

## AISLAMIENTO Y CULTIVO DE PROTOPLASTOS EN MARACUYÁ

### Isolation and Cultive of Protoplast in Passion Fruit

RICARDO RIVERA RODRÍGUEZ, MARGARITA PEREA DALLOS  
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Presentado en febrero 6 de 2004, aceptado en marzo 25 de 2004

### RESUMEN

En este trabajo se ajustaron las condiciones para la regeneración de plántulas a partir del cultivo de protoplastos, proceso indispensable para avanzar hacia la obtención de híbridos somáticos. Se realizó el aislamiento de protoplastos a partir de cotiledones y hojas de plántulas *in vitro* de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*; estos explantes fueron sumergidos en solución CPW13M para inducir plasmólisis. Posteriormente se ensayaron tres combinaciones enzimáticas, los mayores rendimientos fueron  $6,48 \times 10^6$  y  $4,60 \times 10^6$  protoplastos viables /500 mg de tejido, obtenidos respectivamente con la combinación de Celulasa R-10 al 1% y Pectolyasa Y-23 al 0,05% a partir de hojas y la solución enzimática Celulasa al 2% y Macerozima al 0,4% para cotiledones. Las mejores densidades de cultivo para los protoplastos fueron  $5 \times 10^4$  protoplastos/ml para los obtenidos de cotiledones y  $1,5 \times 10^5$  protoplastos/ml para los aislados de hojas, empleando el sistema de cultivo en gotas de medio KM8p solidificadas con agarosa al 0,6% y recubiertas con medio líquido KM8p con 100 g/l de glucosa y cefotaxim 300 µg/ml. Con las primeras divisiones celulares, se empezó a disminuir el nivel osmótico al renovar el medio líquido con la mezcla de medio KM8p:KM8 en proporción 3:1 y se continuó cada siete días en proporciones 2:1, 1:1 y 1:3 hasta la obtención de colonias y callos. Los callos fueron transferidos a medio MS con 2 mg/l de BAP y 1 mg/l de AIB para inducir la regeneración en condiciones de iluminación; después de seis semanas de cultivo se diferenciaron yemas, posteriormente fueron subcultivadas a medio MS sin reguladores de crecimiento para su enraizamiento.

**Palabras clave:** *Passiflora*, protoplastos, nivel osmótico, cefotaxim, regeneración.

### ABSTRACT

In this research we adjust the protoplasts culture and regeneration conditions, necessary to advance into somatic hybrids obtention. Isolation of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* protoplasts from *in vitro* seedlings cotyledons and leaves was carried out. These tissues were plasmolysed in a CPW13M solution, then exposed to enzymatic solutions. The better yields were  $6,48 \times 10^6$  and  $4,60 \times 10^6$  protoplasts/500 mg of tissue, reached with the mixture Cellulase R-10 1% and Pectolyase Y-23 0,05% from leaves, and the enzymatic solution Cellulase 2% and Macerozyme 0,4% from cotyledons tissue,

respectively. The best densities for protoplasts culture were  $5 \times 10^4$  protoplasts/ml obtained from cotyledons and  $1,5 \times 10^5$  protoplast/ml from leaves, employing agarose droplets system, bathing by KM8p liquid media with glucose 100g/l and cefotaxime 300 $\mu$ g/ml. When first cell divisions occurred, the osmotic concentration was reduced by removing the liquid media and adding equal volume of fresh mix media KM8p:KM8 in a ratio of 3:1. Every seven days, this action was repeated using mix media in ratios of 2:1, 1:1, and 1:3, until colonies and callus formation was achieved. Then, the call were transferred into MS media with BAP 2 mg/l and IBA 1 mg/l for plant regeneration on light conditions. After six weeks shoot differentiation was promoted, finally those shoots were subcultured to free regulators media for rooting.

**Key words:** *Passiflora*, protoplasts, osmotic level, cefotaxime, regeneration.

**Abreviaturas.** KM8p, medio de cultivo para protoplastos de Kao y Michayluk (1975); KM8, medio de cultivo para células de Kao y Michayluk (1975); MS, medio de Murashige y Skoog (1962); BAP, 6-Bencilaminopurina; AIB, ácido 3-indolbutírico; ANA, ácido  $\alpha$ -naftalenacético; 2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético; AG<sub>3</sub>, ácido giberélico; CPW13M, solución de lavado para protoplastos de Frearson *et al.* (1973), con 13% de manitol; MES, ácido morfolino 2-N etanosulfónico; FDA, diacetato de fluoresceína; rpm, revoluciones por minuto.

## INTRODUCCIÓN

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 del mosaico 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).

*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., el maracuyá amarillo, tiene origen amazónico, pertenece al subgénero *Passiflora*, produce una fruta de gran importancia especialmente a nivel industrial por su sabor intenso, alta acidez, agradable aroma y elevado contenido de vitamina C (Ríos-Castaño y Salazar, 1980). Presenta en el follaje alcaloides indólicos como harmana, harmina y harmol y compuestos como la Passiflorina, que le confieren efecto tranquilizante, antiespasmódico, anticonvulsivo y como regulador de la presión arterial, además tiene interés para la elaboración de perfumes y esencias (Gupta, 1995). La importancia económica de este cultivo, amerita el desarrollo de programas de mejoramiento para obtener variedades tolerantes a plagas, enfermedades y a condiciones abióticas extremas. Los estudios sobre habilidad combinatoria

en especies del subgénero *Passiflora* para la obtención de híbridos sexuales, evidenciaron la presencia de barreras para la hibridación, en la mayoría de los cruzamientos se observaron aborto de frutos, baja germinación, plántulas débiles y esterilidad del polen (Payán y Martín, 1975). Solo unos pocos cruces entre especies emparentadas son fértiles, indicando que la hibridación sexual no es una técnica viable para el mejoramiento de las especies cultivadas de este subgénero; pero tiene gran potencial para el mejoramiento de las especies del subgénero *Tacsonia* (Escobar, 1991). Las técnicas de cultivo *in vitro* brindan un gran complemento a las técnicas convencionales de mejoramiento, a través de la obtención de híbridos somáticos mediante el aislamiento y fusión de protoplastos. La aplicación de esta técnica en el mejoramiento de las *Passifloras* representa una opción para transferir características que se encuentran en las especies silvestres hacia las especies cultivadas, la fusión de protoplastos facilita el flujo genético entre las especies de *Passiflora*, permite superar las barreras para la hibridación sexual interespecífica que se presentan en este subgénero (Dornelas *et al.*, 1995; Otoni *et al.*, 1995; Anthony *et al.*, 1999). En este estudio se ajustaron los protocolos *in vitro* para el aislamiento de protoplastos a partir de tejido foliar y cotiledonar de plántulas de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, el cultivo de los protoplastos y la regeneración de plántulas a partir de microcallos, proceso necesario para continuar hacia la obtención de híbridos somáticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron semillas de frutos seleccionados de *P. edulis* var. *flavicarpa*, las cuales fueron esterilizadas en una solución de hipoclorito de sodio al 1,5% durante 15 minutos y luego pasaron por tres enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas fueron escarificadas mecánicamente y cultivadas bajo condiciones asépticas en medio MS con 2 mg/l de  $AG_3$  para su germinación en oscuridad a  $25\pm 2^\circ$  C. Posteriormente, al germinar fueron transferidas a cámara de crecimiento con fotoperíodo de 16 horas luz y  $25\pm 2^\circ$  C. Después de tres a siete semanas, cuando las plántulas presentaron buen desarrollo, se tomaron los cotiledones y el primer par de hojas verdaderas.

### AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS

Se ensayaron tres soluciones enzimáticas: Celulasa 1% + Pectolyasa 0,05%; Celulasa 1% + Macerozima 0,2% y Celulasa 2% + Macerozima 0,4%. Las enzimas fueron disueltas en solución CPW13M y 5 mM de MES, el pH se ajustó a 5,7. Estas soluciones enzimáticas fueron centrifugadas a 1.800 rpm, por 30 minutos y el sobrenadante filtrado a través de membrana *Millipore* de 0,22  $\mu$ m. Las pruebas para el aislamiento se realizaron a partir de tejido cotiledonar de tres a cinco semanas y tejido foliar de plántulas de cinco a siete semanas, tomando 500 mg de tejido; los cotiledones y hojas se manipularon por separado, fueron seccionadas y suspendidas en una solución de plasmólisis CPW13M durante una hora, de acuerdo a Dornelas y Vieira (1993). Las secciones del tejido plasmolizadas se transfirieron a cajas Petri de poliestireno de 5 cm de diámetro, que contenían 6 ml de solución enzimática, (ver Tabla 1), permitiendo que el envés de la hoja quedara en contacto con la solución. La digestión se realizó en oscuridad a  $27^\circ$  C y con agitación permanente a 40-50 rpm por 16 horas; para cada tratamiento enzimático

se realizaron tres repeticiones. La suspensión de protoplastos fue tamizada mediante una malla con poros de 60  $\mu\text{m}$ , se realizaron tres lavados con solución CPW13M y centrifugaciones a 700 rpm; después se procedió al conteo de los protoplastos con apariencia esférica y retención de organelos, utilizando la cámara de Newbauer, además, se determinó la viabilidad con FDA, de acuerdo a Blackhall *et al.*, (1994).

#### CULTIVO DE PROTOPLASTOS

Se realizaron diluciones de la suspensión de protoplastos con medio KM8p, para ajustar las densidades de siembra a  $5 \times 10^4$ , 1,  $1,5$  y  $2 \times 10^5$  protoplastos/ml. Éstos fueron sembrados en cajas Petri de poliestireno, en medio KM8p (1975), solidificado con agarosa (SIGMA) al 0,6%, empleando el sistema de gotas en serie de acuerdo a Eriksson (1985), adicionadas con 300 g/ml de cefotaxim; las gotas sólidas fueron cubiertas con medio KM8p líquido. El medio KM8p fue modificado en la concentración de glucosa a 100 g/l y zeatina 1 mg/l. Se comparó el efecto de la presencia y ausencia de 300  $\mu\text{g/ml}$  del antibiótico cefotaxim, sobre la eficiencia de cultivo, de acuerdo a D'Utra Vaz *et al.* (1993). En estos ensayos se adicionaron 600  $\mu\text{g/ml}$  de cefotaxim al medio de cultivo KM8p con el doble de concentración de sus componentes (2X), se esterilizó por filtración y se le adicionó el mismo volumen de una solución de agarosa al 1,2% esterilizada en autoclave; la mezcla se hizo cuando la solución de agarosa se encontraba a 40° C para lograr la concentración final (X), de igual forma se procedió para los ensayos sin antibiótico. Una vez solidificadas las gotas con los protoplastos, se adicionaron 3 ml de medio KM8p líquido sin cefotaxim. Las cajas fueron selladas con parafilm y se incubaron a  $25 \pm 2^\circ$  C en oscuridad; en cada tratamiento se realizaron cinco repeticiones.

La concentración del osmótico (glucosa) fue disminuida progresivamente, después del décimo día de cultivo, mediante diluciones cada siete días, se retiraron 3 ml de medio líquido y reemplazados por un volumen similar de la combinación KM8p:KM8, mezclados en las proporciones 3:1, 2:1, 1:1 y 1:3 (v/v) respectivamente antes de su adición a las cajas de cultivo. El medio KM8 presenta composición similar al KM8p en los macro y micronutrientes, vitaminas, ácidos orgánicos, caseína hidrolizada, agua de coco, MES, ANA y la mayoría de azúcares; difiere en que el KM8 tiene concentración de glucosa 10 g/l, sacarosa 20 g/l, zeatina 0,5 mg/l y 2,4-D 0,1 mg/l. Se hicieron observaciones frecuentes bajo el microscopio para monitorear el comportamiento de los protoplastos; después de nueve días de cultivo, se determinó la frecuencia de división como el porcentaje de protoplastos en división. Aproximadamente a los 30 días de cultivo se determinó la eficiencia de cultivo, como el número de microcallos con diámetro mayor de 1 mm sobre el número de protoplasto sembrados. Posteriormente, los microcallos fueron transferidos a medio MS solidificado con agar, adicionado con diferentes combinaciones de BAP 1 mg/l y ANA (1-3 mg/l) para continuar la proliferación celular. Estos cultivos permanecieron bajo fotoperíodo de 16 horas luz. Después de cuatro semanas, fueron subcultivados a medio MS solidificado con agar y adicionado con 2 mg/l de BAP y 0,5 -1 mg/l de AIB para inducir diferenciación de yemas; el enraizamiento de los brotes se evidenció al transferirlos a medio básico de MS libre de reguladores de crecimiento (Rivera, 1997; Rivera y Perea, 2001).

## ANÁLISIS DE DATOS

En el aislamiento de protoplastos se aplicó el diseño estadístico de bloques completos aleatorios, agrupando las unidades experimentales en tres bloques o repeticiones; bajo un arreglo factorial que permitió estudiar el efecto de la combinación enzimática y la fuente de protoplastos. Los resultados del cultivo de protoplastos fueron analizados mediante el diseño completamente al azar bajo un arreglo factorial, teniendo en cuenta: procedencia de los protoplastos (hojas primarias o cotiledones), presencia o ausencia del antibiótico cefotaxim y la densidad de siembra. Se aplicaron dos ANDEVA para estimar diferencias entre tratamientos, uno para el aislamiento y otro para la fase de cultivo; la prueba de Duncan permitió comparar medias de tratamientos (Steel y Torrie, 1985). Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS 3.0 para analizar los datos.

## RESULTADOS

## AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS

Después de 16 horas de incubación se logró, la producción de una gran cantidad de protoplastos con una viabilidad mayor de 70%, (Tabla 1). Períodos de exposición a la solución enzimática, superiores a 18 horas fueron nocivos, se observa aumento en liberación de protoplastos, pero hay disminución en la viabilidad.

SOLUCIÓN ENZIMÁTICA % PESO/VOLUMEN	RENDIMIENTO	
	Hojas	Cotiledones
Celulasa 1% + Pectolyasa 0,05%	T <sub>1</sub> . 4,78 ± 1,32 x 10 <sup>6</sup>	T <sub>4</sub> . 2,06 ± 1,01 x 10 <sup>6</sup>
Celulasa 1% + Macerozima 0,2%	T <sub>2</sub> . 3,24 ± 0,92 x 10 <sup>6</sup>	T <sub>5</sub> . 1,89 ± 0,44 x 10 <sup>6</sup>
Celulasa 2% + Macerozima 0,4%	T <sub>3</sub> . 3,39 ± 1,25 x 10 <sup>6</sup>	T <sub>6</sub> . 2,67 ± 1,46 x 10 <sup>6</sup>

Tabla 1. Rendimiento. Cantidad de protoplastos viables liberados por 500 mg de tejido. Celulasa Onozuka R-10 SERVA; Macerozima R-10 SERVA y Pectolyasa Y-23 SIGMA.

Los protoplastos de maracuyá que proceden de hojas y cotiledones jóvenes, presentaron cloroplastos grandes con distribución uniforme en el citoplasma (Fig. 1A); mientras que el empleo de tejido foliar mayor de siete semanas y cotiledones senescentes, produjo menor cantidad de protoplastos, con cloroplastos que se condensaron en algunos sitios del citoplasma y con viabilidad menor al 70%. Los mayores rendimientos correspondieron a 6,48 x 10<sup>6</sup> y 4,60 x 10<sup>6</sup> protoplastos viables /500 mg de tejido, obtenidos respectivamente con la combinación enzimática de Celulasa R-10 al 1% y Pectolyasa Y-23 al 0,05% a partir de hojas (tratamiento 1) y la solución enzimática Celulasa al 2% y Macerozima al 0,4% para cotiledones (tratamiento 6). Se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos enzimáticos ( $F_{(5,10)} = 5,18$ ;  $p < 0,05$ ). Los protoplastos de hoja presentaron diámetro promedio de 19,45 ± 0,50 µm y los de cotiledones presentaron diámetro promedio de 28,90 ± 0,62 µm.

### CULTIVO DE PROTOPLASTOS

En los protoplastos obtenidos a partir de cotiledones y hojas primarias se observó la conformación de la pared celular después de tres días de cultivo en medio con cefotaxim, la formación de colonias después de tres semanas de cultivo y microcallos a las cuatro semanas. Las primeras divisiones celulares se evidenciaron después de cinco a siete días de cultivo, después de 14 días de cultivo, se observó aumento progresivo de las divisiones mitóticas y las primeras colonias celulares de aproximadamente 30-40 células, luego de 20 días de cultivo (Figs. 1B, 1C y 1D). Se presentó un mayor porcentaje de división celular con el empleo de 300 µg/ml del antibiótico cefotaxim, también se encontraron diferencias significativas entre las cuatro densidades de siembra utilizadas ( $F_{(1,34)} = 13,83$ ;  $p < 0,05$ ).

La respuesta de los protoplastos en cultivo, exhibió diferencias relacionadas con el origen de los protoplastos, ( $F_{(1,34)} = 5,96$ ;  $p < 0,05$ ). En los que provienen de hojas primarias, el mayor efecto en la frecuencia de división correspondió al empleo de cefotaxim; se registraron diferencias significativas para la densidad de siembra ( $F_{(3,15)} = 9,26$ ;  $p < 0,05$ ), la mejor se evidenció a  $1,5 \times 10^5$  protoplastos/ml con una frecuencia promedio de  $17,8 \pm 5,44\%$  en presencia de cefotaxim y de  $9,66 \pm 3,24\%$  en ausencia del antibiótico. En los obtenidos de cotiledones, se registraron diferencias relacionadas con la densidad de siembra ( $F_{(3,15)} = 4,36$ ;  $P < 0,05$ ), la mejor correspondió a  $5 \times 10^4$  protoplastos/ml con una frecuencia promedio de  $15,6 \pm 4,31\%$  en presencia de cefotaxim y de  $7,8 \pm 2,06\%$  en ausencia del antibiótico. La eficiencia de cultivo presentó diferencias entre el porcentaje de colonias formadas a partir de los protoplastos que provienen de hojas y de cotiledones ( $F_{(1,34)} = 11,78$ ;  $p < 0,05$ ), la mayor eficiencia se observó en los cultivos de protoplastos de cotiledones; en éstos, la adición de cefotaxim se constituyó en el factor de mayor influencia, la eficiencia más alta se alcanzó a una densidad de  $5 \times 10^4$  protoplastos/ml con un promedio de  $0,37 \pm 0,08\%$ . Los protoplastos que provienen de hojas, también formaron mayor número de colonias celulares en presencia de cefotaxim, la densidad de siembra más apropiada fue  $1,5 \times 10^5$  protoplastos/ml con una eficiencia promedio  $0,09 \pm 0,02\%$ . El manejo del nivel osmótico se facilitó por la utilización del sistema de siembra en gotas solidificadas con agarosa que contienen los protoplastos, esto permitió retirar periódicamente el medio líquido circundante y cambiarlo por la mezcla de medios KM8p:KM, de manera que se disminuyeron progresivamente las condiciones del osmótico en el medio sin afectar la proliferación celular. Los primeros microcallos se evidenciaron a los 30 días de cultivo (Fig. 1E); estos callos con diámetro mayor a 1 mm, fueron transferidos a medio de cultivo de MS solidificado con agar adicionado con ANA y BAP, expuestos progresivamente a la luz.

Los callos con tamaño aproximado de 4 a 5 mm fueron subcultivados para inducir la diferenciación de yemas en medio MS con 2 mg/l de BAP y 1 mg/l de AIB (Fig. 1F), la diferenciación de yemas se observó en un 35% de los callos derivados de protoplastos de hoja y en 40% de los callos derivados de cotiledones. El enraizamiento se logró en un 60% de las yemas, las restantes continuaron formando callo.

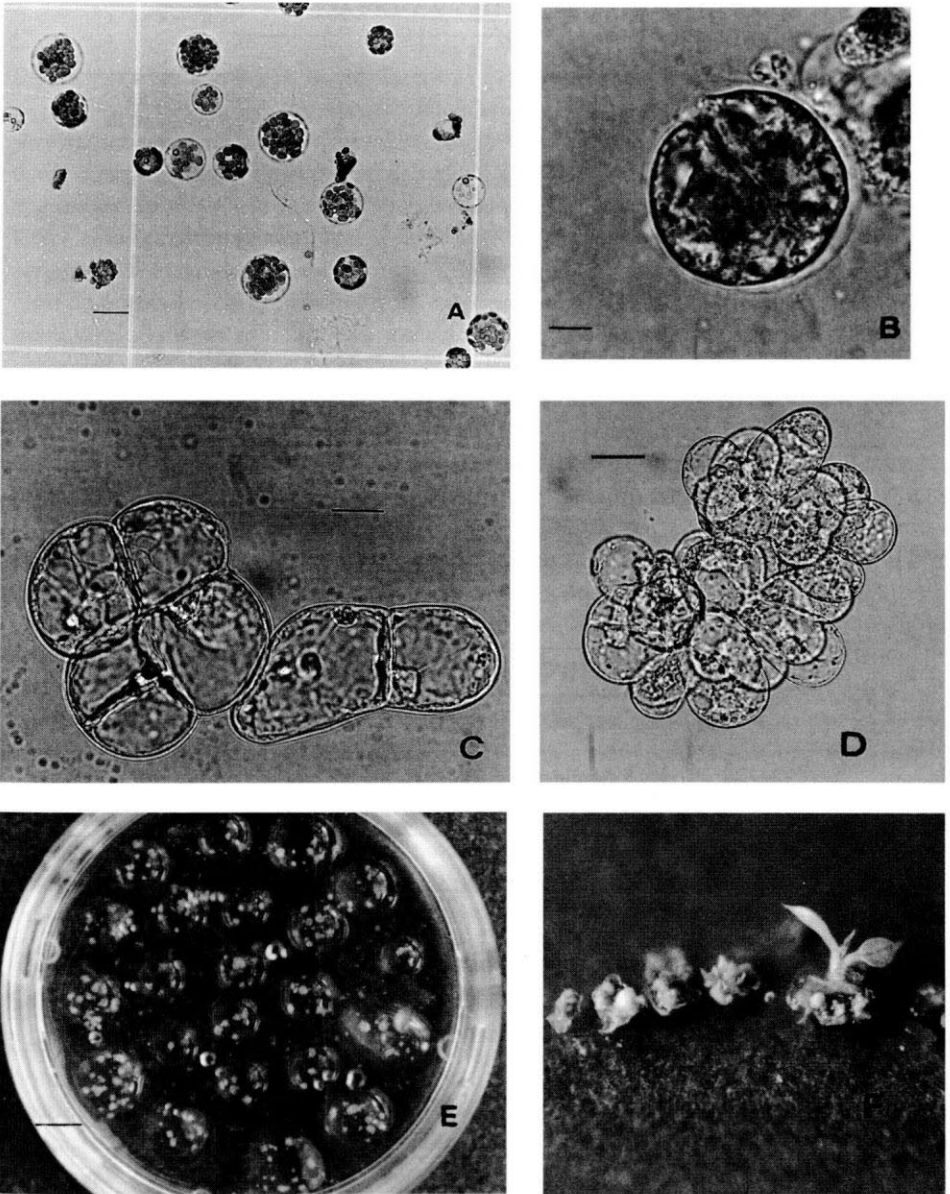


Figura 1. Secuencia de aislamiento y cultivo de protoplastos en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*; A. Aislamiento y conteo a partir de hojas; barra 40  $\mu\text{m}$ . B. Reconformación de la pared y primera división celular, a los siete días de cultivo; barra 10  $\mu\text{m}$ . C. Segunda división celular a los 12 días de cultivo; barra 10  $\mu\text{m}$ . D. Colonia celular a los 20 días de cultivo; barra 20  $\mu\text{m}$ . E. Microcallos a los 30 días de cultivo, se aprecia el sistema de gotas en serie empleado en la siembra de los protoplastos; barra 5 mm. F. Regeneración a partir de callos.

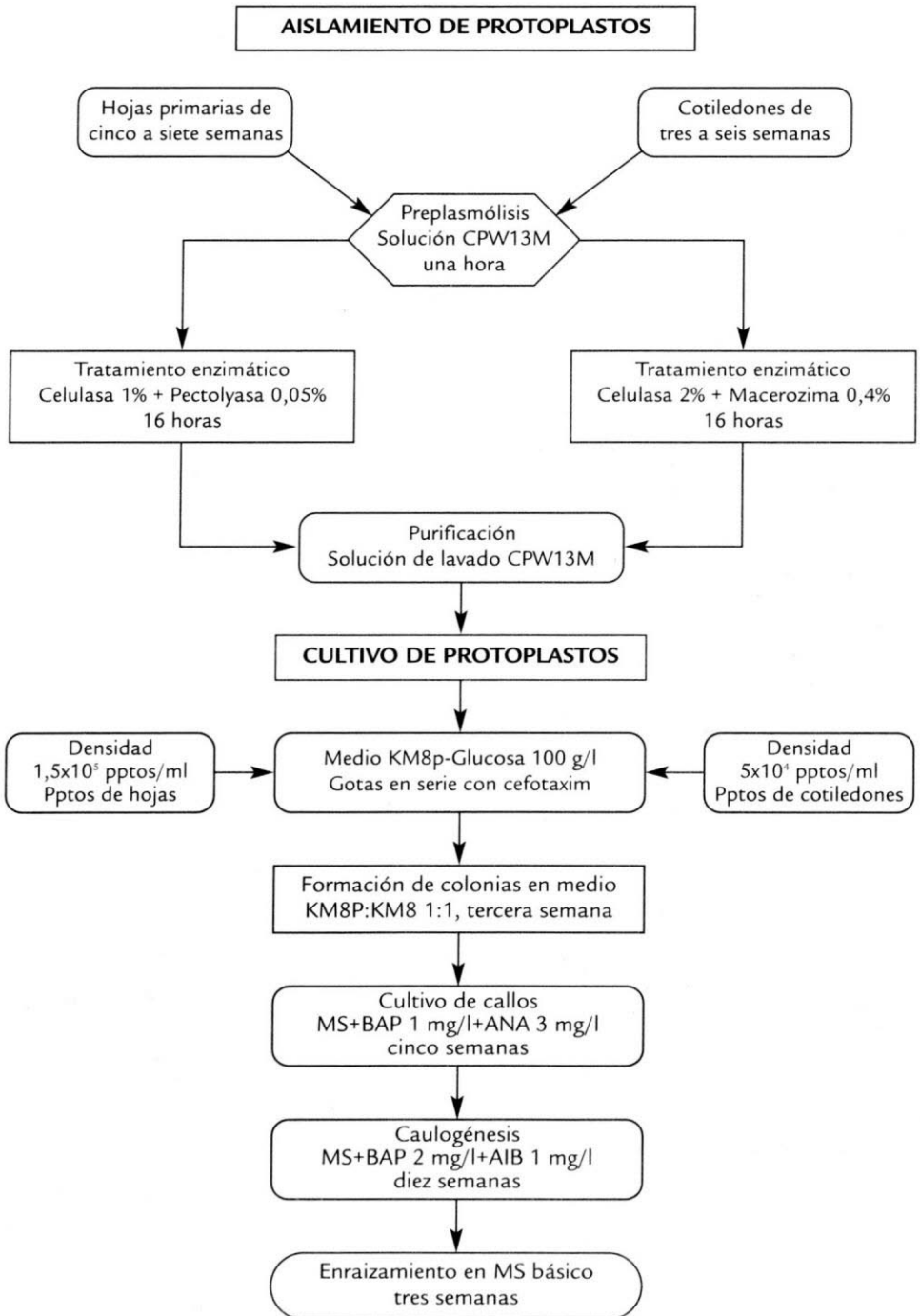


Figura 2. Proceso de regeneración a partir de callos derivados de protoplastos obtenidos de hojas primarias y cotiledones de *Passiflora edulis* variedad *flavicarpa*.



## DISCUSIÓN

En las investigaciones con protoplastos es importante resaltar que los diferentes procesos a que son sometidos durante el aislamiento, pueden tener un efecto deletéreo que se debe disminuir mediante una cuidadosa manipulación de los diferentes factores que intervienen en el proceso, incluso algunos investigadores consideran que el aislamiento y cultivo de protoplastos es más un arte que una técnica (Eriksson, 1985). Entre estos procesos traumáticos, se encuentra la remoción de la pared, por ésto se recomienda estabilizar la membrana citoplasmática mediante el empleo de una solución de preplasmólisis, previa al tratamiento enzimático; esta solución tiene la misma osmolaridad que la solución enzimática. En este trabajo se utilizó como estabilizador osmótico manitol al 13% en la fase de aislamiento, esta concentración fue muy eficiente para disminuir el choque osmótico generado por la digestión de la pared celular. En esta especie, Dornelas y Vieira (1993), evaluaron la utilización de concentraciones de manitol al 9 y 13%, observaron que el manitol al 9% generó dificultades como la explosión de un gran número de protoplastos, mientras que al 13% mantiene las condiciones del nivel osmótico apropiadas sin afectar la viabilidad de los protoplastos. De otra parte, la selección de explantes que provienen de plántulas *in vitro* facilitó la utilización de abundante material homogéneo libre de contaminantes, evitando la aplicación de agentes desinfectantes que pueden tener un efecto negativo en la viabilidad de los protoplastos (Blackhall *et al.*, 1994).

La utilización de hojas primarias y cotiledones jóvenes como fuente de protoplastos permitió obtener gran cantidad de protoplastos viables y contribuyó definitivamente a la proliferación celular, en razón a que el tratamiento con enzimas para degradar la pared celular implica la desdiferenciación y la reorientación del proceso morfogénico, las células del mesófilo joven tienen mayor capacidad para tolerar los tratamientos traumáticos y mantener su totipotencia. Las soluciones y concentraciones de las enzimas empleadas permitieron alcanzar rendimientos similares a los reportados por Vieira y Dornelas (1996) para cotiledones y D'Utra Vaz *et al.* (1993) para hojas, sin afectar seriamente la viabilidad. El medio de cultivo empleado para protoplastos fue el propuesto por Kao y Michayluk, 1975 (KM8p), modificado al incrementar la concentración de glucosa a 100 g/l y zeatina a 1 mg/l, este medio facilitó la expresión del potencial de los protoplastos para sintetizar la pared celular e iniciar el proceso mitótico. Investigaciones anteriores sobre cultivo de protoplastos en *P. edulis* var. *flavicarpa*, (D'Utra Vaz *et al.*, 1993; Dornelas y Vieira, 1993; Dornelas *et al.*, 1995 y Otoni *et al.*, 1995), utilizaron el medio de cultivo de Kao (1977) con las modificaciones de Gilmour *et al.*, 1989; este medio difiere en que las concentraciones de ácidos orgánicos, caseína hidrolizada, agua de coco y azúcares excepto sacarosa, están diluidas a la mitad de las indicadas en el medio de Kao y Michayluk (1975); además, aumentaron la concentración de glucosa de 68,4 g/l a 100 g/l.

En la evaluación de la eficiencia de cultivo se observaron diferencias entre el porcentaje de colonias formadas a partir de los protoplastos que provienen de hojas y de cotiledones; la mayor eficiencia se obtuvo en los cultivos de protoplastos de cotiledones;

donde la adición de cefotaxim, se constituyó en factor importante para lograr una elevada frecuencia de división y elevada eficiencia de cultivo. Así, en protoplastos aislados de cotiledones, la mayor eficiencia se alcanzó a una densidad de  $5 \times 10^4$  protoplastos/ml con un 0,37%. En los protoplastos aislados de hojas, la densidad de siembra más apropiada fue  $1,5 \times 10^5$  protoplastos/ml con una eficiencia promedio de 0,09%. Sin embargo, se observaron colonias en la mayoría de los tratamientos sin el antibiótico para las dos procedencias, con menor eficiencia de cultivo. Es evidente el efecto positivo que tuvo sobre el cultivo de protoplastos de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, la inclusión de cefotaxim en el medio, al respecto D'Utra Vaz *et al.* (1993), reportaron que la adición al medio de cultivo de cefotaxim en concentraciones entre 50-400  $\mu\text{g/ml}$ , fue esencial para mantener divisiones sucesivas en protoplastos de mesófilo. De otra parte, Mathias y Boyd (1986) emplearon este antibiótico en el medio de cultivo para aumentar la organogénesis en callos de *Triticum aestivum* L. y sugirieron que la degradación del cefotaxim por las esterases de la célula produce metabolitos que actúan como reguladores de crecimiento.

La metodología descrita en esta investigación para el aislamiento, cultivo y regeneración a partir de protoplastos, es aplicable a otras *Passifloras* de acuerdo a ensayos preliminares con *P. ligularis*, *P. mixta* y *P. pinnatistipula* (Rivera, 1997). La aplicación de protocolos específicos en el mejoramiento de las *Passifloras* presenta un gran potencial para transferir características que se encuentran en las especies silvestres hacia las especies cultivadas, en la obtención de líneas de mejoramiento que deben ser evaluadas (Rivera, 1997; Anthony *et al.*, 1999). En híbridos obtenidos por fusión de protoplastos de *P. edulis* var. *flavicarpa* con *P. amethystina*, Barbosa y Vieira (1997), obtuvieron algunas plantas con viabilidad del polen superior al 72% y apareamiento multivalente de los cromosomas, esto indica el potencial que tiene la hibridación somática para el mejoramiento genético de las especies cultivadas mediante la introgresión de genes de resistencia a plagas, enfermedades y otros caracteres deseables que se encuentran en las *Passifloras* silvestres. La regeneración a partir de protoplastos es una de las fases más limitantes para la aplicación de las técnicas de fusión y transformación directa mediante electroporación y biobalística (Feher y Dudits, 1994; Vieira y Dornelas, 1996), esta investigación complementa trabajos nuestros sobre regeneración en algunas especies de *Passiflora* de la región Andina, enfocados hacia la utilización de los recursos fitogenéticos nativos (Rivera y Perea, 2001). A corto plazo, es posible obtener estos híbridos somáticos para apoyar programas de mejoramiento, reduciendo el tiempo requerido para generar nuevas variedades que contribuyan a mejorar la productividad de los cultivos de maracuyá, granadilla y badea, con lo cual se podría fortalecer la participación de estas frutas en los mercados internacionales.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Agencia Internacional de Energía Atómica IAEA. Especial reconocimiento al Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo logístico para realizar esta investigación. Igualmente,

a la Dra. Esperanza Torres, por sus valiosos aportes. Agradecemos las sugerencias de los tres evaluadores anónimos del manuscrito.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANTHONY P., W. OTONI, J.B. POWER, K.C. LOWE, M.R. DAVEY. 1999. Protoplast Isolation, Culture and Plant Regeneration from *Passiflora*. En: Hall, R.D. (Ed.), Methods in Molecular Biology. Vol. 111. Plant Cell Culture Protocols. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp. 169-182.
- BARBOSA L.V., M.L.C. VIEIRA. 1997. Meiotic Behavior of Passion Fruit Somatic Hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystina* Mikan. Euphytica 98: 121-127.
- BLACKHALL N.W., M.R. DAVEY, J.B. POWER. 1994. Isolation, Culture and Regeneration of Protoplasts. En: Dixon R.A. and González R.A. (Eds.), Plant Cell Culture. IRL Press, Second Edition. Oxford, pp 27-39.
- DORNELAS M.C., M.L.C. VIEIRA. 1993. Plant Regeneration from Protoplast Cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, Degener *P. amethystina* Mikan and *P. cincinnata*, Mast. Plant Cell Reports 13: 103-106.
- \_\_\_\_\_, F.C.A. TAVARES, J.C. DE OLIVEIRA, M.L.C. VIEIRA. 1995. Plant Regeneration from Protoplast Fusion in *Passiflora* spp. Plant Cell Reports 15: 106-110.
- D'UTRA VAZ F.B., A.V.P. DOS SANTOS, G. MANDERS, E.C. COCKING, M.R. DAVEY, J.B. POWER. 1993. Plant Regeneration from Leaf Mesophyll Protoplasts of the Tropical Woody Plant, Passion Fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener): The Importance of the Antibiotic Cefotaxime in the Culture Medium. Plant Cell Reports 12: 220-225.
- ERIKSSON T. 1985. Protoplast Isolation and Culture. En: Fowke, L. and Constabel, F. (Eds.) Plant Protoplasts. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, pp 1-20.
- ESCOBAR L.A. 1991. La sistemática y evolución de las *Passifloras*. En: Memorias del Primer Simposio Internacional de *Passifloras*. Centro Frutícola Andino. Cali, Colombia, pp. 51-54.
- FEHER A., D. DUDITS. 1994. Plant Protoplasts for Cell Fusion and Direct DNA Uptake: Culture and Regeneration Systems. En: Vasil I. and Thorpe T. (Eds.), Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp 71-117.
- FREARSON E.M., J.B. POWER, E.C. COCKING. 1973. The Isolation, Culture and Regeneration of Petunia Leaf Protoplasts. Developmental Biology 33: 130-137.
- GILMOUR D., M. DAVEY, E. COCKING. 1989. Production of Somatic Hybrid Tissues Following Chemical and Electrical Fusion of Protoplasts from Albino Cell Suspensions of *Medicago sativa* and *M. borealis*. Plant Cell Reports 8: 29-32.
- GUPTA M.P. 1995. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Convenio Andrés Bello - CYTED. Editorial Presencia, Bogotá.
- KAO K.N., M.R. MICHAYLUK. 1975. Nutritional Requeriments for Growth of *Vicia hajastana* Cells and Protoplast at a Very Low Population Density in Liquid Media. Planta 126: 105-110.

- MATHIAS R., L. BOYD. 1986. Cefotaxime Stimulates Callus Growth, Embryogenesis and Regeneration in Hexaploid Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* 26: 217-223.
- MURASHIGE T., F. SKOOG. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- OTONI W.C., N.W. BLACKHALL, F.B. D'UTRA VAZ, F.B. CASALI, J.B. POWER, M.R. DAVEY. 1995. Somatic Hybridization of the *Passiflora* Species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener and *P. incarnata* L. *Journal of Experimental Botany* 46: 777-785.
- PAYAN F.R., F.W. MARTIN. 1975. Barriers to the Hibridization of *Passiflora* Species. *Euphytica* 24: 709-716.
- RÍOS-CASTAÑO D., R. SALAZAR. 1980. *Passifloras*. En: Frutales: Manual de asistencia técnica No. 4. Instituto Colombiano Agropecuario ICA, Bogotá, pp. 365-395.
- RIVERA R. 1997. Aislamiento y cultivo de protoplastos y embriogénesis somática *in vitro* en *Passiflora edulis* variedad *flavicarpa* Degener. Trabajo de Grado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- \_\_\_\_\_, M. PEREA. 2001. Morfogénesis *in vitro* de *Passifloras*. En: Perea M. (Ed.), *Biotecnología agrícola: un enfoque hacia el mejoramiento de plantas*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Fondo de Fomento Hortofrutícola, Asofrucol, Universidad Nacional de Colombia y Asociación Colombiana de Estudios Vegetales *in vitro* ACEVIV. Bogotá, Colombia, pp. 177-183.
- STEEL R., J. TORRIE. 1985. *Bioestadística*. Editorial McGraw Hill. Bogotá.
- VIEIRA M.L.C., M.C. DORNELAS. 1996. Regeneration of Plants from Protoplasts of *Passiflora* Species (Passion Fruit). En: Bajaj Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 38. *Plant Protoplasts and Genetic Engineering*, VII. Springer Verlag. Berlin, pp. 108-119.