

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias Agroalimentarias
Escuela de Agronomía

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

**Determinación de tratamientos pregerminativos físicos y químicos, luz y temperatura
para promover la germinación de tres especies de *Passiflora***

Estudiante: Elizabeth Vega Corrales

2022

San José, Costa Rica

APROBACIÓN

Los profesores que suscriben, miembros del jurado dictaminador declaran que la presente tesis ha cumplido con los requisitos fundamentales, siendo aprobada por



M.Sc. Ester Vargas Ramírez

Directora



Dr. Andrés Antonio Monge Vargas

Miembro del Comité



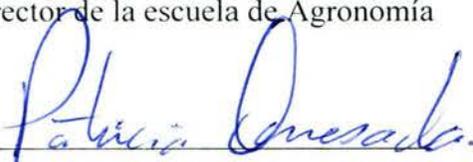
Lic. Sonia Bertsch Hernández

Miembro del Comité



Dr. Luis Gómez Alpizar

Director de la escuela de Agronomía



M.Sc. Patricia Quesada Rojas

Profesora de la escuela de Agronomía



Elizabeth Vega Corrales

Candidata

1. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi mamá Lía Corrales Navarro que ha trabajado incansablemente y ha hecho esfuerzos enormes para permitirme la oportunidad de una carrera universitaria, por apoyarme, cuidarme y estar ahí siempre.

Agradezco a mis hijos Lía y Lucas García Vega, el reto y la recompensa más grande de mi vida, quienes han sido la inspiración, impulsándome a seguir cada momento que se ha puesto cuesta arriba, por su alegría, apoyo incondicional, palabras dulces y muestras de amor.

Agradezco a la M.Sc Ester Vargas, directora de este proyecto que ha sido una gran guía y maestra, por su paciencia, su disponibilidad, su carisma, generosidad y sobre todo su gran profesionalismo, conocimiento y esfuerzo constante durante el tiempo que he realizado esta investigación.

A Verónica Campos y Guillermo Solano quienes han estado en el proceso día a día, encontrando soluciones a mis contratiempos y aportando grandes ideas para la investigación, han sido un gran apoyo académico y emocional.

Al Dr. Andrés Monge Vargas quién con su gran conocimiento y su minucioso trabajo me ha impulsado a aprender más cada día y dar el máximo esfuerzo para superar los desafíos que se presentaron durante la investigación.

A la Lic. Sonia Bertsch por todo el apoyo que me ha brindado para la elaboración de este proyecto, sus aportes desde otra visión, su gran conocimiento sobre estas especies y la disponibilidad siempre para trasmitirlo de manera alegre, agradezco que haya sido la gran inspiradora de ampliar este tema tan maravilloso del cual he aprendido más de lo que se podría pedir.

Finalmente, al Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) por el financiamiento de este el proyecto y por el maravilloso trato que recibí de todos sus funcionarios durante el periodo de investigación.

2. ÍNDICE

Contenido

APROBACIÓN	2
1. AGRADECIMIENTOS.....	1
.....	5
3. RESUMEN	6
4. INTRODUCCIÓN.....	7
5. OBJETIVOS.....	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos.....	9
6. REVISIÓN DE LITERATURA	10
6.1. Origen y distribución de las especies de interés	10
6.2. Características de las semillas del género <i>Passiflora</i>	10
6.3. Germinación	11
6.4 Factores que afectan la germinación	11
6.4.1. Efecto de la temperatura sobre la germinación de semillas de <i>Passiflora</i>	12
6.4.2. Efecto de la luz sobre la germinación de semillas de <i>Passiflora</i>	12
6.5. Dormancia en semillas.....	13
6.6. Tratamientos pregerminativos para romper dormancia.....	14
6.6.1. Tratamientos físicos.....	15
6.6.2. Aplicación exógena de ácido giberélico (AG ₃).....	15
7. METODOLOGÍA.....	17
7.1. Localización.....	17
7.2 Material experimental.....	17
7.3 Determinación de viabilidad de la semilla	18
7.3.1 Germinación	18
7.3.2. Prueba de tetrazolio (TZ).....	19
7.3.2.1 Prueba de tetrazolio en semillas no germinadas	20
7.3.2.2 Optimización del protocolo de la prueba de tetrazolio.....	20
7.4. Experimentos para promover la germinación.....	21
7.4.1. Experimento 1.1: tratamientos físicos prueba I.....	21
7.4.2. Experimento 2.1: efecto de las condiciones de germinación externas (luz, temperatura y sustrato) prueba I.....	23
7.4.3. Prueba de desinfección	24

7.4.4. Experimento 2.2: efecto de las condiciones de germinación externas (luz, temperatura y sustrato) prueba II.....	25
7.4.5. Experimento 1.2: tratamientos Físicos prueba II.....	25
7.4.5.1. Prueba de tetrazolio en semillas no germinadas de <i>P. ligularis</i>	26
7.4.6. Curva de absorción de agua.....	26
7.4.7. Experimento 3: Efecto de la aplicación exógena de ácido giberélico (AG ₃)	27
7.5. Diseño estadístico y variables evaluadas.....	27
7.6. Análisis estadístico de los datos	28
8. RESULTADOS	29
8.1 Determinación de la viabilidad inicial de las semillas	29
8.1.1 Prueba de Germinación	29
8.1.2. Prueba de tetrazolio	30
8.1.3. Optimización del protocolo de la prueba de tetrazolio.....	31
8.2. Experimentos para promover la germinación.....	32
8.2.1. Experimento 1.1: tratamientos físicos prueba I.....	32
8.2.1.1. Prueba de tetrazolio para semillas no germinadas.....	34
8.2.3. Prueba de desinfección	37
8.2.4. Experimento 2.2: efecto de las condiciones de germinación externas (luz, temperatura y sustrato) prueba II.....	40
8.2.5. Experimento 1.2: tratamientos físicos prueba II.....	43
8.2.5.1. Prueba de viabilidad de semillas no germinada de <i>P. ligularis</i>	44
8.11 Curva de absorción de agua.....	45
8.12 Experimento 3: Efecto de la aplicación exógena de ácido giberélico (AG ₃)	46
9. DISCUSIÓN.....	49
10. CONCLUSIONES.....	55
11. RECOMENDACIONES	56
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

Ficha Bibliográfica

Vega Corrales, Elizabeth. “Determinación de tratamientos pregerminativos físicos y químicos, luz y temperatura para promover la germinación de tres especies de *Passiflora*” Tesis para optar al título profesional de Ingeniera Agrónoma con el grado de Licenciada en Agronomía, Facultad de Ciencias Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Directora: M.Sc. Ester Vargas Ramírez.

Palabras clave: dormancia, viabilidad, *Passiflora biflora*, *Passiflora adenopoda*, *Passiflora ligularis*.

3. RESUMEN

Las especies del género *Passiflora* tienen un alto potencial gastronómico, farmacológico y ornamental, debido a su composición fitoquímica. Sin embargo, la mayoría se encuentra en estado silvestre, por lo que existen pocos estudios sobre su biología y manejo, incluyendo su germinación. En general, se ha reportado que la germinación de las semillas de especies del género *Passiflora* es lenta y desuniforme, y que la mayoría posee dormancia. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de tratamientos pregerminativos (físicos y químicos), luz y temperatura, sobre la ruptura de la dormancia y la estimulación de la germinación de las semillas de tres especies de *Passiflora*. Esta investigación se realizó en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. Se utilizaron semillas de *Passiflora ligularis*, *Passiflora biflora* y *Passiflora adenopoda*. Se evaluó el efecto de cuatro tratamientos físicos, tres condiciones de temperatura, dos fotoperiodos, dos tipos de sustrato y de la aplicación exógena de cinco concentraciones de ácido giberélico sobre la germinación de las semillas, determinada a partir del número de plántulas normales. Se analizó también el efecto de utilizar tres tratamientos de desinfección sobre la disminución de la contaminación y la viabilidad de las semillas. Además, se realizó una curva de absorción de agua para determinar la dinámica de absorción de las semillas de estas tres especies. Al aplicar los tratamientos físicos se encontró que, en el caso de *P. adenopoda* y *P. ligularis*, los porcentajes de germinación fueron bajos y no hubo diferencias significativas entre tratamientos. En el caso de *P. biflora*, los porcentajes de germinación fueron mayores al 70% en el testigo y el tratamiento 2 (imbibición en agua 24 horas), lo que sugiere que los demás tratamientos físicos evaluados pudieron haber dañado las semillas, disminuyendo su viabilidad. Los experimentos de condiciones ambientales mostraron que la temperatura a 25 °C, la turba como sustrato y el fotoperiodo 12/12 fueron, en general, las condiciones más favorables para la germinación de las tres especies. La aplicación exógena de ácido giberélico promovió la germinación en *P. adenopoda* y *P. ligularis*, al aumentar los porcentajes de germinación al 56 y 60%, respectivamente, al utilizar dosis en dosis entre 400 y 500 ppm. Para *P. biflora* no hubo diferencias significativas entre tratamientos. En cuanto a la desinfección, se demostró que, para las tres especies estudiadas, el hipoclorito de sodio a 1% fue el tratamiento más efectivo para disminuir los porcentajes de contaminación, sin afectar la germinación. Con respecto a la dinámica de absorción, se evidenció que ninguna de las tres semillas presentó un impedimento al ingreso de agua y que la máxima absorción se dio durante las primeras horas en imbibición. Los resultados obtenidos sugieren que las semillas de *P. ligularis*, presentan dormancia de tipo fisiológico y que las semillas de *P. adenopoda* podrían tener dormancia combinada. Las semillas de *P. biflora* no presentan ningún tipo de dormancia, ya que, en una condición de luz (fotoperiodo 12/12), la germinación fue superior al 70 % y ninguno de los tratamientos realizados en los experimentos promovió un aumento significativo en los porcentajes de germinación.

4. INTRODUCCIÓN

La familia Passifloraceae posee cerca de 630 especies que se encuentran distribuidas en aproximadamente 18 géneros y se caracteriza por ser muy dinámica y diversa (Miranda et al., 2009; Pérez-Cortez et al., 2005). El género *Passiflora* fue establecido por Linnaeus y comprende más de 500 especies, la mayoría de ellas están distribuidas principalmente en América tropical (Morales et al., 2015; Morales et al., 2016; Patel et al., 2011).

En la actualidad, aunque no todas las especies de *Passiflora* se cultivan comercialmente, al menos 80 de ellas poseen frutos comestibles que contienen vitamina A, componentes del complejo B y ácido ascórbico, mientras que alrededor de 20 especies son cultivadas para uso ornamental por el atractivo de sus flores (Torres- González, 2018). Tanto la pulpa como el jugo de estas plantas presentan características fisicoquímicas que poseen gran potencial para su agroindustrialización (Soto et al., 2014). Algunos de los fitoconstituyentes de las especies estudiadas de *Passiflora* son alcaloides, fenoles, glucosil flavonoides y cianogénicos, aunque la mayoría de las especies no cuentan con estudios realizados al respecto (Patel et al., 2011). Además, se ha documentado que algunas especies sintetizan compuestos con propiedades analgésicas, antimicrobianas, sedantes, diuréticas y ansiolíticas. Es así como las plantas de especies de *Passiflora* son de gran interés para la elaboración de nuevos fármacos (Morales et al., 2015; Patel et al., 2011).

Muchas especies de *Passiflora* tienen también un importante valor ecológico, ya que son productoras de néctar, polen, semillas, frutos y tejidos vegetales que son una fuente importante de alimento para insectos herbívoros. Debido a la diversidad existente en este género, la posibilidad de mejorar la genética de especies cultivadas podría favorecer el desarrollo de nuevas variedades con características deseadas (Aular & Rodríguez, 2003; Bonilla, 2014; Ramírez, 2006).

Existe un número importante de especies del género *Passiflora* alrededor del mundo que se encuentran en estado silvestre y, por lo tanto, la información referente a la caracterización y evaluación del fruto, las semillas, los métodos de propagación y la germinación de estas es escasa (Aular & Rodríguez, 2003). En general, en las especies que se conocen, el principal método de propagación es mediante semilla sexual, debido a que se obtienen plantas más vigorosas en comparación con otros métodos de propagación y, además, es un método de fácil ejecución. Sin embargo, en algunas especies presenta limitaciones

importantes, como lo es una germinación baja, lenta y desuniforme (Bautista, 2018). La baja germinación en las semillas de *Passiflora* puede estar relacionada a que las semillas recién extraídas de los frutos podrían presentar cierto grado de dormancia, lo que dificulta la propagación sexual de algunas especies (Miranda et al., 2009; Severin et al., 2004).

La dormancia se conoce como el estado en el que, aunque la semilla sea viable y cuente con todas las condiciones (humedad, disponibilidad de oxígeno y temperatura) adecuadas para su germinación, no germina. Se puede clasificar como fisiológica, física o morfológica, la primera causada por factores endógenos, la segunda por impermeabilidad de las estructuras protectoras que no permiten el paso del agua y la última, por embriones inmaduros. Estos factores, por separado o en conjunto, pueden causar el retraso de la germinación de algunas semillas (Baskin & Baskin, 2004; Bautista, 2018; Santos et al., 2015).

Algunas especies de *Passiflora* presentan diferentes tipos de dormancia, debido a esto, cuando no son tratadas pueden tardar meses en germinar. Por lo tanto, se han estudiado algunos tratamientos pregerminativos de distintos tipos tales como la eliminación del arilo, desecación, almacenamiento durante varios meses, el remojo en agua durante distintos periodos, variaciones de luz y temperatura, la fermentación, la escarificación y la aplicación de giberelinas (Mediondo & García, 2009).

Debido a que la información relacionada con la germinación de las semillas en el género *Passiflora* se limita a unas pocas especies, y a que la germinación es la principal limitante para su propagación, se pretende estudiar el efecto de condiciones ambientales y de tratamientos físicos y químicos sobre la germinación de tres especies de *Passiflora* que poseen un alto valor ecológico y un importante uso potencial a nivel agroindustrial, con el fin de evaluar los factores que pueden afectar su germinación y de proponer nuevas alternativas que favorezcan su propagación y ayuden a ampliar el uso de estas especies.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de tratamientos pregerminativos (físicos y químicos), luz y temperatura, sobre la ruptura de la dormancia y la estimulación de la germinación de las semillas de las especies *Passiflora adenopoda*, *P. biflora* y *P. ligularis* en condiciones de laboratorio.

Objetivos específicos

1. Analizar la eficiencia de la imbibición, la inmersión en agua a 50 °C y la eliminación del segmento distal de la cubierta seminal, sobre la ruptura de la dormancia y la promoción de la germinación de *P. adenopoda*, *P. biflora* y *P. ligularis*.
2. Determinar el efecto combinado de la luz y la temperatura sobre la ruptura de la dormancia y la promoción de la germinación de *P. adenopoda*, *P. biflora* y *P. ligularis*.
3. Comparar el efecto de la aplicación exógena de seis concentraciones de ácido giberélico (AG₃), sobre la ruptura de la dormancia y la promoción de la germinación de *P. adenopoda*, *P. biflora* y *P. ligularis*.

6. REVISIÓN DE LITERATURA

6.1. Origen y distribución de las especies de interés

Las pasifloras se distribuyen mayormente en zonas tropicales y subtropicales, desde el nivel del mar hasta los 4300 msnm. En América, la mayoría de las especies se encuentran en Centro y Sudamérica (Bonilla, 2014; Deginani, 2001). La especie *Passiflora ligularis* (granadilla) está distribuida desde el norte de Argentina hasta México (Pinduisaca, 2016). En Costa Rica, es una especie introducida y cultivada que crece desde los 1200 hasta los 2800 msnm. *Passiflora adenopoda* se encuentra desde México hasta Perú y, en Costa Rica, se considera una especie silvestre de bosques húmedos, muy húmedos y pluviales. *Passiflora biflora* (calzoncillo) es originaria de México, se distribuye desde México hasta Ecuador, Venezuela y las Bahamas. En Costa Rica, también es considerada una especie silvestre y se ubica en el bosque húmedo a muy húmedo (Aguilar et al., 2018; Axol-Rodríguez et al., 2018; Estrada & Rodríguez, 2009).

6.2. Características de las semillas del género *Passiflora*

Las semillas que se encuentran en los frutos de estas especies son abundantes, color marrón cuando están maduras, en el interior puede presentarse o no un endospermo blanquecino. Poseen un funículo dilatado en un arilo o pulpa (Patel et al., 2011). Como muchas de las características de este género, los tamaños, formas y colores de la semilla, son variables e importantes para la separación taxonómica entre especies (Estrada & Rodríguez, 2009; Pérez-Cortéz et al., 2005).

Las semillas del género *Passiflora* en su mayoría poseen una testa gruesa semipermeable. En varias especies se ha reportado la presencia de inhibidores de la germinación en la testa que limitan el paso del agua (Deginani, 2001; Mediondo & García, 2009; Pérez-Cortéz et al., 2009). Además, se ha reportado que pueden presentar cubiertas con células lignificadas que no solo afectan la absorción de agua sino también el crecimiento embrionario (Cárdenas-Hernández et al., 2011; Gutiérrez, 1988).

Según su tolerancia a la desecación, la semilla de *Passiflora* se considera ortodoxa, ya que poseen tolerancia a la deshidratación y pueden ser almacenadas por períodos y condiciones controladas, sin embargo, existe variabilidad entre especies (Berjak & Pammenter, 2010; Gutiérrez et al., 2011).

6.3. Germinación

La germinación es un proceso que involucra cambios morfológicos y fisiológicos, es complejo y requiere de condiciones específicas de temperatura, niveles de oxígeno y luz para cada especie; además, puede verse afectada por factores como las hormonas presentes en las plantas y otras sustancias químicas (Carranza et al., 2016). El comportamiento germinativo en semillas de *Passiflora* para la mayoría de las especies no se conoce, sin embargo, en la literatura se reporta que, en general, presentan largos periodos de dormancia que hacen que la germinación, sin tratamientos previos, sea lenta y desuniforme, se reportan periodos entre los diez días a los tres meses, esto se convierte en un obstáculo importante para su comercialización (Marostega et al., 2017; Rezazadeh & Stafne, 2018).

En cuanto a las especies de este estudio, los porcentajes de germinación reportados para *P. ligularis* son variables, van desde el 20 % al 72,2 %. Se reportó que el inicio de la emergencia en semillas de granadilla ocurre entre 19 y 25 días después de la siembra (dds) y el aumento máximo se da entre 30 y 60 días (Cárdenas-Hernández, 2011). En los casos de *P. biflora* y *P. adenopoda* no se encontraron referencias relacionadas con los componentes involucrados con la germinación de estas especies.

6.4 Factores que afectan la germinación

La germinación se ve afectada tanto por factores internos como externos que influyen de diferentes maneras, entre los factores externos se pueden mencionar el contenido de humedad y el nivel de oxígeno del medio, así como la temperatura a la que son sometidas las semillas, ya que interviene en la actividad enzimática y metabólica de las mismas. También, la calidad e incidencia de luz, ya que la germinación de algunas semillas depende de la intensidad y longitud de onda percibidas (Copete, 2011). De acuerdo con lo anterior, la luz

es un factor primordial en la germinación de las semillas del género *Passiflora*, sin embargo, no existe una generalidad para todas las especies, mientras algunas se ven beneficiadas por la ausencia de luz, otras evidencian efectos contrarios. Por otra parte, en este género se dice que la eficiencia de la germinación depende en gran medida de la temperatura, incluso sin tomar en cuenta los efectos de otros factores (Zucarelli, 2015).

6.4.1. Efecto de la temperatura sobre la germinación de semillas de *Passiflora*

La temperatura es un factor importante para cualquier semilla o cultivo y su apropiada germinación, es decisiva y tiene una influencia directa sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones químicas que se pueden dar después del proceso de imbibición (Gutiérrez et al., 2011). También influye en la velocidad y uniformidad de la germinación, en la absorción de agua y en las reacciones químicas involucradas en el proceso. Se ha reportado que los procesos de germinación en algunas pasifloras ocurren a una temperatura alterna entre los 20 °C y los 30 °C. Algunos autores afirmaron que esto se da porque las temperaturas alternas asemejan lo que ocurre en la naturaleza, aunque no es una generalidad, ya que no tiene el mismo efecto en todas las especies, pero pueden aumentar los porcentajes de germinación en algunas de ellas, como en el caso de *P. ligularis* (Gutiérrez et al., 2011; Miranda et al., 2009; Roa Nieto, 2017).

La temperatura puede afectar procesos asociados con la luz, específicamente las respuestas del fitocromo a umbrales de Pfr necesarios para romper la dormancia, la tasa de reversión de Pfr en la oscuridad o ambos, ya que el fitocromo tiene un efecto dependiente de la temperatura sobre la germinación. Además, se ha demostrado que la temperatura afecta la concentración y sensibilidad del AG₃ (Cárdenas-Hernández, 2011; Riveros, 2012).

6.4.2. Efecto de la luz sobre la germinación de semillas de *Passiflora*

La luz influye en la germinación y emergencia de plántulas de diferentes maneras y depende en gran medida de los requerimientos de la especie que se estudia. Existen plantas que inhiben su germinación y emergencia en presencia de la luz, estas semillas son llamadas fotoblásticas negativas, mientras que las fotoblásticas positivas requieren de la presencia de

luz para germinar; sin embargo, puede darse también el caso de especies que son indiferentes a la ausencia o presencia de luz (Gutiérrez et al., 2011; Roa Nieto, 2017).

La influencia de la luz es definida por fotoperiodos, es decir la duración de la exposición a la luz, también por la intensidad y calidad de la misma. En las semillas fotosensibles, el fitocromo es el fotorreceptor principal asociado con la captación y transmisión del estímulo bajo la forma activa (Pfr). La respuesta que presentan las plantas del género *Passiflora* a diferentes estímulos de luz es variable, algunas de las especies potencian los porcentajes de germinación bajo luz normal diaria, mientras que otras se favorecen por la ausencia de la luz (Cárdenas-Hernández, 2011; Riveros, 2012).

La inhibición de la germinación debido a la luz es común en semillas de especies no domesticadas, aunque también se ha demostrado que existe en especies cultivadas. Esto ocurre en algunas especies de pasifloras, por ejemplo, los porcentajes y la velocidad de la germinación fueron mayores cuando las semillas de *P. incarnata* L., *P. cincinnata* Mast., *P. actinia* y *P. edulis* se mantuvieron en oscuridad (Grzybowski et al., 2019; Roa Nieto, 2017; Zucarelli, 2009; Zucarelli, 2015). Esto ocurre también en otras especies como *P. ligularis*, aunque la luz no impide del todo la germinación (Gutiérrez et al., 2011). La respuesta a la luz en las pasifloras suele ser muy variable incluso dentro de la misma especie (Cárdenas-Hernández, 2011).

6.5. Dormancia en semillas

La dormancia es un mecanismo de sobrevivencia que se presenta en las semillas de algunas plantas, para evitar la germinación en condiciones ambientales adversas o poco adecuadas y, por lo general, es una característica que se pierde con la domesticación. Existen dos tipos de dormancia, dormancia exógena y endógena, la primera está relacionada con la cubierta seminal y puede ser física, química o mecánica; la segunda se refiere a factores internos de la semilla y puede ser por embriones rudimentarios o por inhibición metabólica (Baskin & Baskin, 2004; Bautista, 2018).

La dormancia física conlleva a que la semilla permanezca con baja actividad hasta que algún factor permita que la cubierta se permeabilice al agua. Entre esos factores están la temperatura (ya sean altas o fluctuantes), el fuego, el secado, el efecto de la

congelación/descongelación y el paso a través del tracto digestivo de los animales. Una vez que esto ocurre, en la mayoría de las especies la semilla puede germinar tanto en la luz como en la oscuridad (Baskin & Baskin, 2000).

La dormancia fisiológica está relacionada con factores internos; para que las semillas con este tipo de dormancia puedan germinar se deben romper los bloqueos metabólicos y lograr que el embrión sea capaz de vencer la resistencia impuesta por la cubierta, esto puede ocurrir mediante estímulos ambientales, es decir, ciertas condiciones de luz, temperatura y periodos de almacenamiento disminuyen la exigencia de oxígeno y promueven la síntesis de hormonas necesarias para la germinación. En algunas semillas de *Passiflora*, la baja y heterogénea germinación no está asociada a la presencia de dormancia endógena, así lo han evidenciado algunos estudios donde a partir de embriones extraídos de la semilla, se obtiene una alta tasa de germinación (Bautista, 2018). La tendencia a la variación en sus características seminales también podría presentarse en la intensidad de la dormancia, incluso en la misma especie.

Se ha demostrado que varias especies de *Passiflora* presentan una dormancia exógena causada por la combinación de factores físicos o mecánicos y químicos (Delanoy et al., 2006; Gutiérrez et al., 2011). Además, algunas semillas de este género presentan dormancia química, ya que poseen una capa interna semipermeable cubierta por una testa dura, en donde el endospermo presente o residual puede contener sustancias inhibitoras del crecimiento, mientras que otras presentan latencia mecánica, debido a cubiertas endurecidas (Gutiérrez et al., 2011). Tomando en cuenta lo anterior, se hace indispensable el uso de tratamientos de distintos tipos dirigidos a conseguir una germinación más uniforme y en menor tiempo (Roa Nieto, 2017).

6.6. Tratamientos pregerminativos para romper dormancia

El comportamiento fisiológico de las semillas de *Passiflora* ha sido estudiado al evaluar el efecto de diferentes temperaturas, la escarificación y las concentraciones variables de ácido giberélico. Al implementar estos tratamientos se logró promover significativamente la germinación, rompiendo la dormancia de la semilla (Posada et al., 2014).

6.6.1. Tratamientos físicos

Algunos tratamientos físicos para superar la dormancia son la escarificación mecánica, la remoción del arilo y los tratamientos con agua caliente, fría o tibia (Rezazadeh & Stafne, 2018). La escarificación consiste en remover parcial o totalmente la cubierta de las semillas, puede hacerse con lija o se puede remover los puntos basales de la semilla. En algunos casos como en *P. mollissima*, *P. edulis* y *P. alata*, la combinación con tratamientos químicos (como la aplicación exógena de ácido giberélico), generaron mejores resultados (Cárdenas-Hernández, 2011). Especies como *P. micropelata* aumentaron las tasas de germinación al inducir las a escarificación mecánica (Marostega et al., 2017), mientras que en otras especies la escarificación con lija puede ser perjudicial, debido a que las semillas son sensibles a esta. Estudios realizados por Cárdenas-Hernández (2011), demostraron que las semillas de *P. ligularis* al ser lijadas no lograron germinar, por el contrario, el despunte basal aumentó los porcentajes de germinación. Esto también lo demostró Alila (2014) para *P. edulis*.

En maracuyá amarillo, Grzybowski et al. (2019) encontraron que los mejores resultados de germinación se presentaron con la inmersión en agua caliente durante 5 a 10 minutos en combinación con otros factores como la temperatura y la ausencia de luz. *Passiflora incarnata* mostró mejores resultados al ser únicamente remojada en agua. Por otra parte, la escarificación con bisturí o por inmersión en agua hirviendo aumentó la germinación de *P. edulis* y *P. maliformis* a temperatura entre los 20 y 35 °C en un fotoperiodo de 6/8 horas (Torres- González, 2018). En el caso de las especies *P. biflora* y *P. adenopoda*, no se encontró literatura relacionada a tratamientos físicos estudiados previamente.

6.6.2. Aplicación exógena de ácido giberélico (AG₃)

Los reguladores de crecimiento son sustancias que se usan comúnmente para romper la dormancia fisiológica de las semillas de algunas especies, entre ellos destaca la aplicación exógena del ácido giberélico. Su acción está dirigida a la expresión génica de enzimas hidrolíticas que debilitan el tegumento y degradan las sustancias de reserva, lo que facilita la germinación (Grzybowski et al., 2019). Además, está directamente relacionado con el ácido abscísico (ABA), hormona que regula los procesos de dormancia (Carranza et al., 2016).

En *P. quadrangularis* y *P. edulis* una dosis de 100 ppm de AG₃ tuvo un efecto significativo sobre el aumento en el porcentaje de germinación y la ruptura de la dormancia (Alila, 2014). Al aplicar una concentración de 100 ppm de AG₃ en maracuyá amarilla, Grzybowski et al. (2019) obtuvieron un aumento significativo en el porcentaje de germinación con respecto al testigo. Semillas de *P. edulis* sometidas a una concentración de 500 ppm de AG₃ mostraron un porcentaje de germinación mayor con respecto al control (Gurung et al., 2014). En *P. mollissima* el efecto de AG₃ en concentraciones de 600 ppm, reforzó el efecto de la escarificación, al aumentar no solo los porcentajes de germinación, sino también la velocidad de absorción de agua (Gutiérrez, 1988). Al utilizar concentraciones de 1000 ppm de AG₃, Marostega et al. (2017) demostraron que se rompe la dormancia en semillas de *P. suberosa*, *P. morifolia* y *P. tenuifila*, ya que encontraron porcentajes de germinación superiores a los del control. El efecto de la aplicación exógena de diferentes concentraciones de AG₃ en semillas de *P. ligularis*, fue estudiado por Cárdenas-Hernández (2011), quien concluyó, de manera general, que los porcentajes más altos de germinación se obtuvieron al utilizar concentraciones de 100 ppm. En el caso de las especies *P. biflora* y *P. adenopoda* no se encontró literatura relacionada a la aplicación exógena de AG₃.

7. METODOLOGÍA

7.1. Localización

Este proyecto se realizó durante los meses de febrero del 2021 a julio del 2022 en el Laboratorio Oficial de Análisis de Calidad de Semillas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica, ubicado en San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

7.2 Material experimental

Se utilizaron semillas de tres especies del género *Passiflora*: *P. biflora*, *P. adenopoda* y *P. ligularis*. Para la obtención de éstas, entre los meses de febrero y marzo del 2021, se cosecharon frutos maduros y frescos de *P. biflora* y *P. adenopoda*, en el mariposario Kekoldi ubicado en Tres Ríos de la Unión de Cartago, la selección de los frutos se realizó con base en la escala de maduración descrita por Vega-Corrales et al. (2022) en la cual se presentan tres estados de maduración, para esta investigación se utilizó el estado tres de maduración. Para *P. ligularis* se utilizaron frutos comerciales, los cuales fueron colectados en la finca Clementina ubicada en Santa Cruz de León Cortés, San José.

Una vez obtenidos los frutos, se extrajeron las semillas y se les removió el arilo por medio de fermentación, proceso que consistió en colocar las semillas durante cuatro días en agua destilada, según el procedimiento descrito por Vargas et al. (2018). Sin embargo, este se modificó ligeramente, se colocaron las semillas en un recipiente con agua destilada durante seis días, ya que preliminarmente se determinó que era difícil remover el arilo después de cuatro días. Posteriormente, las semillas se lavaron con agua en un tamiz y se dejaron secar en un papel toalla sobre una superficie metálica con perforaciones para permitir el flujo de aire y con borde de madera a temperatura ambiente por cinco días.

Una vez concluido el periodo de secado, las semillas fueron pasadas por un soplador, en el cual se separaron las semillas vanas o vacías (Baalbaki et al., 2012). Seguidamente, se observaron a través de una lupa separando por color. Se seleccionaron únicamente las

semillas con coloración café o café oscuro, esto con el fin de utilizar semillas con condiciones homogéneas y así no afectar los resultados.

Se determinó la humedad de las semillas mediante el método gravimétrico del horno. Para esto, se tomaron tres repeticiones de 1 g de semillas cada una y se sometieron a una temperatura de 105 °C durante 24 horas, se modificaron ligeramente los lineamientos establecidos por el Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Brasil (2009), el cual recomienda utilizar para semillas pequeñas 4,5 g para recipientes con un diámetro de 5-8 cm. Sin embargo, por el tamaño y la disponibilidad de semilla, se utilizó 1 g de muestra y contenedores de 4 cm.

Se comprobó que después de cinco días de secado a temperatura ambiente las semillas tenían un porcentaje de humedad adecuado para su almacenamiento (menor al 12%), por lo que se almacenaron en sobres recubiertos con una película plástica colocados en un cuarto frío a una temperatura de 7 °C y una humedad relativa de 60 ± 5 %. El contenido de humedad de las semillas de *P. ligularis* fue de $8,4 \pm 0,2$ %, el de *P. adenopoda* fue de $10,6 \pm 0,17$ % y el de *P. biflora* de $7,6 \pm 0,3$ %.

7.3 Determinación de viabilidad de la semilla

La viabilidad inicial de las semillas se evaluó mediante dos pruebas: La primera fue una prueba de germinación estándar y la segunda una prueba de tetrazolio (TZ).

7.3.1 Germinación

Para el análisis de la germinación, se utilizó el protocolo establecido por el Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Brasil (2009) para *P. edulis*, el cual consiste en colocar las semillas sobre papel de germinación (100 % pulpa sulfatada de madera sin blanquear, Anchor Paper Co., Minnesota, USA), en cajas de poliestireno de $11 \times 11 \times 3,5$ cm. Las cajas se mantuvieron en una cámara marca Hoffman modelo SG222 con una humedad relativa cercana al 100 %, una temperatura constante de 25 °C y en oscuridad.

Se realizaron dos pruebas con dos distintos métodos de evaluación, se colocaron cuatro repeticiones (cajas) con 25 semillas cada una para cada especie en estudio y para cada uno de los métodos de evaluación, se les colocaron tres papeles de germinación con 12 ml de agua destilada, las cuales a su vez se colocaron en cajas de 36,5 cm x 26,5 cm x 10 cm transparente, con un papel de germinación grueso con 40 ml de agua destilada, forradas con papel aluminio y envueltas en una bolsa negra para mantener tanto las condiciones de oscuridad como la humedad, posteriormente se llevaron a una cámara de germinación con una temperatura de 25 °C.

Se evaluó a los 7 y 14 dds únicamente germinación (plántulas normales) y a 28 dds el número de plántulas normales, de plántulas anormales, de semillas muertas y de semillas no germinadas para ambos métodos de prueba.

Para el primero (método continuo) se realizó la evaluación de las mismas repeticiones (cajas) a los 7, 14 y 28 días después de la siembra (dds) en un cuarto oscuro con una luz tenue proporcionada por un bombillo de luz led verde marca ECOMAX, terminada la evaluación se devolvieron a la cámara. En el caso del método intermitente se colocaron cuatro repeticiones con 25 semillas por día de evaluación (7, 14 y 28 dds), el material fue desechado una vez terminada la evaluación correspondiente al día. El objetivo de analizar estos dos métodos fue determinar si los estímulos de luz percibidos en el momento de la evaluación del método continuo de oscuridad afectaban la germinación de las semillas y así definir el método más adecuado para la evaluación de los siguientes experimentos.

7.3.2. Prueba de tetrazolio (TZ)

La prueba de tetrazolio (TZ) se realizó con base en el protocolo descrito por la Association of Official Seed Analysts y la Society of Commercial Seed Technologists, (2010). Se tomaron 250 semillas de cada especie, se embebieron por 24 horas a una temperatura de 25 °C. Transcurrido este tiempo, se cortaron longitudinalmente a la mitad sin separar completamente ambas mitades y se colocaron en una solución de TZ al 1% para la tinción de los tejidos. Una vez concluido este periodo se lavaron con agua destilada, con la ayuda de pinzas se extrajeron los embriones sobre un vidrio transparente y se colocaron en

cajas de petri sobre papel blanco húmedo, para observar y evaluar la viabilidad de las semillas en un estereoscopio. Se clasificaron como semillas viables a aquellas que presentaron un embrión entero teñido uniformemente de coloración rojo carmín o rosado, mientras que, las no viables fueron aquellas que presentaron cualquier parte esencial del embrión sin teñir.

7.3.2.1 Prueba de tetrazolio en semillas no germinadas

Se realizó una prueba de tetrazolio a las semillas no germinadas resultantes de la prueba de germinación inicial (6.3.1), mediante el protocolo descrito en la sección anterior, con la excepción que se omitió el periodo de imbibición previo al corte de la semilla. Esto con el fin de determinar la viabilidad de estas semillas.

7.3.2.2 Optimización del protocolo de la prueba de tetrazolio

Se tomaron 90 semillas de cada especie (*P. biflora*, *P. adenopoda* y *P. ligularis*) y se dividieron en grupos de 30 semillas que se embebieron colocándolas en un recipiente de vidrio con agua destilada durante 24 horas. Al terminar ese proceso se realizaron tres cortes diferentes a cada grupo:

1. Corte por la mitad sin desprender por completo ambas mitades (protocolo estándar AOSA, 2010). (Figura 1A)
2. Remoción del segmento distal (Figura 1B)
3. Corte longitudinal en uno de los lados de la semilla siguiendo su forma natural (Figura 1C).



Figura 1. Corte por la mitad (A), remoción del segmento distal (B) y corte longitudinal (c) realizados a la semilla de las especies en estudio como prueba para optimización del protocolo de determinación de viabilidad.

Cada grupo de semillas se colocó en una solución de tetrazolio al 1 % a 35 °C por 18 horas, modificando el protocolo utilizado anteriormente en cuanto a tiempo y temperatura debido a que la tinción de las semillas resultantes del protocolo (24h) es muy intensa, lo cual puede afectar la evaluación de la misma. Una vez terminado el proceso, se extrajeron los embriones en un vidrio transparente y se colocaron en platos de Petri sobre papel blanco húmedo para observación en el estereoscopio, siguiendo las pautas anteriormente descritas para determinar la viabilidad de cada lote de semillas. Este proceso se llevó a cabo con el fin de determinar el método más eficiente de extracción del embrión y la obtención de una adecuada tinción.

7.4. Experimentos para promover la germinación

Una vez comprobada la viabilidad de las semillas, se procedió a realizar los experimentos descritos a continuación.

7.4.1. Experimento 1.1: tratamientos físicos prueba I

Para analizar la eficiencia de tratamientos físicos en la ruptura de la dormancia y la promoción de la germinación de las semillas de *P. biflora*, *P. adenopoda* y *P. ligularis*, se evaluaron cuatro tratamientos y un testigo (cuadro 1). Las semillas se desinfectaron con una

solución de hipoclorito de sodio al 0,05 %, en agitación por 20 minutos, una vez desinfectadas se lavaron con agua destilada de 3 a 5 veces aproximadamente.

Las semillas correspondientes al testigo se colocaron directamente sobre el papel de germinación sin tratamiento previo. Para el tratamiento 2 (E1T2), las semillas se colocaron en agua a temperatura ambiente (25°C) durante 24 horas, transcurrido este tiempo se colocaron sobre el papel de germinación. Para el tratamiento 3 (E1T3), las semillas se colocaron en agua destilada a temperatura ambiente durante 24 horas, luego se les removió el segmento distal de la cubierta seminal (el extremo opuesto a la localización del embrión) y se colocaron sobre el papel de germinación. En el tratamiento 4 (E1T4) las semillas fueron inmersas en agua caliente a 50 °C durante cinco minutos y para el tratamiento 5 (E1T5) las semillas fueron inmersas en agua a 50 °C durante 10 minutos controlando la temperatura mediante un termómetro y sobre un calentador. En ambos tratamientos, una vez finalizado este periodo, las semillas se colocaron sobre papel de germinación (Cuadro 1). Las condiciones de germinación de todos los tratamientos se mantuvieron igual a las descritas para la prueba de germinación inicial (humedad relativa cercana al 100 % y 25 °C continuo en oscuridad).

Cuadro 1. Tratamientos físicos para analizar la ruptura de la dormancia y la promoción de la germinación de las especies *P. adenopoda*, *P. biflora* y *P. ligularis*.

Tratamiento	Descripción
E1. T1	Testigo.
E1. T2	Imbibición en agua 24 horas.
E1. T3	Imbibición en agua 24 horas + eliminación de segmento distal.
E1. T4	Inmersión en agua (50 ° C) 5 minutos.
E1. T5	Inmersión en agua (50 ° C) 10 minutos.

7.4.2. Experimento 2.1: efecto de las condiciones de germinación externas (luz, temperatura y sustrato) prueba I

Antes de continuar evaluando el efecto de tratamientos pregerminativos, se realizó una prueba para evaluar el efecto de la luz, la temperatura y el sustrato sobre la germinación (cuadro 2), esto debido a que los porcentajes de germinación resultantes del experimento 1.1 fueron muy bajos, lo que podría estar influenciado porque las condiciones ambientales utilizadas no eran las adecuadas para inducir la germinación de las especies en estudio.

Se utilizaron tres cajas de poliestireno con papel de germinación grueso y tres con turba, con 10 semillas para cada uno de los tratamientos, para las tres especies en estudio (tres repeticiones de diez semillas por tratamiento por especie).

Posteriormente se colocaron en una caja de 36,5 cm x 26,5 cm x 10 cm forrada con papel aluminio (para evaluar el efecto de la oscuridad) y una transparente de las mismas dimensiones (para evaluar el efecto del fotoperiodo 12/12), como se describió en la sección 6.3.1, en cámaras a temperaturas continuas de 25 °C (E2. T1, E2. T2, E2. T7 y E2. T8), 30 °C (E2. T3, E2. T4, E2. T9 y E2. T10) y 20 °C (E2. T5, E2. T6, E2. T11 y E2. T12).

Todas las cajas se colocaron en una cámara con fotoperiodo 12/12, las correspondientes a los tratamientos en oscuridad se forraron con papel aluminio y se colocaron en bolsas negras para evitar que fueran afectadas por los estímulos de luz y mantuvieran las condiciones de humedad necesarias. Las semillas expuestas a la luz se colocaron en bolsas transparentes.

Cuadro 2. Tratamientos para evaluar el efecto de la luz, la temperatura y el sustrato sobre la ruptura de la dormancia y la promoción de la germinación de las especies *P. adenopoda*, *P. biflora* y *P. ligularis*.

Tratamiento	Descripción
E2. T1	Temperatura continua 25°C con fotoperiodo 12/12 en papel de germinación.
E2. T2	Temperatura continua 25°C con fotoperiodo 12/12 en turba.
E2. T3	Temperatura continua 30°C con fotoperiodo 12/12 en papel de germinación.

E2. T4	Temperatura continua 30°C con fotoperiodo 12/12 en turba.
E2. T5	Temperatura continua 20°C con fotoperiodo 12/12 en papel de germinación.
E2. T6	Temperatura continua 20°C con fotoperiodo 12/12 en turba.
E2. T7	Temperatura continua 25°C en oscuridad en papel de germinación.
E2. T8	Temperatura continua 25°C en oscuridad en turba.
E2. T9	Temperatura continua 30°C en oscuridad en papel de germinación.
E2. T10	Temperatura continua 30°C en oscuridad en turba.
E2. T11	Temperatura continua 20°C en oscuridad en papel de germinación.
E2. T12	Temperatura continua 20°C en oscuridad en turba.

7.4.3. Prueba de desinfección

En los experimentos anteriores se evidenció una contaminación persistente en las semillas, principalmente por hongos. Un crecimiento excesivo de estos microorganismos pudo haber afectado negativamente la germinación, por lo que se realizó una prueba de desinfección. Para este experimento con base en el análisis de los datos del experimento 2.1, se consideró únicamente las mejores condiciones resultantes para cada una de las especies en estudio.

Para *P. biflora* los resultados obtenidos en el experimento 2.1 fueron significativamente contrastantes, por lo que únicamente se corroboró el comportamiento bajo la mejor condición. Para esto, se utilizó turba como sustrato en un fotoperiodo de 12/12 y una temperatura de 25 °C. Para *P. adenopoda* se contrastó el efecto de utilizar turba o papel como sustrato, todas las cajas se colocaron en un fotoperiodo de 12/12 y una temperatura de 25 °C. Finalmente, para *P. ligularis* se determinó el efecto del sustrato (turba o papel) y del fotoperiodo (oscuridad y 12/12) a una temperatura de 25 °C. En cada una de estas condiciones se analizó el efecto de tres métodos de desinfección de la semilla: vitavax (75 g/100kg de

semilla), hipoclorito de sodio al 1% e hipoclorito de sodio al 1,5%. A los tratamientos con hipoclorito de sodio se les agregó dos gotas de tween/100 ml y se colocaron en agitación durante diez minutos. Además, se evaluó un control el cual no fue desinfectado (colocado directamente en el sustrato).

La evaluación se realizó a los 7, 14 y 28 días y se determinó el porcentaje de contaminación a partir del número de semillas contaminadas en cada evaluación.

7.4.4. Experimento 2.2: efecto de las condiciones de germinación externas (luz, temperatura y sustrato) prueba II

Este experimento se realizó para corroborar el comportamiento observado en el experimento 2.1 y para determinar si el tratamiento de desinfección seleccionado no afectaba el potencial de germinación de las semillas. Nuevamente se utilizaron las condiciones del experimento 2.1 donde se evidenció mayor respuesta, para poder disminuir el número de tratamientos inicial y aumentar el número de repeticiones por tratamiento (con el fin de aumentar la confiabilidad estadística del análisis).

Para *P. biflora* los resultados obtenidos en el experimento 2.1 fueron significativamente contrastantes, por lo que únicamente se corroboró el comportamiento bajo la mejor condición. Para esto, se utilizó turba como sustrato en un fotoperiodo de 12/12 y una temperatura de 25 °C. Para *P. adenopoda* se contrastó el efecto de utilizar turba o papel como sustrato, todas las cajas se colocaron en un fotoperiodo de 12/12 y una temperatura de 25 °C. Finalmente, para *P. ligularis* se determinó el efecto del sustrato (turba o papel) y del fotoperiodo (oscuridad y 12/12) a una temperatura de 25 °C.

7.4.5. Experimento 1.2: tratamientos Físicos prueba II

Tomando en cuenta los resultados de los experimentos de condiciones externas y el método de desinfección más eficaz, se realizaron nuevamente los tratamientos correspondientes al experimento 1 (Cuadro 1). Se colocaron cuatro cajas de poliestireno con

25 semillas por especie para cada tratamiento en turba como sustrato y con un fotoperiodo 12/12 y se colocaron en cajas de 36,5 cm x 26,5 cm x 10 cm transparentes con papel de germinación grueso en el fondo al que se le vertieron 40 ml de agua destilada, se colocaron en una cámara de germinación a 25°C en bolsas transparentes para mantener las condiciones de humedad.

7.4.5.1. Prueba de tetrazolio en semillas no germinadas de *P. ligularis*

Debido a la baja germinación presentada en la especie *P. ligularis* en el experimento anterior, se realizó una prueba de tetrazolio a las semillas no germinadas. El análisis se llevó a cabo con dos muestras de 100 semillas divididas en cuatro repeticiones de 25 semillas cada una, es decir, 200 semillas en total. Se realizó un corte por la mitad de la semilla dejándola pegada de un extremo (según el protocolo antes descrito) y se colocaron en una solución de tetrazolio al 1% durante la noche (16 horas) a una temperatura de 35°C. Terminado este periodo, con la ayuda de una pinza, se extrajeron los embriones sobre un vidrio transparente y se colocaron en cajas petri con papel azul húmedo para la observación en el estereoscopio.

7.4.6. Curva de absorción de agua

Esta prueba se realizó con el fin de determinar la dinámica de absorción de agua de las semillas de *P. ligularis*, *P. adenopoda* y *P. biflora*. Para esto, se tomaron 30 semillas de *P. ligularis*, 210 de *P. adenopoda* y 230 de *P. biflora* para alcanzar aproximadamente 10g de cada una. La prueba se realizó con tres repeticiones por tratamiento, se colocó la misma cantidad de semillas en un recipiente de vidrio con agua destilada para evaluar a las 3, 6, 12, 24, 48, 96 y 192 horas; cambiando el agua cada 24 horas en los tratamientos que lo requerían. Una vez concluido el periodo de imbibición, se determinó la humedad mediante el método gravimétrico del horno (descrito en la sección 6.2) colocando las semillas 24 horas a 105°C.

7.4.7. Experimento 3: Efecto de la aplicación exógena de ácido giberélico (AG₃)

En este experimento se evaluó el efecto de la aplicación exógena de AG₃, para lo cual se evaluaron seis tratamientos y un testigo (cuadro 3), cada uno con cuatro repeticiones compuestas por 25 semillas. Previo al establecimiento de los tratamientos, se realizó una desinfección con una solución de 1 % de hipoclorito de sodio en agitación por 10 minutos.

Las semillas correspondientes al testigo (E3. T1) se colocaron directamente sobre la turba. Se evaluó una concentración de 0 ppm de AG₃ (E3.T2), para lo cual las semillas se colocaron en agua por 24 horas, posteriormente, se colocaron sobre el sustrato. Para los tratamientos E3.T3, E3.T4, E3.T5, E3.T6 y E3.T7, las semillas se colocaron durante 24 horas en una solución de ácido giberélico (AG₃) a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 ppm, respectivamente. Una vez transcurrido este tiempo, las semillas se colocaron sobre turba, a una temperatura de 25°C en un fotoperiodo de 12/12.

Cuadro 3. Tratamientos para evaluar el efecto de la aplicación exógena de AG₃ sobre la ruptura de la dormancia y la promoción de la germinación de las especies *P. adenopoda*, *P. biflora* y *P. ligularis*.

Tratamiento	Descripción
E3. T1	Testigo.
E3. T2	Inmersión en solución con 0 mg/l de AG ₃ por 24 h.
E3. T3	Inmersión en solución con 100 mg/l de AG ₃ por 24 h.
E3. T4	Inmersión en solución con 200 mg/l de AG ₃ por 24 h.
E3. T5	Inmersión en solución con 300 mg/l de AG ₃ por 24 h.
E3. T6	Inmersión en solución con 400 mg/l de AG ₃ por 24 h.
E3. T7	Inmersión en solución con 500 mg/l de AG ₃ por 24 h.

7.5. Diseño estadístico y variables evaluadas

En general (excepto el experimento 2.1), cada uno de los tratamientos contó con cuatro unidades experimentales por especie, compuestas por una caja con 25 semillas. Para

cada una de las especies y de forma independiente, se utilizó un diseño experimental irrestricto al azar. Además, conforme lo establece MAPA (2009), para semillas de *Passiflora edulis*, a los siete días después de la siembra (dds), se realizó el primer conteo de germinación (en el cual se evaluó únicamente plantas normales).

A los 14 dds se evaluó nuevamente el número de plántulas normales. Posteriormente, a los 28 dds, se realizó el conteo final, donde se determinó el porcentaje de germinación (plántulas normales), de plántulas anormales, de semillas muertas y de semillas no germinadas. Los criterios de evaluación para la clasificación de plántulas normales, anormales, semilla no germinada y semilla muerta se tomaron conforme a los lineamientos establecidos por la International Seeds Testing Association (2022).

7.6. Análisis estadístico de los datos

En los experimentos cuyo diseño incluía únicamente un factor (germinación inicial, tetrazolio, experimentos 1.1 y 1.2), se analizó la normalidad y homocedasticidad de los datos y, en caso de cumplir ambos supuestos, se efectuó un análisis de varianza (ANDEVA) a un nivel de significancia del 95 %. Cuando se detectaron diferencias significativas, estas se separaron por medio de la prueba de Tukey al 95 % de confianza. En el caso de los datos que no cumplieron los supuestos anteriores, se analizaron mediante un ANDEVA no paramétrico Kruskal-Wallis y a las variables que mostraron diferencias significativas se les aplicó una prueba de comparaciones múltiples no paramétrica de Bonferroni con un 95% de confianza. Todos los análisis anteriores se realizaron mediante el paquete “agricolae” (Felipe de Mendiburu, 2021) en la interfaz RStudio (RStudio Team, 2021) del programa R (R Core Team, 2021).

En los experimentos cuyo diseño incluía dos o más factores, se realizaron análisis factoriales. En el experimento 2.1, para los datos que cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se realizó un análisis trifactorial, donde se tomaron en consideración la temperatura, el sustrato y el fotoperiodo. Con los datos que no cumplieron lo anterior, se realizó un análisis exploratorio mediante un boxplot para estudiar su comportamiento en relación con cada uno de los factores. Para llevar a cabo estos análisis se utilizaron los paquetes “tidyverse” (Wickham et al., 2019) “ggpubr” (Alboukadel, 2020) y “rstatix” (Alboukadel, 2021) en la interfaz RStudio (RStudio Team, 2021) del programa R

(R Core Team, 2021). Lo mismo se realizó para los experimentos de desinfección y 2.2, donde, dependiendo del número de factores, se realizó un análisis bi- o trifactorial, o, en su defecto, un análisis exploratorio del comportamiento de los datos según los factores analizados.

Los datos correspondientes a la aplicación exógena de ácido giberélico (experimento 3) se analizaron mediante una regresión polinomial de segundo grado. Este análisis de regresión se realizó mediante el programa Sigma Plot (Systat Software, versión 10.0). En *P. biflora*, los datos no se ajustaron satisfactoriamente al modelo anteriormente mencionado y otros que fueron probados, por lo que se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) a un nivel de significancia del 95 %. Además, las diferencias entre tratamientos se separaron por medio de la prueba de Tukey al 95 % de confianza.

8. RESULTADOS

8.1 Determinación de la viabilidad inicial de las semillas

8.1.1 Prueba de Germinación

En el caso de las especies *P. adenopoda* y *P. ligularis*, los porcentajes de germinación obtenidos fueron del 0% para ambos métodos de evaluación, esto evidenció que, bajo las condiciones utilizadas, no hubo efecto de las metodologías de evaluación en estas especies. En el caso de la especie *P. biflora*, no se presentaron diferencias significativas entre ambos métodos de evaluación. Sin embargo, en ambas metodologías el porcentaje de germinación fue menor al 9% (figura 2).

Estos resultados sugieren que los estímulos de luz percibidos al usar una luz led verde no generaron cambios en el porcentaje de germinación de las especies estudiadas. Los porcentajes bajos de germinación podrían deberse a la presencia de dormancia o a la falta de condiciones adecuadas para promover la germinación en estas especies. Al no existir diferencias entre los métodos de evaluación, la metodología de “evaluación continua” se utilizó como método de evaluación para los experimentos siguientes.

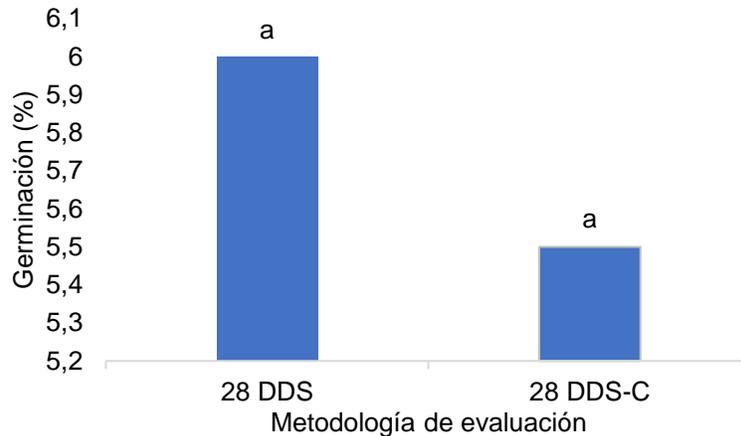


Figura 2. Germinación de semillas de *P. biflora* obtenido a partir de dos metodologías de evaluación “continua” (28DDS-C) e “intermitente” (28DDS) a los 28 días después de la siembra. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes de acuerdo con un ANDEVA no paramétrico Kruskal-Wallis y una prueba post hoc de Bonferroni con un 95% de confianza.

8.1.2. Prueba de tetrazolio

Se determinó la viabilidad de las semillas no germinadas resultantes de la prueba inicial de germinación, la misma se realizó con el protocolo recomendado por AOSA, (2010). Al llevar a cabo este protocolo se observó que el corte resultó difícil debido al tamaño reducido de la semilla, especialmente para la especie *P. biflora*. En esta especie, sumado al tamaño reducido, su forma no permitió reconocer fácilmente el segmento distal de la semilla, lo cual incidió en el hecho de que algunos de los cortes se realizaron en el lado opuesto, dañando el embrión. Al intentar la extracción del embrión, se debía sacar ambas mitades por separado y unir las en el plato petri, en este proceso algunos de los embriones fueron dañados (Figura 3B), por lo que no fue posible determinar un porcentaje de viabilidad. Sin embargo, se realizó un análisis visual descriptivo de la tinción obtenida. Se observó que la mayoría de las partes de los embriones extraídos estaban teñidos completa o parcialmente, lo que sugiere una alta viabilidad de la semilla para las tres especies en estudio.



Figura 3. Embriones de *P. adenopoda* (A) y *P. ligularis* (B) teñidos por la solución de tetrazolio resultantes de la prueba inicial de tetrazolio siguiendo los protocolos de AOSA (2010) para *Passiflora edulis*.

A pesar de que la tinción resultante fue limpia y uniforme (figura 3), el proceso descrito anteriormente requiere gran cantidad de tiempo y se debe encontrar una técnica adecuada para la extracción sin dañar el embrión. Por lo que se realizó una prueba para evaluar distintos cortes en la semilla, con el fin de facilitar la extracción del embrión.

8.1.3. Optimización del protocolo de la prueba de tetrazolio

Al realizar los ensayos para la optimización de la prueba, también se perdieron una alta cantidad de embriones en el proceso de extracción, por lo que no se logró obtener un porcentaje de viabilidad por tipo de corte para determinar y comparar su eficacia. Sin embargo, el corte sugerido por la AOSA (2010) fue el corte que permitió la extracción más eficiente de los embriones, permitiendo además una tinción uniforme. El corte lateral o longitudinal (figura 4) da como resultado una tinción desuniforme en algunos casos.

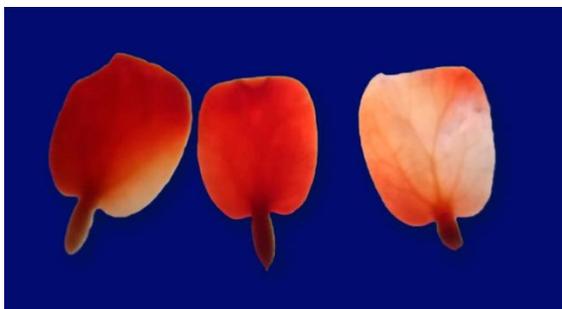


Figura 4. Embriones de *P. ligularis* obtenidos a partir de la prueba de tetrazolio utilizando corte lateral de la semilla más remoción del segmento distal.

En el caso de la remoción del segmento distal, la extracción de los embriones requiere de gran cantidad de tiempo y desprender la cubierta externa de la semilla en su totalidad lo cual dañó en gran medida los embriones (figura 5), esto disminuyó la eficiencia del método, sumado a que la tinción fue desuniforme y no se determinó de manera adecuada la viabilidad de la semilla.



Figura 5. Embriones de *P. adenopoda* (A) y *P. ligularis* (B) teñidos por solución de tetrazolio resultantes de la prueba con remoción del segmento distal de la cubierta seminal.

8.2. Experimentos para promover la germinación

8.2.1. Experimento 1.1: tratamientos físicos prueba I

Los datos obtenidos (figura 6) mostraron que los porcentajes de germinación en las tres especies en estudio fueron inferiores al 30%, los más altos correspondieron a *P. biflora* (figura 6A). Además, se demostró, a través del análisis estadístico, que no hubo diferencias significativas entre tratamientos para ninguna de las variables analizadas en las especies *P. adenopoda* y *P. ligularis*. Mientras que para la especie *P. biflora* (figura 6A) se observó que en las semillas muertas se presentaron diferencias significativas, en los tratamientos 1 y 3

hay un porcentaje más alto de las mismas en comparación con los tratamientos 4 y 5. Por otra parte, el tratamiento 2 no presentó diferencias con ninguno de los anteriores, esto se puede deber a que el corte en el tratamiento tres pudo haber dañado la semilla, o bien a la contaminación presente.

Además de un bajo porcentaje de germinación, se encontró que la variable que presentó el porcentaje más alto, en las tres especies y en todos los tratamientos, correspondió a las semillas no germinadas (figura 6). Debido a esto, se realizó una prueba de viabilidad a las semillas no germinadas para determinar si la baja germinación se debía a la viabilidad del lote de semillas en sí o a la presencia de algún otro factor que pudiera estar limitando la capacidad de germinación de las semillas tal como dormancia o factores externos a la misma.

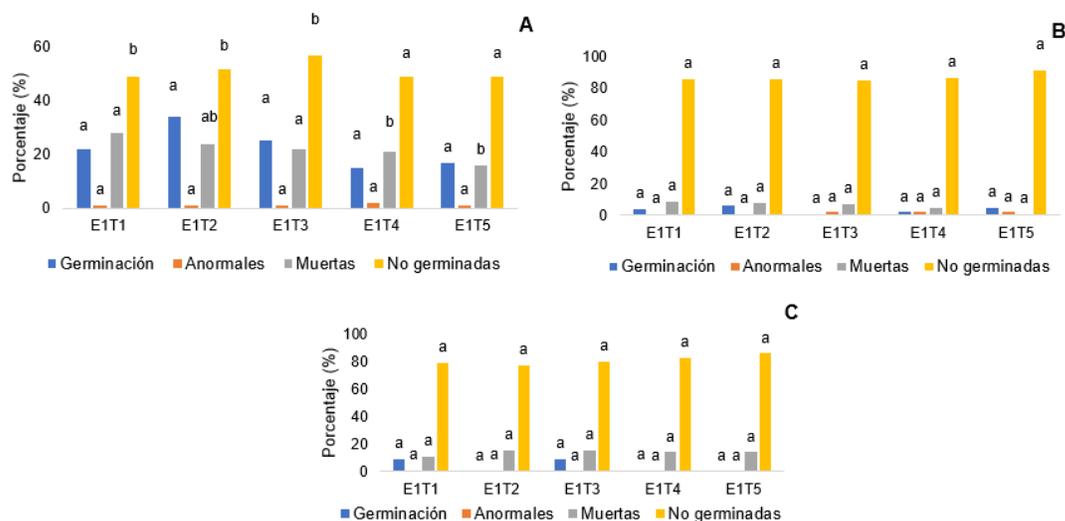


Figura 6. Germinación, plántulas anormales, semillas muertas y no germinadas obtenidas al evaluar el efecto de tratamientos físicos en semillas de *P. biflora* (A) *P. adenopoda* (B) y *P. ligularis* (C) a los 28 dds. Donde E1.T1: testigo (semillas puestas sobre el papel de germinación directamente), E1.T2: imbibición en agua 24 h, E1.T3: imbibición en agua 24 h más la eliminación del segmento distal, E1.T4: inmersión en agua a 50°C 5 min y E1.T5: inmersión en agua a 50°C 10 min. Los valores señalados con letras desiguales entre tratamientos, por variable, son significativamente diferentes de acuerdo con un ANDEVA no paramétrico Kruskal-Wallis y una prueba post hoc de Bonferroni con un 95% de confianza.

8.2.1.1. Prueba de tetrazolio para semillas no germinadas

Los valores obtenidos para la viabilidad de la semilla, por medio de la prueba de TZ, son considerados adecuados en todos los tratamientos, ya que en su mayoría presentaron el 80% en las tres especies estudiadas (cuadro 4), lo que sugiere que los bajos porcentajes de germinación se pueden deber a la presencia de una condición de dormancia o bien a que las condiciones externas (ambientales) en las que se realizó el experimento, no son las adecuadas para estas especies. La especie que presentó menores porcentajes de viabilidad fue *P. ligularis*, se observó la presencia de contaminación por hongos que pudieron haber deteriorado la semilla.

Cuadro 4. Viabilidad por tetrazolio en semillas no germinadas obtenidas al evaluar el efecto de tratamientos físicos en semillas de *P. biflora*, *P. adenopoda* y *P. ligularis* a los 28 dds. Donde E1.T1: el testigo (semillas puestas sobre el papel de germinación directamente), E1.T2: imbibición en agua 24 h, E1.T3: imbibición en agua 24 h más la eliminación del segmento distal, E1.T4: inmersión en agua a 50°C 5 min y E1.T5: inmersión en agua a 50°C 10 min. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes de acuerdo con un ANDEVA no paramétrico Kruskal-Wallis y una prueba post hoc de Bonferroni con un 95% de confianza.

TRATAMIENTO	<i>P. biflora</i>		<i>P. adenopoda</i>		<i>P. ligularis</i>	
	No Germinadas (%)	Viables* (%)	No Germinadas (%)	Viables* (%)	No Germinadas (%)	Viables*
E1T1	49 ± 7,18 b	100	86 ± 6 a	100	79 ± 3,41 a	72*
E1T2	52 ± 4,43 b	95	86 ± 3,41 a	95	77 ± 2,58 a	82
E1T3	57 ± 9 b	100	85 ± 3,41 a	81	80 ± 4,16 a	77
E1T4	49 ± 5,16 a	89	87 ± 1 a	91	83 ± 1 a	70
E1T5	49 ± 3,41 a	90	91 ± 8,71 a	89	86 ± 1,63 a	80

*Viabilidad determinada en 22 semillas por tratamiento.

8.2.2. Experimento 2.1: efecto de las condiciones de germinación externas (luz, temperatura y sustrato) prueba I

Se realizó un análisis trifactorial para evaluar el efecto del fotoperiodo, la temperatura y el sustrato sobre la germinación, esto para las tres especies en estudio. En el caso de *P. biflora* los datos se ajustaron a los supuestos del análisis de varianza y se observó que el único factor que presentó un efecto significativo sobre la germinación fue el fotoperiodo, se obtuvo un porcentaje de germinación significativamente mayor al utilizar un fotoperiodo 12/12 (70%) (figura 7). Según los resultados del análisis estadístico, los factores sustrato y temperatura no mostraron un efecto significativo en la germinación de *P. biflora*.

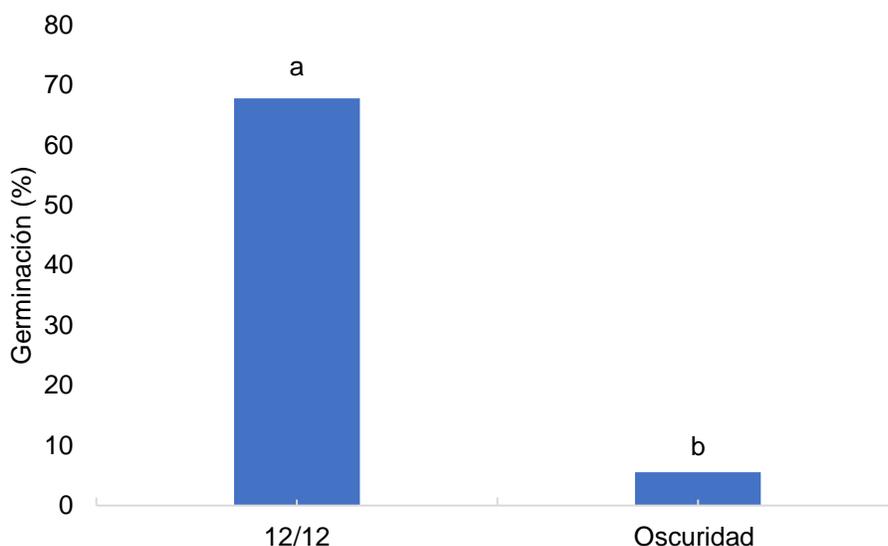


Figura 7. Efecto del fotoperiodo sobre la germinación de semillas de *P. biflora* a los 28 dds. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes según un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de Tukey con 95% de confianza.

En el caso de la especie *P. adenopoda*, los datos no cumplieron los supuestos del análisis de varianza para el análisis trifactorial (aun cuando fueron transformados), por lo que se realizó un análisis exploratorio de los datos (figura 8), esto con el fin de conocer su comportamiento según los factores analizados y determinar la presencia de tratamientos contrastantes. En este caso, algunos de los datos son asimétricos, es decir, que se alejan en gran medida del valor de la mediana (línea gruesa central) y poseen alta variabilidad entre

tratamientos. Sin embargo, se observó que los mayores porcentajes de germinación se presentaron a una temperatura de 25°C, además el comportamiento observado parece indicar que también puede haber un efecto del sustrato sobre el porcentaje de germinación, ya que este fue más alto y más uniforme, en turba que en papel.

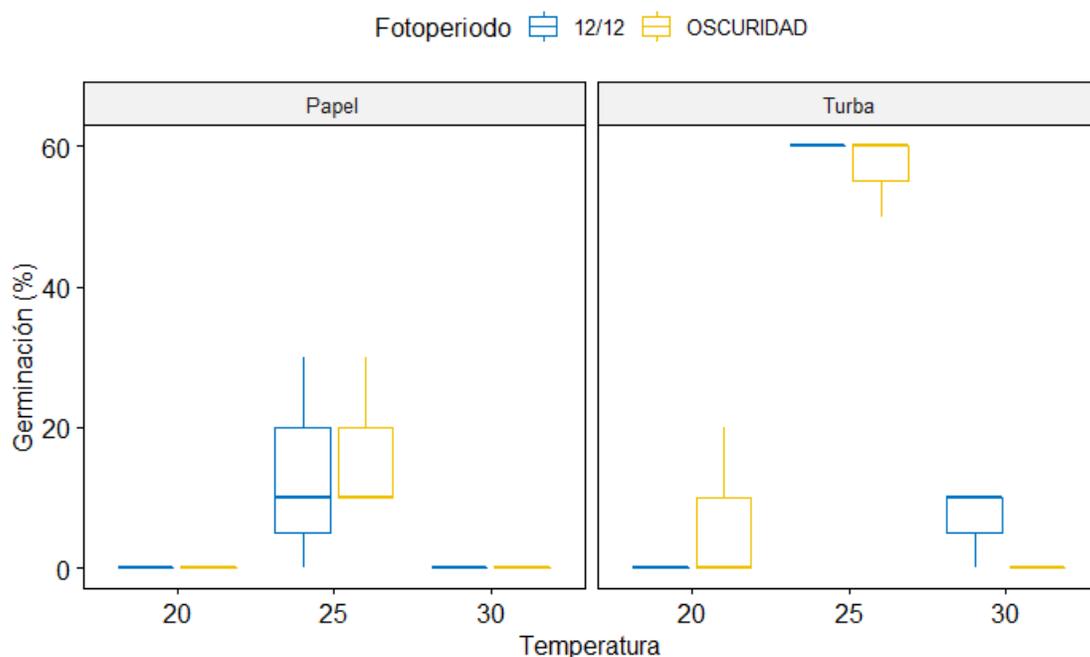


Figura 8. Efecto de la temperatura (20, 25 y 30°C), luz (fotoperiodo 12/12 y oscuridad) y sustrato (turba y papel) sobre la germinación de semillas de *P. adenopoda* a los 28 dds.

El comportamiento de los datos para *P. ligularis* fue similar al caso anterior, no se cumplieron los supuestos del análisis de varianza, aun cuando los datos fueron transformados, por lo tanto, se realizó un análisis exploratorio (descriptivo) en donde se pudo observar que la temperatura a la que se presentaron los mayores porcentajes de germinación fue a 25°C (figura 9). Además, parece existir un efecto tanto del fotoperiodo como del sustrato utilizado, sin embargo, el comportamiento de los datos para ambos factores es altamente variable, por lo que no es posible definir con claridad si estos tienen un efecto significativo o no.

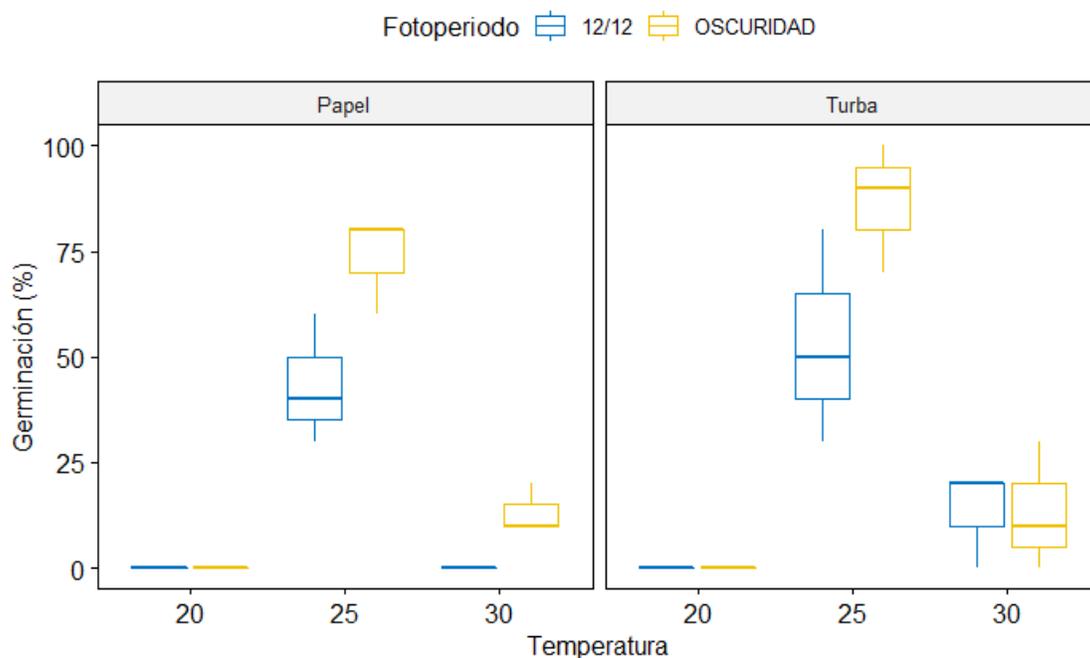


Figura 9. Efecto de la temperatura (20, 25 y 30°C), luz (fotoperiodo 12/12 y oscuridad) y sustrato (turba y papel) sobre la germinación de semillas de *P. ligularis* a los 28 dds.

Se observó que la presencia de contaminación por hongos y bacterias en este experimento fue alta, sin embargo, no se determinó el porcentaje de esta, aunque se consideró necesario evaluar métodos de desinfección con el fin de reducir este factor, ya que este podría haber afectado los porcentajes de germinación obtenidos.

8.2.3. Prueba de desinfección

Debido a la contaminación presentada en ensayos anteriores, y al efecto que esta puede tener sobre la viabilidad de las semillas, se decidió evaluar el efecto de tres tratamientos de desinfección. Los datos obtenidos, para las especies *P. adenopoda* y *P. ligularis*, no cumplieron con los supuestos de análisis de varianza, por lo que no se pudieron analizar mediante un análisis factorial. Debido a esto, se realizó un análisis exploratorio (descriptivo) de los datos, con el fin de conocer la respuesta del porcentaje de contaminación de cada tratamiento en relación con los factores estudiados.

El comportamiento de los datos obtenidos para *P. adenopoda* fue similar para turba y papel, se observó que en ambos casos los porcentajes más altos de contaminación

correspondieron al testigo (figura 10). El tratamiento con vitavax presentó datos atípicos (representados con puntos), lo que refleja un comportamiento desuniforme. Este efecto podría deberse a una aplicación no homogénea del producto, ya que su formulación es en polvo, lo que dificulta asegurar una cobertura homogénea en todas las semillas. Por otra parte, el tratamiento con cloro al 1% mostró poca variabilidad y porcentajes de contaminación menores al 15 %, en ambos sustratos. Además, presentó un porcentaje de control similar al obtenido con 1,5% de cloro, pero con una menor concentración, por lo que se consideró como el tratamiento más adecuado para el control de la contaminación en semillas de *P. adenopoda*.

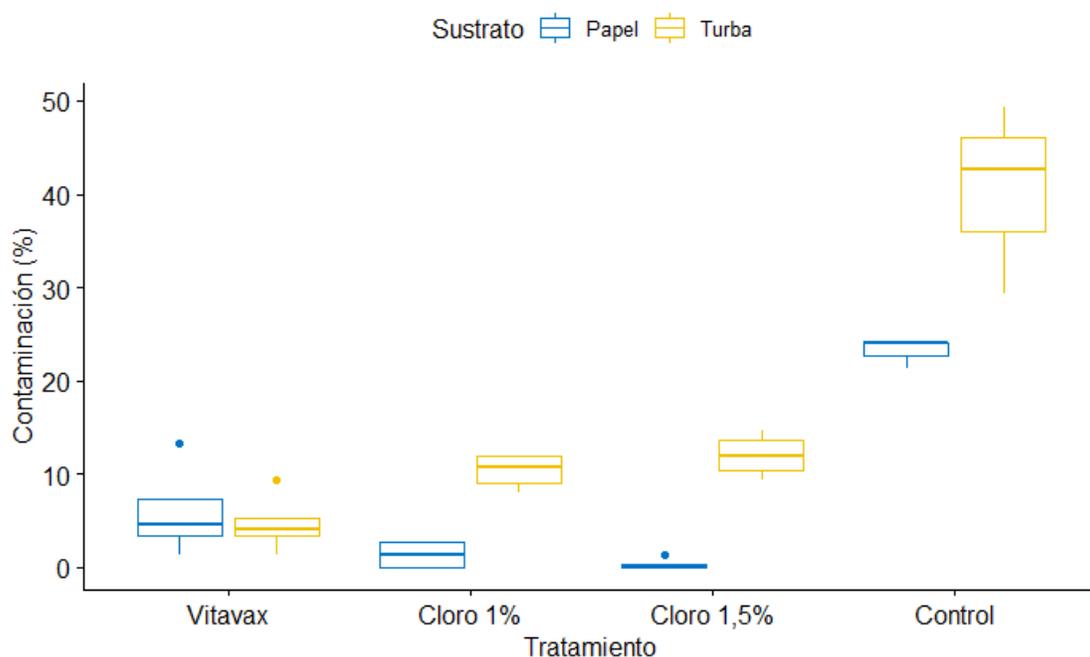


Figura 10. Desinfección de semillas de *P. adenopoda* a partir de tres tratamientos (Vitavax, cloro 1%, cloro 1,5%) en dos sustratos, a los 28 dds.

En el caso de *P. ligularis* se observó un comportamiento similar al anterior, los porcentajes más altos de contaminación se presentaron en el control, aunque fueron mayores en papel que en turba (figura 11). En general, se observó poca variabilidad en los tratamientos evaluados, siendo menor en los tratamientos sobre papel. Este comportamiento puede estar influenciado por la capacidad de absorción de la turba, la cual puede ser diferencial según el acomodo de la semilla. Además, en los tres tratamientos evaluados la contaminación se

mantuvo por debajo del 15 %, lo cual evidencia su efectividad. Por lo que por aspectos prácticos (facilidad de aplicación y menor uso de reactivo), también se consideró para *P. ligularis* el utilizar 1 % de cloro como el mejor tratamiento para controlar la contaminación.

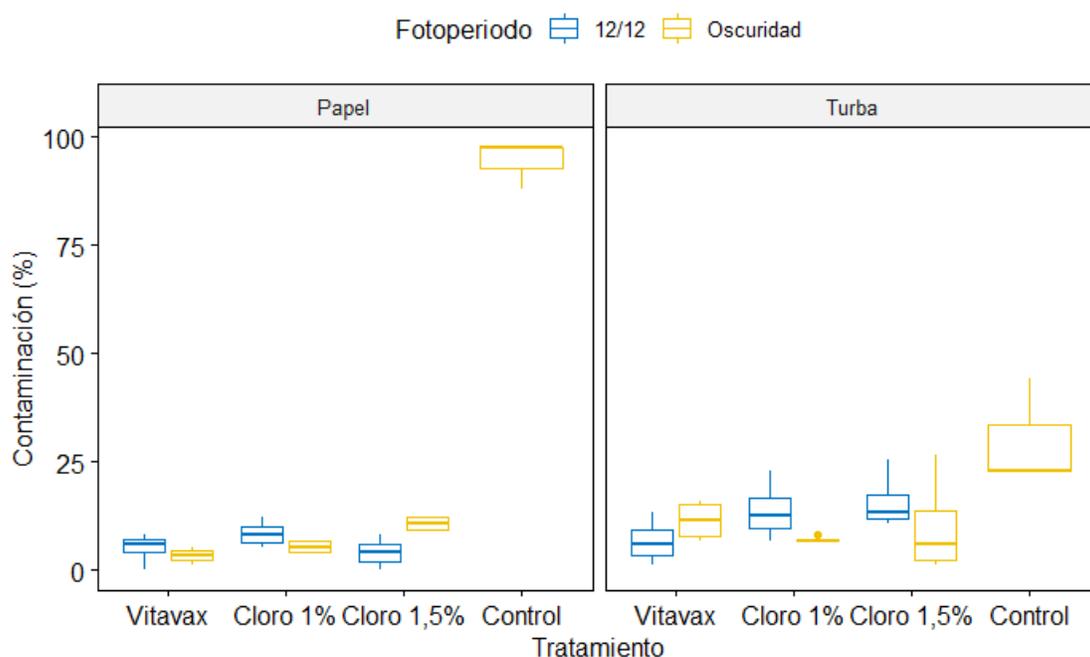


Figura 11. Desinfección de semillas de *P. ligularis* a partir de tres tratamientos (Vitavax, cloro 1%, cloro 1,5%), en dos sustratos y dos fotoperiodos distintos, a los 28 dds.

Para *P. biflora*, de igual forma, los datos mostraron que el valor más alto de contaminación se presentó en el control (12%) (figura 12), lo que evidenció la efectividad de los tratamientos evaluados en el control de la contaminación. En cuanto a los tratamientos, se observó que el menor porcentaje de contaminación entre los tres se presentó en el tratamiento con cloro al 1,5% y el mayor en vitavax, sin embargo, el análisis estadístico demostró que no existen diferencias significativas entre ellos. Por lo que por aspectos prácticos (facilidad de aplicación y menor uso de reactivo), también se consideró para *P. biflora* el utilizar 1 % de cloro como el mejor tratamiento para controlar la contaminación.

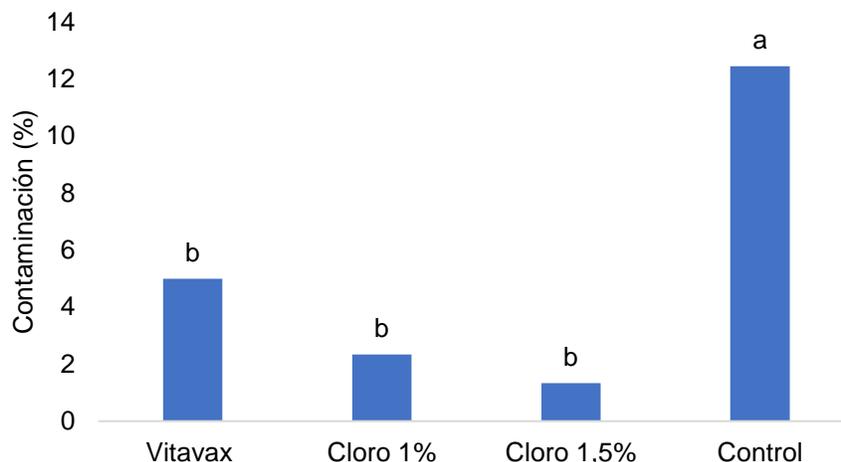


Figura 12. Desinfección de semillas de *P. biflora* a partir de tres tratamientos (Vitavax, cloro 1%, cloro 1,5%), a los 28 dds). Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes según un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de Tukey con 95% de confianza.

8.2.4. Experimento 2.2: efecto de las condiciones de germinación externas (luz, temperatura y sustrato) prueba II

Se repitieron las condiciones ambientales específicas que dieron mejores resultados de germinación en la sección 7.2.2 para cada una de las especies en estudio, pero con cuatro repeticiones de 25 semillas cada una, todas a una temperatura de 25°C.

En el caso de *P. biflora*, donde las semillas se colocaron únicamente en un fotoperiodo 12/12 y en turba a 25 °C, se observó que el porcentaje de germinación fue del 63% ± 4,4. Se obtuvo además un porcentaje de semillas no germinadas del 26% ± 5,0 y un porcentaje de semillas muertas del 11% ±, 1,9, lo cual coincide con los resultados del experimento bajo condiciones ambientales I. Es decir, que el comportamiento se mantuvo para las variables en estudio, lo cual demostró que es una condición adecuada para la germinación de esta especie y, por lo tanto, se decidió colocar los experimentos siguientes en estas condiciones.

En el caso de *P. adenopoda*, los datos no cumplieron con los supuestos del análisis de varianza, por lo que se analizaron mediante un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis (figura 13). Se evaluó únicamente el efecto del sustrato, donde se observó que el porcentaje de germinación fue bajo (entre 3-7%). Sin embargo, en turba fue ligeramente más alto,

aunque no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las variables evaluadas. Este comportamiento coincide con el observado en *P. adenopoda* en el experimento “condiciones ambientales prueba I” (sección 7.2.2), en el cual se observó que el porcentaje de germinación se incrementó ligeramente al utilizar turba como sustrato, por lo tanto, se tomó como sustrato para los siguientes experimentos. Sin embargo, con respecto al porcentaje de germinación, en el primer experimento se encontró un porcentaje de germinación cercano al 60% en esta condición. Este porcentaje de germinación difiere de forma importante con respecto al obtenido en este experimento II, esto pudo estar relacionado con que el primer experimento se realizó con repeticiones de únicamente 10 semillas, lo cual puede ser un número bajo para evidenciar el comportamiento real de la población.

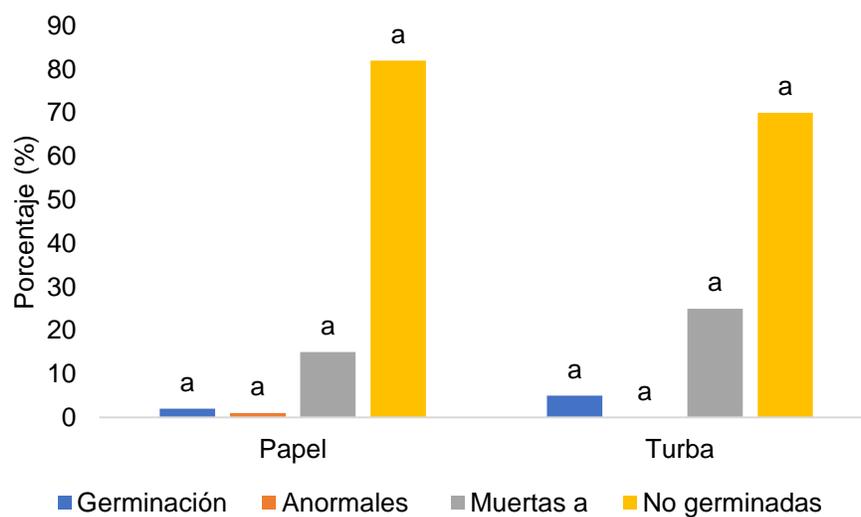


Figura 13. Efecto de dos tipos de sustrato (turba y papel de germinación) sobre el porcentaje de germinación de semillas de *P. adenopoda* a los 28 dds. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes de acuerdo con un ANDEVA no paramétrico Kruskal-Wallis y una prueba post hoc de Bonferroni con un 95% de confianza.

Para *P. ligularis* los datos no cumplieron los supuestos del análisis de varianza para el análisis bifactorial, por lo que se realizó un análisis descriptivo de los mismos (figura 14). Se observó que los porcentajes de germinación fueron bajos (menores al 10%) en todas las condiciones evaluadas. Sin embargo, en turba se observó un aumento con respecto a los datos obtenidos en papel de germinación. Por otra parte, la condición de oscuridad parece tener un

efecto sobre el porcentaje de germinación, sin embargo, los datos obtenidos son valores bajos y altamente variables. Este comportamiento es similar al observado en la figura 8 del experimento de condiciones ambientales I, donde la oscuridad parece promover la germinación, pero los resultados obtenidos no permitieron determinar de manera clara esta condición. Con respecto al porcentaje de germinación, en el primer experimento se encontró un porcentaje de germinación cercano al 90% en esta condición. Este porcentaje de germinación difiere de forma importante con respecto al obtenido en este experimento, esto pudo estar relacionado con que el primer experimento se realizó con repeticiones de únicamente 10 semillas, lo cual puede ser un número bajo para evidenciar el comportamiento real de la población.

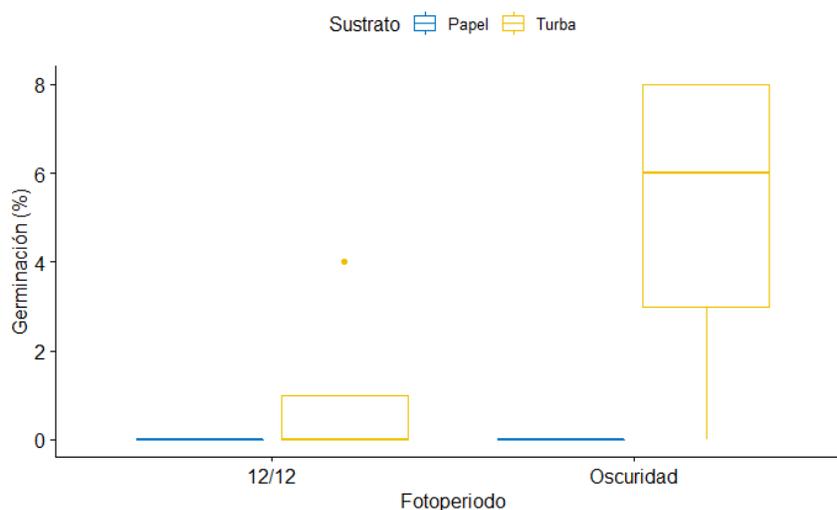


Figura 14. Efecto de dos tipos de sustrato (turba y papel de germinación) y dos fotoperiodos (de 12/12 y oscuridad) en el porcentaje de germinación (porcentaje de plántulas normales) de semillas de *P. ligularis* a los 28 dds.

Con base en los resultados obtenidos en los dos experimentos realizados donde se evaluó el efecto de las condiciones de germinación externas (luz, temperatura y sustrato) y en la prueba de desinfección, se decidió para los siguientes experimentos utilizar turba como sustrato, un fotoperiodo de 12/12 y una temperatura de 25 °C. Esto con el fin de uniformar los procesos y facilitar la evaluación, ya que se eliminó la necesidad de un cuarto oscuro, con lo que se mejoró la visibilidad a la hora de realizar la toma de datos.

8.2.5. Experimento 1.2: tratamientos físicos prueba II

En el caso de *P. biflora* los datos obtenidos cumplieron con los supuestos del análisis de varianza. Como se observa en la figura 15, el tratamiento 3 presentó un porcentaje significativamente mayor de semillas muertas y un porcentaje significativamente menor de germinación en comparación con los demás tratamientos evaluados. Esto podría deberse a que el corte pudo dañar la semilla, ya que es difícil distinguir la posición del segmento distal de la misma. Además, la testa de *P. biflora* es más delgada con respecto a la de *P. adenopoda* y de *P. ligularis*. Los datos obtenidos coincidieron con los resultados del experimento tratamientos físicos I, con lo que se corroboró que los tratamientos físicos evaluados no promueven la germinación de las semillas de esta especie.

En cuanto a las especies *P. adenopoda* y *P. ligularis*, no se cumplieron los supuestos del análisis de varianza, por lo que los datos se analizaron mediante un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis. En *P. adenopoda* se encontró que los porcentajes de germinación se encontraban entre 0- 26% (figura 15b). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos 1, 2 y 3, los cuales promovieron de manera parcial la germinación, aunque no se puede determinar si alguno de estos favoreció de manera significativa la misma. Mientras que los tratamientos 4 y 5 presentan un porcentaje de germinación más bajo, mostrando diferencias significativas con los tres anteriores. Esto se puede deber a un efecto negativo de la temperatura sobre la germinación. Por otro lado, se demostró que el porcentaje de germinación aumentó en comparación con los datos obtenidos en el experimento tratamientos físicos I, pasando de menos del 10% hasta el 26% en el tratamiento 3. Por otra parte, el porcentaje de semillas no germinadas para esta especie fue el parámetro más alto en todos los tratamientos evaluados, comportamiento que coincide con el experimento tratamientos físicos I (sección 8.2.1.).

Para *P. ligularis* (figura 15 C), los porcentajes de germinación se encontraban entre 0-5%. Además, no se muestran diferencias significativas para ninguna de las variables evaluadas entre tratamientos, lo que indica que ninguno de los tratamientos físicos evaluados favoreció la germinación de esta especie. El comportamiento que se observó en el

experimento tratamientos físicos I para esta especie se mantuvo para todas las variables en estudio, corroborando los resultados obtenidos.

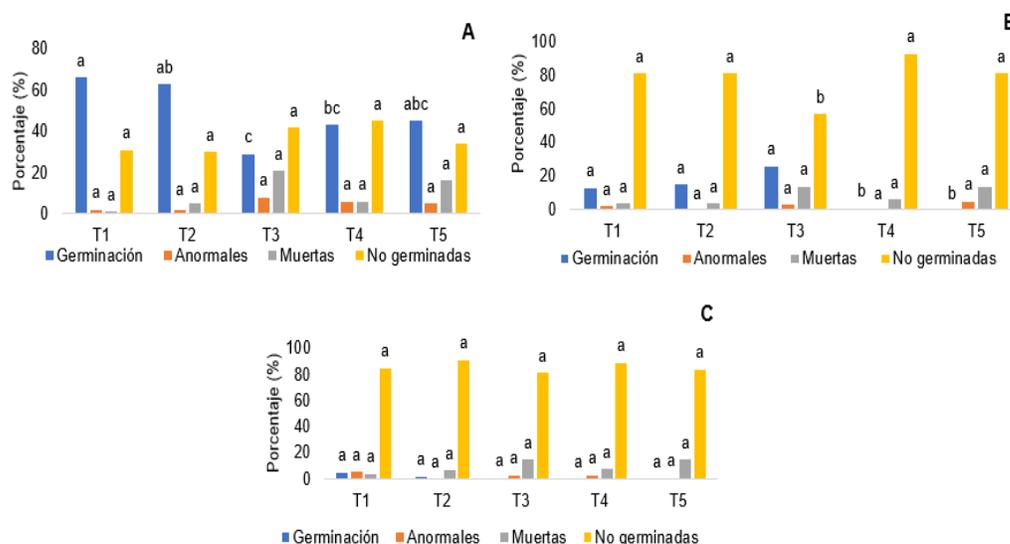


Figura 15. Germinación, plántulas anormales, semillas muertas y no germinadas obtenidas al evaluar el efecto de tratamientos físicos en semillas de *P. biflora* (A), *P. adenopoda* (B) y *P. ligularis* (C) a los 28 DDS. Donde T1: testigo (semillas puestas sobre el papel de germinación directamente), T2: imbibición en agua 24 h, T3: imbibición en agua 24 h más la eliminación del segmento distal, T4: inmersión en agua a 50°C 5 min y T5: inmersión en agua a 50°C 10 min. Los valores señalados con letras desiguales entre tratamientos, por variable, son significativamente diferentes de acuerdo con un ANDEVA no paramétrico Kruskal-Wallis y una prueba post hoc de Bonferroni con un 95% de confianza.

8.2.5.1. Prueba de viabilidad de semillas no germinada de *P. ligularis*

Al analizar los embriones de las semillas de *P. ligularis* resultantes del experimento tratamientos físicos II se obtuvo un porcentaje de viabilidad del $98\% \pm 1,5$, lo cual indica que la semilla es viable. Esto sugiere que la baja germinación que se presentó podría deberse a factores como la dormancia. En la literatura se reporta que algunas especies del género *Passiflora* presentan un impedimento a la entrada del agua, por lo que el siguiente paso, antes de evaluar el efecto de la aplicación exógena de AG₃, fue determinar la dinámica de absorción de agua de las semillas.

8.11 Curva de absorción de agua

Al analizar la dinámica de absorción del agua en las semillas de *P. adenopoda*, *P. biflora* y *P. ligularis* se observó que ninguna de las tres especies presentó un impedimento al ingreso del agua (figura 16). Se observó el mayor aumento en el porcentaje de humedad de las semillas evaluadas a las tres horas de imbibición, esto en comparación con la humedad inicial de las mismas.

En el caso de *P. biflora* el porcentaje de humedad mantuvo un comportamiento ascendente hasta las 24 horas. En el punto de evaluación a las 24 horas se observó una disminución significativa en el porcentaje de humedad, además de una importante variabilidad entre las repeticiones, lo cual sugiere un error metodológico a la hora de la determinación de la humedad. Después de las 24 horas el porcentaje aumentó nuevamente a las 48 horas y, posteriormente, se mantuvo constante, evidenciando un máximo de absorción a las 48 horas. Este mismo comportamiento se presentó al analizar las semillas de *P. adenopoda* y *P. ligularis*, con la única diferencia que las semillas de *P. biflora* absorben mayor cantidad de agua, es decir, presentan mayores contenidos de humedad en los mismos tiempos de imbibición.

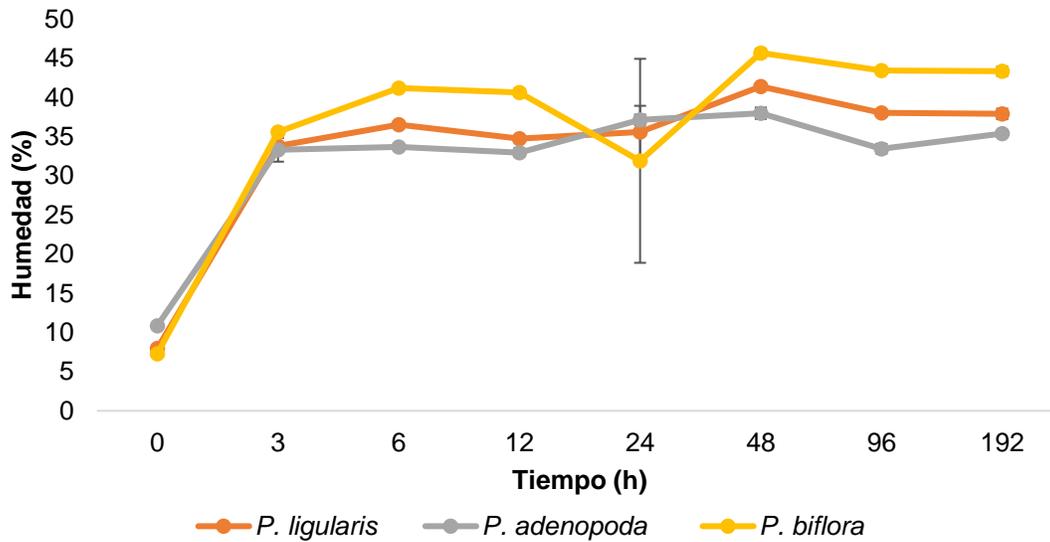


Figura 16. Curva de absorción de agua de las semillas de *P. biflora*, *P. ligularis* y *P. adenopoda*, a las 0, 3, 6, 12, 24, 48, 96 y 192 horas de su imbibición en agua.

8.12 Experimento 3: Efecto de la aplicación exógena de ácido giberélico (AG₃)

En este experimento se evaluó el efecto sobre la germinación de aplicar de forma exógena seis concentraciones crecientes de ácido giberélico. Los datos fueron analizados mediante modelos de regresión, en donde para *P. adenopoda* y *P. ligularis*, los datos se ajustaron a un modelo polinomial de segundo grado. Sin embargo, para *P. biflora* los datos no se ajustaron a diferentes modelos probados, por lo que se analizaron mediante un análisis de varianza, para determinar si alguna concentración en particular promovió la germinación (figura 17) y se observó que para las variables germinación, anormales y semillas no germinadas no hubo diferencias significativas entre tratamientos. En cuanto al porcentaje de semillas muertas, sí se presentaron diferencias significativas entre el testigo y resto de los tratamientos evaluados, es decir, que al colocar las semillas en AG₃ (en cualquiera de las concentraciones evaluadas) aumentó el porcentaje de semillas muertas.

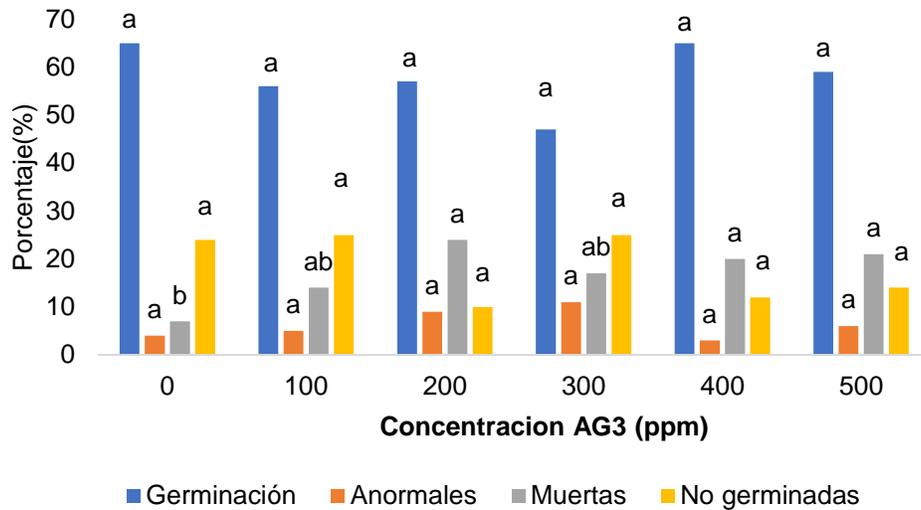


Figura 17. Germinación, plántulas anormales, semillas muertas y no germinadas obtenidas al evaluar el efecto de la aplicación exógena de ácido giberélico (AG₃) en semillas de *P. biflora* a los 28 DDS. Los valores señalados con letras desiguales entre tratamientos, por variable, son significativamente diferentes de acuerdo con un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba Tukey con un 95% de confianza.

En el caso de *P. adenopoda* los datos se analizaron mediante un modelo de regresión polinomial de segundo grado, el cual presentó un coeficiente de determinación (R^2) de 0,57. Se observó que las concentraciones de 400 ppm y 500 ppm de AG₃ promovieron en mayor proporción la germinación (figura 18). Con respecto al modelo utilizado, a pesar de presentar un bajo ajuste, al ser esta una especie silvestre en la que los datos tienden a ser variables y la mayoría del tiempo no se ajustan a un comportamiento normal, se determinó a través del análisis y comparaciones con otros modelos que este era el más indicado y que brindó el mejor ajuste para *P. adenopoda*.

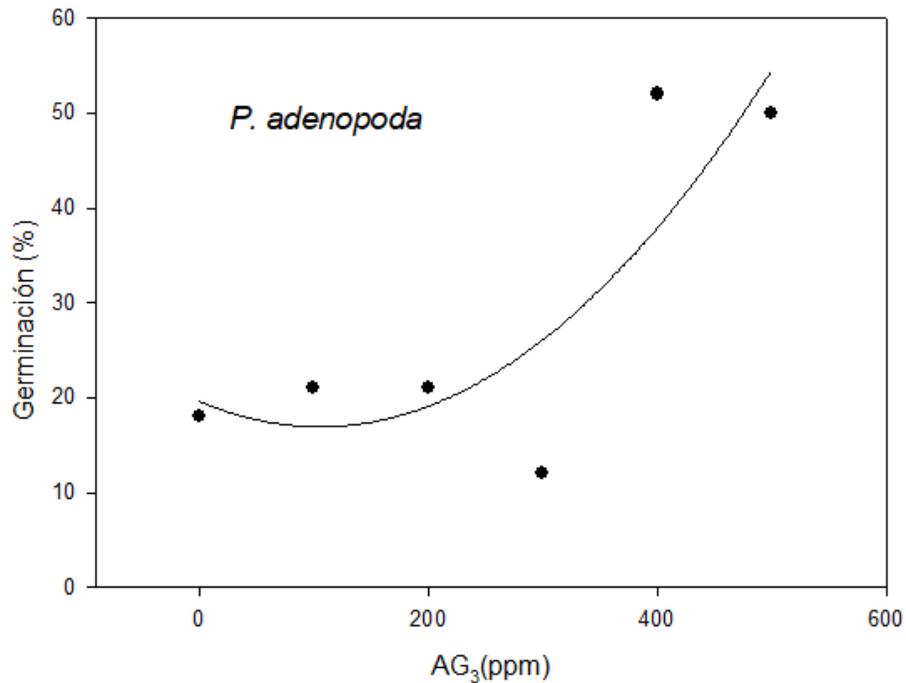


Figura 18. Efecto de la aplicación exógena y creciente de ácido giberélico en semillas de *P. adenopoda* a los 28 dds. Regresión ajustada a un modelo de polinomio de segundo grado asociada a la ecuación: $f=y_0+a*x+b*x^2$ (R^2 0,57).

Al analizar el efecto del ácido giberélico en semillas de *P. ligularis* se encontró que los datos también se ajustaron a un modelo de regresión polinomial de segundo grado. En este caso se observó el mismo comportamiento que para *P. adenopoda*, pero con un mayor ajuste al modelo (R^2 0,81) y se determinó que a los 400 ppm hubo un aumento significativo en la germinación (figura 19). Se demostró que la aplicación exógena de AG₃ aumentó los porcentajes de germinación de *P. ligularis* en comparación con los experimentos realizados anteriormente.

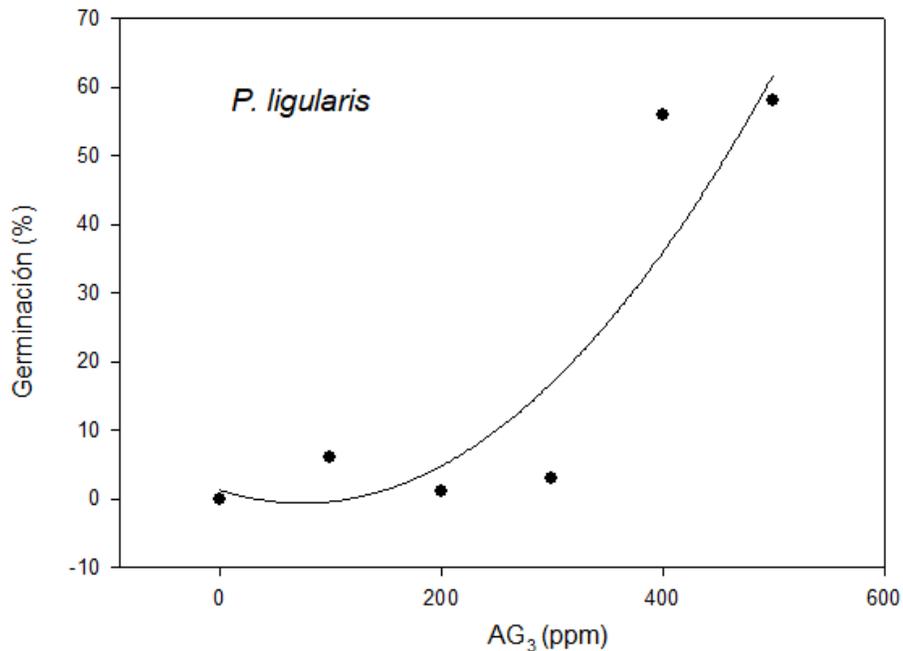


Figura 19. Efecto de la aplicación exógena de ácido giberélico en semillas de *P. ligularis* a los 28 dds. Regresión ajustada a un modelo de polinomio de segundo grado asociada a la ecuación: $f=y_0+a*x+b*x^2$ (R^2 0,81).

9. DISCUSIÓN

La germinación es el proceso mediante el cual, a partir de una semilla, se forma una nueva plántula. Es un proceso complejo que conlleva la reactivación del metabolismo de las semillas, es iniciada por la absorción de agua e implica la activación de mecanismos (como la respiración, la removilización de reservas y la división celular) que pueden ser regulados por condiciones externas o internas (Escobar, 2011). Las condiciones requeridas para la activación del metabolismo no son iguales en todas las especies, existen requerimientos específicos de agua, temperatura y oxígeno, que promueven la germinación (Ubidia, 2021). Este comportamiento se corroboró al realizar la prueba inicial de germinación, donde se encontró que las condiciones de germinación establecidas en la norma internacional para *P. edulis*, no indujeron la germinación de las semillas de las especies *P. biflora*, *P. adenopoda* y *P. ligularis*.

Antes de definir las condiciones adecuadas para la germinación, se debe determinar si las semillas están vivas, ya que únicamente las semillas vivas van a tener la capacidad de germinar (Salazar et al., 2019). Esta característica se conoce como viabilidad y una de las

metodologías para determinarla es a partir de la prueba de viabilidad por tetrazolio. Esta prueba se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas presentes en las células vivas de las semillas, las cuales participan en el proceso de respiración celular (Salazar y Botello, 2018). Estas enzimas reaccionan con la solución de tetrazolio, formando un compuesto insoluble de color rojo (formazán), este permite diferenciarlas de las semillas muertas (Rodríguez y Durán, 2008). En el caso de la prueba de TZ inicial algunas semillas se separaron por completo y se desprendieron los embriones dentro de la solución antes de ser evaluadas (Figura 3A), este factor podría deberse a que el tiempo establecido de exposición a la solución no sea el adecuado para estas especies y sea necesario reducirlo, esto porque al estar 24 horas dentro de la solución la cubierta seminal tiende a ablandarse y los embriones se desprenden fácilmente de la misma. También puede deberse a que el corte realizado fue más extenso del adecuado y se desprendieron ambas mitades de la semilla durante el proceso de tinción y/o imbibición, los embriones extraídos estaban teñidos en su mayoría, lo que sugiere una alta viabilidad de la semilla para las tres especies en estudio. Además, se corroboró que las semillas correspondientes a la variable “no germinadas”, presentaron una alta viabilidad (cuadro 4). Considerando el tamaño de la muestra, el porcentaje obtenido (entre 70 y 80%) se puede interpretar como alto, debido a que se trata de especies silvestres, las cuales pueden presentar comportamientos distintos en la semilla en una misma especie (Rodríguez-Morales et al., 2013).

Debido a lo anterior se consideró necesaria la optimización, sin embargo, no todos los cortes utilizados funcionan de manera adecuada en las especies en estudio, por ejemplo se observaron embriones teñidos de manera desuniforme usando el corte lateral o longitudinal lo que puede deberse a que la solución de TZ no tenga el alcance requerido dentro de la semilla para que esta se tiña por completo, especialmente en *P. ligularis* que es la especie de mayor tamaño y que presenta la testa más gruesa.

Una vez comprobada la viabilidad de las semillas, se deben establecer las condiciones adecuadas para promover la germinación. En este caso, se deben tomar en cuenta tanto las características intraespecíficas como interespecíficas del género *Passiflora*, las cuales poseen alta variabilidad (Aular y Rodríguez, 2003). Por lo tanto, cada especie de *Passiflora* posee condiciones de luz, temperatura y sustrato específicos que pueden promover o disminuir su germinación (Zucarelli, 2015). En *P. biflora* la luz tiene un efecto favorable sobre los

porcentajes de germinación (figura 7), en la especie *P. adenopoda* no se presentaron diferencias significativas entre los porcentajes de aquellas semillas que se encontraban en condiciones de luz (fotoperiodo 12/12) y las que se encontraban en oscuridad total (figura 8). Por otra parte, *P. ligularis* mostró un efecto más favorable al colocarse en condiciones de oscuridad, sin embargo, los porcentajes de germinación obtenidos se mantuvieron bajos (figura 9). En el caso de *P. ligularis* la luz no inhibe del todo la germinación, como en otras especies, por ejemplo *P. tripartita* var. *Mollissima* en la que se ha comprobado que a los 30 dds las semillas expuestas a la luz presentaron porcentajes nulos de germinación (Riveros, 2012).

Otra condición que puede incidir tanto en el porcentaje como en el índice de velocidad de germinación es la temperatura, ya que esta puede afectar la absorción de agua y regular el metabolismo involucrado en los procesos de germinación (Riveros, 2012). Las temperaturas reportadas para la germinación de semillas de pasifloras están entre los 20 °C y los 30 °C (Ubidia, 2021). En el caso de las tres especies estudiadas se evidenció (sección 8.2.2) que los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron en semillas colocadas a una temperatura de 25°C constante, lo que entra en el rango mencionado anteriormente.

Para la adecuada germinación de una plántula de calidad, se requiere del empleo de un sustrato idóneo, el cual, en general, debe ser inocuo, de pH adecuado y con buena textura y estructura (Hidalgo et al., 2009). En el caso de *P. biflora*, *P. adenopoda* y en menor grado en *P. ligularis*, se observó que la turba favoreció la germinación, sumado a que disminuyó la contaminación por hongos y bacterias en comparación con el papel de germinación (Figuras 13 y 14). Esto coincide con los datos obtenidos por Solórzano (2022) en semillas de *P. edulis* en donde obtuvo porcentajes de germinación del 95% usando turba como sustrato. En *P. adenopoda* en el experimento “condiciones ambientales prueba I” se observó que el porcentaje de germinación se incrementó ligeramente al utilizar turba como sustrato, por lo tanto, se tomó como sustrato para los siguientes experimentos, sin embargo, con respecto al porcentaje de germinación, en el primer experimento se encontró un porcentaje de germinación cercano al 60% en esta condición. Este porcentaje de germinación difiere de forma importante con respecto al obtenido en este experimento, esto pudo estar relacionado con que el primer experimento se realizó con repeticiones de únicamente 10 semillas, lo cual puede ser un número bajo para evidenciar el comportamiento real de la población.

A pesar de que se proporcionaron las condiciones de luz, temperatura y sustrato más adecuadas para cada una de las especies en estudio, en el experimento de condiciones ambientales II, las especies *P. adenopoda* y *P. ligularis* mantuvieron bajos porcentajes de germinación (Figuras 13 y 14). Este comportamiento puede deberse a que las semillas se encontraban dormantes. La dormancia es una condición interna de la semilla que evita que esta germine aun teniendo las condiciones externas adecuadas (Baskin & Baskin, 2004). En pasifloras se ha reportado dormancia física por cubiertas seminales poco permeables y dormancia fisiológica por presencia de sustancias inhibidoras de la germinación, por presencia de inhibidores químicos en las cubiertas seminales y/o por barreras mecánicas que impiden la protrusión de la radícula (Sánchez, 2021). Por lo que, en busca de promover la germinación de las especies *P. biflora*, *P. adenopoda* y *P. ligularis*, en esta investigación se estudió el efecto de tratamientos físicos y químicos (aplicación exógena de AG₃).

Con el fin de determinar si las semillas presentaban dormancia física, se evaluó el efecto de aplicar cuatro tratamientos físicos. Se encontró que para *P. adenopoda*, en el caso del primer experimento, se obtuvieron porcentajes de germinación menores al 10% en todos los tratamientos utilizados. Sin embargo, al realizar estos mismos tratamientos con las condiciones ambientales más adecuadas la germinación aumentó, especialmente en el tratamiento 3, a pesar de que el porcentaje de germinación fue menor al 30%. En estudios realizados en *Passiflora mollissima*, se obtuvieron porcentajes de germinación del 88% al realizar una escarificación basal la cual fue superior a tratamientos como la imbibición y el uso de AG₃ y de KNO₃ (Bautista-Rubio, 2018), por lo que la implementación de otros tratamientos físicos podría ser útil para promover la germinación en esta especie. En *P. ligularis*, el porcentaje de germinación se mantuvo menor al 10% en ambos experimentos para todos los tratamientos físicos evaluados. Gutiérrez et al., (2011) encontraron resultados similares (8% de germinación) en semillas de *P. ligularis* a las cuales se les aplicó el despunte apical, sin embargo, al aplicar un despunte basal el porcentaje aumentó al 52%.

Los tratamientos de imbibición e inmersión en agua caliente no tuvieron efectos significativos sobre la germinación de las especies *P. adenopoda* y *P. ligularis* (figura 6 y 16), esto puede deberse a que la semilla no presenta dormancia física sino de otro tipo, o bien, a que los tratamientos específicos realizados en este experimento no fueron los adecuados para la mismas. Estudios en *Passiflora mollissima* demostraron que al embeber

las semillas durante siete días se alcanzó un porcentaje de germinación de 70% (Bautista, 2018). Estos resultados coinciden con estudios realizados en *P. edulis* por Mabundza et al., (2010), en donde al colocar las semillas por siete días en imbibición se presentó un porcentaje de germinación del 71,5%. Con base en estas experiencias, se podría probar tiempos mayores de imbibición a los evaluados en este trabajo, por otra parte, los porcentajes más altos de germinación en *P. biflora* se obtuvieron de en el tratamiento 2 (imbibición en agua 24 horas), mientras que en los tratamientos de inmersión en agua caliente los porcentajes obtenidos fueron los más bajos, estos resultados contrastan con los presentados por Grzybowski et al. (2019) para *Passiflora actinia*, quienes encontraron que la inmersión en agua a 40°C y 50°C, indujo porcentajes de germinación entre el 81 y 88%, mientras que la imbibición en agua por 24 horas dio como resultado un porcentaje del 60%. El porcentaje más bajo que se obtuvieron en ese estudio fue el resultante del tratamiento de imbibición más corte, lo cual coincide con el comportamiento de *P. biflora* en esta investigación donde, corte puede haber dañado las semillas.

Debido a la importancia que tiene la imbibición para la activación del metabolismo durante la germinación, es importante conocer la dinámica de absorción de agua de las especies con las que se trabaja. En este caso, las tres especies absorben la mayoría de agua en las primeras 3 a 6 horas de imbibición (figura 16), lo cual indica que ninguna de las especies en estudio posee limitantes para la absorción de agua. En el caso de *P. ligularis* se reportó en el estudio de Escobar (2011), que ocurre una estabilización del peso fresco alrededor de las 9 a 11 horas. En este caso, se observó que durante las primeras tres horas las semillas absorbieron rápidamente agua, debido a su bajo potencial hídrico, después la entrada de agua fue más lenta, lo que coincide también con la estabilización del contenido de humedad. La disminución y estabilización de la absorción de agua caracteriza la segunda fase del proceso de germinación, donde se da la activación del metabolismo en la semilla y comienza la elongación celular (Escobar, 2011). Sin embargo, aunque la dinámica de absorción de agua concuerde con la esperada durante el proceso de germinación, esto no garantiza que las semillas vayan a germinar, ya que además de un impedimento físico puede existir una dormancia de tipo fisiológica donde la semilla presente sustancias inhibitoras del proceso (Monge, 2011).

Algunas investigaciones en *P. ligularis* (granadilla) sugieren que con la aplicación exógena de ácido giberélico en concentraciones entre 50 a 400 ppm los porcentajes de germinación pueden llegar incluso a ser del 100% (Rodríguez et al., 2020). Los resultados obtenidos en esta investigación para la aplicación exógena de AG₃ demuestran que al utilizar concentraciones entre 400 y 500 ppm el porcentaje de germinación fue de un 58% (figura 19). Este fue el máximo porcentaje de germinación obtenido para esta especie durante esta investigación. En el segundo experimento donde se evaluó el efecto de la luz, el comportamiento observado sugirió que la oscuridad favorecía la germinación en esta especie. Sin embargo, este experimento se realizó solo utilizando un fotoperiodo 12/12, por lo cual todavía se debe evaluar el efecto combinado de concentraciones de 500 ppm, o de concentraciones superiores, en oscuridad. En otras especies como *P. quadrangularis* se ha reportado que a los 13 dds, semillas sometidas a una concentración de 1,200 ppm presentaron porcentajes de germinación de 9,5 y a los 51 días dds se obtuvo un porcentaje de 54% (Carranza et al, 2016). También en *P. edulis* Sims. inmersa en 250 ppm de AG₃ por 10 minutos se alcanzó un porcentaje de germinación de 74%. El ácido giberélico promueve la germinación en especies que presentan dormancia fisiológica debido a que participa en los procesos de difusión de auxinas, además, el AG₃ puede ser antagónico a las sustancias inhibitoras, así como desencadenar la actividad de enzimas hidrolíticas (Gurung et al, 2014). Como se observa en la sección 8.12, para las especies *P. adenopoda* y *P. ligularis* los porcentajes de germinación obtenidos en este experimento fueron superiores a los obtenidos en los otros experimentos, lo cual indica que el AG₃ promueve la germinación de estas especies, pero sería importante determinar el efecto de dosis mayores, en busca de encontrar la concentración óptima para estas especies.

Se pudo determinar que las especies del género *Passiflora*, al poseer características variables entre especies en cuanto a las características de la semilla, cubierta, grosor, tamaño y la respuesta a condiciones ambientales como luz, temperatura y sustrato, así como la aplicación de AG₃, hace que los tratamientos utilizados para la ruptura de la dormancia muestren resultados diferentes aumentando o disminuyendo los porcentajes de germinación según la especie.

10. CONCLUSIONES

- El fotoperiodo posee un efecto variable en las especies estudiadas ya que mientras en *P. biflora* se observó que la luz promueve la germinación, en *P. ligularis* la oscuridad podría favorecerla. Para *P. adenopoda* el fotoperiodo aparentemente no posee efectos sobre la germinación.
- La turba como sustrato favorece el control de la contaminación en todas las especies evaluadas.
- En cuanto a la temperatura, las tres especies en estudio presentaron mayores porcentajes de germinación colocadas a 25°C continuo.
- Los tratamientos físicos como la imbibición e inmersión en agua a 50°C no poseen efectos favorables sobre la germinación de las especies en estudio, por el contrario, en *P. biflora* puede haber dañado las semillas, mientras que en las especies *P. adenopoda* y *P. ligularis* no hay diferencias significativas entre tratamientos.
- La remoción del segmento distal de la semilla (distal), no promueve la germinación en *P. biflora*, debido posiblemente al tamaño y forma de la semilla, sin embargo, en *P. adenopoda* posee efectos favorables
- La aplicación exógena de ácido giberélico en semillas *P. ligularis*, a una concentración entre 400 y 500 ppm, promueve la germinación, lo que sugiere la presencia de dormancia fisiológica.
- La aplicación exógena de ácido giberélico a una concentración entre 400 y 500 ppm promueve la germinación en semillas de *P. adenopoda*. Además, su comportamiento sugiere que posee dormancia combinada (física-fisiológica), ya que su germinación también se ve favorecida por la remoción del segmento distal.
- La especie *P. biflora* posee porcentajes de germinación de medios a altos en todos los experimentos, incluso en los testigos utilizados, con lo cual se puede concluir que sus semillas no presentan dormancia.

11. RECOMENDACIONES

- En la especie *P. ligularis* se recomienda evaluar concentraciones de AG₃ superiores a 500 ppm en combinación con oscuridad, para determinar si se logra promover un porcentaje de germinación superior al alcanzado en esta investigación.
- En la especie *P. adenopoda* se recomienda combinar la aplicación de ácido giberélico en conjunto con la remoción del segmento distal, ya que ambos mostraron tener efectos positivos sobre la germinación.
- En las especies *P. adenopoda* y *P. ligularis* tiempos más extensos de imbibición podrían tener favorecer la germinación, e incluso la combinación con otros tipos de escarificación mecánica, por lo que es recomendable evaluar estos tratamientos, especialmente en *P. adenopoda*, ya que no se cuenta con referencias de esta especie.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, D., Rodríguez, O., Luna, G., Zarate, G.& Bello, L. (2018). Microencapsulation of passion fruit extract (*Passiflora biflora*) by spray drying. In *IDS 2018. 21st International Drying Symposium Proceedings* (pp. 1887-1894). Editorial Universitat Politècnica de València. España. <http://dx.doi.org/10.4995/ids2018.2018.7852>
- Alila, P. (2014). Germination studies on passionfruit cultivars with different pre-sowing seed treatments. In *XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes*. Department of Horticulture Nagaland University, India. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.711.353>
- Alboukadel Kassambara (2020). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.4.0. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
- Alboukadel Kassambara (2021). rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests. R package version 0.7.0. <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>
- Association of Official Seed Analysts/ Society of Commercial Seed Technologists. (2010). tetrazolium testing handbook. USA. 414 p.

- Aular, J. & Rodríguez, Y. (2003). Algunas características físicas y químicas del fruto de cuatro especies de *Passiflora*. *Bioagro*, 15(1), 41-46.
- Axol-Rodríguez, J. J., Jerónimo-López, M., Valdivia-Camarillo, A. & Avalos-de la Cruz, D. A. (2018). Extraction and characterization of *Passiflora biflora* Lam extract. *Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Laboratorio de Extractos Vegetales. Veracruz, México, Instituto Tecnológico Superior de Teziutlán. Puebla, México.* <http://dx.doi.org/10.4995/ids2018.2018.7852>
- Baskin, J. M.; Baskin, C. C.; Li, X. (2000). Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant species biology*, 15(2), 139-152.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed science research*, 14(1), 1-16. DOI: 10.1079/SSR2003150
- Bautista Rubio, J. R. (2018). *Tratamientos pregerminativos en semillas de Tumbo Serrano (Passiflora mollissima)*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Berjak, P., & Pammenter, N. W. (2010). Semillas ortodoxas y recalcitrantes. *Manual de Semillas de Árboles Tropicales. IV. US. Agricultural Department. Forestal Service*, 143-155.
- Bonilla Morales, M. M. (2014). *Biogeografía y morfología de las Passifloraceae (subg. Tacsonia, Rathea & Manicata) del trópico andino como estrategia de conservación* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira.
- Cárdenas Hernández, J. F. (2011). *Morfología y tratamientos pregerminativos de semillas de granadilla (Passiflora ligularis Juss)*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Carranza, C., Castellanos, G., Deaza, D. & Miranda, D. (2016). Efecto de la aplicación de reguladores de crecimiento sobre la germinación de semillas de badea (*Passiflora quadrangularis* L.) en condiciones de invernadero. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 284-291. <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.5791>

- Copete Parada, A. (2011). Efecto de acondicionamientos sobre la calidad fisiológica de semillas y plántulas de *Passiflora edulis*. (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana.
- Delanoy, M., Van Damme, P., Scheldeman, X., & Beltran, J. (2006). Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) LH Bailey, *Passiflora tricuspidata* Mast. and *Passiflora nov sp.* seeds. *Scientia Horticulturae*, 110(2), 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.007>
- Deginani, N. B. (2001). Las especies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). *Darwiniana*, 39(1-2), 43-129.
- Escobar, Y. 2011. Efecto del acondicionamiento hídrico y osmótico sobre a calidad de semillas y plántulas de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.). (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8878>
- Estrada, A. & Rodríguez, A. (2009). Flores de pasión de Costa Rica: Historia natural e identificación. *Costa Rica. Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio*.
- Felipe de Mendiburu (2021). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-5. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Gutiérrez, M. I., Miranda, D. & Cárdenas-Hernández, J. F. (2011). Efecto de tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y cholupa (*Passiflora maliformis* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 209-219. <http://dx.doi.org/10.17584/rech.2011v5i2.1268>
- Gutiérrez, R. H. C. (1988). Efecto de la escarificación y la dosis del ácido giberélico (AG3) en la germinación de semilla de curuba (*Passiflora mollissima*). *Acta Biológica Colombiana*, 1(4), 127-132.

- Gurung, N., Swamy, G. S. K., Sarkar, S. K. & Ubale, N. B. (2014). Effect of chemicals and growth regulators on germination, vigour and growth of passion fruit (*Passiflora edulis Sims.*). *The Bioscan*, 9(1), 155-157. <http://www.thebioscan.in/>
- Grzybowski, C. R. D. S., Silva, R. C. D., Belniaki, A. C. & Panobianco, M. (2019). Investigation of dormancy and storage potential of seeds of yellow passion fruit. *Journal of Seed Science*, 41(3), 367-374. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n3214892>
- International Seeds Testing Association (2018). International Rules for Seeds Testing. International Seeds Testing Association. Bassersdorf, Suiza. 245p.
- Mabundza, P; Wahome & Masarirambi P. 2010. Effects of different pre-germination treatment methods on the germination of passion (*Passiflora edulis*) seeds. *Journal of Agriculture & Social Sciences*. 6 (3). <http://dx.doi.org/10.20546/ijemas.2017.604.077>
- Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2009). Regras para análise de sementes. BR, Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasil. 399 p.
- Marostega, T. N., da Luz, P. B., Tavares, A. R., Neves, L. G. & de Paiva Sobrinho, S. (2017). Methods of breaking seed dormancy for ornamental passion fruit species. *Ornamental Horticulture*, 23(1), 72-78. <http://dx.doi.org/10.14295/oh.v23i1.982>
- Mendiondo, G. M. & Amela Garcia, M. T. (2009). Germination of stored and scarified seeds of *Passiflora caerulea* L. (Passifloraceae). *Plant Biosystems*, 143(2), 369-376. <https://doi.org/10.1080/11263500902722709>
- Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C. Magnitskiy, S., Casierra, F., Piedrahíta, W. & Flórez, L. E. (2009). Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. *Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas*.
- Monge, A. 2011. Tratamientos de temperatura y humedad para incrementar el porcentaje de germinación de Teca (*Tectona grandis* Linn. f.). (Tesis de grado). Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

- 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, A. C. A., Morales, M. M. B. & Varela, O. A. (2016). Historia de *Passiflora Supersec*. Tacsonia (*Passifloraceae*): un acercamiento taxonómico. *Revista Biodiversidad Neotropical*, 6(2), 107-120.
- Patel, S. S., Soni, H., Mishra, K. & Singhai, A. K. (2011). Recent updates on the genus *Passiflora*: a review. *International Journal of Research in Phytochemistry and Pharmacology*, 1(1), 1-16.
- Pérez-Cortéz, S., Escala, M. & Tillett, S. (2005). Anatomía de la cubierta seminal de ocho especies de *Passiflora* L. subgénero *Passiflora*. *Acta Botanica Venezuelica*, 28(2), 337-348.
- Pérez-Cortéz, S., Escala, M. & Tillett, S. (2009). Morfoanatomía de la cubierta seminal en siete especies de *Passiflora* L., subgénero *Passiflora* (*Passifloraceae*). *Hoehnea*, 36(1), 131-137. <https://doi.org/10.1590/S2236-89062009000100007>
- Pinduisaca Esparza, N. M. (2016). *Estudio Fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante In Vitro de hojas y flores de Passiflora ligularis*. (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Posada, P., Ocampo, J. & Santos, L. G. (2014). Estudio del comportamiento fisiológico de la semilla de tres especies cultivadas de *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) como una contribución para la conservación ex situ. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(1), 9-19.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RStudio Team (2021). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

- Ramírez, W. (2006). Hibridación interespecífica en *Passiflora* (*Passifloraceae*), mediante polinización manual, y características florales para la polinización. *Lankesteriana*, 6(3), 123-131.
- Rezazadeh, A., & Stafne, E. T. (2018). Comparison of seed treatments on the germination of seven passion fruit species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(11), 3074-3083. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2018.711.353>
- Riveros Geronimo, N. (2012). Efecto del ácido giberélico y la luz sobre la germinación de semillas de *Passiflora tripartita* var. *mollissima*. (Tesis de grado). Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
- Roa Nieto, C. E. (2017). *Efecto de la estratificación sobre la germinación de semillas de badea* (*Passiflora quadrangularis* L.). (Tesis de grado). Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Bogotá, Colombia.
- Rodríguez, A G. & Durán, J. M. (2008). Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. *Agricultura: Revista Agropecuaria*, 78(912).
- Rodríguez-Morales, J.; Guillén, S & Casas, A. (2013). Consecuencias de la domesticación de *Stenocereus stellatus* en el tamaño de las semillas y en la germinación en un gradiente de estrés hídrico. *Botanical Sciences*, 91(4), 485-492. <http://dx.doi.org/10.17129/botsci.425>
- Sánchez, C. (2013). Anotación funcional de transcriptomas de semillas de especies pasifloras cultivadas en Colombia e identificación in silico de genes potencialmente relacionados con regulación de dormancia. (Tesis de grado). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Santos, C. E. M. D., Morgado, M. A. D. O., Matias, R. G. P., Wagner Júnior, A. & Bruckner, C. H. (2015). Germination and emergence of passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds obtained by self-and open pollination. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37(4), 489-493. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v37i4.19616>

- Salazar, S; Quintero, J & Bustos, J. (2019). Implementación de la prueba de tetrazolio en las semillas de *Raphanus sativus* L. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 15(2), 7-15.
DOI: <https://doi.org/10.18359/rfcb.3831>
- Severin, C., Salinas, A., Gattusso, S., Gattusso, M., Busilacchi, H., Giubileo, G. & Aguirre, A. (2016). Estimulación de la germinación de semillas de *Passiflora caerulea* L. cultivadas in vitro. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNR*, (06), 55-58.
- SigmaPlot version 10.0, from Systat Software, Inc., San Jose California USA,
www.systatsoftware.com
- Solórzano, T. 2022. Efecto de bioestimulantes en la producción de plantas de maracuyá (*Passiflora edulis*) en vivero con varios sustratos. (Tesis de grado). Universidad Estatal del sur de Manabí. Ecuador.
<http://repositorio.unesum.edu.ec/handle/53000/4172>
- Soto, J. M. S., Ramos, L. H. & Mendoza, E. J. T. (2014). Efectos fisiológicos de badea (*Passiflora quadrangularis*) y yuca (*Manihot esculenta*) utilizando recubrimientos a base de cera y parafina bajo conservación en frío. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 1(1), 33-43.
<http://dx.doi.org/10.23850/24220582.113>
- Torres-González, A. M. (2018). Seed dormancy and germination of two cultivated species of Pasifloraceae. *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat.*, 22(1), 15-27.
- Ubidia, J. (2021). Evaluación de dos tipos de escarificación para incrementar el porcentaje de germinación de Gulupa (*Passiflora edulis* SIMS. F. EDULIS), Badea (*Passiflora quadrangularis*) y Taxo (*Passiflora tariniana*) bajo invernadero. (Tesis de grado). Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Ecuador.
<https://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/10960>
- Vargas, A., Assis, A., Nadal, M., Schuch, M., & Tunes, V. (2018). Storage temperature effect on seed emergence and substrates during the initial development of yellow passion

fruit. *Agronomy Science and Biotechnology*, 4(1), 22-22. Doi: 10.33158/ASB.2018v4i1p22

Vega, E; Campos, V; Monge, A; Bertsch, S & Vargas, E. (2022). Morfología y optimización de prueba de viabilidad en semillas de *Passiflora* spp. de Costa Rica. *Agronomy Mesoamerican*, 51567-51567. <https://doi:10.15517/am.v33iEspecial.51567>

Wickham et al., (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open-Source Software*, 4(43), 1686, <https://doi.org/10.21105/joss.01686>

Zucarelli, V., Ferreira; G., Amaro, A. C. E. & Araújo, F. P. D. (2009). Fotoperíodo, temperatura e reguladores vegetais na germinação de sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. *Revista Brasileira de Sementes*, 31(3), 106-114.

Zucarelli, V., Henrique, L. A. V. & Ono, E. O. (2015). Influence of light and temperature on the germination of *Passiflora incarnata* L. seeds. *Journal of Seed Science*, 37(2), 162-167. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v37n2147082>

