio se emplearon diferentes dosis de BAP para la inducción de brotes y el desarrollo de segmentos nodales, observándose que, a diferencia de estudios previos, la ausencia de BAP en el medio de cultivo generó los mejores resultados en cuanto a crecimiento y elongación de los explantes. Esto sugiere que el tipo, estado de madurez y grado de juvenilidad de los inóculos en esta especie, determinan condiciones ideales relacionadas con la cantidad endógena de reguladores de crecimiento. Tal y como señala Pierik (1990), las citoquininas se concentran en tejidos con crecimiento activo, siendo una etapa crítica en la cual los niveles de estas hormonas, son muy elevados en plantas juveniles, promoviendo la división celular sin necesidad de estímulos exógenos.

Se destaca que el tratamiento control, no presentó crecimiento de ninguna yema, por lo que es importante que en el medio de cultivo exista alguna concentración de citoquinina para que estos explantes puedan comenzar a tener un desarrollo en esta especie, en este caso la presencia de K en bajas concentraciones.

CONCLUSIONES

Las principales fuentes de contaminación encontradas en la siembra *in vitro* fueron bacterias, mientras que la

incidencia de hongos fue baja, lo que subraya la necesidad de un enfoque adecuado en la selección de agentes desinfectantes y sus concentraciones.

El tratamiento más efectivo para la desinfección de semillas de cholupa fue el tratamiento 3 (2 min etanol 70%, 15 min NaClO al 2.5% + 2 gotas Tween 20®), con una efectividad del 77%. Este tratamiento también resultó con la mayor tasa de germinación de los explantes.

El tratamiento más efectivo para la desinfección de segmentos nodales fue el tratamiento 2 (2 g L^{-1} Benomyl® a 150 rpm x 15 min, Isodine® al 3% y NaClO 2% por 10 min + 2 gotas Tween® 20), con una efectividad del 67%.

El Benomyl® demostró ser el fungicida más eficaz, superando a Ridomil® bajo las condiciones de estudio evaluadas, lo que resalta su utilidad en la desinfección de explantes *in vitro* de esta especie.

La utilización de hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones adecuadas y tiempos de exposición controlados fue fundamental para la reducción de la contaminación.

El tratamiento 2, que consistió en 1 mg L^{-1} de BAP y 0 mg L^{-1} de K, mostró los mejores resultados en la germinación de las semillas, con un alto número de brotes y un notable crecimiento en longitud. Esto destaca la influencia positiva del BAP en la promoción del crecimiento.

Altas concentraciones de BAP y K, tuvieron un efecto negativo en la germinación de la semilla, sugiriendo que dosis elevadas pueden alterar el balance hormonal y afectar negativamente el crecimiento, originando la formación de callo.

El tratamiento 4 (0 mg/L^{-1} de BAP y 1 mg L^{-1} de K) fue el más efectivo, con un 80% de efectividad en la brotación de los segmentos nodales a los 45 días, demostrando que la suplementación con Kinetina en ausencia de BAP favorece el crecimiento.

Este estudio proporciona una información para la optimización de protocolos de desinfección y uso de reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Passiflora maliformis*, con implicaciones significativas para la investigación y la producción comercial de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

El autor principal expresa sinceros agradecimientos a sus padres por su apoyo incondicional, a Cesar Augusto Hernández Rendón por su valiosa asesoría, a Elena Paola González por su colaboración en la ejecución del

proyecto y al Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid por su apoyo con reactivos e insumos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcantara, J. S., Acero, J., Alcántara, J. D., & Sánchez Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129.
- Alvarado, Y., Herrera, M., Suárez, O., Rivero, L., García, A., & Acosta, M. (1997). Control de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. *Memorias del Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal*.
- Alvarado, Y., Herrera, Y., & García, A. (1993). Estudio preliminar sobre la contaminación microbiana en la biofábrica de Villa Clara. *Memorias del Tercer Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas*, p 15.
- Aroucha, E. M. M., Siqueira, D. L., & Cecon, P. R. (2009). Propagación *in vitro* de *Passiflora cincinnata* utilizando diferentes concentraciones de BAP y kinetina. *Scientia Agrícola*, 66(5), 664-668.
- Barragán, A. (2010). Huila: Paraíso Frutícola. Programa de competitividad agropecuaria del Huila. Cadena Frutícola, Informe técnico y de gestión.
- Baskaran, P., & Jayabalan, N. (2005). Un sistema de micropropagación eficaz para *Eclipta alba*: una valiosa hierba medicinal. *Biología celular y del desarrollo in vitro Plant*, 41, 532-539.
- Bernal, S. C., Duarte, L. C., Quintero, D. M., Araque, M. D. L. A., & Pacheco, J. (2018). Embriogénesis no zigótica en *Passiflora maliformis*. *Revista peruana de biología*, 25(3), 281-290.
- Betancur, J., García, N. J., Fernández, J. L., & Hernández, A. (2006). Libro Rojo de Plantas de Colombia. Volumen 3. Las bromelias, las labiadas y las pasifloras. Bogotá, Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, p 681.
- Bohórquez, M. A., Araque, E. J., & Pacheco, J. C. (s.f.). Respuesta Germinativa y Micropropagación de Congo (*Passiflora maliformis* var. Pubescens). Tunja, Colombia. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Facultad de Ciencias, p 10.
- Cárdenas, M., Chávez, A., González, M., Medina, S., Kosky, R., Pérez, L., Corona, M. (2012). Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas *in vitro* de *Sorghum bicolor* para la formación de callos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 101-110.
- Gupta, K., Bishop, J., Peck, A., Brown, J., Wilson, L., & Panda, D. (2004). El compuesto antimicótico benomilo inhibe la polimerización y la dinámica de los microtúbulos cerebrales y la proliferación de células cancerosas en la mitosis, al unirse a un nuevo sitio en la tubulina. *Biochemistry*, 43(21), 6645-6655.
- Gutiérrez, M. I., Miranda, D., & Cárdenas, J. F. (2011). Efecto de tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de gulupa (*Passiflora edulis Sims.*), granadilla (*Passiflora ligularis Juss.*) y cholupa (*Passiflora maliformis L.*). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 209-219.
- Guzmán, I. P., Rodríguez, J. D., & Pacheco, R. A. (2005). Evaluación de la micropropagación por cultivo de tejidos vegetales *in vitro* en dos especies de passifloras (*Passiflora popenovii* Killip y *Passiflora edulis Sims.*). Pérez-Arbelaezia, (16), 73-103.
- Huh, Y. S., Lee, J. K., & Nam, S. Y. (2017). Efecto de los reguladores del crecimiento de las plantas y antioxidantes en la regeneración de plantas *in vitro* y la inducción de callos a partir de explantes de hojas de maracuyá morado (*Passiflora edulis Sims.*). *Journal of Plant Biotechnology*, 44(3), 335-342.
- Isutsa, D. K. (2004). Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis Sims.*) varieties. *Scientia Hort.*, 99(3-4), 395-400.
- Lalinde, S. N. (2021). Diseño de Plan de Mercadeo para comercializar Cholupa en Colombia. Universidad EIA, p 59.
- Manjarrés, E., Perea, M. (2012). Establishment of a purple passion fruit (*Passiflora edulis Sims.*) propagation protocol from zygotic embryos and axillary shoots. *Universidad Nacional de Colombia*. 20(2), 53-64.
- Mariña, L. J. (2020). Metodología de propagación *in vitro* de *Dahlia sp.* *Avances*, 22(3), 406-422.
- Mathew, L., & Philip, V. J. (2014). Efecto de la cinetina y otros reguladores del crecimiento vegetal en la propagación *in vitro* de *Passiflora suberosa*. *Cultivo de tejidos vegetales y biotecnología*, 24(2), 173-179.
- Miranda, D., Perea, M., & Magnitskiy, S. (2009). Propagación de especies pasifloráceas. Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. *Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 69-96.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised médium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*, 15, 473-497.
- Ocampo, J., Rodríguez, A., Puentes, A., Molano, Z., & Parra, M. (2015). El cultivo de cholupa (*Passiflora maliformis L.*) una alternativa para la fruticultura colombiana. CEPASS, *Surcolombiana SA*, 10-12.
- Orrego, C. E., Rodríguez, Y., Zemanate, K., & Rodríguez, L. J. (2021). Productividad y competitividad frutícola andina. Producto 3: Informe técnico de resultados sobre la productividad alcanzada por cultivo y por país. Fontagro, p 41.
- Ortiz, L. P. (2009). Evaluación del crecimiento *in vitro* de maracuyá amarilla (*Passiflora edulis SIMS* forma flavi-

- carpa) a partir de segmentos nodales mediante la técnica de organogénesis. Bucaramanga, Colombia. Universidad de Santander, p 60.
- Otahola, V. González, M. (2010). Regeneración *in vitro* de *Passiflora edulis* f. flavicarpa y *Passiflora quadrangularis* utilizando dos tipos de explantes provenientes de plantas adultas y bencilaminopurina. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 23-28.
- Parrado, L. M. (2023). Morfología, viabilidad y germinación *in vitro* en semillas de especies de *Passiflora* L. distribuidas en Colombia. Palmira Colombia. Universidad Nacional de Colombia, p 95.
- Pedroza, J. A., González, S. R., & Téllez, D. C. (2007). Micropropagación de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq: una especie en vías de extinción. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 33-44.
- Pierik, R. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa, p 326.
- Resolución 43536 de 2007. Denominación de Origen de Cholupa del Huila. Superintendencia de Industria y Comercio.
- Rodríguez, M., Matehus, J., Gerstl, A., & Santana, M. A. (2008). Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (*Dioscorea alata* L.). *Interciencia*, 33 (7), 537-541.
- Santos, L. M., & Zambrano, J. S. (2021). Efecto *in vitro* de fungicidas y biochar sobre *Sclerotium rolfsii*. Calceta, Ecuador. ESPAM MFL, p 63.
- Segretín, M. (2013). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II. Cultivos de células vegetales. *Argen Bio*, p 6.
- Thorpe, T., Harry, I., Kumar, P. P., Debergh, P., Zimmerman, R. (1991). Micropropagación: tecnología y aplicación. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 311-336.
- Triana, N., & Pasifloras, M. C. (2020). Indicadores e Instrumentos. Bogotá, Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, p 15.
- Uribe, M. E., Delaveau, C., Garcés, M., & Escobar, R. (2008). Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque (Valdivia)*, 29(1), 58-64.
- Valencia, Á. J. (2022). Evaluación de protocolos de desinfección en la reproducción de material vegetal de Maracuyá (*Passiflora edulis* var. flavicarpa) para propagación *in vitro* y almácigo en vivero. UCEVA, 82.
- Vargas, C. D., & Díaz, A. Y. (2017). Establecimiento *in vitro* de maracuyá (*Passiflora edulis*), granadilla (*Passiflora ligularis*) y cholupa (*Passiflora maliformis*) a partir de discos foliares y yemas axilares. San José de Cúcuta, Colombia. Ed Universidad Francisco de Paula Santander, p 226.
- Vargas, I. (2020). Comparación de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la fase de multiplicación de pitahaya roja (*hylocereus undatus*). Huaraz, Perú, FCA-UNASAM, p 63.
- Vázquez, D. M. (2017). Efecto de la bencilaminopurina en la inducción de brotes de *Passiflora maliformis* L. (cholupa). Pamplona, Colombia. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, p 72.
- Villalobos, R., León, S., & Urdenata, A. (1999). Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. *Rev. Fac. Agron. (Luz)*, 16, 243-255.
- Viuche Ducuara, A. (2017). Propuesta de formulación de estrategias para la exportación de frutas de la familia Passiflora en Colombia con base a un modelo prospectivo. Bogotá, Colombia. universidad militar nueva granada facultad de estudios a distancia, p 31.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., & Schmölling, T. (2001). Regulación del crecimiento vegetal por citoquinina. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*, 98(18), 10487-10492.