



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE CITOQUINAS Y AUXINAS EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE *Passiflora punctata*

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: MATHEW SEBASTIAN GAIBOR COBOS

TUTOR: PhD. CAROLINE NICOLE BACQUET PÉREZ

Tena - Ecuador

2024

Carrera de Biotecnología

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 16 de agosto de 2024

Yo, Mathew Sebastian Gaibor Cobos con documento de identidad 1726473695, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniería en biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en el presente documento, son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.



Mathew Sebastian Gaibor Cobos

CI: 1726473695

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Tena, 16 de agosto de 2024

Yo, Mathew Sebastian Gaibor Cobos, con documento de identidad 1726473695 en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Efecto de la aplicación de citoquinas y auxinas en el cultivo *in vitro* de *Passiflora punctata*”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.



Mathew Sebastian Gaibor Cobos

CI: 1726473695

Carrera de Biotecnología

Certificado de dirección de trabajo de titulación

Tena, 16 de agosto de 2024

Certifico que el trabajo de titulación: “Efecto de la aplicación de citoquinas y auxinas en el cultivo *in vitro* de *Passiflora punctata*”, aprobado bajo el mecanismo de titulación de: tesis, fue realizado por Mathew Sebastian Gaibor Cobos, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.



Caroline Nicole Bacquet Pérez

C.I: 1756516041

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Caroline Nicole Bacquet Pérez por brindarme la invaluable oportunidad de colaborar con ella. Su guía experta, paciencia y dedicación durante todo este proceso han sido fundamentales para la culminación exitosa de mis estudios.

Asimismo, deseo agradecer a Ángel Ojeda, cuyos conocimientos y sugerencias han enriquecido enormemente este trabajo. Su aporte fue fundamental en el análisis de los resultados, lo que contribuyó al desarrollo y la calidad del trabajo.

De igual manera quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi psicóloga, Paulina Nieto, quien me ha enseñado que soy el resultado de mis acciones y que tengo la capacidad de moldear mi futuro mediante el empoderamiento de mi vida. Agradezco también a mis amigos Michell Salcan, Ricardo Caiza y Ariel Tinajero por su constante apoyo emocional, así como por enriquecer y satisfacer tanto mis inquietudes académicas como personales.

Finalmente deseo expresar mi profundo agradecimiento a mi hermana Sarai Gaibor por su apoyo incondicional a lo largo de mi trayectoria académica. Su constante aliento y respaldo han sido pilares fundamentales en mi camino hacia el logro de mis metas educativas. Así mismo a mi familia por su inquebrantable apoyo, permitiéndome seguir estudiando y brindándome el respaldo necesario para hacer realidad mis sueños. Su amor y apoyo incondicional han sido un impulso invaluable en este viaje hacia el conocimiento y el crecimiento personal.

DEDICATORIA

A mis padres por darme la oportunidad de estudiar

TABLA DE CONTENIDOS

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad	ii
Autorización de publicación en el repositorio institucional	iii
Certificado de dirección de trabajo de titulación	iv
DEDICATORIA	vi
TABLA DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 <i>Passiflora</i>	1
1.1.2 <i>Passiflora punctata</i>	1
1.1.3 Morfología	2
1.1.4 Usos de <i>Passiflora</i>	3
1.1.5 Principales enfermedades	3
1.1.6 Cultivo <i>in vitro</i>	4
1.1.7 Medio de cultivo	4
1.1.8 Reguladores de crecimiento	5
1.1.8.1 Citoquinas	5
1.1.8.2 Auxinas	6
1.1.9 Reguladores de crecimiento en <i>Passiflora</i>	7
1.2 Planteamiento del problema	8
1.3 Justificación de la investigación	9
1.4 Objetivos de la investigación	10
1.4.1 <i>Objetivo General</i>	10
1.4.2 <i>Objetivos Específicos</i>	10
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	11
2.1 Diseño experimental	11
2.2 Preparación de medios	12
2.3 Obtención y desinfección de explantes	12
2.4 Incubación	13

2.5	Monitoreo y análisis de datos	13
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....		15
3.1	Supuestos de ANOVA	15
3.2	Ensayo citoquinas	15
3.2.1	<i>Brotes</i>	15
3.2.2	<i>Hojas</i>	17
3.3	Ensayo auxinas.....	18
3.3.1	<i>Brotes</i>	18
3.3.2	<i>Hojas</i>	20
3.3.3	<i>Raíces</i>	21
3.4	Ensayo de citoquinas vs. Auxinas	22
3.4.1	<i>Interacciones entre citoquina y auxina</i>	22
3.4.2	<i>Brotes</i>	23
3.4.3	<i>Hojas</i>	24
3.4.4	<i>Raíces</i>	26
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN		28
4.1	Ensayo de Citoquinas.....	28
4.1.1	<i>Brotes</i>	28
4.1.2	<i>Hojas</i>	29
4.2	Ensayo de Auxinas	30
4.2.1	<i>Brotes</i>	30
4.2.2	<i>Hojas</i>	31
4.2.3	<i>Raíces</i>	31
4.3	Ensayo de Combinaciones de Citoquinas y Auxinas.....	32
4.3.1	<i>Brotes</i>	32
4.3.2	<i>Hojas</i>	33
4.3.3	<i>Raíces</i>	34
4.4	Clorosis	34
REFERENCIAS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3.	Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para Auxinas, citoquinas y combinación en cultivo <i>in vitro</i> de <i>Passiflora punctata</i>	15
Tabla 2-3.	Tendencias y variaciones de citoquinas en función de las concentraciones para brotes.....	16
Tabla 3-3.	Comparaciones por pares utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad para número de hojas en ensayo citoquinas.	18
Tabla 4-3.	Tendencias y variaciones de auxinas en función de las concentraciones para brotes.....	19
Tabla 5-3.	Comparaciones por pares utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad para número de hojas en ensayo auxinas.....	21
Tabla 6-3.	Comparaciones por pares utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad para número de raíces en ensayo auxinas.....	22
Tabla 7-3.	Esquema de interacciones entre citoquina vs. auxina.	22
Tabla 8-3.	Tendencias y variaciones de citoquinas vs. auxinas en función de las concentraciones para brotes.....	23
Tabla 9-3.	Comparaciones por pares utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad para número de hojas en combinación de citoquinas vs auxinas.....	26
Tabla 10-3.	Comparaciones por pares utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad para número de hojas en combinación de citoquinas vs auxinas.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. <i>Passiflora punctata</i> a. toma general de la planta b.estípulas c. zarcillos d. hoja entera lobulada.	2
Figura 2-1. Señal de citoquinas a través de Hisp - Asp phosphorelay.....	6
Figura 3-1. Componentes clave en la percepción y señalización de auxinas.	7
Figura 1-2. Croquis del diseño experimental.....	11
Figura 1-3. Diagrama de cajas y bigotes del crecimiento de brotes por aplicación de BAP y kinetina.	17
Figura 2-3. Diagrama de cajas y bigotes del crecimiento de brotes por aplicación de IAA e IBA.	20
Figura 3-3. Diagrama de cajas y bigotes del crecimiento de brotes citoquinas vs auxinas.	24

RESUMEN

El género *Passiflora*, el más diverso de la familia Passifloraceae, abarca 530 especies y 400 híbridos distribuidos en América y Europa. Entre estas, *Passiflora punctata*, una especie silvestre no domesticada, juega un papel crucial en la crianza de las mariposas *Heliconius erato*, ampliamente comercializadas en artesanías, exposiciones e investigaciones científicas. No obstante, *P. punctata* es vulnerable a diversas patologías tropicales, lo que subraya la necesidad de desarrollar métodos eficientes de cultivo *in vitro*. Este estudio se centra en el uso de medios de cultivo enriquecidos con reguladores de crecimiento, como auxinas y citoquinas, para promover y controlar el crecimiento y desarrollo celular de *P. punctata*. Se realizaron tres ensayos con diferentes concentraciones de citoquinas (BAP, kinetina) y auxinas (IBA, IAA). En el tercer ensayo, se combinaron las concentraciones óptimas determinadas previamente. Los resultados mostraron que 2 mg/L. de 6-bencilaminopurina (BAP) generaron la mayor longitud de brotes, con una significancia estadística alta ($\text{Pr}(> F)$ de 5.25×10^{-16} ***). En el ensayo de auxinas, aunque no hubo diferencias significativas entre el ácido indol-3-butírico (AIB) y el ácido indol-3-acético (IAA), 2 mg/L. de IAA promovieron el crecimiento en hojas y raíces. Las combinaciones de 6-BAP a 2.5 mg/L. e IAA a 2.5 mg/L. mostraron la mayor longitud de brotes, sugiriendo una sinergia en la promoción de brotes y hojas, sin cambios significativos en las raíces. Estos resultados son significativos para la propagación *in vitro* de *P. punctata* y mejoran los protocolos de cultivo aplicables a otras especies vegetales importantes. Se recomienda ajustar las concentraciones de reguladores de crecimiento y aumentar los intervalos de tiempo para una morfogénesis más evidente, abriendo nuevas líneas de investigación.

Palabras Clave: Ácido indol-3-acético, ácido indol-3-butíricos, *in vitro*, reguladores de crecimiento, 6-bencilaminopurina, 6-furfuril-aminopurina.

ABSTRACT

The genus *Passiflora*, the most diverse in the Passifloraceae family, encompasses 530 species and 400 hybrids distributed across America and Europe. Among these, *Passiflora punctata*, a wild, non-domesticated species, plays a crucial role in the breeding of *Heliconius erato* butterflies, widely commercialized in crafts, exhibitions, and scientific research. However, *P. punctata* is vulnerable to various tropical pathogens, highlighting the need to develop efficient in vitro cultivation methods. This study focuses on using culture media enriched with growth regulators, such as auxins and cytokinins, to promote and control the cell growth and development of *P. punctata*. Three trials were conducted with different concentrations of cytokinins (BAP, kinetin) and auxins (IBA, IAA). In the third trial, the previously determined optimal concentrations were combined. The results showed that 2 mg/L of 6-benzylaminopurine (BAP) produced the greatest shoot length, with high statistical significance (Pr(>F) of $5.25\text{e-}16$ ***). In the auxin trial, although there were no significant differences between indole-3-butyric acid (IBA) and indole-3-acetic acid (IAA), 2 mg/L of IAA promoted growth in leaves and roots. Combinations of 6-BAP at 2.5 mg/L and IAA at 2.5 mg/L showed the greatest shoot length, suggesting a synergy in promoting shoots and leaves, without significant changes in roots. These results are significant for the in vitro propagation of *P. punctata* and improve cultivation protocols applicable to other important plant species. It is recommended to adjust the concentrations of growth regulators and increase the time intervals for more evident morphogenesis, opening new lines of research.

Key words: Growth regulators, Indole-3-butyric acid, Indole-3-acetic acid, *in vitro*, 6-benzylaminopurine, 6-furfuryl-aminopurine,

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Passiflora*

El género *Passiflora*, perteneciente a la familia Passifloraceae, es uno de los más diversos y ampliamente distribuidos, abarcando aproximadamente 530 especies y 400 híbridos artificiales (Fonseca et al., 2022; Pizarro et al., 2022). Su distribución geográfica es extensa, desde el sureste de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile. Los bosques tropicales de América del Sur, especialmente en Brasil, Colombia, Ecuador y Perú, albergan la mayor diversidad de especies debido a los variados climas y hábitats presentes, lo que ha permitido la evolución y diversificación de innumerables plantas. (Ulmer & MacDougal, 2004).

1.1.2 *Passiflora punctata*

En Ecuador, según el Herbario QCA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, *P. punctata* se distribuye en las provincias de El Oro, Loja, Azuay y Manabí. No obstante, portales como Trópicos también mencionan su presencia en las provincias de Guayas y Esmeraldas. (*Tropicos / Name - !Passiflora punctata L., s. f.*). La descripción morfológica de *P. punctata* ha resultado complicada debido a la presencia de polimorfismo. Esto ha llevado a la identificación de numerosas especies que posteriormente se han considerado sinónimos, dificultando una delimitación taxonómica precisa. Este fenómeno es consecuencia de la influencia selectiva ejercida por las mariposas de la subfamilia Heliconiinae (Deginani, 2001).

1.1.3 Morfología

A pesar de esta complejidad, se aborda la morfología del género *Passiflora* desde sus características generales. La mayoría de las especies son arbustos trepadores con tallos leñosos. Presentan hojas alternas que pueden ser enteras, lobuladas o, en ocasiones, compuestas. Las estípulas nacen en la base de los pecíolos y también poseen zarcillos axilares que surgen de pedicelos estériles (Dhawan et al., 2004). En cuanto a las raíces se describe que a mayor edad tienden a ser gruesas y lignificantes (M. M. B. Morales et al., 2015). **Ver figura 1-1**



Figura 1-1. *Passiflora punctata* a. toma general de la planta b. estípulas c. zarcillos d. hoja entera lobulada.

1.1.4 Usos de *Passiflora*

Las especies domesticadas más utilizadas, como *P. edulis*, *P. ligularis* y *P. quadrangularis*, han sido ampliamente estudiadas debido a sus frutos comestibles y su significativo valor comercial en la agricultura. Además, también son apreciadas por su valor ornamental, destacando por sus codiciadas flores (Dhawan et al., 2004; Peña & Cruz, 2020). Así mismo se han abierto campo en la industria de la medicina siendo empleadas en enfermedades como: colitis, diabetes tipo II, hipertensión, diarrea y disentería usando sus diferentes órganos en formas de extractos, harinas y zumos (Landázuri et al., 2021). Por otro lado, *P. punctata*, a pesar de ser una planta silvestre y no domesticada, juega un papel crucial en la comercialización de mariposas *Heliconius* para diversos fines, como investigaciones, exposiciones vivas, museos y artesanías. Esta planta hospedera, rica en compuestos cianogénicos tóxicos, ha obligado a las mariposas *Heliconius* a desarrollar la capacidad de detoxificar y utilizar estos compuestos para su defensa. Las hembras de *Heliconius* muestran un comportamiento preciso de oviposición, seleccionando meticulosamente brotes jóvenes de *P. punctata* para maximizar la supervivencia de sus larvas. Este delicado equilibrio de adaptaciones y contraadaptaciones, influenciado por la competencia interespecífica y la distribución geográfica, explica la coevolución entre *P. punctata* y *Heliconius* (Jiggins, 2017).

1.1.5 Principales enfermedades

Las condiciones tropicales, como precipitaciones intensas y altos niveles de humedad, son propicias para el desarrollo de hongos, virus y bacterias en *Passiflora*. Entre los hongos más comunes se encuentra la podredumbre de collar, causada principalmente por *Phytophthora*. Esta enfermedad se manifiesta inicialmente con el ennegrecimiento y descomposición de la base del tallo, lo que interrumpe el flujo de agua y nutrientes (Agrios, 2005).

Otro hongo significativo es el que causa la antracnosis, generalmente atribuido a *Colletotrichum*. La antracnosis se caracteriza por la aparición de manchas oscuras y

hundidas en las hojas, tallos y frutos. Estas lesiones pueden expandirse rápidamente en condiciones de alta humedad, provocando la caída prematura de hojas y frutos (Zakaria, 2021).

En el ámbito viral, el potyvirus y el virus de mosaico amarillo son prevalentes. Estos virus son transmitidos por insectos vectores, como los áfidos, y causan deformaciones en las hojas, mosaicos y manchas amarillas que afectan la fotosíntesis y el desarrollo general de la planta. Las plantas infectadas con estos virus presentan síntomas como la acronecrosis, marchitez foliar y, eventualmente, necrosis total de la planta (Fischer et al., 2008; Wang et al., 2021).

En el caso de las infecciones bacterianas, la mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas campestris pv. passiflorae*, es una de las más comunes. Esta enfermedad se manifiesta a través de la aparición de pequeñas manchas acuosas en las hojas y los frutos, que eventualmente se vuelven necróticas. La infección bacteriana puede provocar la caída prematura de hojas y afectar el desarrollo de los frutos, disminuyendo la producción y calidad de los mismos (Montoya-Estrada et al., 2013).

1.1.6 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* surge como una técnica prometedora que permite el desarrollo y la multiplicación de células, tejidos y órganos vegetales de plántulas en condiciones controladas. Esto se logra mediante la preparación de un medio nutritivo estéril, junto con la adecuada incorporación de reguladores de crecimiento (Bidabadi & Jain, 2020; Espinosa-Leal et al., 2018).

1.1.7 Medio de cultivo

Los medios de cultivo representan una parte fundamental del cultivo *in vitro*, ya que contienen las sustancias necesarias para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. Estos medios son soluciones acuosas que contienen sales minerales,

proporcionando los elementos esenciales, tanto macronutrientes como micronutrientes, necesarios para el desarrollo adecuado de las plantas (Murashige & Skoog, 1962). Suelen ser enriquecidos con sacarosa, aminoácidos, vitaminas y reguladores de crecimiento para promover un desarrollo óptimo de los tejidos vegetales (Suárez Padrón, 2020).

1.1.8 Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento desempeñan un papel crucial en el cultivo *in vitro*, regulando una variedad de procesos fisiológicos y morfológicos (Jaroszuk-Ścisiel et al., 2019). Estas hormonas pueden influir en la diferenciación celular, el crecimiento de tejidos y la formación de órganos, modificando los patrones morfológicos (Borjas-Ventura et al., 2020). La aplicación controlada de reguladores de crecimiento como auxinas y citoquinas, ajusta el desarrollo de las plántulas, promoviendo la formación de brotes, hojas y raíces, optimizando así el proceso de cultivo y aumentando la eficiencia de la propagación masiva (Wang et al., 2021).

1.1.8.1 Citoquinas

Las citoquinas son una clase de reguladores de crecimiento que juegan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Regulan la expansión y división celular, el metabolismo del fósforo y nitrógeno, el equilibrio hídrico, la integridad de los cloroplastos y la senescencia. Se sintetizan principalmente en las raíces y en el meristemo apical, y se trasladan hacia las partes aéreas mediante el xilema, empleando minerales como facilitadores de absorción (Asif et al., 2022; Vaishnav et al., 2023).

Una vez en las células diana, las citoquinas se unen a receptores específicos en la membrana plasmática denominados HKs (Histidina Kinasas), que auto transfieren un grupo fosfato a un residuo de histidina en la propia proteína. Este fosfato es luego transferido a un residuo de aspartato en una proteína intermedia, conocida como AHPs (Histidina Fosfotransferasa), la cual se transloca del citosol al núcleo celular. En el

núcleo, el grupo fosfato se transfiere a un residuo de aspartato en los reguladores de respuesta (RRs) tipo B, promoviendo la transcripción de genes específicos. Además, los RRs tipo A funcionan como reguladores negativos, inhibiendo la respuesta para evitar una señalización prolongada. Otros factores, como las proteínas PHPs (Histidina Fosfatasa) y el óxido nítrico (NO), modulan esta señalización fosforilando o desfosforilando proteínas específicas, ajustando así la respuesta celular a las citoquinas (Osugi & Sakakibara, 2015). **Ver figura 2-1.**

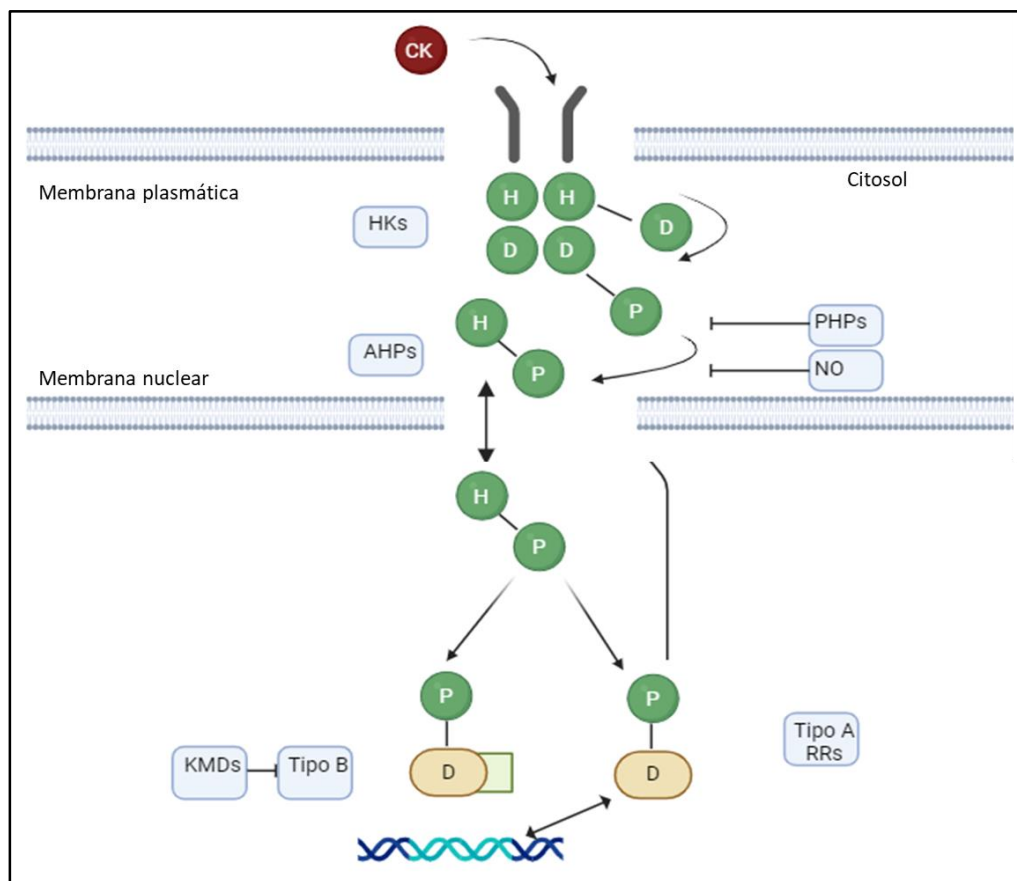


Figura 2-1. Señal de citoquinas a través de Hisp - Asp phosphorelay.
Fuente: Osugi & Sakakibara, 2015

1.1.8.2 Auxinas

Las auxinas son compuestos orgánicos de pequeño tamaño y bajo peso molecular que conforman el grupo más amplio y diverso de reguladores de crecimiento presentes, comúnmente en todas las plantas. Su función principal radica en regular diversas actividades de desarrollo vegetal, incluida la división celular, la formación de brotes, la

expansión vascular y el crecimiento de raíces horizontales. Además, las auxinas desempeñan un papel crucial en el control de la senescencia y en la respuesta de las plantas a patógenos, estrés abiótico y metales pesados. Asimismo, puede influir en la producción de frutos en plantas (Alcantara Cortes et al., 2019; Asif et al., 2022). Su mecanismo de acción inicia el proceso de señalización al unirse a los receptores TIR1/AFBs y Aux/IAA en el núcleo, que forman parte del complejo SCFTIR1 (compuesto por TIR1/AFB, ASK1, CUL1, RBX, y RUB) marcándose para poliubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma 26S. La degradación de Aux/IAA libera a los ARFs, que activan la transcripción de genes sensibles a auxinas (Ljung, 2013) . **Ver figura 3-1.**

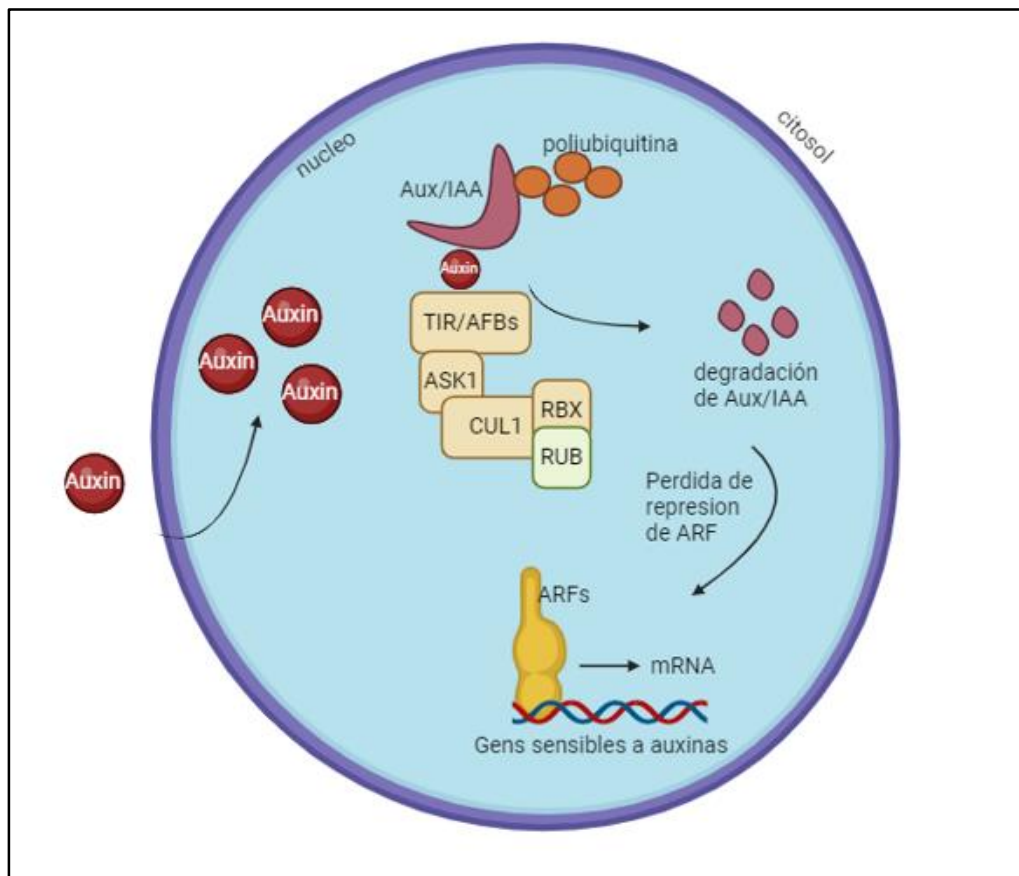


Figura 3-1. Componentes clave en la percepción y señalización de auxinas.
Fuente: Ljung, 2013

1.1.9 Reguladores de crecimiento en *Passiflora*

El uso de reguladores de crecimiento en *Passiflora* ha demostrado ser un enfoque eficaz para mejorar el desarrollo de estas plantas. Investigaciones han explorado la

implementación de diferentes hormonas y sus concentraciones para optimizar diversos procesos fisiológicos. Por ejemplo, el uso de 6-furfuril-aminopurina (kinetina) en concentraciones de 2 mg/L, ha mostrado desarrollar brotes de plántulas de *Pasiflora: edulis f. flavicarpa, edulis, alata, caerulea, mollissima, coccinea, herbertiana y suberosa* (Drew, 1991). Asimismo, la aplicación de 6-bencilaminopurina (6-BAP) en concentraciones de 0 a 2 mg/L ha sido efectiva en la inducción de brotes y la regeneración in vitro de tejidos de *P. edulis* (Antoniazzi et al., 2018). Por otro lado, el ácido indol-3-acético (IAA) y el ácido indol-3-butírico (IBA) se han utilizado en concentraciones 0.5, 1 y 2 mg/L, para mejorar el enraizamiento de esquejes (Jafari et al., 2017). Estas investigaciones subrayan la importancia de ajustar las concentraciones de reguladores de crecimiento según las necesidades específicas de la planta y el objetivo del cultivo.

1.2 Planteamiento del problema

La comercialización de mariposas *Heliconius* abarca desde la fascinación estética hasta la investigación científica y el turismo ecológico. Estas mariposas, con sus vibrantes colores y complejos patrones, han cautivado la atención global de coleccionistas, amantes de la naturaleza e investigadores (O. C. Morales et al., 2019). La crianza exitosa de *Heliconius* depende en gran medida de *P. punctata*, ya que esta planta proporciona el entorno ideal para la oviposición y sirve como alimento para las larvas durante su desarrollo, convirtiéndose en un refugio vital para su ciclo de vida (Jiggins, 2017). Sin embargo, cultivarla de forma tradicional se ha convertido en una tarea complicada por las enfermedades presentes en plantas tropicales (Wang et al., 2021). Estas enfermedades pueden comprometer la salud de *P. punctata*, reduciendo su disponibilidad y calidad, lo que a su vez afecta negativamente la cría de mariposas *Heliconius*. Ante estos desafíos, surge la necesidad de explorar métodos alternativos y más eficientes para su cultivo, asegurando así un suministro continuo y saludable.

1.3 Justificación de la investigación

En este sentido el cultivo *in vitro* surge como un método de evasión de enfermedades, y propagación masiva de especies vegetales (Rozo & Gutiérrez, 2020.). Esta metodología ha sido ampliamente utilizada para conservar y multiplicar plantas de importancia ecológica y económica, ofreciendo una alternativa viable al cultivo tradicional. Sin embargo, *P. punctata* al ser silvestre y no domesticada no cuenta con bibliografía acerca de su relación con el cultivo *in vitro* y mucho menos con la aplicación de reguladores de crecimiento. Entender que el éxito del cultivo *in vitro* depende en gran medida de la regulación de los procesos fisiológicos de la planta, especialmente en las etapas iniciales de multiplicación celular, es fundamental. En este contexto, el uso de reguladores de crecimiento como auxinas y citoquinas es esencial para controlar la morfogénesis vegetal, permitiendo una alta tasa de supervivencia y un desarrollo adecuado de las plantas (Bidabadi & Jain, 2020). Siendo cruciales para la elongación celular, la formación de raíces, la división celular y el desarrollo de brotes, garantizando así un crecimiento equilibrado y saludable (Thorpe, 2007).

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo General

Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento, tanto citoquinas (Kinetina y 6-BAP) como auxinas (IAA y IBA) en la elongación de brotes, inducción de hojas y raíces mediante cultivo *in vitro* de *P. punctata*.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de citoquinas (kinetina y 6-BAP) en la longitud de brotes e inducción de hojas de *P. punctata* en cultivo *in vitro*.
- Comparar la influencia de diferentes concentraciones de auxinas (IBA y IAA) en la longitud de brotes e inducción de hojas y raíces de *P. punctata* en cultivo *in vitro*.
- Determinar la combinación de citoquina y auxina más efectiva en términos de longitud de brotes e inducción de hojas y raíces.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

2.1 Diseño experimental

El diseño experimental se estructuró en tres fases: ensayo de citoquinas, ensayo de auxinas y combinación de auxinas y citoquinas. Para las dos primeras fases, se utilizó un diseño de bloques al azar, con arreglo factorial 2x3 con tres repeticiones, empleando diez esquejes por frasco, sumando un total de treinta explantes por concentración. Las concentraciones de citoquinas 6-furfuril-aminopurina (kinetina) & 6-bencilaminopurina (6-BAP) fueron 0, 1 y 2 mg/L. De igual manera en el ensayo de auxinas: ácido indol-3-butírico (IBA) & Ácido indol-3-Acético (IAA), se evaluaron concentraciones de 0, 1 y 2 mg/L. Finalmente, en la combinación de auxinas y citoquinas, se seleccionaron las concentraciones con mayor respuesta en términos de longitud de brotes e inducción de hojas y raíces de las dos fases anteriores, se estableció un gradiente de concentración de ± 0.50 mg/L. El diseño en esta fase fue completamente al azar con arreglo factorial 3x3, manteniendo tres repeticiones y diez esquejes por frasco, totalizando treinta explantes por combinación. **Ver figura 1-2.**

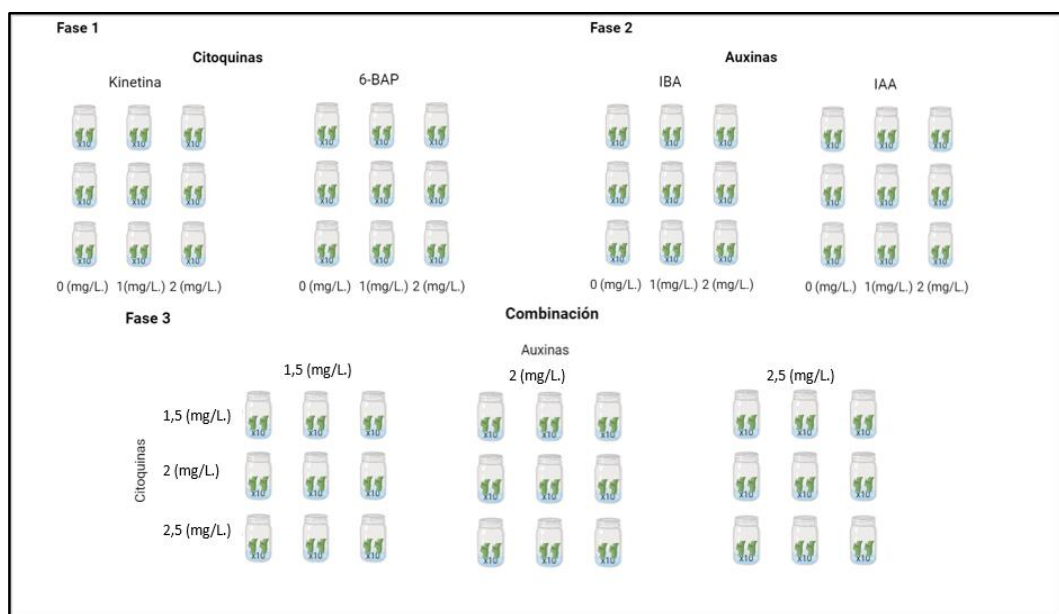


Figura 1-2. Croquis del diseño experimental.

2.2 Preparación de medios

Se empleó la metodología descrita por Molina (2015). Se preparó el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) (MERCK®), suplementado con sucrosa (Acofarma®) en una concentración de 30 g/L. Se ajustó el pH del medio de cultivo a 5.8, utilizando NaOH 0.1 M y un pH-metro digital para garantizar la precisión. También se adicionó agar planta (PythoTechnology®) en una cantidad de 9 g/L. Se vertió en dos frascos Boeco los cuales fueron calentados en el microondas hasta alcanzar el punto de ebullición, verificada la homogeneización, la solución se autoclavó (Otahola Gómez & Díaz González, 2010; Shekhawat et al., 2015).

Una vez que el medio se encontraba en una temperatura tolerable al contacto con la mano, se procedió a verter 40 mL en frascos de compota previamente autoclavados, de dimensiones 7,94 cm de alto x 13,5 cm de diámetro con capacidad de 500 ml, todo realizado dentro de una cabina de seguridad biológica (Thermo Scientific-1375®). Previo a la polimerización del medio se adicionó: fitohormona y fungicida TILT® ingrediente activo propiconazole: 1-[[2-(2,4-diclorofenil)-4-propil-1,3-dioxolan-2-il] metil]-1H-1,2,4-triazole en concentración de 0,015 ml/L., cada frasco fue etiquetado con la fecha, nombre del medio, concentración de hormona y concentración de fungicida. En adición a esto, cada frasco tenía en su base 4 marcas diferentes. Cada una colocada de manera intercalada que creaban un sistema ordinal para diferenciar cada tallo. Finalmente se almacenaron hasta el día de la siembra.

2.3 Obtención y desinfección de explantes

Bajo el contrato MAATE-DBI-CM-2023-0286 el muestreo de *P. punctata* se realizó en uno de los invernaderos de la Universidad Regional Amazónica Ikiam el cual se encuentra en la longitud -0.949873 y latitud -77.864446 a una altura media de 598 metros sobre el nivel del mar. Se seleccionaron segmentos de brotes nodales de 30 cm de largo como material inicial para este estudio, no se consideró la edad de la planta (Shekhawat et al., 2015). Los brotes fueron lavados con agua común y se retiraron las

hojas. Una vez limpios de impurezas iniciales se introdujeron en la cabina de seguridad biológica (Thermo Scientific-1375®) sobre toallas de mano para absorber el agua residual. Ya secos, con la ayuda de pinzas, bisturí y cajas petri como bases de disección, se segmentaron en esquejes de 1,5 cm de longitud, asignándoles una extensión de 0,5 cm en la parte superior del nudo y de 1 cm en la inferior. Esta diferencia de longitud se implementó para distinguir la polaridad con la que el brote se desarrolla (Bhowmik & Rahman, 2020). Finalmente, todos los esquejes fueron sometidos al proceso de desinfección empleado por Gómez & González (2010) realizando pequeñas modificaciones. Los brotes se sumergieron en una solución de alcohol al 70% durante un minuto, seguido de una inmersión en solución de agua y cloro comercial (5% hipoclorito de sodio) en preparación de tres partes de agua por cada parte de cloro, durante un periodo de 10 minutos. Finalmente, los brotes fueron lavados tres veces en intervalos de 5 minutos con agua autoclavada y depositados en toallas de mano autoclavadas (Otahola Gómez & Díaz González, 2010).

2.4 Incubación

Para los tres ensayos los frascos fueron colocados en la cámara bioclimática (JS RESEARCH INC) durante 21 días. Las plantas fueron sometidas a un programa de 15 horas de luz y 9 de oscuridad a una temperatura de 27 ± 1 °C, intensidad de luz de $32 \mu\text{Em}^2 \text{ s}^{-1}$ y humedad 80 % (Otahola Gómez & Díaz González, 2010).

2.5 Monitoreo y análisis de datos

Para los tres ensayos se realizó un control semanal durante un periodo de 21 días, en el cual se tomaron fotografías de las plántulas *in vitro*. Estas imágenes fueron procesadas mediante el programa ImageJ®, considerando la longitud del brote (cm), el número de hojas por brote y el número de raíces por vitroplanta, con el objetivo de registrar las respuestas morfogénicas de los diferentes reguladores de crecimiento. Finalmente, una vez obtenidas las bases de datos, se llevaron a cabo pruebas estadísticas, incluyendo Kolmogorov-Smirnov para la normalidad, Levene para la homogeneidad y un análisis de

varianza (ANOVA). También se realizó una comparación de datos por diferencias estadísticas mediante la prueba de Tukey. En caso de que los datos no cumplieran con la normalidad, se aplicó el equivalente no paramétrico de Kruskal-Wallis con ajuste de Bonferroni seguido de una prueba Wilcoxon. Todos los datos fueron analizados en R Studio® versión 4.3.2 (R Core Team, 2023), utilizando los paquetes ggpubr, lmttest, rstatix, ggplot2, readxl y dplyr, todos en su versión 3.4.0.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Supuestos de ANOVA

Se verificó que las variables evaluadas cumplieran con los supuestos necesarios de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para comprobar la normalidad, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, mientras que la homogeneidad de varianzas se evaluó utilizando la prueba de Levene.

Tabla 1-3. Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para Auxinas, citoquinas y combinación en cultivo *in vitro* de *Passiflora punctata*.

Prueba	Citoquinas		Auxinas			Combinación		
	Longitud de brotes	Número de hojas	Longitud de brotes	Número de hojas	Número de raíces	Longitud de brotes	Número de hojas	Número de raíces
Kolmogorov-smirnov	0.06	1.02e-11	0.68	2.2e-16	2.2e-16	0.63	2.8e-7	5.9e-12
p value								
Levene	0.33	4.51e-7	0.11	8.95e-13	2.2e-16	0.07	5.63e-8	1.4e-6

Los resultados indican que, para todos los tratamientos, la longitud de brotes respetó la normalidad y la homogeneidad de varianzas con valores $p > 0.05$. En contraste, el número de hojas y de raíces no cumplió con la normalidad ni la homogeneidad de varianzas en la mayoría de los casos con valores para $p < 0.05$.

3.2 Ensayo citoquinas

3.2.1 Brotes

Tras los 21 días de control, se observó que la mayor longitud de brote fue de 2.38 cm, mientras que la menor longitud fue de 0.28 cm, pertenecientes a los ejemplares tratados

con kinetina 1 mg/L. y kinetina 0 mg/L. respectivamente. Asimismo, el análisis de varianza ANOVA determinó que la interacción de la hormona y concentración fue estadísticamente significativa con un $\text{Pr}(> F)$ 5.25e-16 ***. No obstante, a pesar de que la mayor longitud se obtuvo con kinetina 1 mg/L, las muestras expuestas a la fitohormona BAP de 2 mg/L., exhibieron la mayor respuesta promedio en cuanto a la longitud de brotes, con una media de 1.19 cm y una desviación estándar de ± 0.44 cm. Además, la prueba Tukey reveló diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones para la longitud de brotes. Los valores de $\text{Pr}(> |t|)$ para las comparaciones fueron: kinetina y BAP 0 mg/L 0.0104 *, kinetina y BAP 1 mg/L. 0.990 y kinetina y BAP 2 mg/L < 0.001 ***. Esta prueba también permitió identificar las agrupaciones formadas por las diferencias estadísticas, siendo grupo “a” la fitohormona BAP 0 mg/L.; grupo “b” las hormonas kinetina 0 mg/L., BAP 1 mg/L. y kinetina 1 mg/L.; grupo “c” BAP 2 mg/L.; y por último el grupo “ab” de kinetina 2 mg/L. **Ver Tabla 2-3**

Tabla 2-3. Tendencias y variaciones de citoquinas en función de las concentraciones para brotes

Reguladores de crecimiento	Concentración (mg/L.)	Media (cm)	Desviación Estándar	Agrupamiento Tukey
BAP	0	0.615	± 0.390	a
BAP	1	0.867	± 0.349	b
BAP	2	1.197	± 0.442	c
kinetina	0	0.848	± 0.369	b
kinetina	1	0.903	± 0.401	b
kinetina	2	0.799	± 0.243	ab

letras iguales no son estadísticamente diferentes para $p \leq 0.05$ según Tukey

En la **Figura 1-3** se visualizan diferentes efectos en el crecimiento de los brotes. La combinación BAP 0 mg/L. presenta la mediana más baja 0.6 cm con un Q1 de 0.35 cm y un Q3 de 0.85 cm, indicando un menor crecimiento. En contraste, BAP 2 mg/L muestra la mediana más alta 1.21 cm, con Q1 en 0.84 cm y Q3 en 1.48 cm, sugiriendo que es la combinación más efectiva para promover el crecimiento de los brotes. Kinetina 0 mg/L

y kinetina 1 mg/L tienen medianas similares 0.81 cm y 0.84 cm, respectivamente, con Q1 y Q3 en rangos cercanos. De manera que las combinaciones con BAP, especialmente BAP 2 mg/L., son más efectivas que las combinaciones con kinetina para el crecimiento de brotes, considerando tanto las medianas como los cuartiles que indican una mayor dispersión y mayor crecimiento.

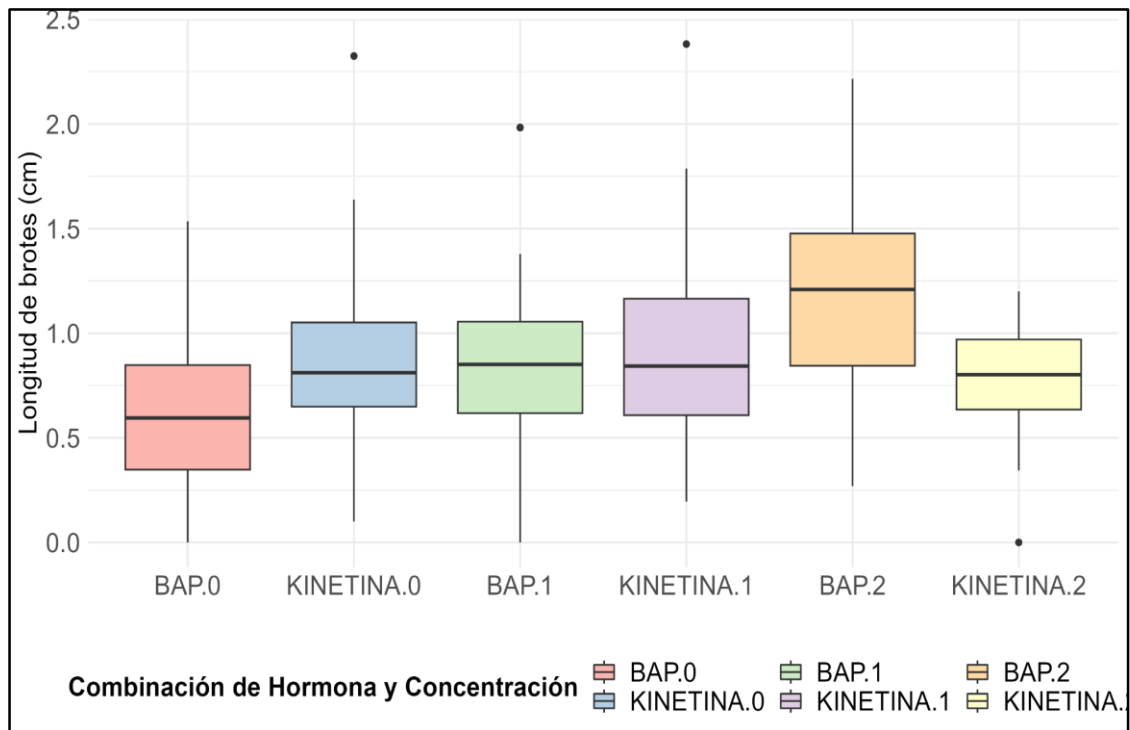


Figura 1-3. Diagrama de cajas y bigotes del crecimiento de brotes por aplicación de BAP y kinetina. Los colores hacen referencia a las combinaciones hormona – concentración.

3.2.2 Hojas

Dado que en este caso los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad se aplicó prueba Kruskal-Wallis la cual reveló un valor chi-cuadrado de 110.42 y un valor p $2.2e-16$, lo que indica diferencias significativas entre las concentraciones de hormonas. También se realizaron comparaciones por pares utilizando la prueba de rango con suma de Wilcoxon con corrección de continuidad y ajuste de Bonferroni para los valores p . Las comparaciones entre concentración BAP 1 mg/L. se diferencia significativamente de BAP 0 mg/L. p 0.00056, y kinetina 1 mg/L. se diferencia significativamente de BAP 1 mg/L. p 0.048. La concentración BAP 2 mg/L. mostró diferencias altamente significativas con todas las demás concentraciones p $2.6e-$

12, indicando un impacto notable en el número de hojas. kinetina.2 también mostró diferencias significativas con todas las demás concentraciones, especialmente con BAP 2 mg/L. $p = 2.6e-12$. lo que sugiere que tanto BAP como kinetina en diferentes concentraciones tienen efectos distintos y significativos en el número de hojas, sin embargo, BAP 2 mg/L. mostró mayor índice de respuesta. **Ver Tabla 3-3**

Tabla 3-3. Comparaciones por pares utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad para número de hojas en ensayo citoquinas.

Reguladores de crecimiento	Concentración (mg/L.)	BAP 0	kinetina 0	BAP 1	kinetina 1	BAP 2
kinetina	0	1.00000	-	-	-	-
BAP	1	0.00056	0.07984	-	-	-
kinetina	1	1.00000	1.00000	0.04893	-	-
BAP	2	4.6e-11	8.1e-09	0.00111	2.5e-09	-
kinetina	2	0.00515	2.3e-05	2.1e-07	0.00063	2.6e-12

3.3 Ensayo auxinas

3.3.1 Brotes

El análisis ANOVA realizado indicó que el efecto de la concentración de las hormonas es altamente significativo con un $\text{Pr}(> F) < 1.03e-10$ ***, sugiriendo que las distintas concentraciones de los reguladores de crecimiento IAA e IBA tienen un impacto significativo en el crecimiento de los brotes. Así mismo para la auxina IAA, la concentración de 2 mg/L resultó en un mayor crecimiento promedio de los brotes 0.561 cm, con una desviación estándar de ± 0.199 cm, formando un grupo estadísticamente diferente (b). Por otro lado, para la auxina IBA, tanto las concentraciones de 1 mg/L 0.546 cm, ± 0.119 como de 2 mg/L 0.549 cm, ± 0.125 mostraron un aumento significativo en el crecimiento, perteneciendo ambas al mismo grupo estadístico (b). Las

concentraciones de 0 mg/L. para ambas auxinas mostraron el menor crecimiento promedio y no presentaron diferencias significativas entre sí (a). **Ver Tabla 4-3**

Tabla 4-3. Tendencias y variaciones de auxinas en función de las concentraciones para brotes

Reguladores de crecimiento	Concentración (mg/L..)	Media (cm)	Desviación Estándar	Agrupamiento Tukey
IAA	0	0.408	± 0.139	a
IAA	1	0.475	± 0.136	a
IAA	2	0.561	± 0.199	b
IBA	0	0.471	± 0.139	a
IBA	1	0.546	± 0.119	b
IBA	2	0.549	± 0.125	b

letras iguales no son estadísticamente diferentes para $p \leq 0.05$ según Tukey

El valor de la mediana IAA 0 mg/L. es de 0.41 cm, con Q1 en 0.34 cm y Q3 en 0.52 cm. Mientras que IAA 2 mg/L. presenta un valor de 0.56 cm, con Q1 en 0.43 cm y Q3 en 0.65 cm lo que sugiere que esta última presenta una mayor efectividad en el crecimiento de los brotes. Sin embargo, las medianas de IBA 1 mg/L. e IBA 2 mg/L., son aproximadamente iguales y cercanas a IAA 2 mg/L., 0.546 cm y 0.548 cm, respectivamente. De esta manera, IAA 2 mg/L., IBA 2 mg/L., e IBA 1 mg/L., son las combinaciones más efectivas para promover la longitud de los brotes. **Ver figura 2-3**

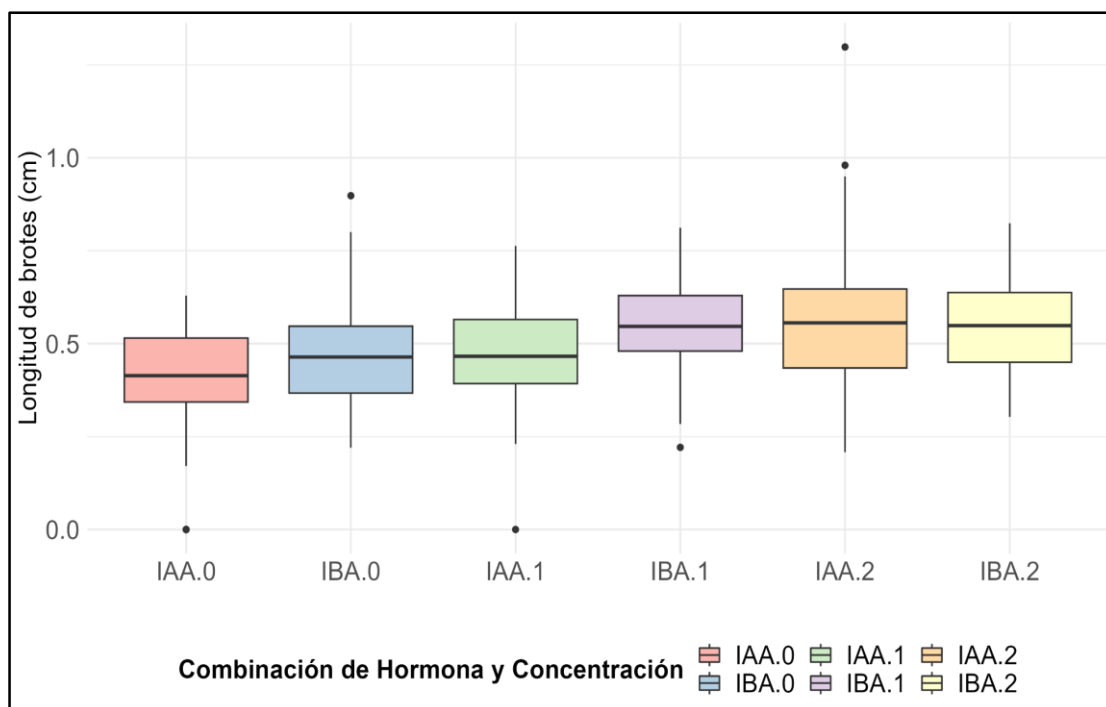


Figura 2-3. Diagrama de cajas y bigotes del crecimiento de brotes por aplicación de IAA e IBA. Los colores hacen referencia a las combinaciones hormona - concentración.

3.3.2 Hojas

De igual manera se aplicó la prueba estadística Kruskal-Wallis para comparar el número de hojas, entre las diferentes concentraciones de hormonas IBA e IAA. El resultado de la prueba de Kruskal-Wallis muestra un valor chi-cuadrado de 144.98 y un valor $p < 2.2e-16$, lo que indica diferencias significativas en el número de hojas entre las diferentes concentraciones de hormonas. Para identificar las diferencias específicas, se realizaron comparaciones por pares utilizando la prueba de Wilcoxon con ajuste de Bonferroni. Los resultados indican diferencias significativas entre IAA 0 mg/L. y IAA 1 mg/L. $p = 0.044$, IBA 0 mg/L. e IAA 1 mg/L. $p = 0.022$, e IAA 1 mg/L. e IBA 1 mg/L. $p = 0.010$. Además, IAA 2 mg/L. mostró diferencias significativas con IAA 0 mg/L., IBA 0 mg/L., IAA 1 mg/L., e IBA 1 mg/L. $p < 0.001$, e IBA 2 mg/L. mostró diferencias con IAA 1 mg/L. $p = 0.070$ e IAA 2 mg/L. $p = 2.3e-08$. Estos resultados sugieren que las concentraciones de 2 mg/L. de IAA y IBA tienen un impacto significativo en la longitud de las hojas. **Ver tabla 5-3.**

Tabla 5-3. Comparaciones por pares utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad para número de hojas en ensayo auxinas.

Reguladores de crecimiento	Concentración (mg/L.)	IAA	IBA	IAA	IBA	IAA
		0	0	1	1	2
IBA	0	-	-	-	-	-
IAA	1	0.044	0.022	-	-	-
IBA	1	-	-	0.010	-	-
IAA	2	3.4e-09	1.8e-10	8.0e-07	7.8e-12	-
IBA	2	-	-	0.070	-	2.3e-08

3.3.3 Raíces

Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar el número de raíces entre diferentes concentraciones de hormonas IBA e IAA. El resultado mostró un valor chi-cuadrado de 68.977 y un valor p 1.673e-13, lo que indica diferencias significativas en el número de raíces entre las diferentes concentraciones de hormonas. Los resultados de la prueba de Wilcoxon con ajuste de Bonferroni Indican que no hay diferencias significativas entre las concentraciones de IAA 0 mg/L. y IAA 1 mg/L. p 1.00000, y entre IBA 0 mg/L. e IAA 1 mg/L. p 0.94374. Tampoco se observaron diferencias significativas entre IAA 1 mg/L. e IBA 1 mg/L. p 0.72827, ni entre IAA 0 mg/L. e IBA 2 mg/L. p 1.00000. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre IAA 2 mg/L. e IAA 0 mg/L. p 0.00057, IBA 0 mg/L. p 0.00015, IAA 1 mg/L. p 0.00203 e IBA 1 mg/L. p 0.000035. Además, la concentración de IBA 2 mg/L. mostró una diferencia significativa con IAA 2 mg/L. p 0.00136. Estos resultados destacan que la concentración de IAA 2 mg/L. tuvo la mayor respuesta en términos de crecimiento de raíces, mostrando diferencias significativas con casi todas las demás concentraciones. **Ver Tabla 6-3**

Tabla 6-3. Comparaciones por pares utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad para número de raíces en ensayo auxinas.

Reguladores de crecimiento	Concentración (mg/L.)	IAA	IBA	IAA	IBA	IAA
		0	0	1	1	2
IBA	0	-	-	-	-	-
IAA	1	1.00000	0.94374	-	-	-
IBA	1	-	-	0.72827	-	-
IAA	2	0.00057	0.00015	0.00203	0.000035	-
IBA	2	-	-	1.00000	-	0.00136

3.4 Ensayo de citoquinas vs. Auxinas

3.4.1 Interacciones entre citoquina y auxina

Una vez determinado que en el ensayo de citoquinas la hormona BAP en una concentración de 2 mg/L. generó la mayor respuesta en términos de longitud de brotes y generación de hojas, y que en el ensayo de auxinas la hormona IAA en una concentración de 2 mg/L. fue la que produjo la mayor respuesta en cuanto a longitud de brotes y generación de hojas y raíces, se procedió a evaluar las interacciones entre estos reguladores de crecimiento. Para ello, se consideró un gradiente de concentración de $\pm$ 0.50 mg/L. para cada hormona. **Ver tabla 7-3.**

Tabla 7-3. Esquema de interacciones entre citoquina vs. auxina.

Reguladores de crecimiento	Concentración (mg/L.)	IAA		
		1,5	2	2,5
BAP	1,5	1,5 x 1,5	1,5 x 2	1,5 x 2,5
	2	2 x 1,5	2 x 2	2 x 2,5
	2,5	2,5 x 1,5	2,5 x 2	2,5 x 2

3.4.2 Brotes

Los resultados indican que todas las combinaciones pertenecen al mismo grupo estadístico "a", lo que significa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ellas según la prueba de Tukey. Sin embargo, se observa que la combinación de BAP 2.5 mg/L. + IAA 2.5 mg/L. tiende a favorecer el mayor crecimiento de los brotes, presentando la mayor media en longitud de brotes (1.00 cm). Esta combinación, junto con BAP 1.5 mg/L. + IAA mg/L. (0.904 cm), muestra una tendencia a promover un crecimiento más robusto en comparación con otras combinaciones. **Ver Tabla 8-3**

Tabla 8-3. Tendencias y variaciones de citoquinas vs. auxinas en función de las concentraciones para brotes

Concentración de reguladores de crecimiento (mg/L.)	Media (cm)	Desviación Estándar	Agrupamiento Tukey
BAP. 1,5 + IAA. 1,5	0.746	± 0.386	a
BAP. 1,5 + IAA. 2	0.740	± 0.460	a
BAP. 1,5 + IAA. 2,5	0.997	± 0.673	a
BAP. 2 + IAA. 1,5	0.904	± 0.481	a
BAP. 2 + IAA. 2	0.845	± 0.480	a
BAP. 2 + IAA. 2,5	0.805	± 0.400	a
BAP. 2,5 + IAA. 1,5	0.879	± 0.493	a
BAP. 2,5 + IAA. 2	0.892	± 0.445	a
BAP. 2,5 + IAA. 2,5	1.00	± 0.452	a

letras iguales no son estadísticamente diferentes para $p \leq 0.05$ según Tukey

Las medianas de las combinaciones varían significativamente. La combinación BAP 1.5 mg/L. + IAA 2 mg/L. tiene la mediana más baja 0.59 cm, indicando una menor efectividad en promover el crecimiento de brotes. En contraste, BAP 2.5 mg/L. + IAA 2.5 mg/L. presenta la mediana más alta 1 cm, siendo la más efectiva. También destacan BAP 2 mg/L. + IAA 2.5 mg/L. y BAP 2.5 mg/L. + IAA 2 mg/L. con medianas de 0.88 cm y 0.86 cm,

respectivamente, mostrando eficacia para favorecer la elongación de brotes. en comparación con otras combinaciones. Esto infiere que las combinaciones con mayores concentraciones de BAP + IAA son más efectivas para promover la longitud de los brotes. Sin embargo, estos resultados no se pueden generalizar, porque la respuesta puede variar según la especie y las condiciones de cultivo. **Ver Figura 3-3**

Aunque no se encontraron diferencias significativas entre las combinaciones de hormonas, estas observaciones (**Tabla 8-3 y Figura 3-3**), sugieren que las combinaciones con mayores concentraciones de BAP + IAA son más efectivas para promover la longitud de los brotes. Sin embargo, estos resultados no se pueden generalizar, porque la respuesta puede variar según la especie y las condiciones de cultivo.

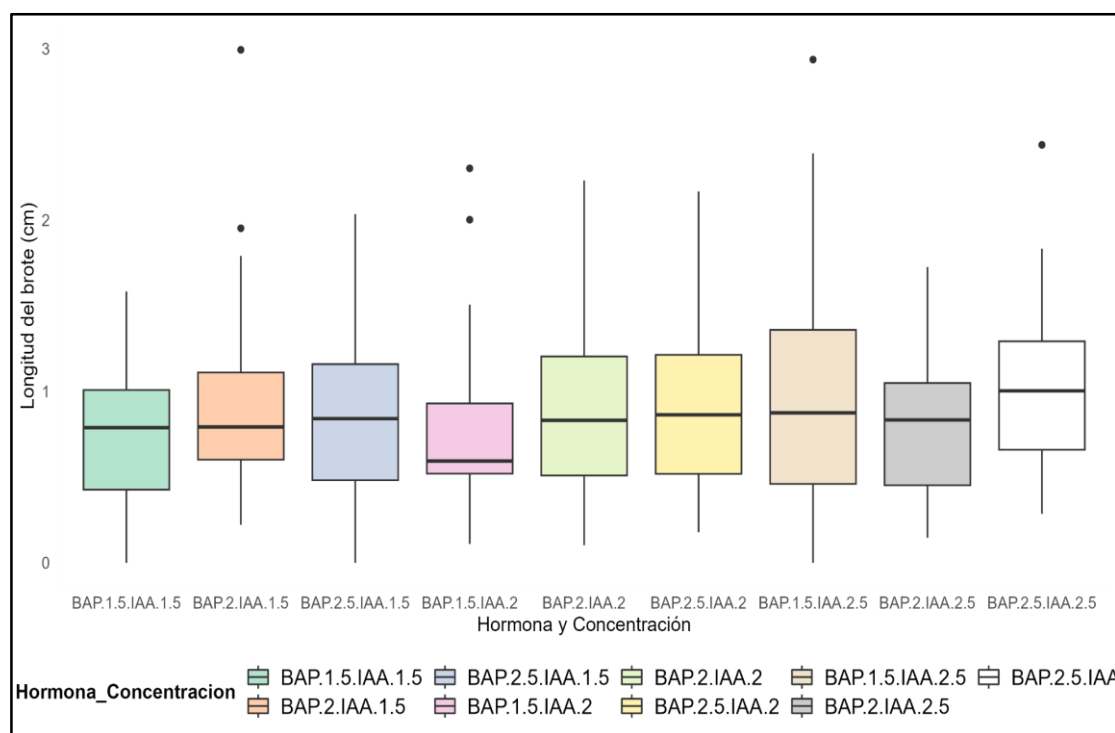


Figura 3-3. Diagrama de cajas y bigotes del crecimiento de brotes citoquinas vs auxinas. Los colores hacen referencia a las interacciones hormona - concentración.

3.4.3 Hojas

El resultado de la prueba de Kruskal-Wallis mostró un valor chi-cuadrado de 45.60 con un $p = 2.83e-07$, indicando diferencias significativas en el número de hojas entre las diferentes combinaciones de hormonas. Las comparaciones más relevantes muestran

diferencias significativas: BAP 2 mg/L. + IAA 1.5 mg/L. comparado con BAP 1.5 mg/L. + IAA 1.5 mg/L. p 0.00013, BAP 2 mg/L. + IAA 2 mg/L. comparado con BAP 1.5 mg/L. + IAA 1.5 mg/L. p 0.000021 y BAP 2.5 mg/L. + IAA 2.5 mg/L. comparado con BAP 1.5 mg/L. + IAA 1.5 mg/L. p 0.00016. Estas combinaciones indican que las concentraciones más altas de citoquinas y auxinas particularmente 2 mg/L. y 2.5 mg/L. tienen un efecto significativo en el número de hojas en comparación con las concentraciones más bajas. Las comparaciones entre otras combinaciones, como BAP 2 mg/L. + IAA 2.5 mg/L. con BAP 2 mg/L. + IAA 1.5 mg/L. p 0.00408, también muestran significancia. Sin embargo, la mayoría de las comparaciones no muestran diferencias significativas, lo que sugiere que muchas de las combinaciones de tratamientos no difieren significativamente entre sí. Las concentraciones de 2 mg/L. y 2.5 mg/L. de BAP combinadas con IAA muestran efectos significativos en el número de hojas, indicando que estos niveles de concentración son efectivos para promover el crecimiento de hojas. **Ver Tabla 9-3**

Tabla 9-3. Comparaciones por pares utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad para número de hojas en combinación de citoquinas vs. auxinas.

Reguladores de crecimiento	Concentració n (mg/L.)	BAP + IAA	BAP + IAA	BAP + IAA	BAP + IAA	BAP + IAA	BAP + IAA	BAP + IAA	BAP + IAA
		1.5+1.5	2+1.5	2.5+1.5	1.5+2	2+2	2.5+2	1.5+2.5	2+2.5
BAP+IAA	2+1.5	0.0001	-	-	-	-	-	-	-
A		3							
BAP+IAA	2.5+1.5	0.1636	1.00000	-	-	-	-	-	-
A		2							
BAP+IAA	1.5+2	1.0000	0.00095	0.4791	-	-	-	-	-
A		0		8					
BAP+IAA	2+2	1.0000	0.00002	0.0418	1.0000	-	-	-	-
A		0	1	3	0				
BAP+IAA	2.5+2	0.9599	0.19077	1.0000	1.0000	0.2748	-	-	-
A		1		0	0	1			
BAP+IAA	1.5+2.5	1.0000	0.23123	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	-	-
A		0		0	0	0	0		
BAP+IAA	2+2.5	1.0000	0.00408	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	-
A		0		0	0	0	0	0	
BAP+IAA	2.5+2.5	1.0000	0.00016	0.1475	1.0000	1.0000	0.7989	1.0000	1.0000
A		0		9	0	0	4	0	0

3.4.4 Raíces

Los resultados del test Kruskal-Wallis indican que no hay diferencias significativas en la longitud de las raíces entre los diferentes tratamientos, con un valor de chi-cuadrado de $2.24e-4$ y un valor p de $9.999e-1$. Lo que determinó que las variaciones en las concentraciones de BAP e IAA no tienen un efecto significativo en la longitud de las raíces. Además, en las comparaciones por pares usando la prueba de Wilcoxon con corrección de continuidad entre combinaciones específicas de BAP e IAA. Los p-valores obtenidos, ajustados mediante el método de Bonferroni, son predominantemente altos 1.00 o 0.34, indicando nuevamente la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos comparados. **Ver tabla 10-3**

Tabla 10-3. Comparaciones por pares utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad para número de hojas en combinación de citoquinas vs. auxinas.

Reguladores de crecimiento	Concentración (mg/L.)	BAP + IAA	BAP + IAA	BAP + IAA	BAP + IAA	BAP + IAA	BAP + IAA	BAP + IAA	BAP + IAA
		1.5+1.5	2+1.5	2.5+1.5	1.5+2	2+2	2.5+2	1.5+2.5	2+2.5
BAP+IAA	2+1.5	1.00	-	-	-	-	-	-	-
BAP+IAA	2.5+1.5	1.00	1.00	-	-	-	-	-	-
BAP+IAA	1.5+2	1.00	-	1.00	-	-	-	-	-
BAP+IAA	2+2	1.00	0.34	1.00	0.34	-	-	-	-
BAP+IAA	2.5+2	1.00	-	1.00	-	0.34	-	-	-
BAP+IAA	1.5+2.5	1.00	0.34	1.00	0.34	1.00	0.34	-	-
BAP+IAA	2+2.5	1.00	-	1.00	-	0.34	-	0.34	-
BAP+IAA	2.5+2.5	1.00	-	1.00	-	0.34	-	0.34	-

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

4.1 Ensayo de Citoquinas

4.1.1 Brotes

El análisis comparativo entre los ensayos de citoquinas revela diferencias significativas en los efectos que estos reguladores de crecimiento ejercen sobre el crecimiento y desarrollo vegetal. Se observó un resultado significativo de la concentración y el tipo de hormona en la longitud de brotes. Específicamente, se encontró que el tratamiento con BAP a una concentración de 2 mg/L. mostró una mayor longitud de brotes, con una media de 1.19 cm, lo que sugiere una mejor asimilación en comparación con la kinetina.

Ver tabla 2-3.

Las citoquinas desempeñan múltiples funciones cruciales en el control del desarrollo vegetal, incluyendo la estimulación de la proliferación celular en los brotes, la iniciación y actividad de los meristemos apicales y axilares, la regulación del ciclo celular en las células vegetales, y la síntesis de ARN y proteínas, lo que explicaría este comportamiento (Gomez-Leyva et al., s. f.; Kieber & Schaller, 2018). Debido a su fuerte afinidad por los receptores de citoquinina en las células vegetales, BAP ha demostrado ser particularmente eficaz en la inducción de brotes. Aunque no se han realizado estudios previos en *P. punctata*, se ha observado que en otras especies de *Passiflora* BAP es especialmente efectivo en promover el crecimiento y desarrollo de brotes. Así lo enfatiza (Ragavendran et al., 2012) en su experimentación sobre el cultivo de *Passiflora foetida* L., se compararon diferentes concentraciones de BAP 0.5, 1, 1.5 y 2.0 mg/L. y una combinación de kinetina 0.5 + BAP 1.5 mg/L., los resultados mostraron que la concentración de 1.5 mg/L., de BAP produjo el mayor crecimiento, alcanzando una altura de 7.3 cm en longitud de brotes. Demostrando que BAP fomenta el crecimiento de las yemas laterales desplazando la dominancia apical, lo que se traduce en un aumento de la división celular del meristemo, la ramificación y la tasa de división celular.

También se determinó que el crecimiento de brotes mediante aplicación de kinetina es dependiente de BAP, lo que sugiere que kinetina de manera independiente no posee una correcta absorción por parte de los explantes. De igual manera estos resultados son apoyados por (Jafari et al., 2017) quienes, en su experimentación para la producción de brotes múltiples en *Passiflora caerulea* L., utilizaron concentraciones de BAP que varían de 1 a 4 mg/L. En su estudio, se observó que la mayor longitud de los brotes 5.8 cm, se obtuvo con una concentración de 3 mg/L., destacando mayor respuesta en concentraciones elevadas de BAP. Así mismo en otro estudio realizado por (Huh et al., 2017) se evaluó el efecto de BAP y GA3 sobre las características de crecimiento *in vitro* de brotes de *Passiflora edulis* Sims, se determinó que BAP a una concentración de 2 mg/L., produjo brotes con una longitud promedio de 3.4 cm, superior a las obtenidas con concentraciones menores.

Otro factor a considerar en cuanto a la efectividad de BAP en comparación con kinetina puede ser por su estructura química. BAP posee un grupo bencilo unido a una adenina, lo que le proporciona mayor estabilidad en el medio de cultivo, prolongando así su vida útil. Por otro lado, kinetina tiene un grupo furfurilo unido a una adenina, lo que genera una estructura menos estable y, en consecuencia, una degradación más rápida en el medio(Sompornpailin & Khunchuay, 2016).

4.1.2 Hojas

De igual manera para la generación de hojas, la concentración de BAP a 2 mg/L., mostró diferencia significativa con otras concentraciones. **Ver tabla 3-3**, lo que sugiere que esta hormona también es altamente efectiva en la inducción de hojas. Sin embargo, estos resultados contrastan con el estudio realizado por (Eshghi Khas et al., 2020) en el cual independientemente de las diferentes concentraciones de BAP 0 a 2 mg/L., no se encontró diferencia estadística significativa, ya que el valor de p fue 0.302 y el promedio del número de hojas por vitroplanta fue de 8.25. Sin embargo, en otro estudio realizado por (Costa et al., 2018) se observó un mayor número de hojas a una concentración de 0,5 mg/L. de BAP sin NAA, mientras que no hubo diferencias significativas entre las otras

dosis sin auxina, lo que indica que el regulador BAP es necesario para obtener valores más altos en organogénesis de hojas. Lo que indicaría que el estrés del gradiente de concentración ayuda a las células a especializarse y activar genes específicos, lo que conlleva en la formación de hojas (Hong & Fletcher, 2023).

4.2 Ensayo de Auxinas

4.2.1 Brotes

El ensayo con auxinas mostró que la concentración de 2 mg/L. de IAA fue la más efectiva para la promoción de longitud de brotes con una media de 0.561 cm muy cercano a IBA 1, 2 mg/L., con una media de 0.546 y 0.549 respectivamente, sugiriendo un comportamiento similar. **Ver tabla 4-3.** Sin embargo, esto se contrapone al estudio realizado por (Sozo et al., 2016) en el que en el establecimiento de cultivo *in vitro* de *P. tenuifolia* y *P. setacea* mediante la aplicación de IBA en concentraciones de 0 a 1 mg/L. La concentración de 0.25 mg/L. produjo la mayor longitud de brotes, alcanzando los 8.5 cm, seguida por la concentración de 0.508 mg/L., que resultó en una longitud de 6.7 cm.

El ensayo con auxinas mostró que la concentración de 2 mg/L. de IAA fue la más efectiva para la promoción de longitud de brotes con una media de 0.561 cm muy cercano a IBA 1, 2 mg/L., con una media de 0.546 y 0.549 respectivamente, sugiriendo un comportamiento similar. **Ver tabla 4-3.** Sin embargo, esto se contrapone al estudio realizado por (Sozo et al., 2016) en el que en el establecimiento de cultivo *in vitro* de *P. tenuifolia* y *P. setacea* mediante la aplicación de IBA en concentraciones de 0 a 1 mg/L. La concentración de 0.25 mg/L., produjo la mayor longitud de brotes, alcanzando los 8.5 cm, seguida por la concentración de 0.508 mg/L., que resultó en una longitud de 6.7 cm. Afirmando, que existe mayor respuesta en concentraciones menores. esto igual se respalda mediante la experimentación realizada por (Jafari et al., 2017) en el que se buscó la proliferación *in vitro* de brotes de *P. caerulea*. a través de ápices de brotes, con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP 0.5 1 y 2 mg/L., e IBA en concentraciones de 0 0.5 0.1 y 0.15 mg/L., reportando que el mayor número de brotes

fue generado a partir la combinación BAP 1.5 mg/L. + 0.15 IBA con un total de 9.86 brotes lo que recalca la importancia de IBA dependiente de BAP.

Esto igual se respalda mediante la experimentación realizada por (Jafari et al., 2017) en el que se buscó la proliferación *in vitro* de brotes de *P. caerulea*. a través de ápices de brotes, con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP 0.5 1 y 2 mg/L., e IBA en concentraciones de 0 0.5 0.1 y 0.15 mg/L., reportando que el mayor número de brotes fue generado a partir la combinación BAP 1.5 mg/L. + 0.15 IBA con un total de 9.86 brotes lo que recalca la importancia de IBA dependiente de BAP.

4.2.2 Hojas

Para la inducción de hojas, la concentración de 2 mg/L., de IAA también mostró una respuesta significativa. Sin embargo, esto contrasta con los estudios realizados por (Sozo et al., 2016) en los que en las concentraciones de IBA 0.25 mg/L., resultó en un mayor número de hojas. Esta discrepancia puede sugerir que IAA e IBA, aunque ambos son auxinas, pueden tener efectos diferentes en la formación de hojas dependiendo de la especie y las condiciones experimentales. Las auxinas, en general, influyen en la organización del citoesqueleto y la dirección de la expansión celular, lo que es crucial para la formación y crecimiento de las hojas (Garay-Arroyo et al., 2014).

4.2.3 Raíces

En cuanto a la formación de raíces, la concentración de 2 mg/L., de IAA mostró la mayor respuesta, lo cual es consistente con la función conocida de las auxinas en la promoción del crecimiento radicular. Esta hormona actúa sobre el periciclo, una capa de células parenquimatosas situada debajo de la endodermis, que es meristemática y da origen a las raíces laterales (ALONI et al., 2006). Sin embargo, en la experimentación realizada por (Jafari et al., 2017) en el que se buscó la proliferación *in vitro* de brotes de *P. caerulea* a través de ápices de brotes, utilizando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento IBA, NAA e IAA a 0.5, 1 y 2 mg/L., se reportó que la mayor cantidad de raíces

(8 por vitroplanta) se obtuvo con IBA a una concentración de 1 mg/L. Por otro lado, IAA produjo la menor cantidad de raíces, con un promedio de una raíz por brote. En contraste, investigaciones previas (Jafari et al., 2022) sobre el efecto de diferentes reguladores de crecimiento en *P. caerulea*, demostraron que 1 mg/L., de IBA generó un promedio de 9.83 raíces por vitroplanta, mientras que el IAA, independientemente de la concentración, produjo solo una raíz por vitroplanta.

4.3 Ensayo de Combinaciones de Citoquinas y Auxinas

4.3.1 Brotes

El ensayo de combinaciones de citoquinas y auxinas mostró que la combinación BAP 2.5 mg/L. + IAA 2.5 mg/L., presentó la mayor media en longitud de brotes con una media de 1 cm. **Ver tabla 8-3** Sin embargo, estos datos deben ser recibidos con precaución, ya que la interacción entre la concentración y el tipo de reguladores de crecimiento depende de la planta. Concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento pueden inducir una saturación hormonal, y una relación no adaptativa de la planta a dicha combinación podría inhibir el crecimiento. (Afful et al., 2022). Así lo demostró el estudio realizado por (Rukaité, 2016) se centró en la regeneración directa *in vitro* de *P. caerulea* y *P. edulis*, evaluando varias concentraciones de combinaciones de BAP e IAA. En *P. caerulea* se probaron combinaciones de 1 mg/L., de BAP con 0.5, 1 y 2 mg/L., de IAA, mientras que en *P. edulis* se utilizaron combinaciones de 2 mg/L. de BAP con 0.5, 1 y 2 mg/L. de IAA. Los resultados demostraron que en *P. caerulea*, la combinación de 1 mg/L. de BAP con 0.5 mg/L. de IAA resultó en un promedio de 3.5 brotes por explante, mientras que la combinación de 1 mg/L. de BAP con 1 mg/L. de IAA produjo 2.8 brotes por explante. En *P. edulis*, la combinación de 2 mg/L. de BAP con 0.5 mg/L. de IAA fue la más efectiva, con un promedio de 5.2 brotes por explante y la combinación de 2 mg/L. de BAP con 2 mg/L. de IAA produjo 3.8 brotes por explante. Lo que presupone que las concentraciones moderadas de IAA son más efectivas para la proliferación de brotes, mientras que concentraciones más altas pueden inhibir el crecimiento debido a una posible saturación hormonal. De igual manera este comportamiento es apoyado por (P. et al., 2015) en el

que se utilizaron diversos reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones para evaluar su efecto en la iniciación, multiplicación y enraizamiento de los explantes en concentraciones de BAP 2 mg/L., kinetina 1 mg/L. e IAA 0.4 y 0.8 mg/L. dando como resultado que la concentración más efectiva para la multiplicación de brotes fue en concentración BAP 2 mg/L., kinetina 1 mg/L. e IAA 0.8 mg/L. Las variaciones en las respuestas entre las combinaciones podrían atribuirse al equilibrio preciso de citoquinas y auxinas que optimiza la señalización hormonal y desencadena las vías de crecimiento. La interacción de las hormonas podría haber establecido una atmósfera hormonal más armoniosa, fomentando un mayor crecimiento celular y elongación de las células de los brotes. (Schaller et al., 2015).

4.3.2 Hojas

Para la generación de hojas, las combinaciones de BAP e IAA a concentraciones de 2 mg/L. y 1.5 mg/L. mostraron efectos significativos. Este comportamiento puede ser resultado de la interacción entre las citoquinas y auxinas en la regulación de la morfogénesis foliar ya que las citoquinas promueven la división celular en el meristemo apical, mientras que las auxinas influyen en la expansión celular y la formación de primordios foliares (Alcantara Cortes et al., 2019). Este efecto es similar al observado en el estudio de (Eshghi Khas et al., 2020) donde la combinación de BAP con IBA en concentraciones de 2.2 y 0.5 μ M generó los promedios más altos en la inducción de hojas, con un promedio de 9.44 hojas por explante. De igual manera en otro estudio realizado por (Cardona Mejia, 2022) que buscó la caracterización genómica de los virus que infectan los cultivos de *P. edulis* mediante el uso de cultivo *in vitro*, se implementaron cinco medios de cultivo. Dos de estos medios utilizaron combinaciones de citoquinas y auxinas: BAP 0.1, 0.6, 1.2 mg/L. con IBA 0.2, 1.0, 1.5 mg/L., y BAP 0.1, 0.6, 1.2 mg/L. con ANA 0.2, 1.0, 1.5 mg/L. Estas combinaciones mostraron un mayor número promedio de hojas 2.5 y 2.7, respectivamente en comparación con los medios que sólo emplearon un tipo de fitohormona. Esto sugiere que, aunque se utilicen diferentes auxinas, los efectos en la morfogénesis foliar pueden ser muy similares,

respaldando la idea de que la interacción adecuada entre citoquinas y auxinas es crucial para la promoción del crecimiento foliar.

4.3.3 Raíces

En cuanto a la formación de raíces, las combinaciones de BAP con IAA no mostraron diferencias significativas en la longitud de las raíces. Este resultado podría indicar que la interacción entre citoquinas y auxinas en estas combinaciones específicas no favorece la inducción de raíces en *P. punctata*, o que la concentración de citoquinas puede haber contrarrestado el efecto de las auxinas en la formación de raíces (Alcantara Cortes et al., 2019). Otra alternativa que puede ser tomada en cuenta es que aun en presencia de hormonas, las concentraciones de sales de N, P y K en los medios MS suelen ser demasiado elevadas para el enraizamiento. Al reducir la concentración de sales a la mitad, un tercio o un cuarto de la fuerza estándar, se incrementa la supervivencia de los cultivos de meristemas y el enraizamiento. No obstante, aunque una menor concentración de sales puede favorecer la inducción de raíces, en ocasiones puede disminuir el crecimiento en la parte aérea de las plantas (Bajaj, 1991).

4.4 Clorosis

Durante todas las fases de la experimentación, se observó consistentemente la clorosis en los explantes, independientemente de la concentración o tipo de hormona utilizada. Lo que derivaría en diferentes factores que no se abordan en este estudio. Así lo menciona (Montenegro et al., 2014) concluyendo que las plantas cultivadas en medios *in vitro* pueden presentar clorosis, a menudo atribuida a desbalances minerales, especialmente por niveles altos de potasio y fósforo, que causan deficiencia de hierro. Además, los fertilizantes inorgánicos añadidos a las sales minerales, como las del medio MS, pueden contener impurezas y trazas de otros elementos, como cloruros y sodio, que afectan la nutrición y fisiología de los explantes.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El análisis comparativo entre los ensayos de citoquinas y auxinas revela diferencias significativas en los efectos que estos reguladores de crecimiento ejercen sobre el crecimiento y desarrollo vegetal. En el ensayo de citoquinas, se evidenció un efecto altamente significativo de la concentración y el tipo de hormona. Específicamente, el tratamiento con 6-bencilaminopurina (BAP) a una concentración de 2 mg/L. mostró una mayor longitud de brotes e inducción de hojas, indicando una mejor asimilación en comparación con 6-furfuril-aminopurina. En el ensayo de auxinas, no se encontraron diferencias significativas en la longitud de brotes, ya que el comportamiento del ácido indol-3-butírico (AIB) y el ácido indol-3-acético (AIA) fue muy similar. Sin embargo, en hojas y raíces, la concentración de 2 mg/L. de ácido indol-3-acético mostró tendencias positivas entre los grupos tratados, evidenciando una mejor respuesta en comparación con otras concentraciones.

En el análisis de las combinaciones de citoquinas y auxinas, se observó una diferencia significativa debido a la sinergia de estas hormonas. La combinación de 6-BAP a 2.5 mg/L. e IAA a 2.5 mg/L. mostró tendencias positivas en la promoción de brotes y hojas, maximizando la señalización celular necesaria para la proliferación y expansión celular. Sin embargo, debido a la inhibición competitiva entre citoquinas y auxinas en el desarrollo radicular, las combinaciones no cambiaron mucho en las raíces.

Una vez analizados estos resultados, se sugiere que la optimización de la aplicación de reguladores de crecimiento podría lograrse utilizando cortes de concentración más pequeños para verificar si existe una varianza significativa entre tratamientos. De igual manera, se podría incrementar los intervalos de tiempo para una morfogénesis más evidente.

Estos resultados tienen implicaciones significativas para la propagación de *P. punctata* *in vitro* y ofrecen una guía para la mejora de protocolos. Este conocimiento se aplica no

solo a *P. punctata*, sino también a otras especies vegetales importantes para la agricultura y el medio ambiente. Debido a la variabilidad en la respuesta hormonal, los protocolos de cultivo deben adaptarse en función de los factores fisiológicos de los explantes y las condiciones ambientales del medio de cultivo. Este estudio abre nuevas líneas de investigación para explorar los mecanismos moleculares y fisiológicos de la interacción entre citoquinas y auxinas, así como el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* avanzadas que integren de manera efectiva estas hormonas.

REFERENCIAS

- Afful, N. T., Abdulai, I., Azu, E., Elegba, W., Annor, C., Akama, C., Asare, K., Dentey, J., & Amoatey, H. M. (2022). In vitro regeneration of *Vitellaria paradoxa* from shoot tip explants. *BioTechnologia*, 103(1), 71-79. <https://doi.org/10.5114/bta.2022.113917>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier.
- Alcantara Cortes, J. S., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D., & Sánchez Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129. <https://doi.org/10.22490/24629448.3639>
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., & Ullrich, C. I. (2006). Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture: Regulating Vascular Differentiation, Lateral Root Initiation, Root Apical Dominance and Root Gravitropism. *Annals of Botany*, 97(5), 883-893. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl027>
- Asif, R., Yasmin, R., Mustafa, M., Ambreen, A., Mazhar, M., Rehman, A., Umbreen, S., Ahmad, M., Asif, R., Yasmin, R., Mustafa, M., Ambreen, A., Mazhar, M., Rehman, A., Umbreen, S., & Ahmad, M. (2022). Phytohormones as Plant Growth Regulators and Safe Protectors against Biotic and Abiotic Stress. En *Plant Hormones—Recent Advances, New Perspectives and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102832>
- Bajaj, Y. P. S. (Ed.). (1991). *High-Tech and Micropropagation I* (Vol. 17). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-76415-8>
- Bhowmik, T., & Rahman, M. (2020). Micropropagation of commercially important orchid *Dendrobium palpebrae* Lindl. Through in vitro developed pseudobulb culture. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*, 3(3), 225. <https://doi.org/10.5455/jabet.2020.d128>
- Bidabadi, S. S., & Jain, S. M. (2020). Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. *Plants*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/plants9060702>
- Borjas-Ventura, R., Julca-Otiniano, A., & Alvarado-Huamán, L. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 150-164.
- Cardona Mejia, D. (2022). *Caracterización genómica de los virus que infectan los cultivos de gulupa (Passiflora edulis f. Edulis) en Antioquia para el apoyo de los programas de certificación de semilla* [PhD Thesis, Universidad Nacional de Colombia]. https://redcol.minciencias.gov.co/Record/UNACIONAL2_821732b71f4254519882141429568ad8/Details
- Costa, S., Mello-Farias, P., Copatti, A., Albuquerque, I., & Dias, C. (2018). Cytokinin and Auxin on In vitro Multiplication of Yellow Passion Fruit. *Journal of Experimental Agriculture International*, 19(6), 1-6. <https://doi.org/10.9734/JEAI/2017/37858>
- Deginani, N. B. (2001). *Las especies argentinas del género passiflora (Passifloraceae)*.

- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004a). Passiflora: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004b). *Passiflora*: Una actualización de la revisión. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>
- Eshghi Khas, M., Abbasifar, A., & ValizadehKaji, B. (2020). Optimization of In Vitro Propagation of Purple Passion Fruit (*Passiflora edulis*), an Important Medicinal and Ornamental Plant. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 7(3), 305-314. <https://doi.org/10.22059/ijhst.2020.297194.342>
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: Means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Fischer, I., bullet, & Rezende, J. (2008). *Diseases of Passion flower (Passiflora spp.)*. 2.
- Fonseca, A. M. A., Geraldi, M. V., Junior, M. R. M., Silvestre, A. J. D., & Rocha, S. M. (2022). Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*): A comprehensive review on the nutritional value, phytochemical profile and associated health effects. *Food Research International*, 160, 111665. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111665>
- Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., & Gutiérrez, C. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de Arabidopsis Thaliana. *REB. Revista de educación bioquímica*, 33(1), 13-22.
- Gomez-Leyva, J. F., Acosta, L. A. M., Muraira, I. G. L., Espino, H. S., Ramirez-Cervantes, F., & Andrade-Gonzalez, I. (s. f.). Multiple Shoot Regeneration of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from a Shoot Apex Culture System. *International Journal of Botany*, 4(3), 326-330. <https://doi.org/10.3923/ijb.2008.326.330>
- Hong, L., & Fletcher, J. C. (2023). Stem Cells: Engines of Plant Growth and Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14889.
- Huh, Y. S., Lee, J. K., & Nam, and S. Y. (2017). Effect of plant growth regulators and antioxidants on in vitro plant regeneration and callus induction from leaf explants of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Journal of Plant Biotechnology*, 44(3), 335-342. <https://doi.org/10.5010/JPB.2017.44.3.335>
- Jafari, M., Daneshvar, M., Jafari, S., & Hesami, M. (2022). Machine Learning-Assisted In Vitro Rooting Optimization in *Passiflora caerulea*. *Forests*, 13, 2020. <https://doi.org/10.3390/f13122020>
- Jafari, M., Daneshvar, M., & Lotfi, A. (2017). In vitro shoot proliferation of *Passiflora caerulea* L. via cotyledonary node and shoot tip explants. *Biotechnologia*, 98, 113-119. <https://doi.org/10.5114/bta.2017.68310>
- Jaroszuk-Ścisł, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., Tyśkiewicz, K., Pawlik, A., & Janusz, G. (2019). Phytohormones (Auxin, Gibberellin) and ACC Deaminase In Vitro Synthesized by the Mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 Strain and Changes in the Level of

Auxin and Plant Resistance Markers in Wheat Seedlings Inoculated with this Strain Conidia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms20194923>

- Jiggins, C. D. (2017). *The ecology and evolution of Heliconius butterflies*. Oxford University Press.
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development*, 145(4), dev149344. <https://doi.org/10.1242/dev.149344>
- Landázuri, P., Loango Chamorro, N., Aguillón Osma, J., Restrepo Cortés, B., Arismendi Bustamante, J., Monsalve Bedoya, V., & Maldonado Celis, M. E. (2021). *Descripción, características y beneficios de Passiflora edulis: Parchita, fruto de la pasión, maracuyá*. Editorial Universidad Pontificia Bolivariana. <https://doi.org/10.18566/978-958-764-979-6>
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140(5), 943-950. <https://doi.org/10.1242/dev.086363>
- Montenegro, J. F. E., Rojas, I. C., Quevedo, C. D., & Delgado, P. G. E. (2014). Efecto del SULPOMAG y compuestos orgánicos como sustitutos parciales del medio de cultivo de micropropagación de Musa sp. CV. Cavendish, 147-159.
- Montoya-Estrada, C. N., Castaño-Zapata, J., & Villegas-Estrada, B. (2013). Evaluación de alternativas de manejo de la bacteriosis del maracuyá. *Acta Agronómica*, 21(2), 40-50.
- Morales, M. M. B., Morales, A. C. A., & Varela, O. M. A. (2015). Morfología de Passiflora: Una guía para la descripción de sus especies. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 91-109.
- Morales, O. C., Rivas, A. G., & Valverde, M. M. (2019). Tamaño corporal de cuatro especies de mariposas del género Heliconius (Lepidoptera: Nymphalidae) producidas en zoocriaderos del Caribe de Costa Rica. *UNED Research Journal / Cuadernos de Investigación UNED*, 11(03), 2699.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Osugi, A., & Sakakibara, H. (2015). Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? *BMC Biology*, 13(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0214-5>
- Otahola Gómez, V. A., & Díaz González, M. J. (2010). Regeneración in vitro de Passiflora edulis f. Flavicarpa y Passiflora quadrangularis utilizando dos tipos de explantes provenientes de plantas adultas y bencilaminopurina. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 23-28.
- P., R., Pohare, M., Bhor, S., Jadhav, K., Batule, B., B., S., Wagh, S., Wadekar, H., K., K., & Kulkarni, M. (2015). In vitro Micro Propagation of Blue Passion Flower (Passiflora caerulea L.). *trends in bioscience*, 7, 3079-3082.
- Peña, R., & Cruz, A. (2020). Aplicación de bioestimulantes con microelementos en el cultivo de maracuyá (Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.): Rendimiento, calidad y rentabilidad económica. *Manglar*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.17268/manglar.2020.007>
- Pizarro, J. V. M., Herrera, E. M. O., Batista, R. M. G., & Delgado, I. R. (2022). Influencia de las distancias de

- siembra en el desarrollo y producción de 2 variedades de Maracuyá (*passiflora edulis* degener). *Revista Científica Agroecosistemas*, 10(1), Article 1.
- R Core Team (2023). *_R: A Language and Environment for Statistical. Computing_. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.* <<https://www.R-project.org/>>.
- Ragavendran, C., D., K., Reena, G., & Natarajan, D. (2012). In vitro propagation of nodal and shoot tip explants of *Passiflora foetida* L. An exotic medicinal plant. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2012, 707-711.
- Rozo, D. L. S., & Gutiérrez, A. M. L. (2020.). Método de propagación de plantas. *Avances en Biotecnología Agrícola en Risaralda*, 73.
- Rukaitė, T. (2016). *Pasifloros tiesioginė regeneracija in vitro* [PhD Thesis]. <https://www.vdu.lt/cris/entities/etd/7c465599-5b38-46f4-b39a-d5173849a910>
- Schaller, G. E., Bishopp, A., & Kieber, J. J. (2015). The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. *The Plant Cell*, 27(1), 44-63. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133595>
- Shekhawat, M. S., Manokari, M., & Ravindran, C. P. (2015). An Improved Micropropagation Protocol by Ex Vitro Rooting of *Passiflora edulis* Sims. F. *Flavicarpa* Deg. Through Nodal Segment Culture. *Scientifica*, 2015, 578676. <https://doi.org/10.1155/2015/578676>
- Sompornpailin, K., & Khunchuay, C. (2016). Synergistic effects of BAP and kinetin media additives on regeneration of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). *AJCS*, 10, 726-731. <https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.05.p7439>
- Sozo, J. S., Cruz, D. C., Pavei, A. F., Pereira, I. M. da C., Wolfart, M., Ramlov, F., Fiuza Montagner, D., Maraschin, M., & Viana, A. M. (2016). In Vitro Culture and Phytochemical Analysis of *Passiflora tenuifolia* Killip and *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1391, 13-30. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3332-7_2
- Suárez Padrón, I. E. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*.
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169-180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>
- Ulmer, T., & MacDougal, J. M. (2004). *Passiflora: Passionflowers of the World*. Timber Press.
- Vaishnav, D., Chowdhury, P., Vaishnav, D., & Chowdhury, P. (2023). Types and Function of Phytohormone and Their Role in Stress. En *Plant Abiotic Stress Responses and Tolerance Mechanisms*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.109325>
- Wang, N., Chi, F., Ji, Z., Zhou, Z., & Zhang, J. (2021). First Report of Passion Fruit Anthracnose Caused by *Colletotrichum constrictum*. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-21-0754-PDN>
- Zakaria, L. (2021). Diversity of *Colletotrichum* Species Associated with Anthracnose Disease in Tropical Fruit Crops—A Review. *Agriculture*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/agriculture11040297>