
MICROPROPAGACION DE NUDOS DE CURUBA (*Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey).

CARLOS A. MOSQUERA Q.*

NANCY LOPEZ DE VILES**

ALBERTO RICAURTE MONCAYO**

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad de Nariño, Pasto.

Se emplearon plantas de curuba de la especie **mollissima** obtenidas de semilla y mantenidas durante 6 meses en invernadero a 25°C y 50% de humedad relativa. Se tomaron nudos con una porción de entrenudo y haciendo una herida en el centro del nudo. Los explantes fueron colocados en el medio de cultivo LS65 con diferentes niveles de auxina -citocinina, empleando 2,4D y BAP. El material se llevó a incubación a 3000 lux y 18°C, con una humedad relativa del 50% aproximadamente.

Los mejores resultados se obtuvieron con frascos de 125 ml y tapón

* Profesor Asociado, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

** Ingenieros Agrónomos

de papel de aluminio. La producción de callos con óptimas características se logró al emplear 25 ml de medio de cultivo con una relación 7-5 mg/L de 2,4D-BAP, alcanzando un crecimiento promedio de 21,65 veces respecto del tamaño original del nudo. El crecimiento se estabilizó a los 30 días de incubación, sin presentar rizogénesis ni caulogénesis.

INTRODUCCION

Dentro de las líneas de investigación de la Facultad de Ciencias Agrícolas, (FACIA), de la Universidad de Nariño, se encuentra la curuba. No existe información acerca de la micropropagación de la curuba que se encuentre contextualizada con su área de influencia en el departamento de Nariño.

La proyección del mercado de frutas a la luz de la internacionalización de la economía, debe estar amparada con una tecnología, que sea capaz de enfrentar los retos de la competencia, a la cual no debe escapar el cultivo de la curuba.

En el aspecto de la propagación, resulta importante explorar las posibilidades de micropropagación con algunos explantes, como una primera aproximación para obtener material vegetal homogéneo, en cantidad y en tiempo reducido.

Las semillas de origen sexual tardan de 5 a 14 semanas en germinar y la heterogeneidad del material dificulta la planeación y manejo del cultivo (Schoeniger, 1976). Las ventajas comparativas que ofrece el sistema de micropropagación, justifican ampliamente su empleo para obtener material vegetal uniforme y sano.

En atención a lo anteriormente mencionado, el presente trabajo se realizó atendiendo a los siguientes objetivos: Ensayar la micropropagación de nudos de curuba (*Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey) en el medio de LINSMAIER & SKOOG (1965); determinar la viabilidad de la micropropagación empleando como explantes nudos cortos y nudos con una porción de entrenudo y probar la respuesta a la micropropagación de los explantes propuestos en el medio de LS65 con diferentes niveles de auxinacinetina y llevando el cultivo hasta el estado de callo.

REVISION DE LITERATURA

Los agricultores que hoy se dedican al cultivo de la curuba (*Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey) en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Boyacá y Nariño, poseen explotaciones de escasa superficie. Es importante en la granja integral del campesino, y ofrece magníficas perspectivas en el mercado interno y externo (Banco de la República, 1978; Caja Agraria, 1987).

Entre las variedades más conocidas y empleadas en el Departamento de Nariño se cuentan las siguientes: Pasto 1, 2, 3; Caldas, Perú y Botana (Schoeniger, 1978).

Las características fundamentales de *Passiflora mollissima* son:

1. La mayor fructificación al centro de la espaldera.
2. El Involucro es un tubo estrecho alrededor del hipanto, y frecuentemente se rompe entre dos brácteas, y a veces se desprende del pedúnculo antes de o al abrirse la flor.
3. El estilo mide 19,4 mm con un rango de 18 a 21 mm.

4. La inserción de las brácteas es de 2 a 4,5 mm debajo del urcéolo.
5. Los pedúnculos son pubescentes de 33 a 43 mm.
6. El peso de 100 semillas secas al aire es de $3,55 \pm 0,12$ g.
7. Los frutos son oblongos amarillos sin pruina, con pesos de 70 a 85 g, en donde el peso del pericarpio ocupa del 35,1 al 38,4% del total.

Las plantas de curuba obtenidas por semilla, empiezan a fructificar a los 18 meses (Girard y Lobo, 1977). El letargo depende de la herencia y no de los tratamientos que se aplican a la semilla para su germinación (Schoeniger, 1978). La propagación sexual es fácil, se pueden obtener muchas semillas y las plantas tendrán una vida más larga y mejores cosechas (Torres, 1977).

Cuando se emplea el acodo aéreo, las plantas entran en producción a los 10 meses (Girard y Lobo, 1977; Otero, 1984). El enraizamiento se logra en tres meses, también se emplea con éxito el acodo terrestre (Otero, 1984).

Schoeniger (1971) enraizó estacas y acodos, empleando ácido indolacético y ácido indol butírico en concentración de 5.000 ppm.

Molina (1988) enraizó estacas de curuba empleando agua de lluvia, agua mineral y el medio de Jensen, en un período de 23 días.

Morán (1979) realizó una investigación en curuba, con el objeto de explorar el potencial morfogénico de los entrenudos, para lograr una propagación vegetativa. Las plantas de las cuales extrajo los explantes, fueron tomadas de invernadero, en donde permanecieron por ocho meses a 25°C y 45% de humedad relativa. Los explantes

fueron divididos en segmentos de 10 mm. Como medio de cultivo utilizó la solución de Nitsch sin auxinas, en presencia de 2 mg/L de cinetina.

El desarrollo del callo iniciado en los tejidos parenquimáticos, continuó activamente durante los primeros 20 días del cultivo.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad de Nariño, Pasto.

Se emplearon plantas de curuba propagadas por semilla de la especie *mollissima*, de seis meses de edad; las plantas fueron mantenidas en invernadero aproximadamente a 25°C y una humedad relativa cercana al 50%, y recibieron un tratamiento de limpieza de material extraño y esterilización. Dicho proceso incluye los siguientes pasos:

1. Lavar con agua fría
2. Sumergir en alcohol etílico del 70% durante un minuto
3. Humedecer en hipoclorito de calcio al 4% por cinco minutos, agitando ligeramente.
4. Enjuagar tres veces en agua desionizada estéril
5. Extraer los nudos con entrenudos en una longitud de 2 cm con bisturí y dentro de la cámara de flujo laminar (previa esterilización de la mesa de trabajo con alcohol del 96%), de plantas sanas y vigorosas desarrolladas en invernadero.
6. Colocar los explantes en una solución clorox-agua en una proporción de 1:4 por 10 minutos. Repetir el paso cuatro,

- ejecutando todo el proceso dentro de la cámara.
7. Transferir los explantes a una caja petri, cortar los explantes dejando el nudo y una porción de entrenudo con una longitud de 0.5 cm (Tratamiento a1) y de 1 cm (tratamiento a2).
 8. Colocar los explantes en el medio de cultivo según los tratamientos propuestos.

Como medio de cultivo se utilizó el "Medio LS65", con diferentes relaciones auxina/citocinina.

El medio de cultivo se esterilizó a 121°C y 1,05 kg/cm³ de presión, durante 20 minutos aproximadamente. Utensilios y otros materiales se esterilizaron con alcohol del 96% (López, 1993).

Las soluciones stock y los medios nutritivos se esterilizaron después de su preparación.

La siembra de los explantes se hizo en tubos de ensayo con taparosca, frascos tubulares de 125 ml tapados con motas de algodón y gasa, frascos de la misma dimensión pero tapados con papel de aluminio. Cada tubo o frasco constituyó una unidad experimental. Dicho material fué iluminado con lámparas de luz fría de 40 Watios a 30 cm, a una temperatura de 18°C y humedad relativa del 50%.

Para el análisis estadístico se recurrió a un experimento bifactorial de 2 x 4 con arreglo combinatorio, tres repeticiones y distribución de los tratamientos en forma irrestrictamente al azar (Tabla 1).

El factor A corresponde a los tipos de explante y el factor B a los niveles de los reguladores de crecimiento. Paralelamente se llevó un testigo con una relación de reguladores de 7-5 mg/L; las

comparaciones se hicieron con base en las comparaciones múltiples de Duncan-Waller.

Para el factor B se realizó un análisis de regresión, tomando como variable independiente la suma de los reguladores de crecimiento vs la longitud y número de raíces como variable dependiente.

Se evaluaron los siguientes parámetros: tamaño del callo, duración del cultivo hasta la estabilización del callo, porcentaje de diferenciación y contaminación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos del cultivo de callos de curuba a partir de nudos, se encuentran en la Tabla 2. Los mejores resultados corresponden a la interacción a2b4 (nudo de 1 cm de largo y 2,5 mm de ancho con una relación de auxina-citocinina 4-2 mg/L), la cual presenta diferencias estadísticas significativas con las demás alternativas y aumentó 21,65 veces su tamaño en promedio. El testigo con la relación auxina-citocinina 7-5 mg/l alcanzó un tamaño similar a la interacción a2b4 (Tablas 4 y 5).

Del análisis de varianza y la prueba de Duncan-Waller, se concluye que la mejor respuesta a la formación de callo se alcanza con nudos de 1 cm de largo por 2,5 mm de ancho (Tablas 4 y 5).

Hurtado y Merino (1987) corroboran lo enunciado, afirmando que los explantes deben tener una longitud de 0,5 a 1,0 cm con preferencia los cercanos al límite superior.

En todos los tratamientos que tenían reguladores de crecimiento se produjo la formación de callo, y sólo en un 66% en la interacción a1b1 (sin reguladores). Por el contrario, en la interacción a2b1 (sin reguladores de crecimiento) se formó callo. Este resultado permite concluir que los reguladores endógenos de los explantes inciden en la formación parcial de callo. Sin embargo, en la práctica resulta insuficiente el aporte de reguladores de crecimiento de los nudos, salvo en algunos casos, donde el testigo llegó a aumentar en seis veces su tamaño (Tablas 2 y 3).

Un comportamiento similar es reportado por Morán (1979), quien afirma que para la formación de callo en curuba es suficiente la adición de 2 mg/L de cinetina. No obstante, en el presente la misma relación (tratamiento b2 (0-2)), sólo alcanzó un tamaño promedio de cinco veces mayor al original. Se desconoce la razón de esta diferencia, pero se pueden aducir las siguientes: diferentes medios Morán (1979) empleó el medio de Nitsch, no reporta el tamaño o peso del callo; pero si un crecimiento activo hasta los 20 días, en este trabajo el crecimiento se estabilizó a los 30 días; tampoco informa sobre el grosor del nudo empleado, origen del material vegetal y otros factores sinérgicos de las hormonas principalmente la luz.

Hurtado y Merino (1987) concuerdan en la mayoría de las razones posibles que puedan explicar los resultados presentes.

Según Miller, citado por Mitchell (1980), el callo se inicia con la formación de un tejido blancuzco cuya cantidad está en función directa de la cantidad de citocinina, este fenómeno se evidenció en este trabajo, aunque la cantidad de tejido no necesariamente aumentó en función de la cantidad de citocinina, encontrándose que

el testigo a1b1 presentó en algunos casos un desarrollo profuso del tejido blanco. Esto permite concluir que en algunos casos el nudo de curuba aporta citocininas.

Si bien el material vegetal empleado tenía seis meses de edad, y desarrollado en invernadero, algunas plantas crecieron más ahiladas, probablemente con menos reservas nutricionales, y en consecuencia presentaron menor respuesta para producir callo en el tratamiento a1.

La formación del callo se inició en todos los casos positivos en la herida hecha al nudo al eliminar la yema axilar. El 78% de los casos positivos formó también callo en ambos cortes del entrenudo y 22% restante lo hizo en un solo lado, resultados similares a los de Morán (1987).

Posteriormente el callo fue envolviendo totalmente el nudo hasta formar una gran masa de forma ligeramente rectangular, de aproximadamente 5 cm³ para la interacción a2b4 (1,85 cm x 1,72 cm x 1,53 cm).

Para las demás interacciones el comportamiento fue menos acentuado y con mayor variación.

La textura exterior del callo es blanda, esponjosa y ligeramente compacta. A medida que profundiza el callo es más oscuro, duro, compacto y con mayor cantidad de espacios intercelulares. Aproximadamente en el centro se encuentra el nudo completamente esquelético, hueco e incoloro.

El color del callo no fue consistente en todos los tratamientos:

incolore, crema pálido, amarillo pálido, verde oscuro y claro, café oscuro y café pálido en gran parte de los tratamientos. Hurtado y Merino (1987) encontraron variación de colores aún dentro de la misma especie.

Desde el inicio del cultivo se presentó en algunos casos rizogénesis, principalmente en la interacción a2b4, donde mostró un gran vigor. A medida que aumentaba la cantidad de reguladores de crecimiento, el número y longitud de las raíces también aumentó, encontrándose una alta correlación (Figuras 1 y 2).

El testigo comparador (relación auxina-citocinina 7-5 mg/L), presentó un tamaño igual pero en ninguna de las repeticiones hubo rizogénesis (Tabla 3).

En algunos casos, donde no se eliminó bien la yema axilar de los nudos, ésta se desarrolló con gran vigor y sin guardar su fototropismo (Tabla 3).

De 75 unidades experimentales iniciales, cuatro se contaminaron en los primeros tres días (5,3%). Posteriormente a los 15 días se contaminaron 16 unidades experimentales.

A las cuatro semanas del cultivo **in vitro** en la mayor parte de los frascos con tapón de algodón se secó el medio de cultivo, probablemente debido a la evaporación (Tabla 2).

CONCLUSIONES

Para el cultivo **in vitro** de nudos de curuba (*Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey) se deben emplear nudos con porción de entrenudos en una longitud total de 1 cm y 0.25 cm de ancho.

El sistema de recipiente y tapa con mejores resultados para el cultivo de nudos de curuba, fue el de frascos de 125 ml con tapón de aluminio.

Para la producción de callo, la mejor relación auxina-citocinina es de 7-5 mg/L empleando 2,4 D y BAP, y LS65 como medio de cultivo.

El tiempo de estabilización del callo fue de 30 días, alcanzando un crecimiento promedio de 21,65 veces respecto del tamaño original del nudo.

BIBLIOGRAFIA

- COLOMBIA. BANCO DE LA REPUBLICA. Productos agrícolas perecederos. Serie de precios 1987. Bogotá, Imprenta Nacional. Boletín No. 15. 1980. pp. 164-165.
- COLOMBIA. CAJA AGRARIA. La granja integral para clima frío. La curuba. Colombia, Caja Agraria, Almanaque creditario (Colombia) 36:93-98. 1987.
- GIRARD, E. Y LOBO, M. Frutales de clima frío. Bogotá. ICA. Compendio 20, 1977. pp. 219 - 224.
- HURTADO M., D. V. y MERINO M., M. E. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas, 1988. 232 p.
- LOPEZ J., G. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Curso Teórico-práctico. Postgrado. Pasto, Colombia, Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, 1993. 107p.
- MITCHELL, J. y LIVINGSTON, G. Métodos para el estudio de hormonas vegetales y sustancias reguladoras del crecimiento. México, Trillas, 1980. 166 p.
- MOLINA V., L.A. Propagación vegetativa de la curuba (*Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bayley) en C.A.F., Programa de biotecnología, cultivo de tejidos vegetales aplicados a la producción agrícola. Caracas, Instituto Internacional de Estudios Avanzados. 1988. pp. 197-200.

- MORAN, R., M. J. Potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et *P. mollissima* Bailey en culture "in vitro". Unite de Cytogenetique, Universite Ctaholique de Louvain. Revista Turrialba (Costa Rica) 29(3): 224 - 228. 1979.
- OTERO, C. El cultivo de la curuba. Revista Esso Agrícola (Colombia) 41(1):11-17. 1984.
- SCHOENIGER, G. El cultivo de la curuba. Pasto, Colombia, Universidad de Nariño. 1970. 20p.
- , Observaciones sobre el rendimiento de distintas descendencias de *Passiflora mollissima* Bailey. Revista de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño (Colombia) 6(16): 46-58. 1974 -1976.
- , La curuba, técnicas para el mejoramiento de los cultivos. Bogotá, Colección Científica. 1978. 257 p.
- , Ensayos sobre germinación de passifloraceas en especial de *Passiflora mollissima* Bailey. Revista de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño (Colombia) 6(1-6):59-73. 1974-1976(b).

----- Observaciones sobre el crecimiento de la curuba *Passiflora mollissima* Bailey, como base para un sistema de poda. Caldasia, Colombia 11:67-80. 1971.

TORRES, M., SALAZAR, C. y CARDONA, M. Pasifloras en frutales. 2 ed. Manual de Asistencia Técnica. Bogotá, ICA No., 4 1977. Tomo 2. pp. 365-395.

TABLA 1. TRATAMIENTOS

a1b1 = nudo de 0,5 cm con nivel de (0-0) de 2,4 D y BAP

a1b2 = nudo de 0,5 cm con nivel de (0-2) de 2,4 D y BAP

a1b3 = nudo de 0,5 cm con nivel de (2-2) de 2,4 D y BAP

a1b4 = nudo de 0,5 cm con nivel de (4-2) de 2,4 D y BAP

a2b1 = nudo de 1,0 cm con nivel de (0-0) de 2,4 D y BAP

a2b2 = nudo de 1,0 cm con nivel de (0-2) de 2,4 D y BAP

a2b3 = nudo de 1,0 cm con nivel de (2-2) de 2,4 D y BAP

a2b4 = nudo de 1,0 cm con nivel de (4-2) de 2,4 D y BAP

C = Testigo comparador (7 - 5) mg/L de 2,4 D y BAP

TABLA 2. Tamaño del callo de curuba a partir de nudos bajo diferente relación de auxina-citocina en condiciones *in vitro*, en medio LS65 durante cinco semanas (x = número de veces que aumentó de tamaño).

Tratamientos:	alb1	alb2	alb3	alb4	a2b1	a2b2	a2b3	a2b4	C
Tubos de ensayo de 25 ml									
	2x	2x	0	3x	2x	3x	0	6x	
	2x	5x	0	0	0	4x	0	6x	
	0	2x	2x	3x	0	0	0	0	
Frascos de 125 ml con tapón de algodón y gaza									
	2x	4x	5x	3x	2x	4x	6x	0	
	3x	6x	2x	6x	2x	3x	0	17x	
Frascos de 125 ml con tapón de papel de aluminio									
	6x	4x	9x	4x	4x	6x	6x	25x	20x
	5x	3x	4x	6x	3x	5x	0	20x	23x
	2x	2x	0	0	2x	4x	4x	20x	20x

TABLA 3. Organogénesis lograda a partir de callos de curuba, sometidos a diferente relación auxina-citocinina en condiciones *in vitro*. (Porcentaje de diferenciación).

Tratamientos:	alb1	alb2	alb3	alb4	a2b1	a2b2	a2b3	a2b4	C
Tubos de ensayo de 25 ml con tapa rosca									
Callo	66	100	100	100	100	100	100	100	100
Rizogénesis	33	0	0	0	0	0	0	0	0
Caulogénesis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yema axilar(*)	0	0	0	0	0	33	0	0	0
Frascos de 125 ml con tapón de algodón y gaza									
Callo	66	100	100	100	100	100	100	100	100
Rizogénesis	33	0	0	0	0	33	0	66	0
Caulogénesis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yema axilar(*)	0	0	0	0	0	0	33	0	0
Frascos de 125 ml con tapón de papel de aluminio									
Callo	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Rizogénesis	33	33	0	0	0	33	33	66	0
Caulogénesis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yema axilar(*)	0	0	0	0	0	33(1)	33	0	25

* Desarrollo de la yema axilar del nudo

(1) Desarrollo del zarcillo

TABLA 4. Análisis de varianza para el tamaño del callo logrado a partir de nudos de curuba en cultivo in vitro, durante cinco semanas.

Fuentes de variación	S.C.	G.L.	C.M.	Fc	Ft
					.01
Tratamiento	790,74	7	112,962	31(*)	4,4
Factor A	106,07	1	106,070	29(*)	9,1
Factor B	446,49	3	148,830	40(*)	5,7
AxB	238,18	3	79,390	22(*)	5,7
Error	47,83	13	3,68		
Total	838,57	20			

C.V. = 28%

* = diferencias estadísticas altamente significativas

TABLA 5. Pruebas de comparación de tratamientos para "Tamaño de callo", con base en la prueba de DUNCAN-WALLER.

TRATAMIENTOS	SUBTRATAMIENTOS				
	b1	b2	b3	b4	
a1	4,33x(a)	3x(a)	5x(a)	6,5x(b)	4,5x(a)
a2	3x(a)	5x(a)	5x(a)	21,6x(b)	9,0x(b)
	3,66x(a)	4x(a)	5,75x(a)	15x(b)	

Comparador de Duncan-Waller

Tratamientos: (P > .05) = 1,1888

Subtratamientos: (P > .05) = 2,2 (3r vs 3r)
2,5 (3r vs 2r)

Interacciones: (P > .05) = 2,23 (3r vs 3r)
(3r vs 2r)

NOTA: Promedios abarcados con la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas.

CURVA DE CRECIMIENTO RELACIONES AUXINA-CITOCININA

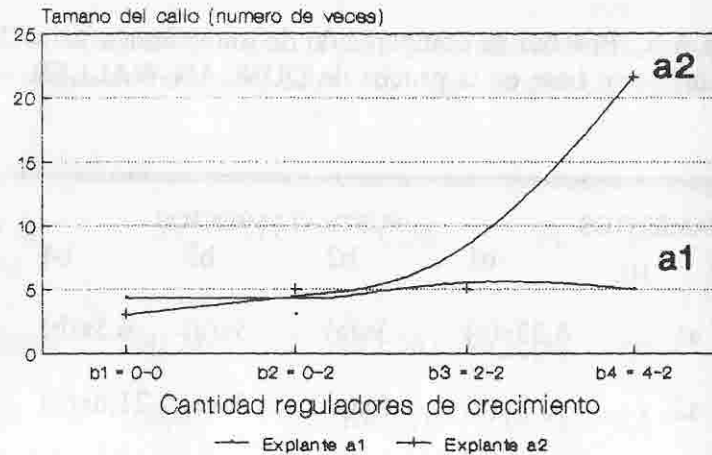
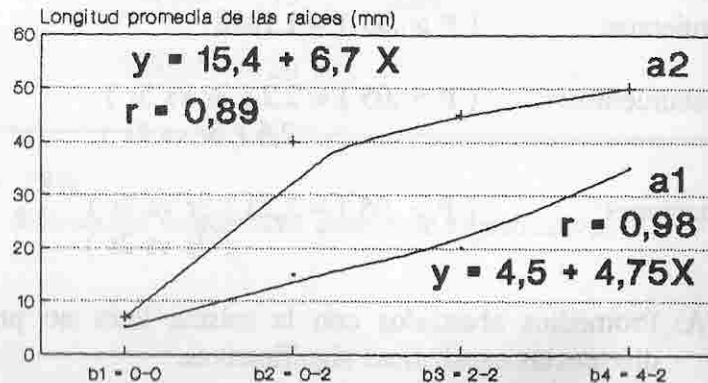


Fig 1 Crecimiento del callo

RIZOGENESIS EN CALLOS DE CURUBA LONGITUD DE RAICES



RIZOGENESIS EN CALLOS DE CURUBA NUMERO DE RAICES

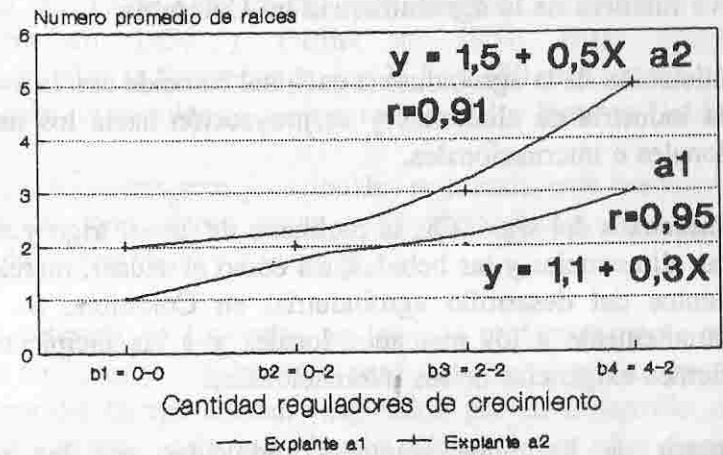


FIG. 3 Rizogénesis en callos de curuba