

Alternativas para la gelificación del medio de cultivo en la producción de vitroplantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) y de parcha (*Passiflora quadrangularis*)

Alternatives for gelation of the culture medium in production vitroplants passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) and giant granadilla *Passiflora quadrangularis*)

Eneida Carolina OTAHOLA BELLO¹, y Víctor Alejandro OTAHOLA GÓMEZ²

1/Universidad de Oriente. Departamento de Ingeniería Agronomía, Escuela de Ciencias del agro y del Ambiente. Maturín, estado Monagas. Venezuela. Telef: 0414-7640661 E-mail: eneidaotaholabello@gmail.com. 2/ Laboratorio de Biotecnología Universidad de Oriente, Núcleo Monagas. Campus Universitario Juanico, Maturín, estado Monagas.

RESUMEN

La obtención de plantas mediante cultivo de tejidos puede ser una alternativa para ofrecer a los productores de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) y la parcha (*P. quadrangularis* L.) plantas sanas y con alta condición genética. Por supuesto, es necesario vencer algunos obstáculos, especialmente en lo relativo a los altos costos de las plantas obtenidas por esta vía, ya que los reactivos y equipos utilizados son muy costosos y casi en su totalidad no producidos en el país. Por esta razón se realizó un experimento para evaluar diferentes alternativas en la sustitución del agar nutritivo por otras sustancias, tales como almidón de maíz (maizina®) o agar comercial (utilizado en la industria alimenticia) y determinar su efecto sobre las características físicas del medio de cultivo y sobre el desarrollo de vitroplantas de parchita y parcha. Se utilizaron seis tratamientos, combinando agar reactivo y almidón de maíz (Maizina Americana®) en combinaciones (100% AR; 20 %AM – 80AR; 40%AM – 60%AR; 60 %AM – 40%AR; 80%AM – 20%AR y 100%AM respectivamente). Para evaluar el crecimiento de los explantes se consideró los tratamientos donde se utilizó 20 y 40% de almidón de maíz y se utilizaron además el agar reactivo puro y la combinación 50 – 50 de agar reactivo y agar comercial y 100% de agar comercial. En este último experimento se evaluaron las variables sobrevivencia y altura de los explantes, número de hojas/explante y número de segmentos nodales/explante. Los datos fueron analizados por ANAVA y las diferencias entre los promedios mediante la prueba DMS al 0,05. Se observaron buenas características físicas y durabilidad del medio de cultivo al utilizar la combinación de hasta 40% de almidón de maíz y 60% agar reactivo. En cuanto a la sobrevivencia de los explantes se observaron respuesta diferencial entre las especies utilizadas, la parchita mostró mejor desarrollo al utilizar agar nivel reactivo, mientras que la parcha se comportó mejor al utilizar una mezcla de 50 – 50 de agar reactivo y agar comercial. Los resultados obtenidos indican que se puede sustituir al agar nivel reactivo con agar comercial e inclusive con almidón de maíz, pero en este último la durabilidad del medio se ve comprometida y se descompone antes de los 45 días.

Palabras claves: Maizina, parcha, vitroplantas, parchita.

ABSTRACT

The production of plants through tissue culture can be an alternative to provide passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) and giant granadilla (*P. quadrangularis* L.) growers with healthy plants of high genetic quality. Of course, it is necessary to overcome some obstacles, especially regarding the high costs of plants obtained through this method, since the reagents and equipment used are very expensive and almost entirely not produced in the country. For this reason, an experiment was conducted to evaluate different alternatives for replacing the nutrient agar with other substances, such as corn starch (Maizena®) or commercial agar (used in the food industry), and to determine their effect on the physical characteristics of the culture medium and on the

development of in vitro passion fruit and giant granadilla plants. Six treatments were used, combining reactive agar and corn starch (Maizena Americana®) in combinations (100% RA; 20% CS – 80% RA; 40 %CM – 60%RA; 60%CM – 40%RA; 80%CM – 20%RA, and 100%CM, respectively). To evaluate the growth of the explants, treatments using 20% and 40% corn starch were considered, and pure reactive agar as well as a 50–50 combination of reactive agar and commercial agar, and 100% commercial agar were also used. In this last experiment, the variables survival and height of the explants, number of leaves per explant, and number of nodal segments per explant were evaluated. The data were analyzed by ANOVA, and the differences between means were assessed using the LSD test at 0.05. Good physical characteristics and medium durability were observed when using a combination of up to 40% corn starch and 60% reactive agar. Regarding explant survival, differential responses were observed among the species used; parchita showed better development when using reactive agar alone, while parcha performed better when using a 50 – 50 of reactive agar and commercial agar. The results obtained indicate that reactive agar can be replaced with commercial agar and even with cornstarch, but in the latter case the medium's durability is compromised and it decomposes before 45 days.

Key words: Maizina, giant granadilla, vitroplants, passion fruit.

INTRODUCCIÓN

El género *Pasiflora* es el de mayor importancia económica dentro de la familia Passifloraceae y la mayoría de las especies están localizadas en las regiones tropicales de Sur América, constituyendo un importante germoplasma que puede aportar genes para resistencia a enfermedades, tolerancia a condiciones ambientales adversas y mejor rendimiento y sabor (Martin y Nakasone, 1970). Dentro de las pasifloras comestibles que se cultivan en Venezuela, la más importante es, sin lugar a dudas, la parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.), de la cual se han realizado selecciones que han permitido mejorar las plantaciones comerciales, siendo cultivada en la mayoría de los estados del país (MPPAT, 2010). Por otro lado, la parcha (*Passiflora quadrangularis* L.), granadina o badea, como se le conoce en Venezuela, es una fruta que ha venido siendo cultivada en muchas regiones del país, pero solo en pequeñas plantaciones familiares, a pesar de tener una gran demanda como fruta de consumo directo (Otahola, 2011), siendo en ambos casos su propagación por semillas, a diferencia de lo que ocurre en otros países como Brasil, Colombia y Australia donde las plantas se obtienen por propagación asexual, lo cual causa homogeneidad en las plantaciones (CENTA, 2002).

En el estado Monagas, la mayoría de las siembras de parchita se realizan en los municipios Maturín y Piar, en altitudes por debajo de los 500 msnm. Sin embargo, en los últimos años se han ido

incrementando las siembras en los municipios Acosta y Caripe y en zonas altas del municipio Piar, en alturas por encima de los 1000 metros, ello como consecuencia de la aparición de la "muerte del pie o marchitez" de las plantas, causada por el hongo Fusarium y que ha diezmado las siembras en los suelos de las zonas bajas, donde problemas de estrés hídrico incrementan la aparición de patógenos y disminuyen considerablemente la duración de las plantas, llegándose al extremo de ser necesario realizar siembras de más de un 70% de las plantas cada año (MPPAT, 2010).

La producción de vitroplantas de diferentes especies de pasifloras es una alternativa que cada día toma mayor importancia y puede ser una posibilidad de ofrecer a los productores del rubro plantas sanas y con alta condición genética. Por supuesto, es necesario vencer algunos obstáculos, especialmente en lo relativo a los altos costos de las plantas obtenidas por esta vía ya que los reactivos y equipos utilizados son muy costosos y casi en su totalidad importados, lo cual encarece y dificulta su adquisición por las limitaciones de divisas que actualmente atraviesa Venezuela, siendo el agar nutritivo, utilizado como agente solidificante de los medios de cultivo uno de los insumos de mayor costo (Otahola, 1999).

En los últimos años se ha empleado una gran gama de sustancias para sustituir el agar, entre ellas la Agarosa, el Alginato, el Isobgol, la Carragenina, el Gelrite, el Phytogel, los almidones de diferentes especies de plantas y también la goma "katira" proveniente de la corteza de *Cochlospermum religiosum*

y la goma del “xanthano” proveniente de la bacteria *Xanthomonas campestris* (Roca, 1980; Henderson y Kinnersley, 1988; Trigiano y Gray, 2000; Jain y Babbar, 2002; Jain y Babbar, 2006). Posiblemente el que más popularidad ha alcanzado es el “Gelrite”. Debido a que el agar es costoso, es importante tomar en cuenta otros compuestos que permitan sustituir este soporte (FAO, 1990).

Algunos almidones han sido utilizados como gelificantes en medios de cultivo para organogénesis de plantas. Daud *et al.* (2011) cultivaron segmentos de tallos de *Celosia* sp. en medios de cultivo con la mitad de concentración de los componentes del medio Murashige y Skoog (1962) y otro sin tales suplementos, gelificados con harina de yuca, harina de arroz, harina de maíz y almidón de papa. No se encontraron diferencias significativas en la regeneración por vía de organogénesis directa en ninguno de los solidificantes probados.

Debido a sus propiedades funcionales se ha reportado el uso de almidones y gomas como agentes gelificantes, polímeros naturales como almidones y gomas, que sintetizan las plantas y algunas bacterias. Los almidones están formados por 2 polímeros: la amilosa, compuesta de cadenas lineales de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos α 1-4, y la amilopectina, compuesta de cadenas con ramificaciones cada 7 o 10 unidades de D-glucosa. La amilopectina posee también enlaces glicosídicos α 1-4 en las cadenas lineales y las ramificaciones se unen mediante enlaces α 1-6 (Salinas *et al.*, 2003). Aunque en términos generales, los almidones nativos se utilizan ampliamente en la industria alimentaria, por ser sustancias inocuas capaces de regular y estabilizar la textura de los alimentos y por sus propiedades espesantes y gelificantes, algunas dispersiones de almidón nativo, como aquellas obtenidas a partir de raíces y tubérculos, producen una textura gomosa y cohesiva en aquellos alimentos donde se utilizan como agentes espesantes (Pacheco y Techeira, 2009). Según Daud *et al.* (2011) todos los almidones tienen los mismos constituyentes, aunque difieren en el porcentaje de cada uno de ellos, dependiendo de la planta de la cual son extraídos, por lo cual tienen distintas propiedades funcionales (Hernández *et al.*, 2008).

En un estudio realizado en Irán, se probaron un medio líquido con sustrato de algodón y diferentes

combinaciones de almidón, sémola o harina, polvo de patata y agar en dos etapas de la micropropagación (inducción de brotes y proliferación) de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). La mayor frecuencia de regeneración se encontró en medios que contienen agar (0,8%), combinación de almidón: sémola, polvo de patata (2:1:1) en 9 y el 12% y la combinación de almidón (6%) más agar (0,4%), pero el máximo número brotes se produjeron en medios que contenían agar (0,8%), combinación de almidón (6%) más agar (0,4%) y medio líquido con sustrato de algodón. La mejor proliferación de brotes tuvo lugar en medio líquido con sustrato de algodón. Los resultados mostraron que la combinación de almidón: sémola, polvo de patata (2:1:1) en 9% y almidón (6%) más de agar (0,4%) pueden ser alternativas, para sustituir al almidón, adecuadas en etapa de regeneración, pero el número de brotes es menor que en medios gelificados con solo agar (Sharifi *et al.*, 2010).

Por su parte Martín *et al.* (2013), evaluaron las variables como inhibición de crecimiento, número de hojas y nudos, longitud y número de explantes sustituyendo el agar (AR) por almidón de papa (AP) como medio gelificante alternativo en medios de cultivo en la propagación *in vitro* de lulo (*Solanum quitoense Lam*). Para dicho trabajo se utilizaron cuatro tratamientos con las dosis 100% AR, 50% AR + 50% AP, 55% AR + 45% AP Y 60% AR + 40% AP, obteniendo un favorable desarrollo de los explantes de lulo en los medios gelificados con el 40% en peso de agar.

Romay y colaboradores (2006) sugieren la utilización de almidones modificados de yuca como sustitutos del agar. En el estudio cultivaron microesquejes de yuca (*Mahinot esculenta Crantz*) en medios solidificados con tres almidones modificados comparados con un blanco de Phytigel. De igual manera, analizaron el número de nudos y raíces para todos los tratamientos, y peso seco y húmedo para el mejor tratamiento con almidón y el blanco de Phytigel y encontraron diferencias significativas en los tratamientos AIM TF-352 y AIM TP-212 con respecto al control, pues disminuyeron el número de nudos y raíces, mientras el AIM TF-351 no. En el estudio se concluyó que el almidón AIM TF-351 no tuvo efectos significativos en ninguna de las variables analizadas y, por tanto, puede ser un sustituto del agar

La elaboración de medios de cultivo para la propagación de explantes, sustituyendo parcial o totalmente el agar por almidones, es una opción rentable, que disminuye los costos, debido a que los tubérculos o cereales de donde se extraen, se encuentran en mayor cantidad, comparado con las algas rojas (*Rhodophyceae*) de donde se extrae el agar. Por esta razón, se planteó la necesidad de evaluar alternativas para la sustitución del agar nutritivo por otras sustancias de menor costo y de fácil adquisición, tales como almidón de maíz (Maizina Americana®) o agar comercial (utilizado en la industria alimenticia) que permitan obtener medios de cultivo de buenas características físicas y el desarrollo de vitroplantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) y de parcha (*Passiflora quadrangularis*).

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Oriente del Núcleo Monagas, ubicado en el Campus Juanico de la ciudad de Maturín. El experimento se realizó en dos fases, en la primera se realizó la comparación de las características físicas de los medios de cultivo desarrollados a partir de la combinación de diferentes concentraciones de agar nivel reactivo (Sigma) y almidón de maíz (Maizina Americana®) en combinaciones (100 - 0; 20 – 80; 40 – 60; 60 – 40; 80 – 20 y 100 por ciento respectivamente), usando 30 g/L como dosis máxima de almidón de maíz y 7g/L para el agar nivel reactivo.

Los medios de cultivo fueron preparados de la manera tradicional como se hace en el laboratorio de Biotecnología, utilizando los componentes del medio de cultivo MS, ajustando el pH a 5,8 previo a agregar el solidificador. Los medios fueron vertidos en frascos de vidrio con aproximadamente 20 ml por frasco y cubiertos con tapas plásticas transparentes y colocados en la cámara de crecimiento con condiciones de luz artificial (2000 lux), temperatura de 25 +/- 2 grados centígrados y fotoperiodo de 15 horas de luz y 9 horas de oscuridad y también bajo condiciones ambientales no controladas.

La evaluación de las características físicas de los medios se realizó con intervalos de 15 días en las dos condiciones, considerando el color, la consistencia del medio, así como la descomposición en el tiempo, estableciéndose para ello una escala de valores de 0 a 4, tal como se muestra en el Cuadro 1.

Luego de la evaluación física de los medios de cultivo con diferentes concentraciones de almidón de maíz (Maizina Americana®) al ser evaluado después de 60 días de almacenamiento, y seleccionado de acuerdo a sus características físicas los tratamientos, se estableció otro experimento donde fueron evaluados los tratamientos de mejores características físicas (20% MA® + 80% AR) y (40% MA® + 60% AR) y además se incluyó otro solidificador utilizado en panaderías y pastelerías que fue identificado como agar comercial (AC). Se procedió a realizar la preparación de los cinco tratamientos, utilizando las dosis de almidón de maíz (Maizina Americana®), agar comercial (AC) y agar nivel reactivo (AR) seleccionadas, usando 30 g/L como dosis máxima de almidón de maíz, 7 g/L para el agar nivel reactivo y 20 g/L para el agar comercial. Para el tratamiento uno se utilizó 100% AR (7,00 g/L); tratamiento dos 80% AR (5,60 g/L) + 20% AM (6,00 g/L); tratamiento tres 60% AR (4,20 g/L) + 40% AM (12,00 g/L); tratamiento cuatro 50% AR (3,50 g/L) + 50% AC (10,00 g/L) y para el tratamiento cinco 100% AC 20,00 g/L.

Los medios preparados fueron vertidos en tubos de ensayo de 12 cm de largo y 2,5 cm de diámetro con 10 ml de medio aproximadamente y llevados a la autoclave por 20 min. Una vez esterilizados se dejaron enfriar a temperatura ambiente por un período de 48 horas antes de la siembra de las vitroplantas de parcha y parchita. A Las vitroplantas sembradas en los tratamientos antes mencionado, se les evaluó cuatro variables: sobrevivencia de los explantes, contando el total de explantes vivos/ total de explantes inoculados, altura de los explantes, número de hojas por explante y el número promedio de segmentos nodales presente por explante. Estas evaluaciones fueron realizadas cada quince (15) días hasta 60 días después de la siembra. El experimento se estableció bajo un diseño estadístico completamente aleatorizado. Se utilizó análisis de varianza y las diferencias entre los tratamientos se obtuvieron mediante la Prueba Mínima de la Diferencia Significativa (MDS) a un nivel de significación del 5%. Cada unidad experimental constó de cinco tubos de ensayo y cinco repeticiones para un total de 150 tubos.

RESULTADOS

Evaluación física de los medios de cultivos

En el cuadro 2, se muestran los resultados de las características presentes en los medios de cultivos, se

observa que el tratamiento 3 (40% MA y 60% AR) mostró buenas características y color translúcido, aunque de consistencia más floja que los tratamientos 1 y 2, su estabilidad se mantuvo entre 40 y 60 días.

Todo lo contrario, se observó en el tratamiento 4 (60% + 40% AR) el cual presentó malas características y color blanco, una consistencia blanda lo que no permite la estabilidad de los explantes y una descomposición a los 21 días de almacenamiento. Por otro lado, en el tratamiento 5 (80% MA + 20% AR), se observó un color blanco y de consistencia blanda, además una descomposición a los 21 días de preparado y el tratamiento 6 (100% AM), un color muy blanco lo que dificulta observar el crecimiento de las raíces y posibles hongos o bacterias, consistencia líquida y descomposición antes de los 15 días de almacenamiento. El Tratamiento 1 (100% AR) se utilizó como control del experimento y presentó entre sus características físicas, un color transparente y consistencia sólida, manteniendo sus características hasta los 60 días. Similar comportamiento se observó en el tratamiento 2, donde el medio se solidificó utilizando un 20% de AM y 80% de AR.

Estos resultados muestran que a pesar de las posibilidades de sustitución de agar reactivo por almidón de maíz se debe preparar el medio con un máximo de 40% de almidón de maíz, especialmente por la descomposición que sufre el medio de cultivo. Dados estos resultados se seleccionaron los tratamientos 2 y 3, los cuales permiten favorablemente el desarrollo de los explantes, manteniendo estable sus condiciones durante 60 días de almacenamiento y presentando un color translúcido que facilita observar el crecimiento de raíces y posibles hongos o bacterias que puedan desarrollarse en el medio y afectar, de esta manera, el crecimiento satisfactorio de los explantes.

Sobrevivencia de los explantes de Parcha (*Passiflora quadrangularis*)

En el cuadro 3, se muestra los resultados de la sobrevivencia de los explantes de parcha a los 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra. El análisis estadístico de los datos indicó que se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo estudiados en todas las evaluaciones realizadas. Se puede observar que el medio solidificado con agar nivel reactivo y el medio solidificado con la mezcla 60% de AR + 40% de MA® fueron los más

estables. Los datos obtenidos muestran claramente que la MA® en las dosis utilizadas con AR (tratamientos 2 y 3) puede ser una alternativa en la sustitución parcial de agar nivel reactivo, pero solo si los subcultivos se realizan antes de los 45 días, ya que, al dejarlos por más tiempo, la sobrevivencia de los explantes se ve ligeramente afectada. León (2007), trabajando con almidones AIM TF-352 y AIM TP-212 observó menos contaminación de explantes, pero la sobrevivencia fue mayor en los explantes sembrados en agar y almidón AIM TF-351. Estos resultados coinciden con los obtenidos en esta investigación, debido que la parcha arrojó mayor porcentaje de sobrevivencia en el medio solidificado con la mezcla de 60% AR + 40% AC.

Sobrevivencia de los explantes de Parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.*)

En el cuadro 4, se muestra el análisis estadístico de los datos de sobrevivencia de los explantes mostrando diferencias estadísticas. En las dos primeras fechas (15 y 30 dds) los datos fueron muy similares, encontrándose en ambos casos que los tratamientos donde se solidificó el medio de cultivo con 100%AR y en las mezclas 80%AR+ 20%MA® y 60%AR + 40%MA® mostraron 100% de sobrevivencia, siendo estadísticamente superiores a los tratamientos donde se utilizó la mezcla 50%AR + 50% AC y donde se utilizó AC solo.

En la evaluación realizada a los 45 dds se observó mayor sobrevivencia en los tratamientos donde se utilizó AR y la mezcla 80%AR+ 20%MA® los cuales mantuvieron 100% de sobrevivencia. Por otro lado, se observó un resultado similar en la evaluación realizada a los 60 dds, donde solo el tratamiento solidificado con AR se mantuvo estable y con 100% de sobrevivencia, mientras que en el tratamiento donde se utilizó 100AC fue de 50%.

Loaiza (2008), quien realizó un análisis fisiológico de tres marcas de agar y Gelrite en la germinación y desarrollo de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* link et Otto (Cactaceae), determinó que con el uso de Gelrite a razón de 3 g/L se obtuvo una mayor sobrevivencia de los explantes en comparación con el agar reactivo. Esos resultados obtenidos en dicho trabajo, difieren con los resultados de esta investigación, debido a que el medio que reportó mayor sobrevivencia fue el solidificado con AR solamente, en

Cuadro 1. Variables de evaluación de los medios de cultivo con diferentes concentraciones de almidón de maíz (Maizina Americana®) y agar nivel reactivo

Variables	Color	Consistencia	Durabilidad
Muy malo (0)	Muy blanco	Completamente líquido o muy duro	Descomposición muy rápida
Malo (1)	Blanco	Flojo – duro	Descomposición antes de 15 días
Regular (2)	Opaco	Gelatinoso o Blando	Duración hasta 40 días
Bueno (3)	Traslúcido	Sólido aguado	Duración hasta 60 días
Muy bueno (4)	Transparente	Sólido consistente	Mantiene condiciones después de los 60 días

Cuadro 2. Características observadas en los medios de cultivo preparados con diferentes dosis de almidón de maíz (Maizina Americana®) y agar nivel reactivo.

Tratamientos	Características	Color	Consistencia	Durabilidad
(1) 0% AM + 100% AR	Muy buena	Transparente	Sólida	Mantuvo consistencia por 60 días.
(2) 20%AM + 80% AR	Muy buena	Translúcido	Sólida	Mantuvo consistencia por 60 días
(3) 40% AM + 60% AR	Buena	Translúcido	Sólida- aguada	Estable entre 40 y 60 días.
(4) 60% AM + 40% AR	Mala	Blanco	Blanda	Descomposición a los 21 días.
(5) 80% AM + 20% AR	Muy mala	Muy blanca	Líquida	Descomposición a los 21 días
(6) 100% AM + 0% AR	Muy mala	Muy blanca	Líquida	Descomposición antes de los 15 días

Cuadro 3. Sobrevivencia (%) de los explantes de parcha (*P. quadrangularis*) al utilizar diferentes solidificantes del medio de cultivo, en evaluaciones realizadas a los 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)			
	15 dds *	30 dds *	45 dds *	60 dds *
100 % AR	67,00 B	67,00 B	67,00 C	67,00 C
80 % AR + 20% MA®	100,00 A	100,00 A	100,00 A	85,00 B
60 % AR + 40% MA®	100,00 A	100,00 A	100,00 A	100,00 A
50 % AR + 50% AC	100,00 A	100,00 A	100,00 A	83,00 B
100 % AC	100,00 A	100,00 A	75,00 B	50,00 D
Fc	5,785	5,785	3,301	3,023

ns: no significativo al 0.05

*: Significativo al 0,05. Letras iguales indican similitud estadística en cada fecha de evaluación

comparación con el medio solidificado con 100% AC (20 g) donde no hubo sobrevivencia después de la segunda evaluación.

Crecimiento (cm) de los explantes de Parcha (*Passiflora quadrangularis*)

En el cuadro 5, se observa ausencia de diferencias estadísticas entre los tratamientos para las tres primeras evaluaciones (15, 30 y 45 dds), mientras que si se presentaron para la evaluación a los 60 dds. En esta fecha de evaluación el mayor crecimiento de los explantes se presentó al utilizar medio de cultivo solidificado con la mezcla 50% AR + 50% AC, seguido del tratamiento 60%AR + 40% MA®. Los valores más bajos de crecimiento se observaron en la mezcla 80% AR + 20% MA® y al utilizar 100% AR y 100% AC los cuales fueron estadísticamente similares entre sí.

Llama la atención los resultados obtenidos al utilizar agar nivel reactivo como único solidificante del medio de cultivo, donde tampoco se observó crecimiento de los explantes, aunque si buena sobrevivencia. Sin embargo, se pudo observar que los mismos tenían pocos entrenudos y un crecimiento “arrepolado”.

Jiménez (2004) quien trabajó con micropagación de plátano (*Musa AAB*, cv curraré) en un medio con sustitución de insumos utilizando almidón de maíz como gelificante bajo una dosis de 70 g/L, determinó en su estudio que el medio con sustitución de insumo redujo el crecimiento de brotes, lo que difiere con los resultados obtenidos en este trabajo donde se observó un crecimiento sostenido de los explantes de parcha al utilizar las mezclas 50 % AR + 50% AC y 60 % AR + 40% MA®.

Crecimiento (cm) de los explantes de Parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)

En el cuadro 6, los datos analizados mostraron ausencia de diferencias estadísticamente significativas para las evaluaciones realizadas a los 15 y 30 dds, mientras que si se presentaron diferencias en las dos últimas evaluaciones (45 y 60 dds). Los resultados de la evaluación a los 45 dds indican que el mayor crecimiento de los explantes se encontró al utilizar el agar nivel reactivo como solidificante del medio de cultivo, el cual fue estadísticamente superior a los

demás tratamientos, los cuales se comportaron similares entre sí. A los 60 dds, se siguieron presentando los explantes de mayor tamaño en el medio solidificado con agar nivel reactivo, seguido por los tratamientos donde se utilizó la mezcla 80% AR + 20% MA® y 50 % AR + 50%. En general, el único tratamiento donde los explantes de parchita mostró crecimiento sostenido y estable fue en el tratamiento solidificado con agar nivel reactivo. En los otros tratamientos el crecimiento fue bajo o nulo.

Mohamed *et al.*, (2009), en su trabajo del maíz y la fécula de patata como una alternativa para el agar en la micropagación de *Solanum tuberosum*, quienes utilizaron, 1 y 2 g / 1 de agar + 40, 50 y 60 g / 1 de maíz comercial y de fécula de patata respectivamente, encontraron que el almidón de maíz no tuvo ningún efecto en la altura de las plántulas. Los resultados obtenidos en este estudio difieren a los obtenidos por el autor antes mencionado, debido que los explantes sembrados en los medios con mayor concentración de almidón de maíz no alargaron, por lo que se podría decir que el almidón de maíz si afectó el crecimiento de los explantes de parchita en forma negativa.

Número de hoja/explante de parcha (*Passiflora quadrangularis*)

En el cuadro 7, las pruebas de promedios realizadas mostró un comportamiento similar de los tratamientos en todas las fechas de evaluación, siendo el tratamiento donde se utilizó la mezcla de 50 % AR + 50% AC para solidificar el medio de cultivo, el que mostró mayor número de hojas/explante y fue estadísticamente superior a los otros tratamientos evaluados. En todas las fechas de evaluación los explantes con menor número de hojas se presentaron al utilizar 100 % de AC como solidificante del medio de cultivo. En general, se observó un incremento del número de las hojas de los explantes con el tiempo en el medio de cultivo, con la excepción de la evaluación a los 45 dds donde se evidenció una disminución del número de hojas en todos los tratamientos menos en aquel donde se utilizó agar nivel reactivo solamente.

Rodríguez y Echeverría (2006), quienes emplearon gel de sábila (*Aloe vera* (L.) N.L. Burm.) y harina de sagú (*Marantha arundinacea*) como soporte sólido de medio de cultivo para plantas medicinales

Cuadro 4. Sobrevida (%) de los explantes de parchita (*P. edulis f. flavicarpa* Deg.) al utilizar diferentes solidificantes del medio de cultivo, en evaluaciones realizadas a los 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra.

Tratamientos	Sobrevida (%)			
	15 dds *	30 dds *	45 dds *	60 dds *
100 % AR	100,00 A	100,00 A	100,00 A	100,00 A
80 % AR + 20% MA®	100,00 A	100,00 A	100,00 A	40,00 B
60 % AR + 40% MA®	100,00 A	100,00 A	67,00 B	0,00 D
50 % AR + 50% AC	40,00 B	40 ,00 B	40,00 C	20,00 C
100 % AC	43,00 B	14,00 C	0,00 D	0,00 D
Fc Ft	6.912	16.88	22.81	25.29
	2,58	2,58	2,58	2,58

ns: No significativo al 0.05

*: Significativo al 0,05. Letras iguales indican similitud estadística en cada fecha de evaluación

Cuadro 5. Crecimiento (cm) de los explantes de parcha (*P. quadrangularis*) al utilizar diferentes solidificantes del medio de cultivo, en evaluaciones realizadas a los 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra.

Tratamiento	Crecimiento (cm)			
	15 dds ns	30 dds ns	45 dds ns	60 dds *
100 % AR	0,13 A	0,00 A	0,03 A	0,03 C
80 % AR + 20% MA®	0,10 A	0,02 A	0,04 A	0,05 C
60 % AR + 40% MA®	0,01 A	0,10 A	0,15 A	0,24 B
50 % AR + 50% AC	0,02 A	0,13 A	0,18 A	0,34 A
100 % AC	0,01 A	0,01 A	0,01 A	0,02 C
Fc Ft	1,664	1,999	2,195	2,840
	2,58	2 ,58	2,58	2,58

ns: No significativo al 0.05

*: Significativo al 0,05. Letras iguales indican similitud estadística en cada fecha de evaluación

Cuadro 6. Crecimiento (cm) de los explantes de parchita (*P. edulis f. flavicarpa* Deg.) al utilizar diferentes solidificantes del medio de cultivo, en evaluaciones realizadas a los 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra.

Tratamiento	Crecimiento (cm)			
	15 dds ns	30 dds ns	45 dds *	60 dds *
100 % AR	0,09 A	0,18 A	0,24 A	0,38 A
80 % AR + 20% MA®	0,02 A	0,02 A	0,04 B	0,15 B
60 % AR + 40% MA®	0,03 A	0,03 A	0,03 B	0,03 C
50 % AR + 50% AC	0,10 A	0,07 A	0,02 B	0,10 BC
100 % AC	0,02 A	0,03 A	0,00 B	0,00 C
Fc Ft	1,014	1,639	2,975	3,132
	2,58	2,58	2,58	2,58

ns: No significativo al 0.05

*: Significativo al 0,05 Letras iguales indican similitud estadística en cada fecha de evaluación

(*Orthosiphon aristatus* Blume y *Artemisia absinthium* L.), demostrando que la combinación del tratamiento 0,4 % (p/v) de agar técnico No.3 + 15 % (p/v) de gel de sábila, produjo los mayores valores promedios, con un número promedio de hojas de 14 con respecto al agar técnico. Señalando, además, que si se aumenta la concentración de agar en los medios de cultivo in vitro resulta cada vez más difícil para los explantes establecer contacto con el medio, con lo que se limita la absorción de los compuestos del mismo. Los resultados obtenidos por los autores mencionados coinciden con los obtenidos en este trabajo donde el mayor número de hojas/explante se obtuvo en la mezcla de 50% AR + 50% AC siendo estadísticamente superior a los demás tratamientos.

Número de hoja/explante de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)

En el cuadro 8, se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las fechas de evaluación. A los 15 dds el número de hojas fue mayor en los explantes presentes en los tratamientos donde se utilizó 100% de AR y la mezcla de 50 % AR + 50% AC, los cuales fueron estadísticamente iguales entre sí y superiores a todos los tratamientos restantes, que también mostraron similitud estadística entre ellos. Para las evaluaciones realizadas a los 30, 45 y 60 días después de la siembra los resultados mostraron que el tratamiento 100% de AR presentó el mayor número de hojas/explante.

Jiménez (2004) quien trabajó con microporpagación de plátano (*Musa AAB*, cv Curraré) en un medio con sustitución de insumos, y utilizando una dosis de 70g/L de almidón de maíz, señala que el mayor número de hojas se obtuvo en el tratamiento solidificado con 7,5 g/L de agar solamente. Dichos resultados coinciden con los obtenidos en el cultivo de parchita donde el mayor número de hojas se reportó en los explantes solidificado con 100% AR.

Número de segmentos natales/explantantes de parcha (*Passiflora quadrangularis*)

Los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en todas las fechas de evaluación, pero con resultados similares en cada una de ellas, de acuerdo con lo mostrado en las pruebas de promedios respectivas. Así se puede observar que en todas las fechas de evaluación el mayor número de segmentos natales/explante se

presentó en el tratamiento donde se utilizó la mezcla 50 % AR + 50% AC para solidificar el medio de cultivo (Cuadro 9).

En general, se observó poco desarrollo de los explantes y los valores obtenidos difieren mucho de los encontrados por Otahola (1999) y Palma (2009), quienes reportan hasta seis y ocho segmentos natales/explante respectivamente a los dos meses después de la siembra. El bajo número de segmentos natales obtenidos en este experimento harían muy poco exitoso el proceso de microporpagación mediante cultivo de tejidos. Sin embargo, tal como se ha venido explicando, los valores aquí mostrados difieren de los obtenidos en otros experimentos en el Laboratorio de Biotecnología.

Los resultados del número de segmentos natales en el cultivo de parcha son respaldados por Chacón *et al.*, (2000), quienes determinaron que el tipo y concentración del gelificante utilizado durante el cultivo in vitro de *Dioscorea trifida* y *Dioscorea alata*, tuvo influencia sobre el desarrollo de las plántulas, donde concentraciones crecientes de los gelificantes causaron un cambio aparente del crecimiento, ya que el uso de dosis crecientes de Phytagel® afectó negativamente el número de segmentos natales en las vitroplantas.

Número de segmentos natales/explantantes de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg)

En el cuadro 10, se observa que los valores obtenidos para el número de segmentos natales fueron considerablemente bajos en el cultivo de la parchita. Indican que no hubo diferencias entre los tratamientos en la evaluación a 15 dds, pero sí ocurrió en las tres evaluaciones posteriores. En los tres casos se mostraron resultados similares, el tratamiento donde se utilizó 100% de AR fue donde se presentó el mayor número de segmentos natales, siendo estadísticamente diferente a los demás tratamientos.

Henderson y Kinnersley (1988), quienes trabajaron con almidón de maíz como un agente gelificante alternativo para el cultivo de tejido, demostraron que el crecimiento y diferenciación de los cultivos de células vegetales se incrementó en los medios de cultivos gelificados con almidón de maíz en lugar de agar, lo que difiere con los resultados obtenidos en este estudio, donde el mayor número de segmentos natales se obtuvo en el medio gelificado con 100% AR.

Cuadro 7. Número de hojas en los explantes de parcha (*P. quadrangularis*) al utilizar diferentes solidificantes del medio de cultivo, en evaluaciones realizadas a los 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra.

Tratamiento	Número de hojas			
	15 dds *	30 dds *	45 dds *	60 dds *
100 % AR	1,50 C	4,00 C	4,50 D	5,00 C
80 % AR + 20% MA®	2,69 B	6,69 B	5,00 C	4,82 C
60 % AR + 40% MA®	2,73 B	6,79 B	5,43 B	7,79 B
50 % AR + 50% AC	3,50 A	8,42 A	6,33 A	8,60 A
100 % AC	0,83 D	4,45 C	3,11 E	3,17 D
Fc Ft	22,29	4,096	29,43	8,879
	2,58	2,58	2,58	2,58

ns: No significativo al 0.05

*: Significativo al 0,05. Letras iguales indican similitud estadística en cada fecha de evaluación

Cuadro 8. Número de hojas en los explantes de parchita (*P. edulis f. flavicarpa* Deg.) al utilizar diferentes solidificantes del medio de cultivo, en evaluaciones realizadas a los 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra.

Tratamiento	Número de hojas			
	15 dds *	30 dds *	45 dds *	60 dds *
100 % AR	1,00 A	3,20 A	4,27 A	4,60 A
80 % AR + 20% MA®	0,40 B	0,80 C	1,40 C	3,50 B
60 % AR + 40% MA®	0,33 B	0,67 CD	0,67 D	1,00 D
50 % AR + 50% AC	1,00 A	1,50 B	2,00 B	2,33 C
100 % AC	0,33 B	0,33 D	0,00 D	0,00 E
Fc Ft	7,547	6,865	12,971	3,247
	2,58	2,58	2,58	2,58

ns: No significativo al 0.05

*: Significativo al 0,05. Letras iguales indican similitud estadística en cada fecha de evaluación

Cuadro 9. Número de segmentos natales en los explantes de parcha (*P. quadrangularis*) al utilizar diferentes solidificantes del medio de cultivo, en evaluaciones realizadas a los 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra.

Tratamiento	Número de segmentos natales			
	15 dds *	30 dds *	45 dds *	60 dds *
100 % AR	0,00 D	0,50 D	1,00 C	1,50 B
80 % AR + 20% MA®	0,23 B	0,69 C	1,15 B	1,09 C
60 % AR + 40% MA®	0,57 B	1,21 B	1,29 B	1,36 B
50 % AR + 50% AC	0,92 A	1,67 A	1,50 A	2,00 A
100 % AC	0,08 C	0,27 E	0,22 D	0,00 D
Fc Ft	22,29	4,096	29,43	8,879
	2,58	2,58	2,58	2,58

ns: No significativo al 0.05

*: Significativo al 0,05. Letras iguales indican similitud estadística en cada fecha de evaluación

Cuadro 10. Número de segmentos nodales en los explantes de parchita (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.) al utilizar diferentes solidificantes del medio de cultivo, en evaluaciones realizadas a los 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra.

Tratamiento	Número de segmentos nodales			
	15 dds ns	30 dds *	45 dds *	60 dds *
100 % AR	0,36 A	1,21 A	1,29 A	1,64 A
80 % AR + 20% MA®	0,20 A	0,60 B	0,40 B	0,40 B
60 % AR + 40% MA®	0,33 A	0,33 C	0,00 C	0,00 D
50 % AR + 50% AC	0,33 A	0,50 BC	0,50 B	0,67 C
100 % AC	0,00 A	0,00 E	0,00 C	0,00 D
Fc	7,547	6,865	12,971	3,247
Ft	2,58	2,58	2,58	2,58

ns: No significativo al 0.05

*: Significativo al 0,05. Letras iguales indican similitud estadística en cada fecha de evaluación

DISCUSIONES GENERALES

En la evaluación física del medio de cultivo solidificado con almidón de maíz en sustitución del agar se seleccionaron los tratamientos 2 (20% AM + 80% AR) y 3 (40% AM + 60% AR), debido que presentaron las mejores condiciones físicas; tienen consistencia sólida, que permite el desarrollo de los explantes, mantiene estable sus condiciones durante y después de los 60 días de almacenamiento y presentaron un color translúcido que facilita observar el crecimiento de raíces y posibles hongos o bacterias que puedan desarrollarse en el medio y afectar, de esta manera, el crecimiento satisfactorio de los explantes.

La parchita presento mejores respuestas en la producción de las vitroplantas, en cuanto a sobrevivencia, crecimiento (cm), número de hojas/explante y de segmentos nodales/explante en el medio solidificado con 100% agar reactivo, por el contrario, los explantes de parcha mostró en los tratamientos con 50% AR + 50% AC y 60% AR + 40% MA® buena respuesta en cuanto a las variables ya mencionadas anteriormente. Por lo tanto, el cultivo de parcha es más tolerante en el uso de MA® y AC en las mezclas utilizadas como sustitutos parciales de agar nivel reactivo, pero hasta los 45 días, ya que se observó que al dejarlos por más tiempo la sobrevivencia de los explantes se ve afectada.

CONCLUSIONES

Es factible la sustitución parcial del Agar en los medios de cultivo par el establecimiento *in vitro* de parchita y parcha, especialmente con agar comercial, aunque se observó un crecimiento diferencial entre las especies de pasifloras utilizadas.

A pesar de los resultados alentadores es necesario evaluar otras combinaciones para establecer un posible protocolo para la preparación de los medios alternativos.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento parcial de la presente investigación, mediante el proyecto CI: 4-0301011545-09

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Centro nacional de tecnología agropecuaria y forestal (CENTA), 2002. Guía técnica de cultivo de maracuyá amarillo. El Salvador. 38 p.
- Chacón, A; Saborío, F; Torres, S; Valverde, R. 2000. Efecto del tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatación de plantas de yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*). Agronomía Costarricense 24 (2): 57-64.
- Daud, N., Mat Tal, R., Mohd Noor, N. N & Alimon, H. (2011). Potential of alternative gelling agents in

- media for the in vitro micro-propagation of Celosia sp. Internationals Journal of Botany 7(2), 183-188.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 1990. Estudios FAO Investigación y Tecnología, Roma.131pp.
- Hernández, M., Torruco Uco, J. G., Chel, L. & Betancur, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. Ciencia e Tecnología de Alimentos 28(3), 718-726.
- Henderson, W. E Y Kinnersley A. M. 1988. Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. Plant Cell, Tiss. Organ Cult. 15: 17-22.
- Jain, N. y Babbar, S. B. 2006. Xantham gum- an economical substitute for agar in plant tissue culture media. Plant Cell Reports 25: 81-84.
- Jain, N y Babbar, S. B. 2002. Gum Katira- a cheap gelling agent for plant tissue culture media. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 71: 223-229.
- Jiménez, A. 2 004. Micropropagación de plátano (*Musa* AAB cv Curráré) en un medio con sustitución de insumos. Escuela de Agronomía. Instituto Tecnológico de Costa Rica. San Carlos- Costa Rica.
- León, L. 2007. Uso de almidón de yuca como sustituto económico del agar en medio de cultivo para el crecimiento *in vitro* de fresa (*Fragaria X Ananassa* Duch.) Cultivar Chandler. Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Escuela de Ingeniería Agronómica. Universidad de Oriente. 81 p.
- Loaiza, C. 2008. Análisis fisiológico del efecto de tres marcas de agar y gelrite en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto (Cactaceae). Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma de Hidalgo. Pachuca de Soto – Hidalgo, México.
- Martin, D., Cárdenas O Y Cárdenas A. 2013. Almidón de papa, agente gelificante alternativo en medios del cultivo para propagación *in vitro* de lulo (*Solanum quitoense* Lam). Revista de Ciencias Agrícolas. 30(1): 3-11.2013.
- Martin, F. y H. Nakasone. 1970. The edibles species of passiflora. Economic Botany 24(3):333-343.
- Ministerio Del Poder Popular Para La Agricultura y Tierra (MPPAT). 2010. Anuario estadístico.
- Mohamed, M., Alsadon, A. y Mohaidib, Al-Ms. 2009. Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation. Afr. J. Biotechnol. 8: 9199-9203.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant.15, 473-497.
- Otahola, V. 2011. Passifloras de uso actual y potencial en el Estado Monagas. Trabajo de ascenso para optar a la categoría de profesor titular. Universidad de Oriente. 148 p.
- Otahola, V. 1999. Radiosensibilidad a radiaciones gamma de semillas y diferentes tipos de explantes en cultivos *in vitro* de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). Tesis de grado para el optar el título de MSc. en Agricultura Tropical. Universidad de Oriente. 190 p.
- Pacheco De Delahaye, E. y Techeira, N. (2009). Propiedades químicas y funcionales del almidón nativo y modificado de ñame (*Dioscorea alata*). Interciencia 34(4), 280-285.
- Palma, I. 2009. Comparación del crecimiento de tres especies de passifloras en cultivo *in vitro*. Tesis de grado para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Escuela de Ingeniería Agronómica. Universidad de Oriente. 158 p.
- Roca, W. 1980. El cultivo de meristemas de yuca. Guía de Estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 40 pp.
- Rodríguez H. y Echevarría I. (2006). Gel de Aloe vera L.N.L. Burm y harina de sagú como soporte sólido de medios de cultivo para plantas medicinales. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 11(1).
- Romay, G., Matheus, J., Gerlts, A., Rueda, R. y Santana, M. A. (2006). Almidón modificado de yuca como sustituto económico del agente solidificador para medios de cultivo de tejidos vegetales. Interciencia 3 (009), 686-689.
- Sharifi, A., Moshtaghi, N. y Bagheri, A. (2010). Agar alternatives for micropropagation of African violet (*Saintpaulia ionantha*). African Journal of su efecto en la calidad de la tortilla. Revista

Biotechnology 9 54), 9199-9203 Fitotecnia Mexicana 26(002), 115-121

Salinas, Y., Pérez, P., Castillo, J. y Alvarez, L. A. Trigiano R. N y Gray D. J. 2003. Relación amilosa amilopectina Culture concepts and laboratory exercises. CRC en el almidón de harina nixtamalizada de maíz y Press, Washington, DC, EEUU. 454 pp.