

Regeneración *in vitro* de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* y *Passiflora quadrangularis* utilizando dos tipos de explantes provenientes de plantas adultas y bencilaminopurina

in vitro regeneration of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and *Passiflora quadrangularis* using two explant types from adult plants and bencilaminopurina

Víctor Alejandro OTAHOLA GÓMEZ ✉ y Mayerlín José DÍAZ GONZÁLEZ

Escuela de Ingeniería Agronómica y Laboratorio de Biotecnología del Núcleo de Monagas de la Universidad de Oriente. Avenida Universidad, Campus Los Guaritos, Maturín, 6201, estado Monagas, Venezuela
E-mail: votahola@gmail.com ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 08/02/2009

Fin de arbitraje: 24/02/2009

Revisión recibida: 20/11/2010

Aceptado: 25/11/2010

RESUMEN

Se realizaron dos ensayos en el Laboratorio de Biotecnología del Núcleo de Monagas de la Universidad de Oriente con el objeto de determinar el efecto de diferentes dosis de bencilaminopurina (BAP) sobre la regeneración *in vitro* de las especies *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Pe) y *Passiflora quadrangularis* (Pq). Un primer ensayo se realizó utilizando discos foliares, mientras que el segundo se realizó utilizando yemas axilares, en ambos se utilizaron explantes provenientes de plantas adultas. Se utilizaron diferentes dosis de BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mg.l⁻¹), en un medio con macro y micro sales MS con la adición de 30 mg.l⁻¹ de sacarosa y solidificado con 7 g.l⁻¹ de agar. Se utilizó un diseño estadístico completamente aleatorizado en arreglo factorial (5 dosis de BAP x 2 especies) con cinco repeticiones. Las diferencias entre los promedios se encontraron mediante la Prueba de Ámbitos Múltiples de Duncan al 5%. Se evaluaron los caracteres: Porcentaje de supervivencia de explantes a los 25; 35 y 45 días después de la inoculación al utilizar yemas axilares, porcentaje de explantes con formación de brotes a los 25 y 35 días después de la inoculación y el número de brotes por explantes a los 45 días. No se obtuvo regeneración al utilizar discos foliares en ninguna de las dos especies, mientras que si se obtuvo al utilizar yemas axilares. El BAP indujo la formación de brotes en todas las dosis utilizadas, Pq presentó un mayor número de brotes por explante en las dosis de 1,5 y 2,0 mg.l⁻¹ de BAP con promedios de 6,1 y 7,4 brotes por explante, respectivamente, mientras que en Pe, el mayor número de brotes por explante se obtuvo con la dosis de 0,5 mg.l⁻¹ de BAP, con un promedio de 3,0 brotes por explante. Solamente se presentaron callos en Pq, mientras que en Pe se presentó organogénesis directa.

Palabras clave: Regeneración *in vitro*, Pasifloras, tipo de explante, BAP

ABSTRACT

Two experiments were conducted at the Laboratorio of Biotechnology of Núcleo of Monagas, Universidad de Oriente in order to determine the effect of different doses of benzylaminopurine (BAP) on regeneration *in vitro* of the species *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Pe) and *Passiflora quadrangularis* (Pq). The first experiment was conducted using leaf discs, while the second one was performed using axillary buds in both experiments, explants from adult plants were used. Different doses of BAP were used (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg.l⁻¹), in a medium containing macro and micro salts MS with addition of 30 mg.l⁻¹ of sucrose and solidified with 7 g.l⁻¹ of agar. A completely randomized statistical design in factorial arrangement was used (5 doses of BAP x 2 species) with five replications. Differences among means were found by using the Duncan's Multiple range test at 5%. The traits evaluated were: percentage of explant survival at 25, 35 and 45 days after inoculation using axillary buds, percentage of explants with shoot formation at 25 and 35 days after inoculation and the number of shoots per explants after 45 days. No regeneration was obtained using leaf discs in both species but it was achieved using axillary buds. The BAP induced shoot formation at all doses used and a greater number of shoots per explant was found in Pq when doses of 1.5 and 2.0 mg.l⁻¹ BAP were used with an average of 6.1 and 7.4 shoots per explant, respectively, while in Pe, the highest number of shoots per explant was obtained with 0.5 mg.l⁻¹ of BAP, with an average of 3.0 shoots per explant. Callus occurred only in Pq, while direct organogenesis was presented in Pe.

Key words: *in vitro* regeneration, passion fruit, type of explant, BAP

INTRODUCCIÓN

El estado Monagas ofrece ventajas comparativas con otros estados de la región oriental de Venezuela para la producción y procesamiento de

frutales pero problemas de orden agronómico, económicos y sociales han limitado un mayor desarrollo las siembras de estos rubros. Siendo las pasifloras uno de los cultivos de mayor importancia y potencial. Dentro de la familia Passifloraceae el

género más importante, desde el punto de vista económico, es *Passiflora*. Este género incluye especies que presentan frutos comestibles, entre los cuales se encuentran la parchita maracuyá y la parcha, así como otras especies de uso medicinal u ornamental (Avilán, *et al*, 199).

La mayoría, si no todas, las plantaciones de parchita y parcha en Venezuela se realizan mediante semillas cosechadas de siembras anteriores, sin embargo, estas son especies que presentan polinización cruzada, realizada por insectos, lo cual causa una considerable variabilidad genotípica y fenotípica dentro de las plantaciones, presentándose plantas con diferencias en el crecimiento, tipos de frutos, maduración y tolerancia a diferentes condiciones ambientales, lo cual tiende a disminuir la productividad y hace más difícil las labores culturales en las plantaciones. La propagación de estas especies a través de la técnica de cultivo *in vitro*, puede permitir obtener un gran número de plantas idénticas a la planta madre, de ahí la importancia de poder regenerar nuevas plantas a partir de plantas adultas, a las cuales se les conozca su comportamiento agronómico.

Tomando en consideración las ventajas de la propagación asexual y las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se realizaron estos ensayos, con el fin de evaluar la respuesta de dos tipos de explantes tomados de plantas adultas de las especies de parchita maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) D. y parcha (*Passiflora quadrangularis*) y determinar la dosis de Benzil-amino-purina (BAP), que permite mayor regeneración en ambos explantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología, ubicado en el Campus Juanico de la Universidad de Oriente en Maturín, Núcleo Monagas. Se realizaron dos ensayos, para determinar la regeneración de plantas en cultivo *in vitro* en dos especies: Parchita maracuyá y parcha granadina o badea, utilizando como explantes discos foliares y yemas axilares. En ambos ensayos se utilizaron diferentes dosis de Benzil-amino-purina (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mg.l⁻¹ de BAP) en un medio Murashige y Skoog, con la adición de 30 g/l de sacarosa y solidificado con 7 g.l⁻¹ de agar, el pH fue ajustado a 5,8.

Para el ensayo de regeneración mediante explantes foliares se utilizaron discos foliares de 1 cm de diámetro aproximadamente, provenientes de hojas jóvenes de plantas adultas y en producción, tratando de seleccionar hojas que presentaran tamaño similar. La desinfección de los discos foliares se realizó con lavado de las hojas con abundante agua, posteriormente se sumergieron en una solución de alcohol al 70% por un minuto, luego en solución de agua y cloro comercial (5% de hipoclorito de sodio) en relación 3:1 por 20 minutos. Posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar. Una vez extraídos los discos foliares con la ayuda de sacabocados metálicos de 1cm de diámetro, tomados del la zona central de las hojas y teniendo cuidado de que tuviesen sectores de las nervaduras de las hojas, se colocaron 10 en cada cápsula de Petri con los diferentes tratamientos, bajo un diseño estadístico de bloque al azar en arreglo factorial, con cinco repeticiones y una unidad experimental representada por tres cápsulas de Petri en cada una de las cuales se colocaron diez explantes con la cara abaxial de las hoja en contacto con el medio de cultivo. Los explantes inoculados fueron colocados en completa oscuridad durante 15 días y luego colocados en régimen de 15 horas de luz y 9 horas de oscuridad, una temperatura de 27 +/-1C y una intensidad de luz de 32 $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$

En el ensayo de regeneración mediante yemas axilares se utilizaron aquellas que se encuentran hasta 10 cm del ápice de las ramas de plantas adultas y en producción. Los explantes fueron sometidos a lavado y desinfección similar al utilizado con los discos foliares. La inoculación se realizó en tubos de ensayos de 12 cm de largo y 2,5 cm de diámetro conteniendo cerca de 10 ml de medio, colocándose un explante por tubo. Se utilizó un diseño estadístico completamente aleatorizado en arreglo factorial con 5 repeticiones, cada unidad experimental estuvo representada por cinco explantes por tratamiento. Se colocaron los explantes en la cámara de crecimiento en condiciones ambientales similares a las utilizadas con los explantes foliares, solo que no se colocaron en completa oscuridad.

En los dos ensayos, los datos obtenidos fueron estudiados mediante el análisis de varianza y las diferencias entre los tratamientos mediante la Prueba de Ámbitos Múltiples de Duncan al 5%. Los parámetros evaluados fueron: Porcentaje de supervivencia de explantes al utilizar yemas axilares

a los 25, 35 y 45 días después de la inoculación, porcentajes de explantes con formación de brotes a los 25, 35 días después de la inoculación y el número medio de brotes por explantes, a los 45 días.

RESULTADOS

Regeneración de explantes foliares

Al utilizar discos foliares no hubo regeneración en *P. edulis* f. *flavicarpa* ni tampoco en *P. quadrangularis*. En la primera evaluación, realizada 15 días después de la siembra en los explantes foliares no hubo formación de brotes pero si de callos en todos los tratamientos, después de los 25

Cuadro 1. Supervivencia de los explantes de yemas laterales de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) y parcha granadina (*Passiflora quadrangularis*) bajo diferentes dosis de BAP evaluados a los 25 días después de la inoculación.

Especie de <i>Passiflora</i>	Supervivencia de los explantes (%) *
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	78,67 a
<i>P. quadrangularis</i>	66,67 b

* Prueba de Ámbitos Múltiples de Duncan al 5%. Letras iguales indican similitud estadística entre los tratamientos

Cuadro 2. Supervivencia de los explantes de yemas laterales de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) y parcha granadina (*Passiflora quadrangularis*) bajo diferentes dosis de bencilaminopurina (BAP) evaluados a los 35 días después de la inoculación.

Especie de <i>Passiflora</i>	Dosis de BAP (mg.l ⁻¹)	Supervivencia de los explantes (%) *
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	0,0	80,00 a
	0,5	66,67 a
	1,0	80,00 a
	1,5	66,67 a
	2,0	80,00 a
<i>P. quadrangularis</i>	0,0	26,67 b
	0,5	66,67 a
	1,0	66,67 a
	1,5	66,67 a
	2,0	76,33 a

* Prueba de Ámbitos Múltiples de Duncan al 5%. Letras iguales indican similitud estadística entre los tratamientos

días de la siembra se observó que los explantes comenzaron a necrosar igual que los callos ya formados. A los 35 días después de la siembra todos los explantes estaban necrosados.

Regeneración de yemas axilares

En la evaluación para el porcentaje se supervivencia de los explantes realizada a los 15 días después de la inoculación el análisis de varianza indica que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre las especies, entre las dosis utilizadas de BAP como tampoco para la interacción especies por dosis. En la evaluación realizada a los 25 días después de la siembra el análisis de varianza para este carácter mostró diferencias estadísticamente significativa únicamente para el efecto simple entre las especies comportándose (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) estadísticamente superior a *Passiflora quadrangularis* (Cuadro 1).

Para la evaluación realizada 35 días después de la inoculación el análisis de varianza señaló diferencias estadísticamente significativa entre las especies y entre la interacción de las especies con la dosis de BAP. La respectiva prueba de promedios mostró que hubo alta regeneración en la parchita independientemente de la dosis de BAP utilizada, mientras que en la parcha, la presencia de BAP en el medio de cultivo aumentó la supervivencia de los explantes. Al comparar la especie parchita con la parcha se pudo observar que en el tratamiento testigo, en la parchita se obtuvieron un mayor porcentaje de supervivencia en relación con la parcha. En el resto de los tratamientos ambas especies se comportaron iguales (Cuadro 2).

En la evaluación realizada a los 45 días después de la inoculación, el análisis estadístico mostró diferencia solamente para el efecto simple entre las dosis de BAP. La prueba de promedios respectiva muestra que en ambas especie los tratamientos donde se utilizó BAP se comportaron estadísticamente iguales entre sí, superando la supervivencia mostrada en los tratamientos donde no se utilizó el regulador de crecimiento (Cuadro 3).

Al comparar el porcentaje de supervivencia en diferentes épocas de evaluación, en la primera fecha (15 días) tanto las dosis de BAP y las especies se comportaron iguales. A los 25 días después de la inoculación, se muestra que la Parchita presentó un mayor porcentaje de supervivencia en comparación

con la Parcha, manteniendo cierta estabilidad hasta la tercera evaluación (35 días) a partir de la cual se observa que en ausencia del regulador de crecimiento la parcha mostró los menores porcentajes de sobrevivencia. En la última evaluación (45 días) independientemente de la especie se observó que BAP induce una mayor sobrevivencia de los explantes aunque no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos que presentaron el regulador de crecimiento.

Cuadro 3. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de yemas laterales de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) y parcha granadina (*Passiflora quadrangularis*) bajo diferentes dosis de bencilaminopurina (BAP) evaluados a los 45 días después de la inoculación.

Dosis de BAP mg.l ⁻¹	Sobrevivencia de los Explantes (%)*
2,0	76,67 a
1,5	66,67 a
0,5	63,34 a
1,0	56,63 a
0,0	33,33 b

* Prueba de Ámbitos Múltiples de Duncan al 5%. Letras iguales indican similitud estadística entre los tratamientos

Cuadro 4. Explantes de yemas axilares de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) y parcha granadina (*Passiflora quadrangularis*) con formación de brotes bajo diferentes dosis de bencilaminopurina (BAP) evaluados a los 25 y 35 días después de la inoculación (DDI).

Especie de <i>Passiflora</i>	Dosis de BAP (mg.l ⁻¹)	Explantes con brotes (%) (DDI)	
		25	35
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	0,0	40,00 ab	40,00 b
	0,5	76,70 a	83,33 ab
	1,0	60,00 ab	76,67 ab
	1,5	26,70 b	46,67 b
	2,0	53,30 ab	46,67 b
<i>P. quadrangularis</i>	0,0	70,00 ab	50,00 b
	0,5	53,30 ab	73,33 ab
	1,0	53,30 ab	83,33 ab
	1,5	80,00 a	100,00 a
	2,0	80,00 a	100,00 a

* Prueba de Ámbitos Múltiples de Duncan al 5%. Letras iguales indican similitud estadística entre los tratamientos

Porcentaje de explantes con brotes

El análisis de varianza para el porcentaje de explantes con nuevos brotes 25 días después de la inoculación determinó diferencia significativa para el efecto de interacción entre las especies y la dosis de BAP. La prueba de promedio respectiva mostró que todos los tratamientos se comportaron estadísticamente similares entre sí, con la excepción del tratamiento donde se utilizó la especie *P. edulis* y se inocularon los explantes en medio que contenía 1,5 mg.l⁻¹ de BAP. En la evaluación realizada a los 35 días para este mismo carácter el análisis de varianza indicó que hubo diferencia significativa para el efecto simple entre las especies y para el efecto de la interacción entre las especies y las dosis de BAP. La prueba de promedios respectiva muestra que los tratamientos donde se utilizaron las dosis de 0,5 y 1,0 mg.l⁻¹ de BAP en *P. edulis* y todos los tratamientos donde se utilizó BAP en *P. quadrangularis* se comportaron similares entre sí y presentaron mayor porcentaje de explantes con brotes (Cuadro 4).

Números de brotes por explantes.

El análisis de varianza para el número de brotes por explantes de yemas laterales en la evaluación realizada 45 después de la inoculación mostró diferencia significativa para el efecto simple entre las especies, entre las dosis y para la interacción entre ambos factores. La prueba de promedios indica que los tratamientos donde se utilizó las dosis de 1,5 y 2,0 mg.l⁻¹ de BAP en parcha obtuvieron el mayor número de brotes por explantes. Sin embargo es importante señalar que los brotes obtenidos al utilizar estas dosis son pequeños, debido a la competencia entre ellos, lo cual en algunos casos dificulta su separación posterior y su crecimiento (cuadro 5).

DISCUSIÓN

La regeneración *in vitro* en parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) se ha obtenido de ápices y segmentos nodales (Faria y Segura, 1997a; Monteiro *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2003) o de los brotes adventicios desarrollados de discos de la hoja (Dornelas y Vieira, 1994; Appezzato-da-Glória *et al.*, 1999), hipocótilos (Faria y Segura, 1997b), o segmentos internodales (Biasi *et al.*, 2000). Los protocolos optimizados han sido establecidos principalmente usando diversas combinaciones de los reguladores de crecimiento, tales como BAP e IBA (Kawata y *et al.*, 1995), BAP y NAA (Dornelas y

Vieira, 1994), BAP e IAA (Faria y Segura, 1997b), y diversas soluciones de sales (Faria y Segura, 1997b; Monteiro *et al.*, 2000).

En este ensayo no se logró la regeneración de discos foliares provenientes de hojas de plantas adultas. En este sentido, Drew. (1991) indica la dificultad de regeneración de *Passifloras* a partir de tejidos adultos, logrando un porcentaje relativamente bajo de producción de nuevas plantas a partir de explantes nodales y la suplementación del medio MS con diferentes combinaciones de Kinetina y Acido Indol Acético (AIA). Sin embargo, es importante señalar que a partir de plantas jóvenes de Parchita se puede obtener regeneración, así los demuestra Otahola (1999), utilizando explantes foliares provenientes de plantas jóvenes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* D., quien reporta que la hormona BAP en todas las dosis utilizadas (0; 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2 mg.l⁻¹), induce la formación de callos y brotes, sobresaliendo la dosis de 0.6 mg.l⁻¹ en la formación de brotes en los explantes.

Boffino, *et al.* (2000) desarrollaron la metodología para la regeneración de plantas de *P. suberosa* a partir de discos foliares, indicando mayor regeneración de los explantes al utilizar dosis de 0,5 y 1,0 mg.l⁻¹ de BAP, formándose inicialmente callos y posteriormente yemas. Estos resultados difieren a los obtenidos en este experimento, donde no fue posible la regeneración de tejidos a partir de discos foliares.

Cuadro 5. Número de brotes por explantes de yemas laterales de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) y parcha granadina (*Passiflora quadrangularis*) bajo diferentes dosis de bencilaminopurina (BAP) evaluados a los 45 días después de la inoculación.

Especie de <i>Passiflora</i>	Dosis de BAP (mg.l ⁻¹)	Brotos/explante
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	0,0	1,03 cd
	0,5	3,00 b
	1,0	2,62 bc
	1,5	1,60 bcd
	2,0	1,83 bcd
<i>P. quadrangularis</i>	0,0	0,50 d
	0,5	2,93 b
	1,0	3,10 b
	1,5	6,10 a
	2,0	7,37 a

* Prueba de Ámbitos Múltiples de Duncan al 5%. Letras iguales indican similitud estadística entre los tratamientos

Kawata *et al* (1995) reporta alta regeneración de plantas jóvenes de Parchitas al utilizar explantes foliares en medio MS suplementado con 3% de sacarosa, 1 mg.l⁻¹ de BAP y 1 mg.l⁻¹ de IBA, indicando así mismo que al ser transferidos los explantes a un medio sin hormonas se produce un rápido enraizamiento. Sin embargo, no se reportan resultados de regeneración de discos foliares provenientes de plantas adultas.

Dornellas y Carneiro (1994) al trabajar con diferentes tipos de explantes en varias especies de pasifloras, reportan la presencia de organogénesis directa en *P. edulis*, sin pasar por estado de callos. Similares resultados se obtuvieron en este ensayo, donde no se obtuvo formación de callos en *P. edulis*, mientras que en *P. quadrangularis* la regeneración fue indirecta.

Scorza y Janick (1978), estudiando la regeneración de plantas de varias especies de *Passifloraceae*, verificaron inicialmente que la citocinina 6-BAP (6-Bencilamonopurina) en combinación con el ácido naftaleniacético (ANA) estimula, en discos foliares y segmentos nodales, la formación de partes aéreas, aunque solo cuando se utilizan plántulas provenientes de semillas.

Moran Robles (1979) indica que existe gran potencial morfogénético en segmentos caulinares no meristemáticos de *P. edulis* y *Passiflora mollissima*. Después de probar diversas composiciones básicas del medio de cultivo combinados con fitoreguladores, concluyó que la presencia de cinétina es importante para la diferenciación de yemas y partes aéreas de las dos especies y que el enraizamiento es estimulado por la presencia de IAI (Acido indolacético). Sin duda el potencial de regeneración se observó en *P. edulis* y en *P. quadrangularis*, especialmente al utilizar yemas axilares. Sin embargo, es evidente que la mayoría de los experimentos y resultados se han obtenido al utilizar plantas jóvenes y no plantas adultas.

CONCLUSIONES

No se obtuvo regeneración al utilizar como explante los discos foliares, pero si al utilizar yemas axilares. El BAP indujo la formación de brotes en todas las dosis utilizadas, *P. quadrangularis* presentó un mayor número de brotes/explante al utilizar las dosis de 1,5 y 2,0 mg.l⁻¹ con un promedio de 6 y 7 brotes por explante respectivamente, mientras que en *P. edulis* se obtuvieron 3 brotes/explante con la dosis

de 0,5 mg.l⁻¹ de BAP. Se presentaron callos solamente en *P. quadrangularis*, mientras que en *P. edulis* se presentó organogénesis directa.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento del presente trabajo a través del Proyecto de Investigación bajo la responsabilidad del segundo autor

LITERATURA CITADA

- Almeida A.; A. Borges, C. Leite, C. Barbosa, D. Cunha, H. Santos, M. Fancelli e N. Sánchez. 1999. Maracujá. Serie vermelha. Fruteiras. Comunicación para Transferencia de tecnología. EMBRAPA, Brasil Colección Plantar 41. 107 p.
- Araujo, J. A. 1995. Study of passionflower training systems in the Huambo Region-Angola. *Revista de Ciencias Agrarias* 18(3): 81-91.
- Avilan, L.; F. Leal y D. Baustista. 1992. Manual de Fruticultura. Tomo II Editorial AMÉRICA, C.A. 2º Edición. Caracas, Venezuela. 531 p.
- Boffino, A.; G. Nakazawa, B. Mendez, e A. Rodriguez. 2000. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. *Scientia Agricola* 57 (3): 571-573.
- Carneiro Vierira. M. e B. Apezato Da Gloria. 2001. Fundamentos e aplicacoes da Cultura de tecidos no Melhoramento. *In* Recursos genéticos y Mejoramiento de Plantas. Fundacao MT. Rondonópolis, MT. P. 911-939
- Centro de Energía Nuclear na agricultura.1995. Manual de Laboratorio de Cultura de Tecidos de Plantas. Universidad de sao paulo, PiracicaBAP, SP. Brasil. 67 p.
- Dornelas, M. C. e F. C. A. Tavares. 1995. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. *Plant Cell Reports* 15(1-2): 106-110.
- Dornelas, M. C. and M. L. C. Vieira. 1994. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36 (2): 211-217.
- Drew, R. A. 1991. *in vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* spp. *Plant Cell Tissue And Organ Culture* 26(1): 23-28.
- Fajardo, D. and F. Angel. 1998. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. *Euphytica* 101(3): 341-347.
- Faria, J. L. C. and J. Segura. 1997. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. *Hortscience* 32 (7): 1276-1277.
- Faria, J. L. C. and J. Segura. 1997. *in vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 33(3): 209-212.
- Ferreira, A.; F. Denis, M. Quoirin e A. Ayub. 2002. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) *Ciência Rural* 32 (2): 237-241.
- Kawata, K. and C. Ushida. 1995. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. *Journal of Plant Physiology* 147(2): 281-284.
- Manders, G. and W. C. Otoni. 1994. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Degener.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 13(12): 697-702.
- Mantell, S.; J. Mattews e R. McKee. 1994. Principios de Biotecnología em Plantas. Uma introducao a Engenharia Genética em Plantas. Sociedade Brasileira de Genética. Sao Paulo, Brasil. 327 p.
- Murashige, T. y P. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 476-497.
- Otoni, W. C. and N. W. Blackhall. 1995. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener and *P. incarnata* L. *Journal of Experimental Botany* 46 (288): 777-785.
- Perea Dallos, M. y W. Álvarez. 1988. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. Universidad nacional- CONICIT. Colombia. 108 p.
- Vaz, F. B. D. U. and A. V. P. D. Santos. 1993. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener): The importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. *Plant Cell Reports* 12(4): 220-225.