

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Morfología, viabilidad y germinación in vitro en semillas de especies de *Passiflora* L. distribuidas en Colombia

Lina Marcela Parrado Palma

Licenciada en Biología

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Ciencias Biológicas
Palmira, Colombia
2023

Morfología, viabilidad y germinación in vitro en semillas de especies de *Passiflora* L. distribuidas en Colombia

Lina Marcela Parrado Palma

Licenciada en Biología

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias Biológicas

Director

John A. Ocampo, Ph.D.

Universidad Nacional de Colombia

Codirector

Roosevelt Escobar M.Sc.

Alianza Bioversity/CIAT

Maestría en Ciencias Biológicas
Línea de investigación
Recursos Fitogenéticos Neotropicales

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Ciencias Biológicas
Palmira, Colombia

2023

(Dedicatoria o lema)

A mi madre Mónica Palma Dorado y padre Jairo Fernando Parrado por siempre darme fuerzas ante la dificultad, a mi familia hija y esposo, a los docentes de la Universidad Nacional Sede Palmira, por alentar la finalización de nuestro proceso a pesar de la época vivida por la pandemia.

La educación es el arma más poderosa que puedes usar para cambiar el mundo.

Nelson Mandela

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Lina Marcela Parrado Palma

Nombre

Fecha 15/05/2023

Agradecimientos

Agradezco de Antemano a la Universidad Nacional de Colombia Sede palmira por la construcción de conocimiento durante todo el proceso de mi Maestría, a mi director Jhon Albeiro Ocampo por sus aportes y seguimiento en la finalización de este proyecto, Al Docente Magister Roosevelt Escobar por su apoyo en el tema de cultivo de tejidos, A la laboratorista Dora Lilia Jaramillo Cobo por siempre estar presta para mis dudas y compartir su conocimiento, Al Docente Carlos Iván Cardozo por su ayuda en el uso de los espacios de sus laboratorios.

Resumen

Colombia es el país con mayor diversidad de especies del género *Passiflora* L., tanto silvestre como cultivadas. Sin embargo, esta riqueza se ve amenazada por múltiples acciones antrópicas y la falta de estrategias para la conservación de estos recursos biológicos. Por tal razón, el objetivo de esta investigación fue estudiar la morfología, viabilidad y germinación *in vitro* en semillas de cuatro especies colombianas del género *Passiflora* L. (*P. quimbayensis*, *P. kumandayi*, *P. sp. nov.* y *P. ligularis*). La metodología fue establecida por medio de una prueba de viabilidad de las semillas (tetrazolio), una siembra en vivero y técnicas de micropropagación: (1) obtención del material vegetal, (2) establecimiento aséptico del cultivo y (3) multiplicación del material vegetal. Un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos por tres repeticiones y una muestra de 33 unidades experimentales por cada tratamiento fueron analizados con el programa R-Studio. Los resultados mostraron que las semillas obtuvieron entre el 80-95% de viabilidad, exceptuando *P. kumandayi* con embriones no viables. En la siembra en vivero, *P. ligularis* presentó un porcentaje de germinación del 70% de germinación a los 11 días, mientras que *P. quimbayensis* solo alcanzó el 3% de germinación a los 60 días. En el protocolo de conservación *in vitro*, el mejor tratamiento de asepsia (T1) con hipoclorito de sodio al 6% mostró la menor contaminación por patógenos (<25%), aunque en *P. sp. nov.* la contaminación fue del 100%. El despunte apical de las semillas mostró los mayores porcentajes de germinación, con un 98% y 99% en *P. ligularis* y *P. quimbayensis*, respectivamente. El método de cultivo *in vitro* permitió la regeneración de las semillas de *P. quimbayensis*, aunque en las raíces hubo formación de células no definidas con callosidades, mientras que en *P. ligularis* el enraizamiento fue normal sin presencia de callo. El método de conservación *in vitro* implementado en esta investigación muestra resultados positivos para la propagación de *P. ligularis* y debe ser ajustado para las especies silvestres estudiadas.

Palabras claves: Conservación, cultivo de tejidos, escarificación, *in vitro*, *Passiflora*.

Abstract

Colombia is the country with the greatest diversity of the genus *Passiflora* L. species, both wild and farmed. However, this richness looks threatened by several anthropic actions, as well as the lack of strategies to preserve these biological resources. For that reason, the goal of this research was to study the morphology, viability, and *in vitro* germination in seeds of four species of the genus *Passiflora* L. (*P. quimbayensis*, *P. kumandayi* and *P. sp. nov.* and *P. ligularis*) distributed in Colombia. The methodology was established through a seed viability test (tetrazolium), "in nursery" sowing and micropropagation techniques: (1) obtaining plant material, (2) aseptic establishment of the culture and (3) plant material multiplication. A completely randomized experimental design with three treatments for three repetitions and a sample of 33 experimental units for each treatment were analyzed with the "R-Studio" program. The outputs displayed that the seeds had a viability between 80-95%, except the "*P. kumandayi*" with non-viable embryos. In the "in nursery" sowing, "*P. ligularis*" showed a 70% germination percentage at 11 days, whereas the "*P. quimbayensis*" only reached a 3% germination percentage at 60 days. In the "*in vitro*" conservation protocol, the best aseptic treatment (T1) with 6% sodium hypochlorite showed the least contamination by pathogens (less than 25%), even though in "*P. sp. nov.*" the contamination was 100%. The apical sprouting of the seeds showed up the highest germination, percentages with 98% and 99% in "*P. ligularis*" and "*P. quimbayensis*", respectively. The "*in vitro*" culture method allowed the generation of "*P. quimbayensis*" seeds, although there was a formation of undefined cells with calluses in the roots. Whereas in "*P. ligularis*" the rooting was normal without presence of callus. The "*in vitro*" conservation method that was implemented in this research shows positive results for the "*P. ligularis*" propagation and should be adjusted for the studied wild species.

Key words: conservation, tissue culture, scarification, *in vitro*, *Passiflora*

Contenido

| | |
|--|-----|
| Resumen..... | VII |
| Lista de figuras..... | XI |
| Lista de tablas..... | XII |
| 1. Introducción general | 2 |
| 1.1. Historia | 2 |
| 1.2. Distribución y Taxonomía | 3 |
| 1.3. Biología reproductiva | 5 |
| 1.4. Botánica..... | 7 |
| 1.5. Usos | 9 |
| 1.6. Comportamiento fisiológico de la semilla | 10 |
| 1.7. Estatus de conservación..... | 13 |
| 1.8. Recursos genéticos | 15 |
| 1.9. Cultivos de tejidos..... | 20 |
| 1.10. Micropropagación <i>in vitro</i> | 21 |
| 1.11. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Passiflora</i> | 23 |
| 1.12. Prueba de viabilidad de semillas | 25 |
| 1.13. Investigaciones sobre la aplicación de cultivos <i>in vitro</i> en <i>Passiflora</i> | 27 |
| 1.14. Especies estudiadas | 30 |
| 1.14.1. <i>Passiflora quimbayensis</i> Ocampo & Forero..... | 30 |
| 1.14.2. <i>Passiflora kumandayi</i> M.A. Buitrago A. & Coca | 31 |
| 1.14.3. <i>Passiflora sp. nov.</i> | 32 |
| 1.14.4. <i>Passiflora ligularis</i> Juss. | 33 |
| 2. Contexto de la tesis | 35 |
| 3. Objetivos..... | 37 |
| 3.1. General..... | 37 |

| | |
|--|----|
| 3.2. Específicos | 37 |
| 4. Materiales y métodos | 39 |
| 4.1. Área de estudio | 39 |
| 4.2. Material vegetal | 39 |
| 4.3. Preparación y caracterización de la semilla..... | 40 |
| 4.4. Prueba de viabilidad | 40 |
| 4.5. Siembra en vivero..... | 42 |
| 4.6. Cultivo <i>in vitro</i> | 43 |
| 4.6.1. ETAPA 0. Obtención del material vegetal..... | 43 |
| 4.6.2. ETAPA I. Establecimiento aséptico del cultivo | 43 |
| 4.6.3. ETAPA II Multiplicación del material vegetal | 44 |
| 4.6.4. ETAPA III. Estimulación y desarrollo de brotes axilares | 47 |
| 4.6.5. Análisis de datos | 48 |
| 5. Resultados y discusión | 49 |
| 5.1. Material vegetal y caracterización de las semillas | 49 |
| 5.2. Prueba de viabilidad | 53 |
| 5.3. Cultivo en vivero | 56 |
| 5.4. Cultivo <i>in vitro</i> | 57 |
| 5.4.1. ETAPA I. Establecimiento aséptico del cultivo | 57 |
| 5.4.2. ETAPA II Multiplicación del material vegetal y estimulación y desarrollo de brotes axilares | 60 |
| 6. Conclusiones | 71 |
| Referencias | 73 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1-1: Dibujo de una planta de <i>Passiflora</i> que representa la pasión de Cristo: por el monje dominico Simone Parlasca de 1609, (http://www.flwildflowers.com/passiflora.html)3 | |
| Figura 1-2: Distribución mundial del género <i>Passiflora</i> L. de acuerdo con Ocampo (2007). | 4 |
| Figura 1-3: Diversidad de especies cultivadas del género <i>Passiflora</i> . Foto: John Ocampo. | 5 |
| Figura 1-4: Diferentes síndromes de polinización en el género <i>Passiflora</i> . Fotos: John Ocampo, Luis Mazariegos e Iván Sazima. | 6 |
| Figura 1-5: Elementos de la flor en el subgénero <i>Passiflora</i> (izq., <i>P. ligularis</i>) y Tacsonia (<i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>). Foto: Geo Coppens d'Eeckenbrugge (2003). | 9 |
| Figura 1-6: A. Esquema donde se señalan las zonas de la semilla B. Microfotografía de <i>Passiflora nítida</i> indicando ápice y zona micropilar. Escala: 1mm tomado de: Perez <i>et al.</i> (2002). | 10 |
| Figura 1-7: Esquema del protocolo de Hong y Ellis (1996) para las especies estudiadas. Mar: maracuyá; Gra: granadilla; Gul: gulupa..... | 12 |
| Figura 1-8: Lista de especies de <i>Passiflora</i> conservadas en bancos de germoplama en número de accesiones a nivel mundial. Tomado de Posada (2012) y actualizado para esta investigación. | 16 |
| Figura 1-9: Aplicación de técnicas de cultivo <i>in vitro</i> para la propagación de especies de interés agroalimentario. | 22 |
| Figura 1-10: Micropropagación <i>in vitro</i> en <i>P. cumbalensis</i> . Tomado de: Gonzales (2004). proyecto de uso sostenible de los recursos vegetales del distrito capital y la región. | 24 |
| Figura 1-11: Flores de <i>Passiflora quimbayensis</i> . Foto: John Ocampo. | 31 |
| Figura 1-12: Flor de <i>Passiflora kumandayi</i> | 32 |
| Figura 1-13: Flor de <i>P. sp. nov.</i> Foto: John Ocampo..... | 33 |
| Figura 1-14: Flor de la granadilla común (<i>P. ligularis</i>). Foto: John Ocampo. | 34 |
| Figura 1-15: Esquema del protocolo empleado para la prueba de viabilidad de semillas. Fuente propia del autor. | 41 |
| Figura 1-16: Preparación de la semilla para la prueba de viabilidad. | 41 |
| Figura 1-17: Preparación para siembra en vivero. | 42 |
| Figura 1-18: Esquema del protocolo de siembra en vivero. | 43 |

| | |
|--|----|
| Figura 1-19: Esquema del protocolo empleado para la fase de multiplicación del material vegetal..... | 46 |
| Figura 1-20: Esquema del protocolo de germinación de semillas <i>in vitro</i> | 47 |
| Figura 1-21: Dimensiones de la semilla de (A) <i>P. kumandayi</i> , (B) <i>P. quimbayensis</i> , (C) <i>P. sp. nov.</i> , y (D) <i>P. ligularis</i> . Foto: John A. Ocampo. | 51 |
| Figura 1-22: <i>P. quimbayensis</i> (A) Semilla (B) embrión., <i>P. kumandayi</i> (C) Semilla (D) Embrión., <i>P. sp. nov.</i> (E) Semilla (F) Embrión., <i>P. ligularis</i> . (G) Semilla (H) Embrión | 51 |
| Figura 1-23: Patrones de coloración de embriones: (A y B) <i>P. quimbayensis</i> ., (C y D). <i>P. sp. nov.</i> ; (E y F)., <i>P. kumandayi</i> ; (G y H) <i>P. ligularis</i> | 53 |
| Figura 1- 24: Porcentaje de embriones viables en las semillas de las especies evaluadas de acuerdo con el protocolo de Miller y Perters (2010)..... | 55 |
| Figura 1-25: Set de semillas en vivero. <i>P. quimbayensis</i> , <i>P. ligularis</i> y <i>P. sp. nov.</i> Respectivamente | 56 |
| Figura 1-26: Contaminación de las semillas de <i>P. quimbayensis</i> y <i>P. sp. nov.</i> | 58 |
| Figura 1- 27: Porcentaje de contaminación vs tipo de tratamiento de asepsia en cultivo <i>in vitro</i> de las semillas | 59 |
| Figura 1- 28: Oxidación en la especie <i>P. sp. nov.</i> | 60 |
| Figura 1-29: Inicio de la germinación <i>in vitro</i> en <i>P. quimbayensis</i> | 62 |
| Figura 1-30: Inicio de la germinación <i>in vitro</i> de <i>P. ligularis</i> | 62 |
| Figura 1-31: Germinación <i>in vitro</i> promedio para semillas de <i>P. quimbayensis</i> bajo diferentes tipos de escarificación..... | 64 |
| Figura 1-32: Germinación <i>in vitro</i> promedio para semillas de <i>P. ligularis</i> bajo diferentes tipos de escarificación. | 65 |
| Figura 1-33: Desarrollo de brotes axilares de <i>P. ligularis</i> | 66 |
| Figura 1-34: Porcentaje de germinación vs tratamientos pregerminativos de <i>P. quimbayensis</i> | 67 |
| Figura 1-35: Porcentaje de germinación vs tratamientos pregerminativos de <i>P. ligularis</i> .68 | |

Lista de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1-1: Instituciones y numero de accesiones de Pasifloras conservadas en bancos de germoplasma. Tomado de Posada (2012). | 17 |
| Tabla 1-2: Poblaciones de <i>Passiflora</i> en conservación por parte del Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación Colombiana para la Alimentación y la Agricultura. Tomado de: Posada (2012). | 17 |
| Tabla 1-3: Investigaciones sobre la aplicación de cultivos <i>in vitro</i> en <i>Passiflora</i> . Copilado por el autor. | 27 |
| Tabla 1-4: Especies del género <i>Passiflora</i> empleadas en el estudio. | 39 |
| Tabla 1-5: Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) utilizado para el cultivo <i>in vitro</i> en la regeneración de plantas de las especies estudiadas. | 44 |
| Tabla 1-6: Composición de soluciones stock para medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) utilizado para el cultivo <i>in vitro</i> en la regeneración de plantas de las especies estudiadas. | 45 |
| Tabla 1-7: Tratamientos de escarificación evaluados para inducir la germinación en las especies de <i>Passiflora</i> estudiadas. | 45 |
| Tabla 1-8: Caracterización morfológica de las semillas de las especies estudiadas. | 50 |
| Tabla 1-9: Número de semillas de <i>P. quimbayensis</i> y <i>P. ligularis</i> germinadas <i>in vitro</i> bajo diferentes tratamientos de escarificación. | 62 |
| Tabla 1-10: Análisis de varianza (ANDEVA) en <i>P. quimbayensis</i> . | 67 |
| Tabla 1-11: Prueba de comparación de medias de Tukey ($p>0,05$) en <i>P. quimbayensis</i> . | 67 |
| Tabla 1-12: Análisis de varianza (ANDEVA) en <i>P. ligularis</i> . | 68 |
| Tabla 1-13: Prueba de comparación de medias de Tukey ($p>0,05$) de <i>P. ligularis</i> . | 69 |

1. Introducción general

1.1. Historia

Actualmente, existen muchas y diversas plantas que son de gran importancia como fuente de alimento, a nivel ornamental y medicinal para la existencia humana (FAO, 1996). Por primera vez el género *Passiflora* L. captó la atención de los europeos, siendo la razón de esta sus llamativas características a nivel morfológico. Los españoles las hallaron en el Siglo XVI en el nuevo mundo, quienes pudieron observar características físicas que se asemejaban a elementos de la agonía, el sufrimiento que cristo padeció y un símbolo de la conversión al cristianismo (Uribe, 1955). Dicho símbolo religioso dio a las pasifloras el nombre común de Flos Passionis o "flor de la pasión" (Linnaeus, 1753). El jesuita español Juan Romero decide realizar un dibujo y presentarlo al Papa Pablo V (Camollo Borgense) en el año 1608. Unos años después, una diversidad de obras similares estaban disponibles para el público en general en Italia y Alemania (Kugler y King, 2004). Como apoyo a la interpretación de la religión de esa época, las características botánicas de estos dibujos fueron alteradas de forma precisa, como se ilustra en la Figura 1-1.

Figura 1-1: Dibujo de una planta de *Passiflora* que representa la pasión de Cristo: por el monje dominico Simone Parlasca de 1609, (<http://www.flwildflowers.com/passiflora.html>)



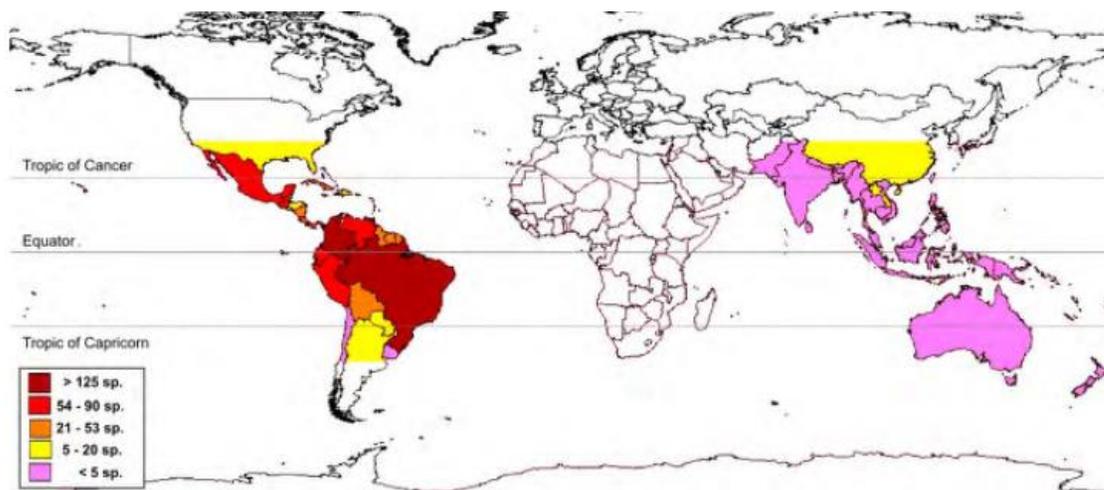
1.2. Distribución y Taxonomía

La familia *Passifloraceae* Juss ex. Roussel, pertenece al orden de los Malpighiales, dividida en dos tribus (*Paropsieae* y *Passifloreae*) está representada por 17 géneros, seis de estos centran su ubicación en América (*Ancistrothyrus*, *Dilkea*, *Mitostemma*, *Passiflora*, *Piriqueta* y *Turnera*). El género *Passiflora* se creó en 1753 por Linneo, el cual realiza una descripción de 29 especies en su trabajo llamado *Species Plantarum*. Posteriormente, este número aumentó a una descripción de 35 especies por Lamarck (1789), en la monografía de Cavanilles en 1790 se publicaron 43 especies clasificadas. Así mismo, autores como Jussieu (1805), De Candolle (1822, 1828), Masters (1872, 1877) y Harms (1898, 1925), acapararon una descripción de 250 especies en 21 secciones, según Killip (1938). De los trabajos más importantes a nivel de monografías y con mayor relevancia se destacó el de Killip, quien realiza la descripción generando una clasificación de 355 especies americanas en 22 subgéneros, teniendo como base las características de la morfología que presentaban las flores. Uribe, en Colombia, hizo el descubrimiento de varias especies nuevas; Escobar “revisó los subgéneros *Distephana*, *Manicata* (syn. *Granadillastrum*), *Rathea* y *Tacsonia* incluyendo *Tacsoniopsis* en el segundo y describe un subgénero adicional, *Porphyropathanthus*” (citado por Ocampo 2007, p. 268). Por último, son numerosos los trabajos que se han publicado en la última década, siendo Feuillet y MacDougal grandes representantes, logrando describir 15 nuevas especies en los

subgéneros *Decaloba* y *Astrophea* (MacDougal, 1992, 1994, 2006; Feuillet, 2002, 2004). Estos mismos representantes, siguiendo la propuesta de caracteres morfológicos, han logrado reconocer cuatro subgéneros: “*Astrophea* y *Deidamioides*, del Sur y América Central, *Decaloba*, de América, el Sudeste Asiático y Australia, y en América *Passiflora*” (Ulmer y MacDougal, 2004, p. 430). En la sección del subgénero *Deidamioides* se encuentra el género *Tetrastylis*.

Passiflora es el género más grande de la familia, con alrededor de 610 especies, la cual se divide en seis subgéneros (*Decaloba* (DC.) Rchb., *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Passiflora*, *Tetrapathea* (DC) P. S. Green y *Tryphostemmatoides* (Harms) Killip), distribuidos principalmente en el Neotrópico (Figura 1-2), desde las zonas costeras hasta los 4.300 m s.n.m., presentes también en las laderas andinas en el límite del páramo (Ulmer y MacDougal, 2004; Krosnick *et al*, 2009; Buitrago *et al*, 2018). De acuerdo con Ulmer y MacDougal (2004), solamente 22 especies del subgénero *Decaloba* se distribuyen en el Viejo Mundo, en la región tropical y subtropical del Sureste Asiático y en el Austral Pacífico.

Figura 1-2: Distribución mundial del género *Passiflora* L. de acuerdo con Ocampo (2007).



Por otro lado, ocho especies presentan importancia económica, *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracuyá), *P. edulis* f. *edulis* (gulupa), *P. ligularis* (granadilla), *P. quadrangularis* (badea), *P. maliformis* (cholupa), *P. tarminiana* (curuba india), *P. tripartita* var. *mollissima* (curuba de Castilla), *P. alata*, (macacua) y *P. popenovii* (granadilla caucana), enfocados en sus usos alimenticios y medicinales (Figura 1-3). Colombia representa el país con mayor

diversidad de pasifloras, en total 176 especies entre silvestres y cultivadas. Las especies se distribuyen por todo el país, siendo más diversas en la región Andina con cerca del 70%, principalmente entre los 1000 y 2000 m s.n.m (Ocampo *et al.*, 2007).

Figura 1-3: Diversidad de especies cultivadas del género *Passiflora*. Foto: John Ocampo.



1.3. Biología reproductiva

En general la reproducción de las pasifloras es alógama con $2n=18$ (Ocampo *et al.*, 2021). La posición de las anteras por debajo del estigma favorece principalmente la polinización cruzada. Así mismo, a nivel morfológico referente a los granos de polen, se puede observar que son de gran tamaño, pesados y de textura viscosa (Nishida, 1958). Es común encontrar autoincompatibilidad fisiológica (Bruckner y Otoni, 1999). Esta autoincompatibilidad según Ho y Shi (1986) genera su principal reacción en las papilas del estigma, Bruckner y Otoni (1999) evidencian que otro sitio asociado a la autoincompatibilidad es el estilo (Rego *et al.*, 1998, 2000). De acuerdo con Escobar (1991), en los subgéneros *Tacsonia* y *Manicata* la autoincompatibilidad es precepto, ya que estas especies poseen frutos con innumerables semillas posteriores a la autopolinización controlada. En el género *Passiflora* encontramos especies auto compatibles y auto incompatibles (Vasconcellos, 1991). Recientemente, Ocampo *et al.* (2016) confirma la presencia de autoincompatibilidad en las tres especies estudiadas por Ho y Shii (1986) y menciona que *P. maliformis*, *P. alata*, *P. mucronata* y *P. vitifolia* son especies predominantemente alógamas. Se ha informado autocompatibilidad parcial en *P. edulis* f.

edulis (Rendón *et al*, 2013) y *P. ligularis* Juss. (Arias *et al*, 2014), así como para *P. tarminiana* Coppens y Barney, *P. manicata* (Juss.) Pers. y *P. foetida* (Ocampo *et al.*, 2016). El comportamiento de la mayoría de los polinizadores puede producir diferentes efectos, debido a la morfología que presentan las flores y a su composición química (Varassin *et al.*, 2001), características como: la dimensión longitudinal del hipantío, la corola y la coloración de la corona, la ubicación del estigma y la concentración de sal y azúcar como néctar son parámetros esenciales (Figura 1-4). Los polinizadores como las abejas pequeñas y las avispas son comunes de flores pequeñas, especialmente en los subgéneros *Astrophea*, *Tetrapathea*, *Decaloba*, *Deidamioides* y *Tryphostemmatoides* (Ulmer y MacDougal, 2004). Las avispas de tamaño grande o abejorros (*Xylocopa* spp.) polinizan flores de tamaño grande en el género *Passiflora*. El proceso de polinización que realizan los insectos involucra principalmente un buen desarrollo de la corona, en el que prevalece una combinación que se centra en colores blanco, amarillo y púrpura. La morfología del insecto, respecto al tamaño para realizar el proceso de polinización depende de varios factores, entre ellos: profundidad y ancho en la flor, firmeza de la cámara de néctar en cuanto al cierre del opérculo, y el espacio que se establece entre la corona y los órganos sexuales.

Figura 1-4: Diferentes síndromes de polinización en el género *Passiflora*. Fotos: John Ocampo, Luis Mazariegos e Iván Sazima.



En cuanto a categorías, el segundo más frecuente es el llamado síndrome de polinización del Colibrí, el cual se centra principalmente en polinizar tonalidades florales que varían en rojo, rosa y anaranjado. En cuanto a forma, favorece aquella que es tubular en el hipantio y presenta un alargamiento del tubo que rodea el androginóforo. Una especialización notoria es la presentada en el hipantio largo de las especies de los Andes del subgénero *Tacsonia* y *Psylanthus* (*P. trinervia*), cuya morfología se relaciona de manera adecuada a la forma del pico del colibrí de la especie *Ensifera ensifera Boissoneau* (Büchert y Mogens, 2001). Esta misma característica ocurre en las flores que presentan una coloración rojo brillante de los subgéneros *Distephana* y *Murucuja*, cuya polinización se da por especies de colibrís cuyo tamaño es pequeño y pertenecen a tierras bajas, entre ellos encontramos a *Phaethornis superciliosus* L. y *Trochilus polytmus* L. (Snow, 1982). Otras especies son polinizadas por mariposas *Heliconius* sp, tales como *P. kermesina* y *P. coccinea* (Benson et al., 1976). En la Amazonía, algunas especies de pasifloras como *P. mucronata* Lam. y *P. ovalis* Vell. ex Roemer, presentan polinización por murciélagos, principalmente el filostómido *Glossophaga soricina* Pallas; mientras que en la especie *P. penduliflora* Bert., se observa la visita del gran murciélago de lengua larga de las Antillas *Monophyllus redmani* Leach (Sazima y Sazima, 1978; Kay, 2001).

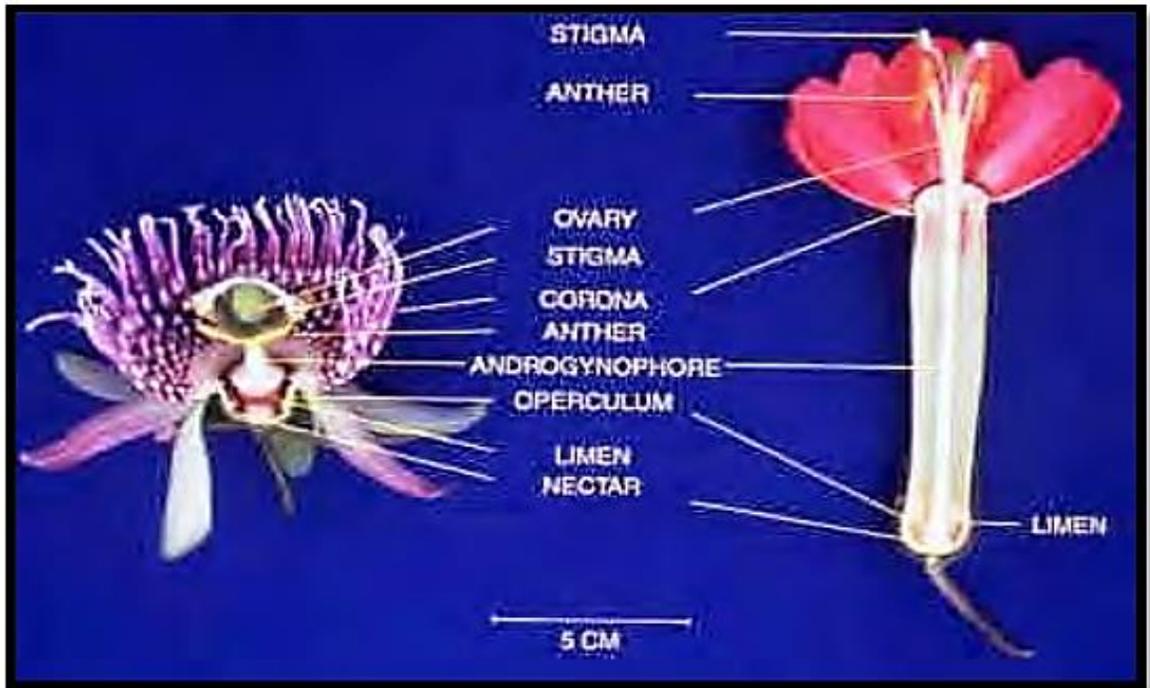
1.4. Botánica

Las especies del género *Passiflora* son principalmente de tipo herbáceas, trepadoras con zarcillos, o con tallos leñosos y axilares, algunos arbustos o árboles (Ulmer y MacDougal, 2004). En cuanto a la estructura externa de las hojas, suelen ser alternas, simples, enteras, lobuladas o palmeadas (Escobar, 1988a, b, 1989). Presentan estípulas que se ubican en la base de los peciolo, los zarcillos principalmente son axilares, provenientes de pedicelos estériles. Estas flores poseen una sexualidad floral de tipo regular, unisexual y bisexual. La Figura 1-5 muestra los diferentes elementos florales de dos especies de los subgéneros *Passiflora* y *Tacsonia*. Un receptáculo grande con un hueco o cuenca que sostiene numerosos apéndices filamentosos o anulares inmersos en la corola y los estambres, de colores brillantes, forman una corona visible con muchas variedades (Dhawan, Dhawan & Charma, 2004). La composición del cáliz se distribuye de la siguiente manera: posee de 3 a 5 carpelos libres, sépalos de forma imbricada, y una corola con algunos pétalos ausentes en casos esporádicos, pero usualmente tiene de 3 a 5 pétalos (Tillett, 1988; Ulmer & MacDougal, 2004). Los 3-5 (10) estambres se insertan tanto en la parte inferior del perianto

como en la base o parte superior del androginóforo; los filamentos poseen una apariencia de hilo (filiformes) y se presentan de forma unida o libre y sujetando las anteras. En cuanto a la forma que poseen las anteras, son versátiles, en botón, bicelares, y presentan dehiscencia de tipo longitudinal (Ulmer & MacDougal, 2004). El ovario de estas especies es supero, un gineceo algo estipitado, en algunas ocasiones sésil, unilocular con una composición estructural de 3 o algunas veces de 5 carpelos en fusión. En cuanto al número de estilos y placenta son iguales, presenta aglutinación en la base, en la parte superior diferentes, con difusión, separados, sencillos o ramificados; el estigma morfológicamente claviforme o peltado, algunas veces bilobulado; los óvulos son innumerables de 1 a 2 seriado y se encuentran sujetos a 3 o 5 placentas de tipo parietal lineales por funículos de estructura larga o corta (Bonilla *et al.*, 2015).

Presenta una baya indehisciente o una cápsula que posee de 3 a 5 válvulas semi-placentiforas, es rica en semillas, las cuales presentan un funículo dilatado en una pulpa o arilo sacciforme, su testa es foveolada y se separa de la membrana que posee, dispone de una gran variedad morfológica de semillas, las cuales según Ellis *et al* (1985) tienen una latencia exógena, una combinación de una latencia mecánica y química que generan una baja germinación en estas especies que presentan inhibidores en su cubierta seminal, y que limitan el crecimiento de las raíces, en estos casos se aplican tratamientos pregerminativos para apoyar la germinación (Escobar, 1988a) Según Hartmann *et al* (2002), respecto a la testa de las semillas, la escarificación química y mecánica permiten romper la testa impermeable que presentan. El embrión recto ocupa el eje del endospermo, los cotiledones poseen láminas superpuestas y paralelas de tipo foliáceo, planos y la radícula es de tipo cilíndrico (Ocampo, 2007).

Figura 1-5: Elementos de la flor en el subgénero *Passiflora* (izq., *P. ligularis*) y Tacsonia (*P. tripartita* var. *mollissima*). Foto: Geo Coppens d'Eeckenbrugge (2003).



1.5. Usos

Las semillas de *Passiflora* se hallaron hace miles de años en Virginia, América del Norte, específicamente en sitios antiguos, lo cual es un dato visible del uso de dichos frutales por el pueblo amerindio (Gremillion, 1989). Así mismo, indígenas pertenecientes al pueblo Malagana en Colombia (200 años a.C.) crearon una joya de oro, cuya inspiración fue la conocida flor de la pasión.

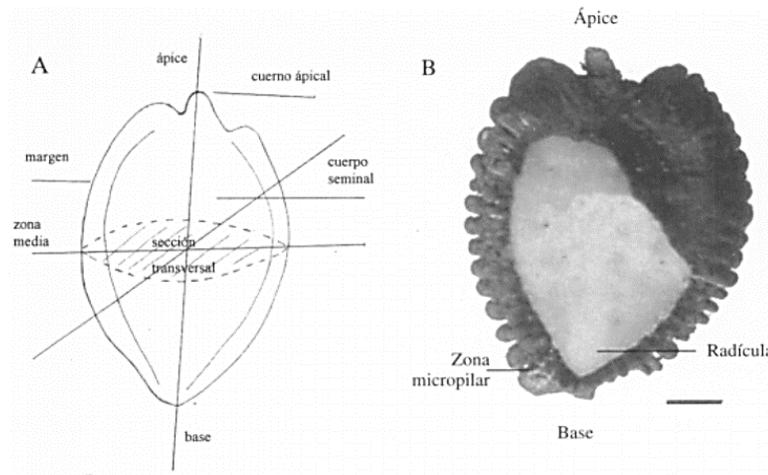
Las pasifloras han logrado desarrollar un enorme número de metabolitos secundarios que les han ayudado a generar métodos de defensa en contra de sus depredadores foliares, se ha reportado que estos metabolitos tienen una función biológica a nivel ecosistémico, además, como mecanismos de defensa en las interacciones de las plantas y en la generación de glándulas laminares contra patógenos potenciales (Ulmer y MacDougal, 2004). En su aporte a los ecosistemas, las pasifloras son generadoras de compuestos como flavonoides y cianogénicos, además, mantienen relaciones evolutivas con otras especies, ya que se ha observado mutualismo con hormigas protectoras, etc., (Simonetti y Devoto, 2018). Poseen síndrome de la polinización, tales como la quiropterofilia,

ornitófila y entomofilia (McCormick, 1982). Así mismo, contribuyen al ecosistema en el ciclaje de nutrientes, polinización y captura de CO₂. Su principal uso es de índole alimenticio, ya que de 57 especies endémicas del género *Passiflora*, 42 producen frutos y son comercializados. (Ocampo *et al.*, 2010). Por ejemplo, su jugo contiene muchas vitaminas (Vilain, 2011). Además, entre la variedad de especies cultivadas y silvestres de pasifloras, se hace notable las propiedades de tipo medicinal asociadas a sus frutos, hojas y flores, ligadas a efectos antioxidantes, sedantes, ansiolíticos y anticonvulsivos (Sandoval *et al.*, 2010). A nivel de industria cosmética y dermatológica, también generan aportes de compuestos para la producción de productos de importancia comercial (Dhawan *et al.*, 2004), pero la mayoría de estas especies sin lugar a duda tienen un uso como especies de tipo ornamental, debido a su amplia diversidad morfológica y exótica a nivel floral que se liga a los efectos que genera la polinización.

1.6. Comportamiento fisiológico de la semilla

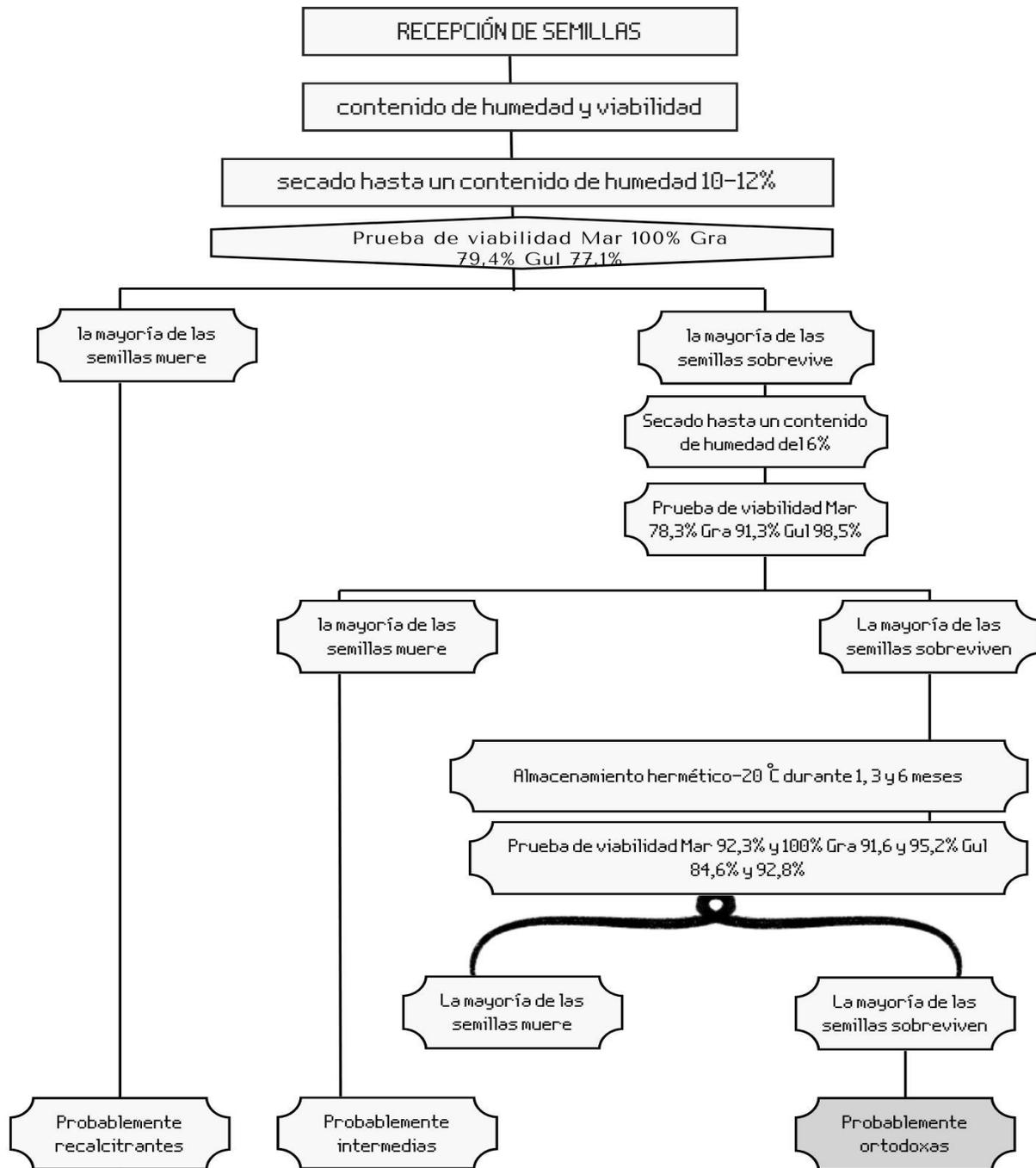
En las pasifloras, la semilla es un órgano principal de propagación (Figura 1-6). Posee testa dura y ornamentada, con formas que varían en cuanto a su morfología (ovaladas, obovadas, obcordadas) y coloración que varía de marrón a negra en su estado maduro (Imig, 2013). La cubierta seminal es un indicador potencial al realizar una verdadera distinción en la taxonomía hasta el nivel de especie (Pérez *et al.*, 2002). En el interior un endospermo de color blanco prominente, con aceites que alimentan el embrión (Ulmer y MacDougal, 2004)

Figura 1-6: A. Esquema donde se señalan las zonas de la semilla B. Microfotografía de *Passiflora nítida* indicando ápice y zona micropilar. Escala: 1mm tomado de: Pérez *et al.* (2002).



De acuerdo con lo mencionado por Hong y Ellis (1996), al realizar pruebas donde se reducían los contenidos de humedad y temperatura se establece un protocolo enfocado en el comportamiento fisiológico de la semilla, a las cuales se les realizaron pruebas de viabilidad (International Seed Testing Association [ISTA], 2009), por lo cual, se definió el siguiente esquema en especies de maracuyá, granadilla y gulupa, el cual se ilustra en la Figura 1-7:

Figura 1-7: Esquema del protocolo de Hong y Ellis (1996) para las especies estudiadas. Mar: maracuyá; Gra: granadilla; Gul: gulupa



Las semillas de *Passiflora* presentan principalmente un comportamiento de tipo ortodoxo respecto a su almacenamiento, definido de acuerdo con su especie y su ecología, por ejemplo, las especies *P. edulis* f. *edulis* (gulupa) y *P. tripartita* var. *mollissima* (curuba de

Castilla) presentan este tipo de semillas (Cardozo, 1988; Posada *et al.*, 2014). “Cabe añadir que se han realizado trabajos posteriormente sobre la conservación de semillas en especies como *P. tarminiana*, *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. tripartita*, *P. mixta*, *P. cumbalensis*, *P. pinnatistipula*, *P. x rosea* y *P. manicata*, mediante la técnica del manejo de germoplasma en campo” (Checa *et al.*, 2011).

1.7. Estatus de conservación

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) busca brindar los instrumentos para que la sociedad mantenga la biodiversidad y utilice los recursos que nos provee la naturaleza de forma equitativa y ecológicamente sostenible. La UICN asigna y ordena a través de categorías a las diferentes especies que se encuentran en riesgo de extinción o que presente un grado de declive poblacional (UICN, 2003).

CATEGORIAS UICN

Aquellas que son asignadas a especies que se encuentran en riesgo de extinguirse o su población presenta un deterioro notorio solo aplicable en especies silvestres. Las categorías son (UICN, 2003):

- Extinto (EX)
- Extinto en Estado Silvestre (EW)
- Extinto a Nivel Regional (RE)
- En Peligro Crítico (CR)
- En Peligro (EN)
- Vulnerable (VU)
- Casi Amenazado (NT)
- Preocupación Menor (LC)
- Datos Insuficientes (DD)
- No Aplicable (NA)
- No Evaluado (NE)

De acuerdo con los criterios de la UICN, Ocampo *et al.*, (2007) hacen referencia a que el 71% de las *Passifloraceae* colombianas se encuentran en cierto grado de amenaza, un

10% en peligro crítico, 6,1% vulnerables y el 16% en menor preocupación y casi amenazadas, por lo que se hace necesario establecer medidas de conservación. Según Ocampo *et al.* (2007) las *Passifloraceae* presentan 48 especies en la categoría de preocupación menor (LC) y 16 especies en peligro crítico (CR).

En Colombia se encuentran 58 especies endémicas: *Ancistrothyrsus antioquiensis* LK Escobar (ined), Género *Passiflora*, Subgénero *Astrophea* (DC.) Masters, 1871 (*P. callistema* LK Escobar, *P. haughtii* Killip, *P. mariquitensis* Mutis ex Uribe, *P. mutisii* Killip, *P. emarginata* Humb. & Bonpl., *P. engleriana*, *P. sphaerocarpa* Triana & Planch., *P. grandis* Killip); Subgénero *Decaloba* (DC.) Rchb. 1828 (*P. azeroana* I. Uribe., *P. bogotensis* Benth., *P. bucaramangensis* Killip., *P. dawei* Killip., *P. erytrophylla* Mast., *P. magdalenae* Triana & Planch., *P. mollis* HBK., *P. munchiquensis* Hernández (ined), *P. occidentalis* Hernández (ined), *P. pilosissima* Killip, *P. popayanensis* Killip, *P. tribolofila* Daños., *P. kalbreyeri* Mástil., *P. menisperma cea* Triana & Planch.) Subgénero *Dysosmia* (DC.) Killip, 1938 (*P. foetida* var. *sanctae-martae*, Killip); Subgénero *Manicata* (Harms) Escobar, 1988 (Syn. *Granadillastrum*) (*P. tolimana* Daños); *P. lehmanni* Mástil., *P. trisulca* Mast., *P. pennellii* Killip, *P. semiciliosa* Planch & Linden, *P. chocoensis* G. Gerlach & T. Ulmer, *P. danielii* Killip, *P. longipes* Juss., *P. longipes* var. *oxyphylla* L. Uribe, *P. magnifica* LK Escobar, *P. sierrae* LK Escobar; Subgénero *Psilanthus* (DC.) Killip, 1938 (*P. bicuspidata* (H. Karst.) Mast., *P. hyacinthiflora* Planch., *P. trinervia* (Juss.) Poir.); Subgénero *Rathea* (Karst.) Killip, 1938 (*P.* LK Escobar); Subgénero *Tacsonia* (Juss.) Tr. y Planch, 1873 (*P. cumbalensis* var. *caucana* LK Escobar, *P. adulterina* Lf, *P. crispolanata* L. Uribe, *P. cuatrecasasii* Killip, *P. formosa* t. Uribe, *P. lanata* (Juss.) Poir., *P. pamplonensis* Planch. & Linden ex Triana & Planch., *P. rigidifolia* Killip, *P. trianae* Killip, *P. antioquiensis* H. Karst., *P. cremastantha* Daños, *P. flexipes* Triana & Planch., *P. leptomischa* Daños, *P. tenerifensis* LK Escobar, *P. linearistipula* LK Escobar, *P. quindiensis* Killip, *P. fimbriatistipula* Harms, *P. uribei* LK Escobar, *P. jardinensis* LK Escobar, *P. parritae* (Mast.) LH Bailey, *P. schlimiana* Triana & Planch., *P. purdiei* Killip); *P. pacifica* LK Escobar (Ocampo *et al.*, 2007).

1.8. Recursos genéticos

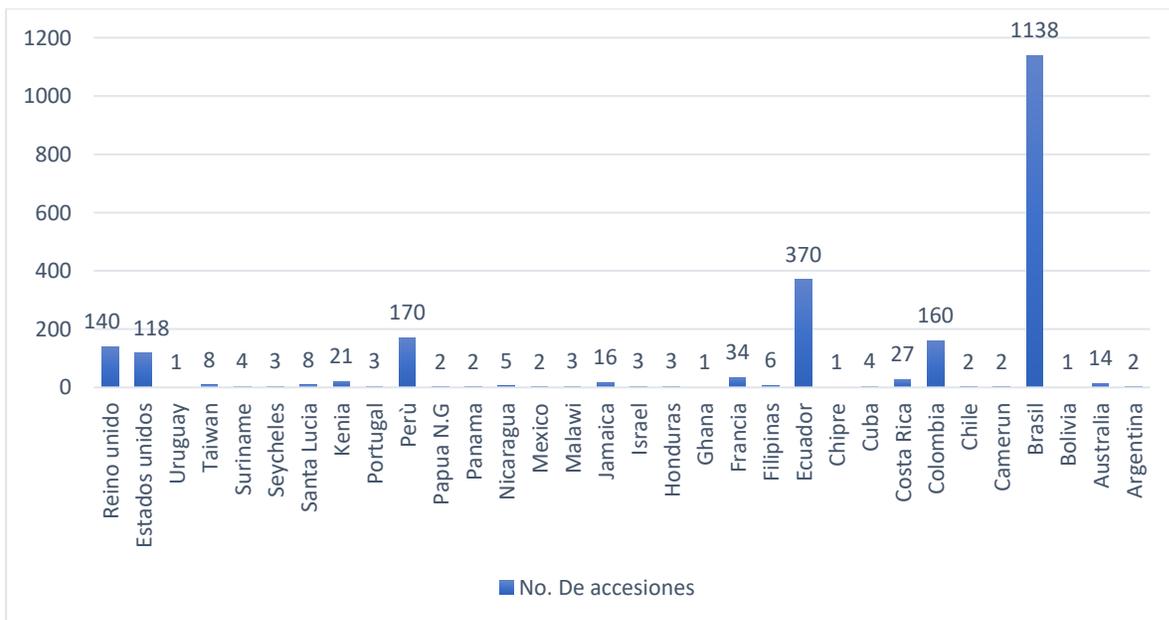
En Colombia se encuentran bancos de germoplasma en diversas entidades de orden nacional e internacional, enfocadas a la conservación de los recursos fitogenéticos, en especies foráneas como nacionales, en las que toman relevancia las colecciones mundiales en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), centro internacional del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR por su sigla en inglés), donde encontramos pastos y forrajes taxones de seguridad alimentaria. Se incluye el Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación Colombiana para la Alimentación y la Agricultura (SBGNC) administrados por la Corporación Colombia de investigación agropecuaria (Agrosavia), donde se conservan recursos genéticos de especies vegetales, animales y de microorganismos. Actualmente, las especies de *Passiflora* se encuentran conservadas en los bancos nacionales de germoplasma (Lobo, 2006). El Sistema de Bancos de Germoplasma, a cargo de Agrosavia, posee un sistema de conservación a través de semilla, con 170 números de accesiones diferentes para las pasifloras (Valencia *et al.*, 2010). El maracuyá y la gulupa (*P. edulis*), representan 18 accesiones, de las cuales se ha evaluado el potencial de aprovechamiento del fruto (Fajardo *et al.*, 1998).

Al realizar un reconocimiento del potencial de recursos genéticos, se debe partir de una información que incluye, colecta, sitio de localización, características para identificar, condiciones del sitio y nombres dados en la colecta (International Plant Genetics Resources Institute [IPGRI], 1991). Con el fin de encontrar atributos específicos, se ha documentado que en cinco pasifloras ya se ha realizado dicho mapeo en los países andinos (Segura *et al.*, 2003). En cuanto a estudios en especies de pasifloras en Colombia, la institución Agrosavia se ha enfocado en las siguientes áreas: área de interpretación de aspectos físicos y químicos (Medina y Lobo, 2000; Medina *et al.*, 2004), estudios a nivel molecular (Fajardo *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2002), y química (Medina y Lobo, 2000 a; Medina y Lobo, 2000b). En cuanto a mejoramiento de frutales andinos en pasifloras, se cuenta con estudios como la colecta, caracterización e hibridación de pasifloras, con énfasis en el grupo de las curubas (*Tacsonia*), emprendidos por la Universidad de Caldas (Restrepo, 2000).

Para un desarrollo de mejores cultivos con alta productividad, calidad óptima y resistencia, juegan un papel muy importante los recursos fitogenéticos, los cuales se definen como las

posibles combinaciones que generan nuevas especies que evolucionan de genes resultantes, donde podemos encontrar especies silvestres que poseen potencial agrícola o genes clonados (Hidalgo, 1991). Cumplen con la función de generar incremento en la producción y sostenibilidad de las naciones, así como de mejoras en el desarrollo de la agricultura. Estos recursos suplen las necesidades de la reducción de pobreza y el sostenimiento de la población, por lo cual son vulnerables y tienden a desaparecer (erosión genética) por causas como la intervención antrópica, el incremento demográfico, el aumento de las industrias y la ampliación de la frontera agrícola, la adopción de germoplasma élite y la modificación y/o devastación de los centros de variabilidad genética (Ocampo y Merlín, 2014). Esta alerta frente a la pérdida de recursos fitogenéticos muestra la realidad de la necesidad apremiante de conservarlos y generar un uso de manera sostenible, debido a que la pérdida de estos surge una amenaza que pone en constante peligro la solidez de los ecosistemas, el progreso a nivel agrícola y el sustento de la alimentación mundial. Como medida, de acuerdo con Posada (2012), en cuanto a programas de conservación de germoplasma, en algunos países existen instituciones donde se puede observar dicho proceso en el género *Passiflora*. En la Figura 1-8 se puede apreciar las accesiones conservadas por países.

Figura 1-8: Lista de especies de *Passiflora* conservadas en bancos de germoplasma en número de accesiones a nivel mundial. Tomado de Posada (2012) y actualizado para esta investigación.



En Colombia se encuentran algunas instituciones que cuentan con bancos de germoplasma en forma de semilla e *in vivo*:

Tabla 1-1: Instituciones y número de accesiones de Pasifloras conservadas en bancos de germoplasma. Tomado de Posada (2012).

| Institución | No. Accesiones | No. Especies |
|--|----------------|--------------|
| Universidad Nacional de Colombia- Sede Palmira | 70 | 40 |
| Universidad de Nariño | 47 | 12 |
| Universidad de Caldas | 80 | 2 |
| Casa Luker | 50 | 1 |
| Agrosavia | 170 | No reporta |

Colombia posee en la actualidad 141 accesiones conservadas del género *Passiflora* manejadas por Agrosavia a través del Sistema de Bancos de la Nación Colombiana para la Alimentación y la Agricultura (Tabla1-2).

Tabla 1-2: Poblaciones de *Passiflora* en conservación por parte del Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación Colombiana para la Alimentación y la Agricultura. Tomado de: Posada (2012).

| Especie | No. accesiones | Categoría dada por la UICN |
|------------------------------------|----------------|----------------------------|
| <i>Passiflora adenopoda</i> | 8 | LC |
| <i>Passiflora alata</i> | 2 | LC |
| <i>Passiflora ambigua</i> | 1 | LC |
| <i>Passiflora apoda</i> | 1 | LC |
| <i>Passiflora caerulea</i> | 1 | |
| <i>Passiflora capsularis</i> | 2 | LC |
| <i>Passiflora edulis</i> | 18 | LC |
| <i>Passiflora edulis f. edulis</i> | 2 | LC |
| <i>Passiflora foetida</i> | 1 | LC |
| <i>Passiflora gracilis</i> | 1 | LC |
| Pos. híbridos interespecíficos | 10 | |
| <i>Passiflora ligularis</i> | | |
| <i>Passiflora maliformis</i> | 26 | LC |

| | | |
|---------------------------------|------------|----|
| <i>Passiflora manicata</i> | 5 | LC |
| <i>Passiflora mixta</i> | 3 | LC |
| <i>Passiflora mollissima</i> | 2 | LC |
| <i>Passiflora sanguinolenta</i> | 18 | LC |
| <i>Passiflora</i> sp. | 1 | |
| <i>Passiflora tarminiana</i> | 12 | LC |
| <i>Passiflora tiliifolia</i> | 18 | LC |
| <i>Passiflora tripartita</i> | 1 | LC |
| | 8 | LC |
| Total de accesiones | 141 | |

1.8.1. Métodos de conservación

Los métodos de conservación pueden ser de tipo *in situ* o *ex situ*. El método *in situ* se enfoca en conservar la diversidad en el hábitat natural en el que prospera (áreas protegidas, reserva, etc.), mientras que el método *ex situ* conserva los recursos genéticos en total aislamiento de su hábitat natural o de los componentes de la diversidad biológica (colección de plantas, bancos de conservación *in vitro*, bancos de semillas, crioconservación, etc.) que complementan la conservación *in situ* (Hidalgo, 1991).

Las pasifloras son importantes en la salud de los agroecosistemas, debido a que la conservación de estas es vital para la producción agrícola y para preservar un ambiente adecuado. La pérdida de muchas de ellas puede afectar en gran medida algunas especies que dependen de ellas como, las especies de mariposa *Heliconius* y muchos insectos, así como aves que corresponden a la fase de polinización.

Evaluación de la erosión genética: Es necesario caracterizar y evaluar la diversidad genética tanto de especies cultivadas como silvestres de las pasifloras para generar la prevención de la erosión genética. Se han documentado innumerables estudios en los que se denota que estas especies poseen variabilidad genética intra e interespecífica (Yockteng *et al*, 2011); donde la especie *P. elegans* Mast., es de la cual se tiene información que posee una tasa de baja variabilidad genética (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005). En algunos estudios se ha generado la comparación en cuanto a diversidad genética de especies silvestres (*P. mixta* L. f.) y especies cultivadas (*P. tripartita* var. *mollissima* y *P. tarminiana*) reportándose una variación limitada respecto a las silvestres (Segura *et al.*,

1998, 2002, 2005). En cambio, Bellon *et al.* (2007) en su estudio no reportó diferencias entre accesiones silvestres y cultivadas de las especies *P. edulis*. Por otro lado, Ocampo *et al.* (2007) mencionan que dentro de una especie se puede haber una alta diversidad, debido a que en muchas especies de *Passiflora* existe la presencia de tipo biparental del genoma del cloroplasto. En cuanto a las especies cultivadas, Vieira y Carneiro (2004) mencionan que el ataque de los patógenos puede causar erosión genética a través del tiempo.

Conservación *in situ*: Estos enfoques de conservación *in situ* se limitan a pasifloras ubicadas en áreas protegidas y no es considerada la adecuada cuando la presión humana es alta. La mayor parte de la diversidad de géneros se ubica en las laderas de la zona cafetera (Ocampo *et al.*, 2007), región con alta población y gran perturbación, sin áreas protegidas. A pesar de ello, muchas de las pasifloras endémicas de Colombia (58 especies) se encuentran en estas laderas, que cada vez presentan mayor afectación por la deforestación, generando amenaza y alto riesgo de extinción. Es aquí donde se despierta la necesidad de generar medidas para conservar la biodiversidad en la gestión de actividades agrícolas, áreas recreativas y recursos hídricos (Ocampo *et al.*, 2007).

En cuanto a documentación sobre la diversidad de las pasifloras y sus estados de amenaza, Jorgensen *et al.* (2009), lograron establecer una distribución geográfica de algunas especies y estimaron su grado de amenaza, situados en el subgénero *Decaloba*. Se encontró que el 40% de estas especies están catalogadas como vulnerables o en peligro de extinción, mientras que el otro 40% no presenta ningún tipo de amenaza (Jorgensen, 2009)

Conservación *ex situ*: En las pasifloras, la conservación de sus recursos genéticos principalmente se genera en ambientes fuera de su hábitat, siendo estos jardines botánicos y colecciones de germoplasma, que se mantienen por institutos de orden nacional. Según Ferreira (2005), en todo el mundo existen alrededor de más de 50 colecciones de *Passiflora* y las accesiones van en aumento en los últimos años, pasando de 524 en 1994, 1235 registradas en 2004 a 2274 actualmente. Se hace necesario el aumento de la variabilidad genética en colecciones de germoplasma.

Crioconservación: Es una estrategia y una técnica eficaz en las pasifloras, que permite conservar semillas a largo plazo tanto en especies silvestres como cultivadas. Se basa en el almacenamiento del material vegetal en nitrógeno líquido, a una temperatura inferior a -150°C, donde se reduce el metabolismo celular y el deterioro (Silva *et al.*, 2017). Para realizar esta estrategia, es necesario conocer la tolerancia a la desecación de las semillas. En cuanto a la documentación sobre este método se ha aplicado en especies como: *P. coccinea*, *P. edulis*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. morifolia*, *P. setacea*, *P. suberosa* y *P. tenuifolia*, mostrando que dichas especies pueden crioconservarse con desecación previa o sin ella (De Jesus *et al.*, 2022). Así como en las especies anteriormente mencionadas en las que ha sido aplicada la crioconservación, en el estudio Veiga *et al.* (2013) las semillas de *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. coriacea*, *P. edulis*, *P. giberti* y *P. morifolia* se pueden desecar en contenido de 2.1 a un 3.6% de humedad relativa y llevar a crioconservación, mientras que las de *P. foetida*, *P. micropetala*, *P. mucronata* y *P. nitida* se pueden crioconservar entre 6,1 y el 7,3% de humedad relativa. Se busca que se amplíen dichos estudios en especies silvestres, que son de importancia para el mejoramiento genético, y que generan ventajas en cuanto a resistencia a plagas y enfermedades.

La técnica de la crioconservación de semillas con nitrógeno líquido ha sido implementada por Bioversity (antes IPGRI) y el CIAT en algunas especies de *Passiflora* (Hong y Ellis, 1996), pero hasta la fecha no existe una colección representativa conservada bajo este sistema.

1.9. Cultivos de tejidos

El término de cultivo de tejidos vegetales se asocia a los distintos procedimientos y técnicas empleados que se realizan a un explante para mantener y hacer crecer sus células, tejidos u órganos en condiciones ambientalmente controladas, como temperatura, humedad, etc., cuyo fin es el de conducir a la regeneración de tejidos organizados o desorganizados, células, embriones, polen, meristemos y/o plántulas, que se cultivan asépticamente en un medio enriquecido químicamente, generando copias idénticas o que pueden ser modificadas genéticamente a posteriori (Roca y Mroginski, 1991). Esta técnica de conservación muestra sus primeros estudios desde 1950 con el objetivo de preservar especies o genotipos de interés comercial bajo condiciones controladas de laboratorio (Perea y Tirado, 2011).

El cultivo de tejidos, según Salazar (2010) es útil en diversas especies vegetales, donde se pueden realizar procesos como la obtención de semillas sintéticas, eliminación de virus y enfermedades, producción de metabolitos secundarios, micropropagación clonal, uso de protoplastos, ingeniería genética, rescate de especies en vía de extinción, cultivo embrionario, entre otros. Esta técnica está asociada con la conservación de especies que se encuentren en peligro crítico o altamente vulnerables, ya que tiene el potencial de inducir tasas altas de reproducción que ayudan a establecer la disponibilidad y viabilidad de diversos recursos naturales, por ejemplo, el almacenamiento y mantenimiento del germoplasma.

1.10. Micropropagación *in vitro*

Es una técnica *in vitro* que sirve para la propagación masiva de material vegetal, en la que se obtienen plantas que se propagan asexualmente en una forma eficiente, incluso acortando el tiempo de producción, donde se debe contar con espacios, reactivos y equipos para generar nuevos protocolos de micropropagación de diferentes especies, las cuales al final del proceso deben estar libres de patógenos (Villalobos y Thorpe, 1991).

Según Murashige (1974) dentro de la técnica de micropropagación existe tres etapas fundamentales: 1. Desinfección, 2. Introducción y multiplicación de brotes y 3. El enraizamiento y la preparación para su trasplante al suelo (control de caracteres ambientales en invernadero, temperatura del entorno, sustrato, luz y humedad relativa. etc.).

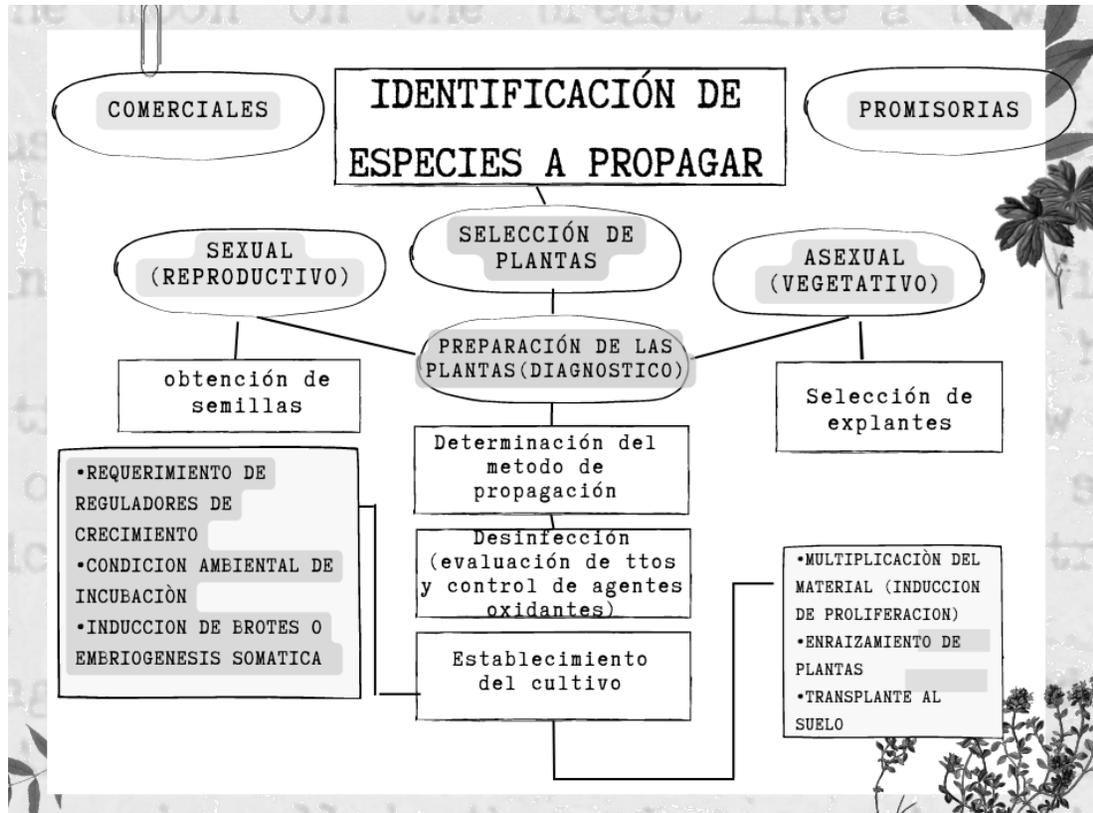
Antes de realizar cada uno de los pasos fundamentales, conviene aclarar que se considera una etapa inicial o etapa 0, que se centra en la obtención y selección de la planta madre y explantes adecuados (yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc.) de la especie que se espera propagar (Pierik, 1990; De Klerk *et al.*, 1997).

- Establecimiento del cultivo aséptico: Después de la selección del explante adecuado con las mejores condiciones, se requiere realizar un proceso de desinfección con el fin de eliminar microorganismos que pueden crecer en el medio de cultivo (bacterias y hongos). “Para esta desinfección se han utilizado distintos compuestos, dentro de los cuales podemos encontrar las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, alcohol a diferentes

porcentajes, etc.” (Pierik, 1990, p. 301). Para realizar una adecuada selección y una óptima concentración de las soluciones desinfectantes y el tiempo de desinfección es primordial el tipo de explante, el cual debe mantenerse en muy buenas condiciones asépticas.

- Crecimiento del explante: En este estado, el explante se desarrolla y se multiplica mediante la formación de brotes adventicios, según las condiciones que posea el cultivo y la concentración de los reguladores de crecimiento. Existe una fase en la cual se puede visibilizar la aparición de callogénesis, la cual debe evitarse cuando la finalidad es la propagación clonal, recordando que la generación de callos puede llegar a causar variación somaclonal, donde dicho cambio puede ser de tipo epigenético o a partir de mutaciones verdaderas (Larkin y Scowcroft, 1981)
- Enraizamiento de los brotes y preparación para su trasplante: Posterior a la propagación *in vitro* se debe generar el enraizamiento de los brotes, lo cual se basa en llevar los explantes a un medio cuya concentración de sales sea muy baja, pero con alta concentración de una auxina (generalmente AIB) y sin citoquininas. Por ejemplo, en el medio de MS (Murashige *et al.*, 1962), se ha logrado dicho proceso con la disminución del 50% de las concentraciones con resultados efectivos en varias especies, a través de la dilución. Asimismo, debe realizarse un cambio en el balance de los respectivos reguladores de crecimiento, reduciendo las citocininas y elevando las auxinas exógenas (Thorpe, 1980).

Figura 1-9: Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* para la propagación de especies de interés agroalimentario.



*Nota: **Tomado de:** Gonzales (2004). proyecto de uso sostenible de los recursos vegetales del distrito capital y la región.

1.11. Germinación *in vitro* de semillas de *Passiflora*

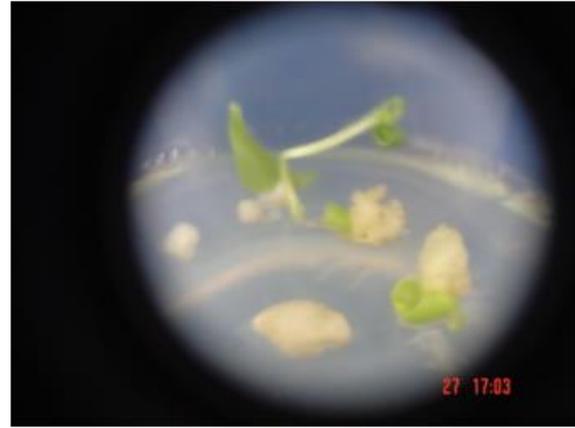
Este proceso beneficia a los agricultores en calidad y control sanitario referente al material vegetal, una técnica que aparte de ser un método de propagación, va de la mano con la conservación y genera un primer paso en la certificación de materiales (Food Agriculture Organization - FAO, 2000).

Este tipo de propagación en semillas y embriones en cuanto a los tipos de material vegetal genera enormes ventajas, como ejemplo, en las orquídeas su semilla posee un tamaño muy pequeño, pero con una masa compuesta de varias células, se ve afectada su germinación por inhibidores que se asocian a las semillas latentes (Villalobos y Thorpe, 1991).

La testa de las semillas de *Passiflora* está compuesta de numerosas células, generalmente lignificadas, esta composición afecta la absorción del agua y además en cierta medida el crecimiento del embrión, como se ha demostrado en otras semillas (Bewley y Black, 1982).

La propagación *in vitro* en pasifloras se enfoca principalmente en el uso de explantes como embriones, cotiledones, yemas axilares y discos foliares, dando como resultado plantas libres de contaminantes biológicos, brindando un proceso biotecnológico con estándares de calidad en la planta, mejor producción de plantas libres de contaminantes asociado a sistemas *in vitro*, permitiendo el establecimiento de plantaciones uniformes, además de otros fines como la conservación del germoplasma para evitar la erosión genética de la especie y contribuir a mejorar la calidad del fruto (cultivos resistentes y de mayor rendimiento), por eso siempre se enfatiza en que el explante original presenta características favorables. Frente a las diferentes alternativas que existen para la producción de materiales vegetales en pasifloras, esta es la que ofrece grandes beneficios en dicha producción (Roca y Mroginski, 1997; Perea y Tirado, 2011). La propagación de las especies de pasifloras se puede generar por vía sexual y asexual (Miranda *et al.*, 2009), si se realiza a través de la semilla esto dependerá de la maduración que posea el fruto, ya que si esta maduración no es pertinente la germinación tendrá un porcentaje bajo; Gonzales (2004), realizó micropropagación a través de la inducción de germinación *in vitro* y rescate de embriones en *P. cumbalensis*. En la Figura 1-10 se observan semillas de pasifloras en medio MS, donde se observa el inicio de la germinación de los embriones rescatados y semillas en medios sin reguladores de crecimiento, como un ejemplo de algunas investigaciones realizadas en la propagación de pasifloras a través de semillas germinadas *in vitro*.

Figura 1-10: Micropropagación *in vitro* en *P. cumbalensis*. Tomado de: Gonzales (2004). proyecto de uso sostenible de los recursos vegetales del distrito capital y la región.



1.12. Prueba de viabilidad de semillas

Esta técnica detecta la actividad metabólica de diferentes tipos de semillas específicamente de su embrión, para determinar la viabilidad de las semillas que presentan latencia o muy bajas tasas de germinación. La determinación de tetrazolio tiene la ventaja de que se puede realizar rápidamente y sin equipo especializado. Esta prueba consolida reacciones químicas oxidativas, que al realizar la liberación de electrones reducen sustancias químicas, se da la activación de vías metabólicas, por lo cual, se puede estimar el respectivo nivel en los tejidos del embrión y su viabilidad (ISTA, 1996).

La actividad metabólica nombrada anteriormente se puede detectar a través de la sal de tetrazolio, sales que poseen soluciones (cloruro o bromuro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) incoloras, pero que al entrar en contacto con la reducción de ciertas sustancias su tonalidad cambia a rojo intenso denominado trifenílformazán.

La semilla viva al ser sumergida en solución de tetrazolio da una tonalidad rojo oscuro, debido a que los electrones liberados en los tejidos embrionarios desalinizan el tetrazolio. El embrión no presenta tinción, si la semilla no presenta viabilidad (ISTA, 1996).

1.13. Investigaciones sobre la aplicación de cultivos *in vitro* en *Passiflora*

Tabla 1-3: Investigaciones sobre la aplicación de cultivos *in vitro* en *Passiflora*. Compilado por el autor

| MEDIO DE CULTIVO Y REGULADORES DE CRECIMIENTO mg. l-1 | | | | | | |
|---|---|---|--|--|----------------------------------|------------------------------|
| EXPLANTE /SP. | MULTIPLICACION | ELONGACION | ENRAIZAMIENTO | VIA DE REGERENACION | ESTABILIDAD GENETICA | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS |
| Discos foliares <i>Passiflora edulis</i> . | MS+NAA (2) + IAA (2) + KIN (0.4) | | | Organogénesis directa | No se evaluó | Amugune <i>et al.</i> (2011) |
| Cotiledón, hipocótilo y tejido foliar <i>Passiflora edulis Sims f. flavicarpa. P. mollissima</i> . | MS + NAA (0.0, 1.0, and 2.0) y BA (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0) 10%agua de coco | MS+ BA (2) Y 10.0% de CW | MS+ sin reguladores NAA (1) | Organogénesis directa | NAA inhibe generación de brotes. | Dornelas y Vieira (1994) |
| Discos foliares <i>Passiflora edulis</i> | MS+ Benzil-amino-purina (BA) (0; 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2) | MS+ Benzil-amino-purina (BA) (0; 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2) | MS+ sin reguladores | Organogénesis indirecta y directa (BA-1.2) | | Otahola y Diaz (2000) |
| Discos foliares <i>Passiflora edulis, Passiflora mollissima</i> | MS+ BAP (1) + KIN (0.5) MNN+ BAP (3) + KIN (2) | | AUXINAS ENDOGENAS MS- sin reguladores | Organogénesis directa e indirecta | No se evaluó | Becerra (2003) |
| Discos foliares <i>Passiflora mollissima</i> | MNN+ BA (0;0.5; 1; 2, 3) + KIN (0;0.5; 1,2.5,3) | MNN+ BA (0;0.5; 1; 2, 3) + KIN (0;0.5; 1,2.5,3) | MNN+ BA (0.5; 1; 2) + KIN (0;1,2.5) | Organogénesis indirecta | No se evaluó | Leal (2003) |
| Semillas <i>Passiflora caerulea L.</i> | Corte extremo chalazal MS+ Sacarosa 2% Alternancia de temperatura | | | | | Severin <i>et al.</i> (2004) |

| Tabla 1-3: (Continuación) | | | | | | |
|---|--|----------------------------------|--|---|---|-----------------------------------|
| EXPLANTE /SP. | MULTIPLICACION | ELONGACION | ENRAIZAMIENTO | VIA DE REGERENACION | ESTABILIDAD GENETICA | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS |
| láminas y segmentos nodales <i>Passiflora alata</i> | WPM- BA (0.0; 1.0; 2.0 mg. L-1). | WPM- BA (0.0; 1.0; 2.0 mg. L-1). | WPM/2 + AIA (0.5) Necrosis en laminas | Organogénesis directa | Presencia de estabilidad genética | Albacete (2007) |
| Hojas e hipocótilos <i>Passiflora edulis</i> <i>Sims f. flavicarpa</i> | MS- BAP (1) | | | Organogénesis directa e indirecta (hipocótilo) organogénesis directa (hojas) | presencia de estabilidad genética en organogénesis directa | Fernando et al. (2007) |
| Discos foliares, raíz, plántula <i>Passiflora Cincinnata</i> | MS- 6 BA (0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0). | | | Organogénesis indirecta | No se evaluó | Lombardi <i>et al.</i> (2007) |
| Segmentos nodales, internodales y foliares. <i>Passiflora suberosa.</i> | MS o MSM TDZ (4,54, 13,2, 22,7, 31,8, 45,4 µM), 2, 4-D (4.5, 13.5, 22.6, 31.6, 45.2 µM), NAA (5.4, 16.2, 26.9, 37.8, 54 µM), picloram (4.14, 12.4, 20.7, 28.9, 41.4 µM), o BA (4.4, 13.2, 22.0, 31.0, 44.4 µM) usado solo o en combinación con NAA (0, 2.7, 5.4 µM) | MSM o MS | ½ MSM o MS | Organogénesis directa | Presencia de estabilidad genética. Entrenados con BA | García <i>et al.</i> (2011) |

| Tabla 1-3: (Continuación) | | | | | | |
|---|---|--|---|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| EXPLANTE /SP. | MULTIPLICACION | ELONGACION | ENRAIZAMIENTO | VIA DE REGERENACION | ESTABILIDAD GENETICA | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS |
| <i>Passiflora cumbalensis</i> semillas, secciones foliares y segmentos nodales | Escarificación mecánica MS + caseína hidrolizada 100 ppm, vitaminas Gamborg y AG ₃ 2 ppm | MS con modificación en las soluciones de nitrógeno al 75% | | | | Córdoba <i>et al</i> (2010) |
| <i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollisima</i> semillas | MS + ácido ascórbico 100 ppm +caseína hidrolizada 200 ppm+ vit Gamborg+ AG3 2 ppm. | MS sin fitorreguladores | Medio ½ MS | | | Córdoba <i>et al</i> (2010) |
| Embriones cigóticos y yemas axilares <i>Passiflora edulis</i> | 24 h imbibición con AG ₃ 2.88 µm- 4.33 µm EMB =MS+ BAP (T0: 0 µm, T1: BAP 2,22 µm, T2: BAP 4,44 µm, T3: BAP 6,66 µm) YA= MS+ AG ₃ 0,58 µm+ BAP 2.22 µm, 4.44 µm+ kinetina 0- 4.65 µm | 25 tratamientos BAP y Kin, M&S + AG ₃ 0,58 µm. | | Embriogénesis | | Manjarres y Perea (2012) |
| Hoja, hipocótilo, raíz <i>Passiflora setacea</i>. | MS-6 BA (1) MS- TDZ (0.5) MS-BA+TDZ | MS- AG ₃ (2.88 µM) | IBA (1) 10 ¹ DDL (Plantmax) | Organogénesis directa e indirecta | Presencia de estabilidad genética | Vieira <i>et al.</i> (2014) |
| Semillas maduras de <i>P. maliformis</i> | Escarificación manual MS- vit B5 2,4-diclorofenoxiacético (2,4- D), 6-bencilaminopurina (BA) y Kinetina (KIN) | MS sin RC+ 3000 mgL ⁻¹ de carbón activado | MS +3000 mgL ⁻¹ de CA | Embriogenesis | | Bernal <i>et al.</i> (2018) |

1.14. Especies estudiadas

1.14.1. *Passiflora quimbayensis* Ocampo & Forero

Esta especie pertenece al subgénero *Decaloba* y es endémica de Colombia en los departamentos de Caldas, Quindío, Risaralda y Norte del Valle del Cauca, en la Cordillera Central, entre los 1072 a 1248 m s.n.m (Ocampo *et al.*, 2018). Esta especie crece en áreas con suelos derivados de cenizas volcánicas, con un alto contenido de materia orgánica y una textura arcillosa; la temperatura media anual en la que se suele encontrar es de 22,4 °C y la precipitación anual es de 1890 mm (precipitación regular); radiación solar de 5 a 6 horas por día (Fick y Hijmans, 2017).

Debido a sus llamativas características físicas, es muy utilizada como planta ornamental, no es de consumo humano, pero sí de diversas aves, además de esto posee compuestos que aportan a la industria farmacéutica, como la pasiflorina que se puede usar como tranquilizante en la producción de ansiolíticos.

Esta especie califica como categoría B2a, su área de ocupación se estima en menos de 500 Km² (28 km²) y su rango de ocurrencia es menos de 5000 km² (956,68 km²); los hábitats están severamente fragmentados y se sabe que existe en siete lugares cuya ubicación se precisa en Caldas, Quindío, Risaralda y Norte del Valle del Cauca. Con respecto al criterio D, el tamaño de la población se estima en menos de 50 individuos maduros, con solo tres plantas observadas durante los viajes de recolección, el estado de conservación de esta especie debe clasificarse como En Peligro Crítico (CR; UICN 2017).

Figura 1-11: Flores de *Passiflora quimbayensis*. Foto: John Ocampo.



1.14.2. *Passiflora kumandayi* M.A. Buitrago A. & Coca

Esta especie pertenece al subgénero *Decaloba* y es endémica de Colombia en los departamentos de Caldas y Tolima, en los bosques Altoandinos de los Andes centrales de Colombia, entre 3000 y 3600 m s.n. m. Crece a una temperatura entre 12 y 18 °C. La especie ha sido colectada en flor y en fruto entre diciembre y enero; en marzo esta especie permanece estéril. Se han observado escarabajos errantes (*Staphylinidae*) visitando las flores de esta especie (Buitrago *et al.*, 2018). Crece en vegetación arbustiva, en áreas fragmentadas por la agricultura y sujeta a futuros desarrollos urbanos para la industria del turismo, poniendo a esta especie en peligro inminente. Así, según el criterio de extensión de ocurrencia (EOO de 0,458 km²) y el continuo descenso del área de ocupación (AOO de 8.000 km²), el estado de conservación de esta especie debe clasificarse como Peligro Crítico (CR; UICN 2017).

Figura 1-12: Flor de *Passiflora kumandayi*.



*Nota: Tomado de *Passiflora kumandayi* (*Passifloraceae*), a new species from the Colombian Andes in a new section within subgenus *Decaloba* (Buitrago *et al.*, 2018)

1.14.3. *Passiflora sp. nov.*

Esta nueva especie pertenece al subgénero *Passiflora* y es endémica de Colombia, la cual se encuentra en proceso de descripción y publicación (com. pers. John Ocampo) y se distribuye en la región Andina del departamento de Antioquia en Colombia entre los 1700 a 2100 m s.n.m. *Passiflora sp. nov.* pertenece a la Sección Laurifolia, Serie Tiliifolia y morfológicamente es similar a la granadilla común (*P. ligularis*), el estado de conservación de esta especie debe clasificarse como Peligro Crítico (CR; UICN 2017).

Esta especie se diferencia de *P. ligularis* en el tamaño del fruto y hojas trilobuladas principalmente, hábito trepador. En cuanto a su morfología floral, sus tonalidades son violeta, con dimensiones que varían entre los 7 a 10 cm, se consolidan en un nudo, usualmente dos de ellas, los pétalos presentan tonalidades blancas rosáceas y resaltan moteados de color azul púrpura, presentando una estructura redondeada. En cuanto a zonas de cultivo, principalmente son planas e inclinadas, suelos ricos en materia orgánica y cuyo pH es favorable, ya que se establece entre los 6 y 6.5.

Figura 1-13: Flor de *P. sp. nov.* Foto: John Ocampo.



1.14.4. *Passiflora ligularis* Juss.

Esta especie pertenece al subgénero *Passiflora* y se distribuye desde México hasta Bolivia, en los Andes tropicales, principalmente entre los 1500 y 2500 m s.n.m (Killip, 1938). En cuanto a importancia económica, la granadilla ocupa el segundo lugar del género *Passiflora*, posee gran comercialización por su sabor y valor a nivel nutricional en mercados nacionales e internacionales (Yockteng *et al.*, 2011; Arias *et al.*, 2015). Colombia, Perú y Ecuador son los principales productores (Agronet, 2011).

La granadilla presenta flores hermafroditas, polinización alógama, realizada por *Xylocopa* spp. y *Epicharis* spp. (Snow y MacDougal, 1993; Franco *et al.*, 2007). Existen un incremento en la productividad, debido al flujo genético que provee el intercambio del polen entre dichas plantas, lo que también beneficia en gran medida la variabilidad (Arias *et al.*, 2015). La fruta de esta especie ha logrado llegar a varios mercados desde Europa, Asia, Norteamérica, Centroamérica y Suramérica, generando ganancias en la economía de los campesinos y la exportación de Colombia (Parra, 2013). El estado de conservación de esta especie debe clasificarse como Preocupación menor (LC; UICN 2017).

Figura 1-14: Flor de la granadilla común (*P. ligularis*). Foto: John Ocampo.



2. Contexto de la tesis

El presente trabajo surge como iniciativa del Grupo de Investigación en Recursos Fitogenéticos (GIRFIN) de coleccionar y conservar especies endémicas en Colombia, que actualmente se encuentran amenazadas (Peligro Crítico – CR) y su hábitat disturbado o destruido. Por lo tanto, esta investigación tiene como objetivos estudiar las características morfológicas de las semillas, la viabilidad y la germinación, e igualmente establecer un protocolo *in vitro* en tres especies endémicas colombianas y una cultivada del género *Passiflora* que permitan su conservación *ex situ*. Este protocolo permitirá acelerar el proceso de la producción de material de siembra (propagación masiva) que por su bajo nivel de poblaciones en áreas restringidas son consideradas endémicas y a su vez contribuir con la propagación y recuperación de estas mismas para evitar eventos de extinción y/o de erosión genética.

Igualmente, uno de los obstáculos en las especies del género *Passiflora* es la baja germinación de las semillas, esto se presenta debido a las características a nivel estructural de su testa lignificada y su cubierta seminal, la cual genera una latencia exógena mecánica que genera dificultad en su porcentaje germinativo, por lo que es necesario buscar alternativas para romper la latencia y generar cultivos uniformes.

En Colombia, 23 especies de este género se encuentran amenazadas y/o en peligro de extinción, según el reporte de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 2017) y los estudios de Ocampo *et al.* (2007), situación que se podría evitar, por lo cual se hace necesario buscar alternativas que apoyen la conservación en bancos de germoplasma para preservar la variabilidad genética y las poblaciones de dichas especies a través de la construcción de protocolos *in vitro* (Pacheco *et al.*, 2009).

En la actualidad las técnicas de propagación *in vitro* aportan al mejoramiento de los porcentajes de germinación o proliferación, a la conservación de la diversidad genética y a las múltiples aplicaciones en programas de mejora genética en especies amenazadas (Dodds, 1991). Se logra evidenciar que es muy poca la información de estudios o

investigaciones referentes a protocolos de germinación *in vitro* en semillas de las especies evaluadas, para su posterior micropropagación e implementación en programas de conservación, lo cual se requiere de manera urgente, esto debido a que en Colombia se evidencia la mayor diversidad de especies en este género y 9,8% se encuentran amenazadas por múltiples actividades antrópicas y naturales.

3. Objetivos

3.1. General

Estudiar la morfología, viabilidad y germinación *in vitro* en semillas de cuatro especies del género *Passiflora* L. distribuidas en Colombia.

3.2. Específicos

- Estudiar las características morfológicas, la viabilidad y la germinación de las semillas de tres especies silvestres endémicas de Colombia en Peligro Crítico (*P. quimbayensis*, *P. kumandayi* y *P. sp. nov.*) y una cultivada (*P. ligularis*) del género *Passiflora*.
- Evaluar el potencial germinativo en semillas de tres especies endémicas colombianas del género *Passiflora* (*P. quimbayensis*, *P. kumandayi* y *P. sp. nov.*), en condiciones de invernadero.
- Desarrollar un protocolo de conservación a partir de una técnica *in vitro* en semillas de tres especies silvestres endémicas de Colombia en Peligro Crítico (*P. quimbayensis*, *P. kumandayi* y *P. sp. nov.*) y una cultivada (*P. ligularis*) del género *Passiflora*.

4. Materiales y métodos

4.1. Área de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos y en el invernadero casa de malla de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, localizada en el municipio de Palmira (Valle del Cauca) a 980 m s.n.m. La investigación se desarrolló en cuatro etapas: caracterización morfológica de la semilla, evaluación de la viabilidad, germinación de las semillas en vivero y propagación en cultivo *in vitro* de las semillas.

4.2. Material vegetal

En la investigación se estudiaron las semillas de cuatro especies del género *Passiflora* representadas en los subgéneros *Decaloba* (*P. kumandayi* y *P. quimbayensis*) y *Passiflora* (*P. sp. nov.* y *P. ligularis*) conservadas en frío (7-8 °C) entre 70-75% de Humedad Relativa en el banco de semillas de la UNAL Palmira (Tabla 1- 4). En el caso de las especies silvestres, el número de las semillas es limitado (200 a 300 semillas por especie), debido a la dificultad de obtener frutos en su hábitat natural y por tal razón los ensayos fueron realizados con una muestra mínima estadísticamente significativa, y de esa manera mantener el número adecuado de semillas en conservación en banco.

Tabla 1-4: Especies del género *Passiflora* empleadas en el estudio.

| Espece | Distribución | Altitud | Origen acesión | Clasificación taxonómica | Estatus de conservación |
|------------------------|---|------------------------|-----------------------|-----------------------------|---|
| <i>P. quimbayensis</i> | Caldas, Quindío, Risaralda, y el norte del Valle del Cauca | 1072 - 1249 Msnm | Palestina (Caldas) | <i>Decaloba/Decaloba</i> | Silvestre En Peligro Critico (CR) |

| | | | | | |
|---------------------|--------------------|------------------------|-----------------------------|---|---|
| <i>P. sp. nov.</i> | Antioquia | 1700 – 2050 Msnm | Liborina (Antioquia) | <i>Passiflora/Laurifolia/ Tiliifoliae</i> | Silvestre En Peligro Crítico (CR) |
| <i>P. kumandayi</i> | Caldas y Tolima | 3000 - 3600 msnm | Villamaría (Caldas) | <i>Decaloba/Auriculata/ Apodae</i> | Silvestre En Peligro Crítico (CR) |
| <i>P. ligularis</i> | México a Perú | 1700- 2300 msnm | Manizales (Caldas) | <i>Passiflora/Laurifolia/ Tiliifoliae</i> | Cultivada Preocupación Menor (LC) Silvestre Vulnerable (VU) |

4.3. Preparación y caracterización de la semilla

Las semillas de cada especie pasaron inicialmente por una fase de preparación con una inmersión en agua destilada durante 4 días para luego retirar el arilo. Posteriormente, las semillas se lavaron con agua estéril para retirar los residuos existentes y se secaron en papel absorbente durante 48 horas a temperatura ambiente antes de iniciar las pruebas de viabilidad y germinación. Adicionalmente, 10 semillas por especie fueron tomadas al azar y caracterizadas morfológicamente en las que se tomaron en cuenta las siguientes variables: longitud (mm), ancho (mm), grosor (mm), forma y margen con base en los descriptores propuestos por Pérez *et al.* (2002).

4.4. Prueba de viabilidad

En la evaluación de la viabilidad de las semillas para cada especie estudiada, fue empleado el protocolo de la prueba de tetrazolio siguiendo la metodología establecida por la Association of Official Seed Analysts/Society of Commercial Seed Technologists (Miller y Peters, 2010). Esta metodología consiste en la realización de un preacondicionamiento, el cual se basó en sumergir las semillas en agua destilada en un Erlenmeyer de 50 ml durante un periodo de 24 horas a 30 °C. Posteriormente, las semillas de cada especie fueron escarificadas totalmente de manera mecánica, realizando un corte longitudinal a la testa y dejando expuesto el embrión. Las semillas escarificadas fueron sumergidas en solución de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio) al 1% bajo oscuridad durante 24 horas a 30 °C (Figura 1-15 y 1-16). Aquellos embriones que cumplieron con más del 70% de su área teñida en rojo fueron considerados viables, los que no cumplían con dichas características

se clasificaron como no viables. Para cada especie, el protocolo de Miller y Peters (2010) fue evaluado con tres repeticiones y 10 semillas por cada repetición para establecer los porcentajes de viabilidad. La evaluación de viabilidad permitió conocer cuáles semillas de cada especie podrían ser sometidas a cultivo en vivero y posteriormente a condiciones *in vitro*.

Figura 1-15: Esquema del protocolo empleado para la prueba de viabilidad de semillas. Fuente propia del autor.



Figura 1-16: Preparación de la semilla para la prueba de viabilidad.



4.5. Siembra en vivero

Para la siembra en vivero, las semillas se sometieron a escarificación de despunte apical y luego fueron sumergidas en solución de KNO_3 al 1% por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución con las semillas fue filtrada para eliminar residuos, después se almacenaron en papel absorbente previamente húmedo antes de la siembra.

Las semillas fueron sembradas en casa de malla (Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira) en bandejas plásticas de 20 cm de altura en una mezcla de sustrato comercial a base de fibra de coco y turba en una relación 2:1 (Figura 1-17 y 1-18) y a 1 cm de profundidad. Después de haber establecido las semillas, los riegos fueron realizados con agua convencional cada dos días y las lecturas de germinación se realizaron cada semana hasta llegar a los 60 días, ya que después de esta fecha no se evidenció más germinación. El ensayo para cada especie fue establecido con tres repeticiones y 10 semillas por cada repetición, las cuáles fueron evaluadas bajo la variable porcentaje de germinación (%PG). Los resultados de este ensayo permitieron conocer cuales semillas de cada especie que presentaron viabilidad de acuerdo con la prueba de tetrazolium tenían la capacidad de germinar en vivero o, por el contrario, presentaban latencia exógena.

Figura 1-17: Preparación para siembra en vivero.



Figura 1-18: Esquema del protocolo de siembra en vivero.



4.6. Cultivo *in vitro*

4.6.1. ETAPA 0. Obtención del material vegetal

Para realizar la fase experimental del cultivo *in vitro*, se emplearon las semillas de las especies que presentaron viabilidad de acuerdo con el protocolo de Milley y Peters (2010). Estas semillas procedieron de las mismas accesiones del banco de semillas de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Palmira y del mismo lote con el que fue realizado el protocolo de viabilidad.

4.6.2. ETAPA I. Establecimiento aséptico del cultivo

Las semillas de cada especie fueron lavadas con agua estéril para retirar los residuos del arilo o sarcotesta, posteriormente fueron sumergidas en una mezcla de detergente alcalino al 3% y un antioxidante de ácido ascórbico a 100 mg/l durante 20 minutos. Luego, las semillas fueron lavadas con agua destilada para retirar el exceso de detergente. Así mismo, en una cámara de flujo laminar, las semillas fueron sumergidas en etanol al 70% por 30 segundos. Posteriormente, las semillas de cada especie fueron sometidas a dos tratamientos de desinfección, que consistieron en el uso de dos concentraciones diferentes de hipoclorito de sodio (NaOCl 6 y 7%) durante 20 minutos, con el objetivo de evaluar el tratamiento de asepsia con mayor eficacia. Finalmente, después de haber efectuado cada

tratamiento, las semillas fueron lavadas con agua destilada estéril 3 veces en intervalos de tiempo de 2 minutos, 5 minutos y 10 minutos para eliminar residuos. El ensayo para cada especie evaluada fue establecido bajo un diseño experimental al azar con dos tratamientos, tres repeticiones y 10 semillas por unidad experimental.

4.6.3. ETAPA II Multiplicación del material vegetal

Para la inducción de germinación *in vitro* de las pasifloras estudiadas, se evaluó el medio de Murashige & Skoog (MS) de acuerdo con las condiciones establecidas en las tablas 1-5 y 1-6, el cual fue suplementado con sacarosa en una preparación de 30 g/l, agar 7 g/l, tiamina 7 g/l y adicionando como regulador del crecimiento ácido giberélico (AG₃) en una concentración de 2 mg/l.

Tabla 1-5: Composición del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) utilizado para el cultivo *in vitro* en la regeneración de plantas de las especies estudiadas.

| REACTIVO | | mg / litro |
|---|--|------------|
| Macroelementos | | |
| Nitrato de amonio | NH ₄ NO ₃ | 1650 |
| Nitrato de Potasio | KNO ₃ | 1900 |
| Cloruro de Calcio dihidratado | CaCl ₂ .2 H ₂ O | 440 |
| Sulfato de magnesio heptahidratado | MgSO ₄ .7H ₂ O | 370 |
| Fosfato monobásico de potasio | KH ₂ PO ₄ | 170 |
| | | |
| | | |
| Microelementos | | |
| Sulfato ferroso heptahidratado | FeSO ₄ .7H ₂ O | 27,8 |
| Ácido Bórico | H ₃ BO ₃ | 6,2 |
| Sulfato de manganeso tetrahidratado | MnSO ₄ .4H ₂ O | 22,3 |
| Sulfato de Zinc heptahidratado | ZnSO ₄ .4 H ₂ O | 8,6 |
| Yoduro de Potasio | KI | 0,83 |
| Sulfato cúprico | CuSO ₄ .5 H ₂ O | 0,025 |
| Molibdato de Sodio hexahidratado | Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O | 0,25 |
| Cloruro de Cobalto hexahidratado | CoCl ₂ .6 H ₂ O | 0,025 |
| Etilen diamino tetracetato de sodio dihidratado | NaEDTA.2H ₂ O | 37,3 |
| Vitaminas | | |
| Piridoxina | | 0,5 |
| Tiamina | | 0,1 |

| | | |
|------------------------|--|--------|
| Ácido nicotínico | | 0,5 |
| Hidrolizado de caseína | | 1000 |
| Sacarosa | | 30.000 |
| Agar | | 7000 |

Tabla 1-6: Composición de soluciones stock para medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) utilizado para el cultivo *in vitro* en la regeneración de plantas de las especies estudiadas.

| CONCENT. | No. | COMPUESTO | NOMBRE | mg | VOL. SOL. STOCK | CONCENTRACION SOLUCION |
|------------|----------|---|--------------------------------|-----------|-----------------|------------------------|
| MEDIO | SOLUCION | FORMULA | | | | SOLUCION |
| mg / Litro | | | | | | mg / ml |
| 1650 | 1 | NH ₄ NO ₃ | Nitrato de amonio | 1650 0 | 100 | 165 |
| 1900 | 2 | | Nitrato de potasio | 1900 0 | 100 | 190 |
| 370 | 3 | MgSO ₄ .7H ₂ O | Sulfato de magnesio | 3700 | 100 | 37 |
| 22.3 | 4 | MnSO ₄ .4H ₂ O | Sulfato de manganeso | 223 | 100 | 2.23 |
| 8.6 | | ZnSO ₄ .4H ₂ O | Sulfato de zinc | 86 | | 0.86 |
| 0.025 | | CuSO ₄ .5H ₂ O | Sulfato cúprico | 0.25 | | 0.0025 |
| 440 | 5 | CaCl ₂ .2H ₂ O | Cloruro de calcio | 4400 | 100 | 44 |
| 0.83 | 6 | KI | Yoduro de potasio | 8.3 | 100 | 0.083 |
| 0.025 | | CoCl ₂ .6H ₂ O | Cloruro de cobalto | 0.25 | | 0.0025 |
| 170 | 7 | KH ₂ PO ₄ | Fosfato monobásico de potasio | 1700 | 100 | 17 |
| 6.2 | 8 | H ₃ BO ₃ | Ácido bórico | 62 | 100 | 0.62 |
| 0.25 | | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | Molibdato de sodio | 2.5 | | 0.025 |
| 27.81 | 9 (**) | FeSO ₄ .7H ₂ O | Sulfato ferroso | 278. 1 | 100 | 2.781 |
| 37.81 | | Na ₂ EDTA. 2H ₂ O | Ácido etilendiaminotetracético | 378. 1 | | 3.781 |
| 100 | 10 | C ₆ H ₁₂ C ₆ | Inositol | 1000 | 100 | 10 |
| 0.1 | | C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS.HCl | Tiamina | 1 | 100 | 0.01 |
| 0.5 | | C ₆ H ₅ NO ₂ | Ácido Nicotínico | 5 | | 0.05 |
| 0.5 | | C ₈ H ₁₁ NO ₃ HCl | Piridoxina | 5 | | 0.05 |
| 2 | | C ₂ H ₅ NO ₃ | Glicina | 20 | | 0.2 |

El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 120 °C y 15 libras de presión durante 25 minutos. Asimismo, se ajustó el pH a 5,8.

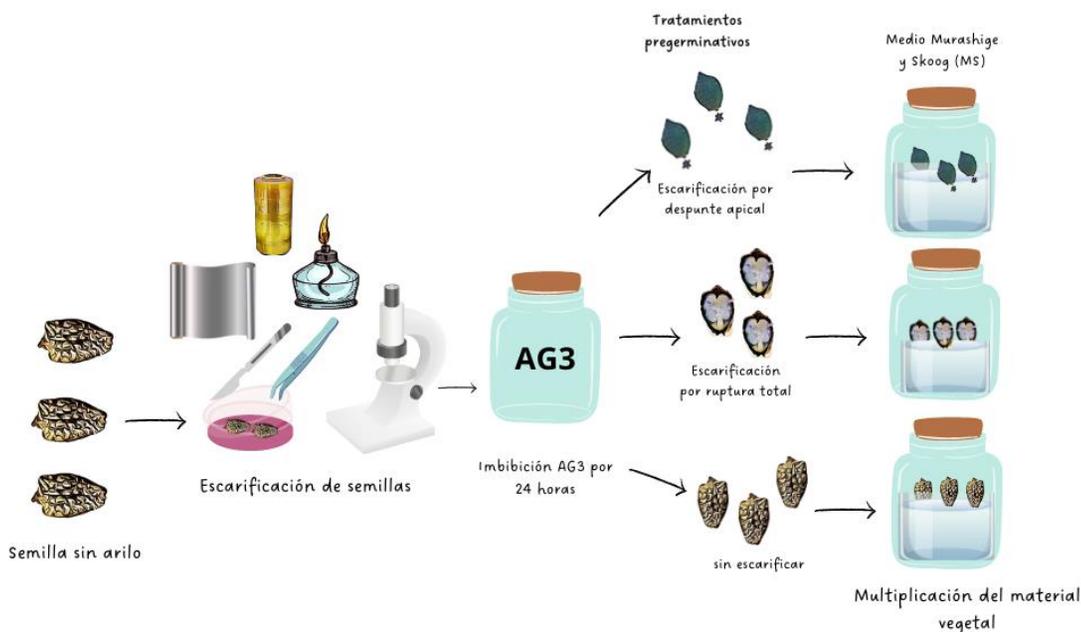
Debido a la estructura que poseen las semillas de *Passiflora* (Figura 1-7) se usaron métodos pregerminativos para aumentar su porcentaje de germinación y romper la latencia exógena y endógena (la cual es causada por diferentes aspectos a nivel del embrión relacionado con el componente hormonal, que impide la protrusión de la radícula). Antes del proceso de escarificación se realizó una imbibición de las semillas en el regulado de

crecimiento ácido giberélico (AG₃) durante 24 horas en las cuatro especies estudiadas (Tabla 1-7). El ensayo para cada especie se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar, con tres tratamientos de escarificación (sin escarificación, escarificación por ruptura total y escarificación por despunte apical) y tres repeticiones, con una unidad experimental de 33 semillas, para un total de 99 semillas por tratamiento. Las semillas de cada especie evaluada fueron sembradas en recipientes de vidrio con una capacidad de 100 ml, el cual contenía 20 ml de cultivo MS suplementado con AG₃, se realizó la siembra de cada embrión en un frasco con el uso de una pinza esterilizada en cámara de flujo laminar, posteriormente los frascos fueron llevados a cuarto de cultivo a una temperatura de 24 °C y un fotoperiodo 16/8; 16 horas de luz y 8 de oscuridad (Figura 1-19).

Tabla 1-7: Tratamientos de escarificación evaluados para inducir la germinación en las especies de *Passiflora* estudiadas.

| Solución AG₃ (mg/l) | Testigo (T0) | Tratamiento 1 (T1) | Tratamiento 2 (T2) |
|---------------------------------------|---------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 2 | Sin escarificar | Escarificación por ruptura total | Escarificación por despunte apical |

Figura 1-19: Esquema del protocolo empleado para la fase de multiplicación del material vegetal



4.6.4. ETAPA III. Estimulación y desarrollo de brotes axilares

Para la estimulación y desarrollo de brotes axilares en este estado, cada explante se multiplicó directamente a partir de la formación de brotes adventicios. Las plantas se transfirieron a un medio de cultivo MS sin fitorreguladores y se dejaron desarrollar para observar las primeras fases de enraizamiento.

Figura 1-20: Esquema del protocolo de germinación de semillas *in vitro*.



4.6.5. Análisis de datos

Los datos de la caracterización de las semillas fueron sometidos a análisis univariado (media, rangos, desviación estándar y coeficiente de variación).

El análisis de datos de las evaluaciones de viabilidad y germinación de las semillas en vivero fue basado en los porcentajes obtenidos por cada repetición.

El ensayo con diseño experimental completamente al azar *in vitro* por cada especie estudiada con diferentes tratamientos y unidades experimentales fue realizado por medio de un análisis de varianza (Andeva) y una prueba de comparación de medias por el método de Tukey con una significación de $P \leq 0,05$. Los datos fueron tabulados, procesados y analizados en Microsoft Excel 2011 y en el software R-Studio usando el paquete "rapportools".

5. Resultados y discusión

5.1. Material vegetal y caracterización de las semillas

El género *Passiflora* posee una amplia variedad de morfología tanto en las estructuras vegetativas como reproductivas (Ocampo y Coppens d'Eeckenbrugge, 2017) y sus semillas (Pérez *et al.*, 2002). Las semillas de las especies estudiadas exhibieron gran variabilidad en forma, tamaño y ornamentación de la testa (Figura 1-21; Tabla 1-8). Las semillas de *P. kumandayi* y *quimbayensis* no superan los 5 mm y 3.2 mm en las variables de longitud y ancho respectivamente; mientras que en *P. sp. nov* y *P. ligularis* los valores observados para todas las dimensiones están por encima de los 5 y 4 mm. Los coeficientes de variación entre las variables evaluadas de cada especie estuvieron entre el 1,18% y el 18,32 %, resaltando a *P. ligularis* con la menor variación promedio (1,68%) y a *P. sp. nov.* con la más alta variación (8,84%). En cuanto a la forma de la semilla se logra contemplar variación entre las especies del subgénero *Decaloba* con una forma ovada y elíptica, contrario a la forma que se presentó en las dos especies del subgénero *Passiflora* la cual es de tipo oblonga. Los resultados en la granadilla (*P. ligularis*) son similares a los reportados por Pérez *et al.* (2002) el cual enuncia poca variación en los caracteres de la semilla, los cuales pueden estar asociados a los procesos de selección y domesticación que se presentan en estas especies cultivadas principalmente en los países de la región Andina (Medina y Lobo, 2006). En contraste, en las especies silvestres evaluadas en este estudio no existen reportes sobre la morfología de sus semillas y los datos presentados en la Tabla 1-8 constituyen información relevante para futuros estudios en semillas del género *Passiflora*.

Tabla 1-8: Caracterización morfológica de las semillas de las especies estudiadas.

| Especie | Variable (mm) | Promedio | Mínimo | Máximo | Desviación Estándar | Coefficiente de Variación (%) | Forma | Margen |
|------------------------|---------------|----------|--------|--------|---------------------|-------------------------------|----------|-----------------|
| <i>P. kumandayi</i> | Longitud | 4,85 | 4,55 | 5,25 | 0,22 | 4,54 | Ovada | Entera |
| | Ancho | 3,01 | 2,85 | 3,19 | 0,12 | 3,99 | | |
| | Grosor | 1,41 | 1,30 | 1,66 | 0,10 | 7,09 | | |
| <i>P. quimbayensis</i> | Longitud | 2,59 | 2,44 | 2,80 | 0,13 | 5,02 | Elíptica | Entera ondulada |
| | Ancho | 1,86 | 1,73 | 2,01 | 0,10 | 5,38 | | |
| | Grosor | 1,00 | 0,84 | 1,13 | 0,11 | 11,00 | | |
| <i>P. sp. nov.</i> | Longitud | 5,53 | 5,00 | 6,00 | 0,50 | 9,10 | Oblonga | Entera |
| | Ancho | 4,36 | 3,00 | 5,00 | 0,60 | 13,82 | | |
| | Grosor | 1,36 | 1,28 | 1,41 | 0,05 | 3,62 | | |
| <i>P. ligularis</i> | Longitud | 7,11 | 7,00 | 7,22 | 0,08 | 1,18 | Oblonga | Entera |
| | Ancho | 4,28 | 4,12 | 4,45 | 0,10 | 2,34 | | |
| | Grosor | 1,78 | 1,75 | 1,83 | 0,03 | 1,52 | | |

En cuanto a las estructuras internas de la semilla se observó que las *Passiflora* estudiadas presentan un embrión de forma espatulada y con variaciones en el tamaño entre las especies comparadas, lo cual corresponde a lo reportado por (Pérez *et al.*, 2002). De esta manera, se evidenció la presencia de un embrión en las especies *P. quimbayensis*, *P. sp. nov.* y *P. ligularis* que ocupa la mayor parte de la semilla con sus respectivos cotiledones rodeados de endospermo. En *P. kumandayi* se observa un embrión un poco más pequeño respecto a las otras especies, pero rodeado de una mayor cantidad de endospermo (Figura 1-22). Lo anterior parece estar relacionado con lo descrito en su estudio por Vega *et al.* (2022) al analizar la parte interna de cada semilla de las especies *P. biflora* y *P. adenopoda* evidenciaron la presencia de un embrión que en su totalidad abarcaba gran parte de la semilla, encontrando una testa dura, así mismo, visualizaron endospermo en mayor cantidad en la especie *P. biflora* y una mayor dimensión del embrión en *P. adenopoda*. Se ha documentado que las semillas de género *Passiflora* presentan un endospermo blanquecino (Pérez *et al.*, 2002).

Figura 1-21: Dimensiones de la semilla de (A) *P. kumandayi*, (B) *P. quimbayensis*, (C) *P. sp.nov.*, y (D) *P. ligularis*. Foto: John A. Ocampo.

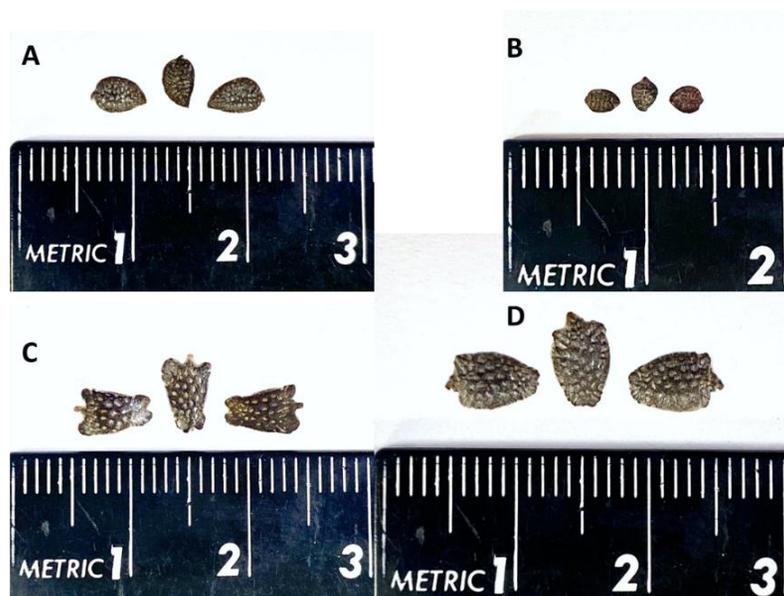
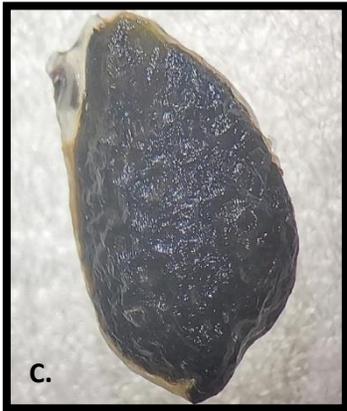


Figura 1-22: *P. quimbayensis* (A) Semilla (B) embrión., *P. kumandayi* (C) Semilla (D) Embrión., *P. sp. nov.* (E) Semilla (F) Embrión., *P. ligularis*. (G) Semilla (H) Embrión

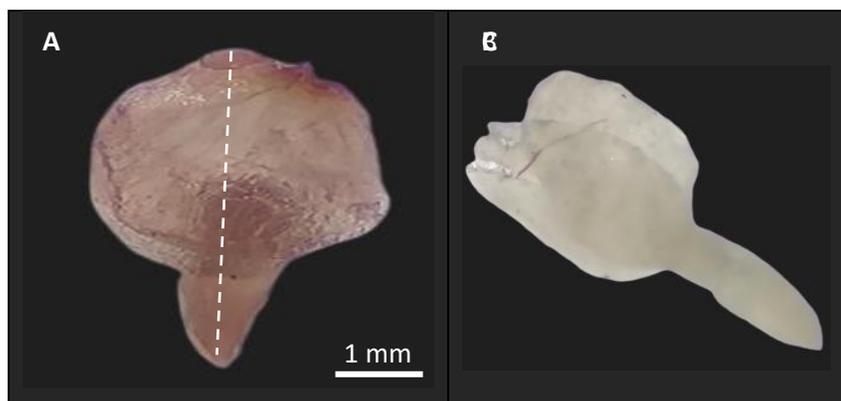


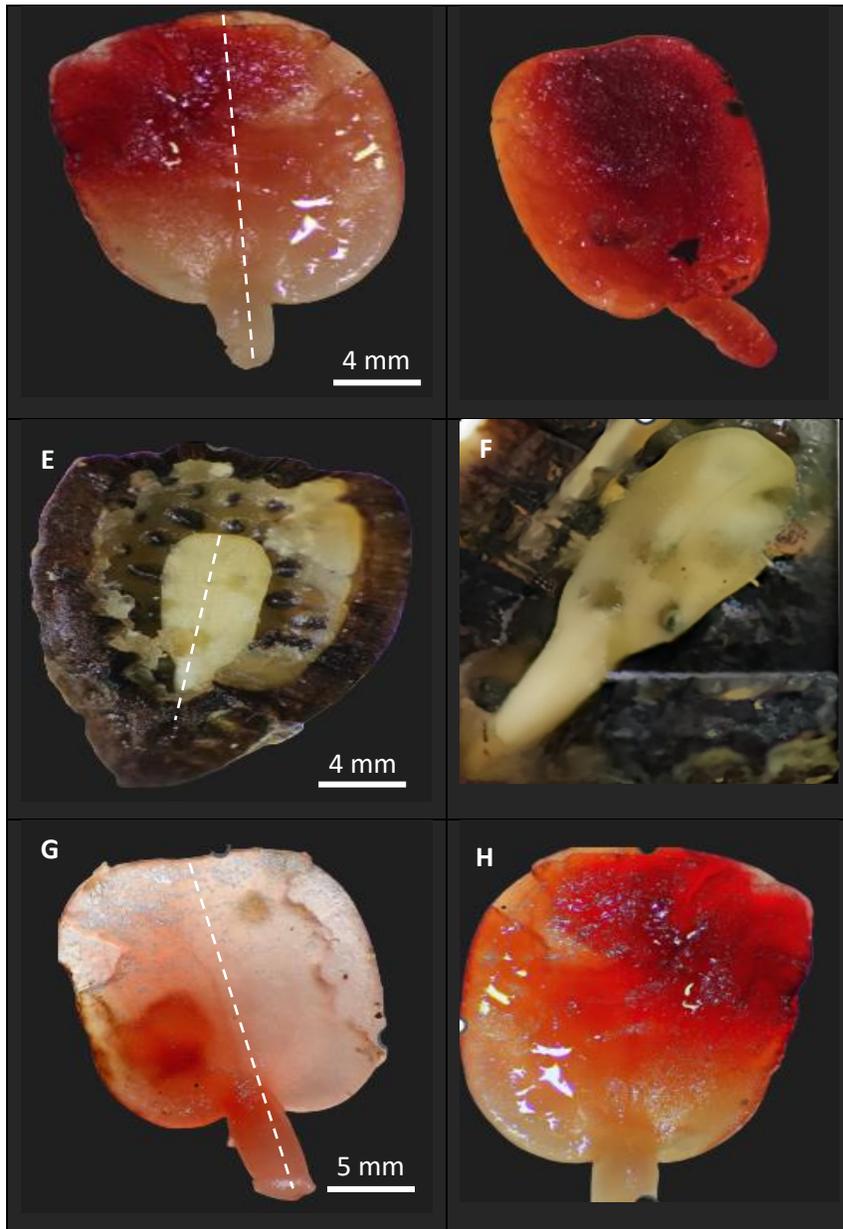


5.2. Prueba de viabilidad

La viabilidad de las semillas fue variable entre las especies, con base en el porcentaje de embriones teñidos con la prueba de tinción de tetrazolio en el embrión y los cotiledones. En cuanto a las especies silvestres, las semillas de la especie *P. quimbayensis* presentó el mayor porcentaje de viabilidad con un 96% de tinción de sus embriones, los cuales presentaban en su mayoría una tinción de coloración uniforme, en segundo lugar *P. sp. nov.* con un porcentaje de viabilidad del 93%, en algunos de ellos no se presentó una tinción limpia y uniforme, los embriones de *P. kumandayi* no presentaron tinción, su coloración fue blanquecina, y finalmente en la especie cultivada *P. ligularis* (testigo) se presenta 100 % de viabilidad (Figura 1-23 y 1-24). Sin embargo, la prueba de viabilidad por tinción no es una garantía para obtener altos porcentajes de germinación, debido a que algunas pasifloras como *P. edulis* (maracuyá), *P. ligularis* (granadilla), *P. maliformis* (cholupa) y *P. quadrangularis* (badea) presenta en sus semillas latencia exógena, la cual causa una latencia parcial e impide una alta capacidad en su germinación (Ellis *et al.*, 1985). Por otro lado, el grado de domesticación también puede tener influencia en la capacidad de germinación de las semillas, lo cual se pudo evidenciar en nuestros resultados asociados a la granadilla (*P. ligularis*) debido a que mostró 100% de los embriones viables en comparación con las especies silvestres estudiadas.

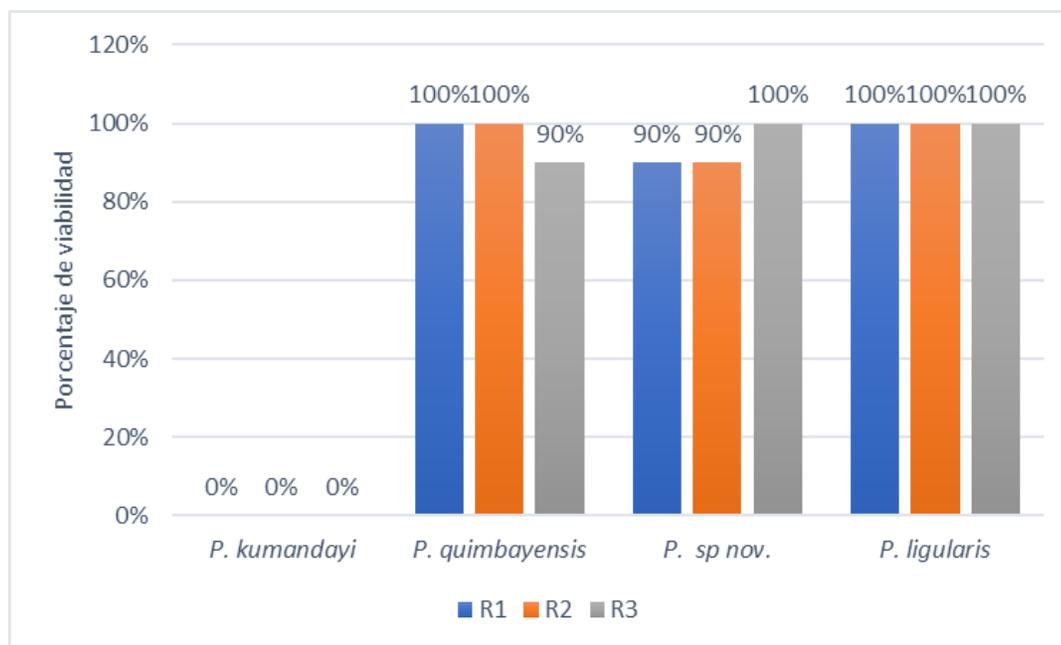
Figura 1-23: Patrones de coloración de embriones: (A y B) *P. quimbayensis*., (C y D). *P. sp. nov.*; (E y F)., *P. kumandayi*; (G y H) *P. ligularis*.





La prueba de viabilidad con tetrazolio (Miller y Peters, 2010) se basa en reducir la sal de tetrazolio en el compuesto trifenilformazán, el cual genera una tinción roja en partes vivas de la semilla (embrión), indicando actividad metabólica respiratoria, este proceso no logra clasificar aquellas semillas que presentan latencia (Moreno, 1984).

Figura 1- 24: Porcentaje de embriones viables en las semillas de las especies evaluadas de acuerdo con el protocolo de Miller y Perters (2010).



En términos de conservación, las semillas son importantes, por lo cual se hace necesario conocer el estado fisiológico, en este caso la capacidad de generar una nueva planta (Waterworth *et al.*, 2015). Igualmente, es importante en esta prueba una correcta interpretación que está ligada a parámetros como lo son: la penetración de los tejidos, el movimiento de la solución, el tipo de corte, la concentración del tetrazolio, el establecimiento de la temperatura y el tiempo de imbibición, lo cual garantiza una tinción uniforme (Vega *et al.*, 2022).

Se ha documentado en especies como *P. foetida* cuya tinción uniforme se reflejó con una concentración del 1% de tetrazolio y un tiempo de 2 horas establecido a una temperatura de 30 °C (Rangel-Costa *et al.*, 2016). En la especie *P. elegans* se evaluaron concentraciones de tetrazolio del 0,05 % a 36 °C por 24 h generando resultados positivos de viabilidad (da Silva *et al.*, 2019). Igualmente, en *P. edulis* y *P. ligularis* se encontró una coloración uniforme en el manejo de una concentración de tetrazolio del 0,5 % a 32 °C por 24 h (Aguacía *et al.*, 2015).

5.3. Cultivo en vivero

Las semillas establecidas como viables en la prueba de viabilidad de tetrazolio fueron sembradas bajo condiciones en vivero para evaluar la germinación. Las semillas antes de la siembra fueron imbibidas en KNO₃ al 1% para generar activación metabólica, a las cuales se les realizó una incisión en una parte de su testa para el ingreso de agua.

Las semillas de *P. quimbayensis* iniciaron su proceso germinativo a los 11 días después de la siembra y solo presentaron el 3% de germinación, evidenciando dificultades de tipo físico y químico en su testa. *P. sp. nov.* no presentó germinación, por lo que posiblemente estaríamos frente a un caso de latencia respecto a lo validado en la prueba de viabilidad en el cual presento un porcentaje alto de semillas viables. Contrario a lo reportado por Romero (2018), en invernadero con las especies (*P. tripartita*, *P. tarminiana*, *P. pinnatistipula* y *P. mixta*) las cuales no presentaron ningún tipo de latencia ni antes ni después de agregar el regulador de crecimiento AG₃ en cuanto a su porcentaje de germinación. *P. ligularis* (testigo) presentó una germinación del 70% a los 25 días, haciendo un seguimiento hasta los dos meses (Figura 1-25); de acuerdo con lo evidenciado por Santos *et al.* (1994) en su estudio logra afirmar que el inicio de germinación en las semillas de granadilla (*P. ligularis*) inicia entre 19 y 25 días después de la respectiva siembra, cuyo pico máximo de porcentaje de germinación se presenta entre 30 y 60 días.

Las testas de las pasifloras contienen estructura pétreo y resina impermeable (Hartmann *et al.*, 2002; Jiménez, 2006) lo cual hace que al embrión se le dificulte la ruptura de esta y retarde la absorción de agua generando bajos niveles de germinación.

Figura 1-25: Set de semillas en vivero. *P. quimbayensis*, *P. ligularis* y *P. sp. nov.* Respectivamente.



5.4. Cultivo *in vitro*

5.4.1. ETAPA I. Establecimiento aséptico del cultivo

Los resultados de los tratamientos pilotos de asepsia en las especies de *Passiflora* evaluadas con semillas viables, teniendo como base el protocolo de Miller y Peters (2010), mostraron una asepsia superficial en *P. quimbayensis* con porcentajes de contaminación del T1 (NaOCl 6%) 0% y T2 (NaOCl 7%) 6,6 % el cual presentó la presencia de una bacteria como contaminante que posiblemente se inocula en el momento de la siembra en el medio de cultivo debido al ambiente de tipo exógeno. En *P. sp. nov.* se presentó un 100 % de contaminación en los dos tratamientos, debido a la presencia y proliferación de hongos, lo cual es resultado de la dificultad de remover el arilo presente en la semilla y posiblemente la presencia de residuos de este. En *P. ligularis* (granadilla) las semillas no presentaron contaminación en ninguno de los dos tratamientos (Figura 1-26). De acuerdo con los porcentajes obtenidos de contaminación, se observó que en el tratamiento 1, el cual poseía una concentración de NaOCl al 6% no presentó ningún tipo de agente biológico contaminante en los medios de las especies *P. quimbayensis* y *P. ligularis*. En comparación con otros estudios en pasifloras, los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con los reportados por Manjarres y Perea (2012) en *P. edulis* con 100% de sobrevivencia en el proceso de asepsia de semillas, en el cual emplearon solución de

Isodine al 3%, hipoclorito de sodio al 2% durante 20 min. Por otro lado, Gonzales (2014), obtuvo un porcentaje de asepsia del 97% de efectividad en *P. mollisima* y *P. cumbalensis* empleando hipoclorito de sodio al 7% por 20 minutos.

Para la evaluación del protocolo de asepsia propuesto, se realizó seguimiento de los medios semanalmente con el fin de identificar la presencia de agentes contaminantes (bacterias y hongos), de acuerdo con los datos obtenidos, se determinó que el protocolo es efectivo y eficiente para el control de este tipo de agentes.

Figura 1-26: Contaminación de las semillas de *P. quimbayensis* y *P. sp. nov.*

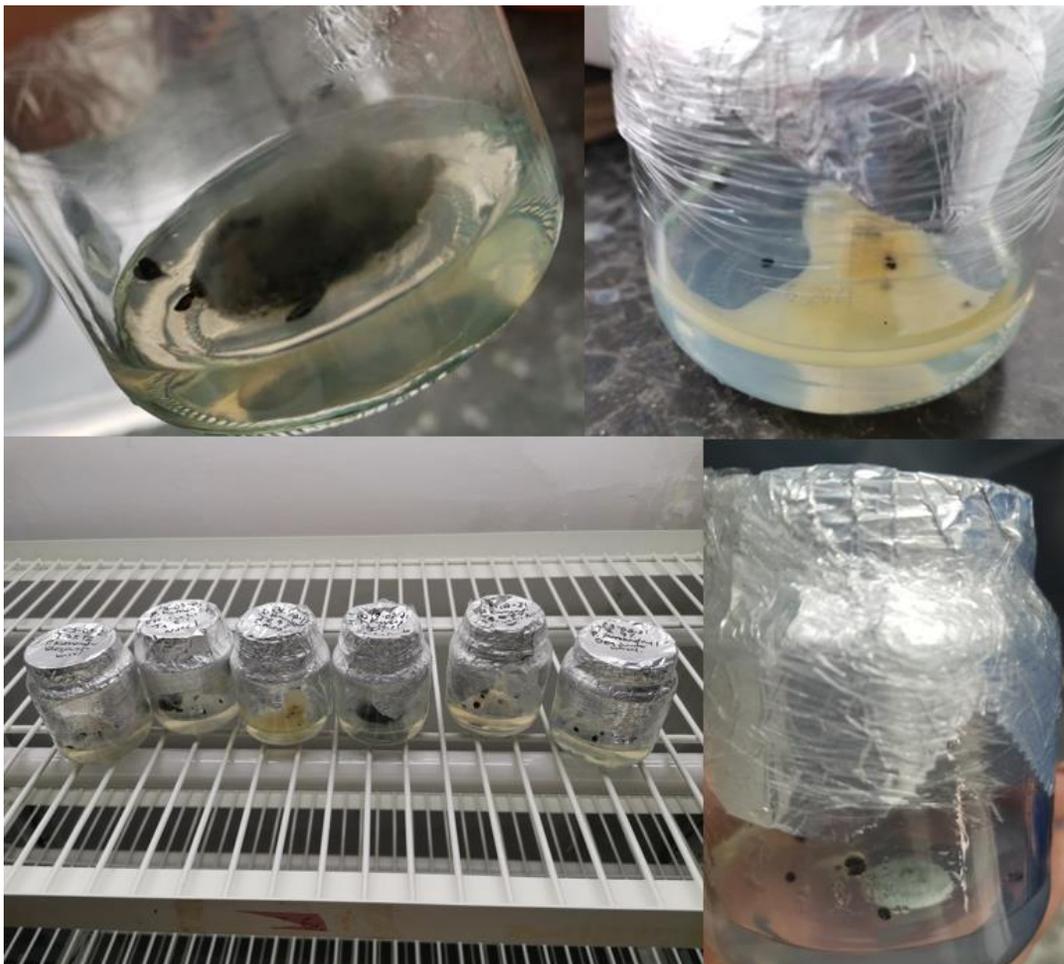
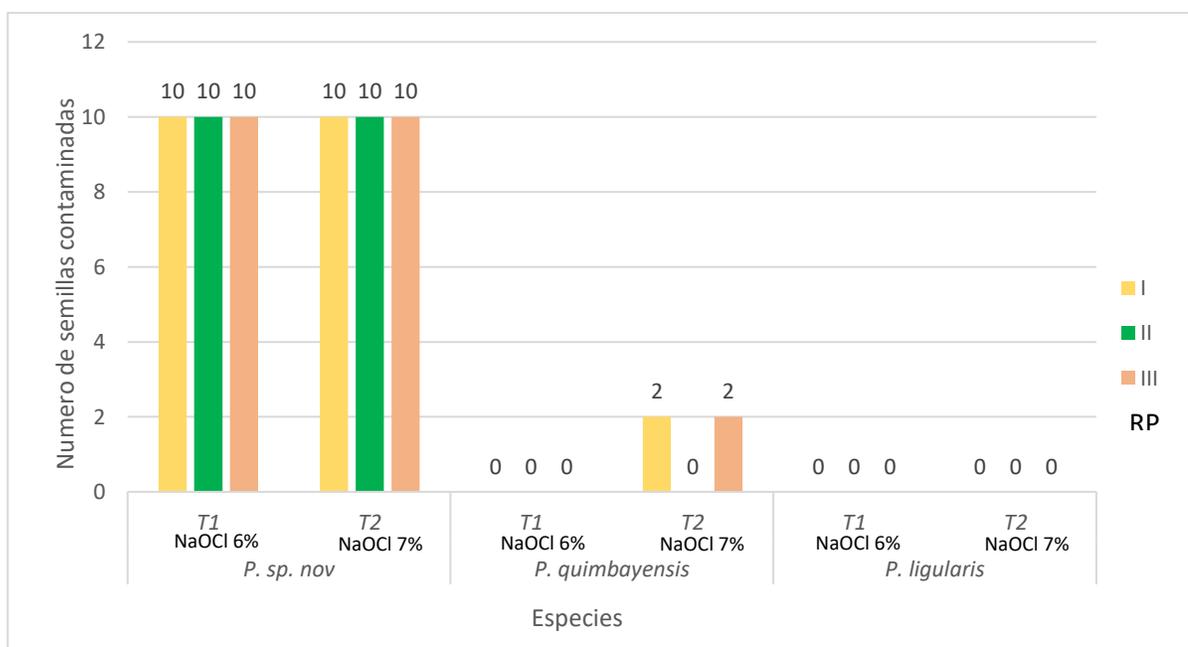


Figura 1- 27: Porcentaje de contaminación vs tipo de tratamiento de asepsia en cultivo *in vitro* de las semillas.



Es fundamental considerar que al realizar el aislamiento del explante, en este caso la semilla y generar su desinfección causa un estado de estrés que produce alteración en el metabolismo celular y balance hormonal, en respuesta a este estrés los explantes inician una producción alta de polifenoles, lo que en consecuencia produce oxidación, oscurecimiento de medio y explante, y muerte total (Gonzales, 2004). Es por esta razón que es de suma importancia el incluir en el proceso de desinfección del explante el uso de soluciones antioxidantes, como lo es el ácido ascórbico, cuya función es minimizar los efectos de la oxidación. Sin embargo, en nuestro estudio se observó presencia de oxidación en algunos de los medios de las semillas de la especie *P. sp. nov.*, no se evidenció necrosis de los tejidos, pero, a pesar del uso del ácido ascórbico no se logró controlar la secreción de fenoles, es importante para estudios posteriores el uso de diferentes concentraciones de antioxidantes para esta especie (Figura 1-28), según lo documentado por Azofeifa (2009), los problemas de oxidación y oscurecimiento en los cultivos *in vitro* están asociados a múltiples factores (físicos, madurez fisiológica, ambientales, del medio de cultivo, etc.) que puede llegar a presentar cada especie, lo cual ocasiona que los exudados que llegan al medio afecten el desarrollo del explante y no proliferen de manera exitosa.

Figura 1- 28: Oxidación en la especie *P. sp. nov.*

Es importante resaltar que los procesos de asepsia deben garantizar un mantenimiento de viabilidad, además de reactivar el crecimiento y buen desarrollo de la semilla como explante (Rache y Pacheco, 2012). Por tal razón, es necesario evitar la contaminación total de los explantes en los cultivos *in vitro*, debido a que los microorganismos tienden a competir por los nutrientes que posee el medio e incluso llegan a causarle modificaciones (Según Roca y Mroginski, 1997). En los resultados obtenidos, la viabilidad y la activación del crecimiento de las semillas de *P. quimbayensis* y *P. sp. nov.* fue afectado por agentes contaminantes, lo cual podría estar relacionado con el tipo de ornamentación de la testa de la semilla, la cual presenta mayores reticulaciones y aloja residuos del arilo o sarcotesta permanentemente, a pesar del proceso de asepsia. La ornamentación de la semilla en *P. ligularis* es menos reticulada que las otras especies evaluadas y esto podría ser la causa de la no contaminación de la semilla.

5.4.2. ETAPA II Multiplicación del material vegetal y estimulación y desarrollo de brotes axilares

Los resultados obtenidos para los tratamientos germinativos *in vitro* son mostrados en la Tabla 1-9. Las semillas de *P. sp. nov.* no presentaron germinación a pesar del 93% de sus semillas viables, de acuerdo con la prueba de tetrazolio. Por otro lado, el tratamiento escarificación despunte apical (T2) presentó los mayores porcentajes de germinación con 98 y un 99% en *P. quimbayensis* y *P. ligularis*, respectivamente (Figura 1-29 y 1-30).

Igualmente, las primeras semillas germinadas de *P. ligularis* inician en la semana 3 (21,21%) con el tratamiento T2, mientras que para *P. quimbayensis* la germinación ocurrió en la semana 4 (24,24%) con el mismo tratamiento. Por el contrario, los porcentajes más bajos de germinación se presentaron en el tratamiento T1 (sin escarificar) con un 35% para *P. quimbayensis* y un 45% para *P. ligularis*. Sin embargo, en el tratamiento (T2) con la escarificación de la ruptura de la testa, el porcentaje de germinación en *P. ligularis* solo se afecta en un 6%. Así, la escarificación despunte apical muestra ser el método más efectivo para inducir germinación en las especies evaluadas.

En el caso de las semillas de *P. quimbayensis* y *P. ligularis*, fue posible observar que la velocidad en la que el agua ingresa y el efecto en la germinación del embrión se encuentran totalmente ligados a la composición de la testa, como se ha visualizado en otros estudios de otras especies (Taylor-son y Hendricks, 1976). De acuerdo con estudios previos, la testa de algunas especies está compuesta de células lignificadas muy compactadas, lo cual dificulta la absorción del agua y genera una resistencia al crecimiento del embrión, lo cual se observó en la especie *P. mollissima* (Cardozo, 1988). Otro factor limitante es la presencia de la latencia exógena reportada en algunas especies de *Passiflora* (Ellis et al. 1985b), e hipotéticamente la testa de las semillas podrían tener algunos inhibidores en su cubierta seminal que pudieran relacionarse con la producción de Ácido abscísico (ABA), lo cual inhibe la germinación.

Así mismo, se observó la producción de callos en la especie *P. quimbayensis* en las raíces de los explantes en el T1 y T2 entre la 8 y 10 semanas después de la siembra (Figura 1-29). Los resultados sugieren que el regulador de crecimiento AG₃, no es suficiente y sería necesario aplicar inhibidores de la callogénesis como caseína hidrolizada, de acuerdo con lo reportado para otras especies (Salazar et al., 2005). Por otro lado, en la conservación *in vitro* es fundamental tener una alta frecuencia de regeneración de plantas a partir de diferentes explantes organizados, entre los cuales están meristemos, embriones, ejes embrionarios, etc., ya que ofrecen la menor frecuencia de variación genética durante la conservación (Karp, 1989). La presencia de callo ocasiona que no se conserve la integridad del desarrollo de la planta, generando posiblemente variación somaclonal y que se presente una competencia por nutrientes (Rajasekharan y Sahijram, 2015).

Tabla 1-9: Número de semillas de *P. quimbayensis* y *P. ligularis* germinadas *in vitro* bajo diferentes tratamientos de escarificación.

| SEMANA | T0 | | T1 | | T2 | |
|--------|---|---------------------|--|---------------------|--|---------------------|
| | AG ₃ 2mg/l (Sin escarificar) | | AG ₃ 2mg/l (Escarificación ruptura testa) | | AG ₃ 2mg/l (Escarificación despunte apical) | |
| | <i>P. quimbayensis</i> | <i>P. ligularis</i> | <i>P. quimbayensis</i> | <i>P. ligularis</i> | <i>P. quimbayensis</i> | <i>P. ligularis</i> |
| | % de germinación | | % de germinación | | % de germinación | |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 9 | 8 | 7 |
| 5 | 0 | 5 | 0 | 11 | 10 | 14 |
| 6 | 0 | 4 | 2 | 10 | 12 | 13 |
| 7 | 0 | 5 | 4 | 8 | 11 | 10 |
| 8 | 0 | 7 | 6 | 9 | 12 | 11 |
| 9 | 0 | 6 | 5 | 11 | 11 | 12 |
| 10 | 10 | 6 | 7 | 10 | 8 | 9 |
| 11 | 8 | 5 | 6 | 9 | 7 | 4 |
| 12 | 8 | 2 | 7 | 8 | 9 | 6 |
| 13 | 2 | 3 | 7 | 6 | 3 | 3 |
| 14 | 7 | 2 | 8 | 3 | 4 | 3 |
| Total | 35 | 45 | 53 | 94 | 98 | 99 |

Figura 1-29: Inicio de la germinación *in vitro* en *P. quimbayensis*.**Figura 1-30:** Inicio de la germinación *in vitro* de *P. ligularis*.



Como se mencionó anteriormente, se observó un efecto significativo del tipo de escarificación en el tiempo y la tasa de germinación en el total de las semillas germinadas; de acuerdo con los resultados obtenidos. El método de despunte apical, aunque es un procedimiento más específico y lento, se propone como una técnica eficaz para obtener la mayor cantidad de plántulas en el menor tiempo posible. Sin embargo, el tipo de escarificación por ruptura total de la testa también se puede utilizar para la germinación, aunque este es un poco más demorado en cuanto al tiempo de emergencia radicular, es por esto por lo cual se recomienda no dejar testas sin escarificación (Figura 1-31 y 1-32). Según Torres (2018), escarificar las semillas en las especies de *Passiflora* permite que el potencial hídrico de sus estructuras embrionarias aumente de manera suficiente para que las semillas puedan germinar. Este método de apertura en la semilla fue aplicado en *P. edulis* para romper las barreras físicas, lo cual permitió una mejor penetración de AG_3 y estimulación de la germinación (Gutiérrez *et al.*, 2011). En varios estudios se ha enfatizado que la remoción total o parcial de la testa de las pasifloras por métodos mecánicos y la alternancia de temperaturas son factores que favorecen la germinación en dichas especies (Gutiérrez *et al.*, 2011; Velásquez *et al.*, 2012).

Conforme a la aplicación de reguladores de crecimiento como AG_3 , es de anotar que es favorable para la germinación de diferentes especies, debido a que está ligada a la

elongación del hipocótilo y el tallo (Hudson *et al.*,1997). Los resultados permiten identificar altos porcentajes (94% y 100%) y cortos tiempos de germinación (3 a 4 semanas) obtenidos con el medio cultivo MS suplementado con AG₃. En estudios previos se ha demostrado que la imbibición de las semillas en soluciones con AG₃ aumentan los niveles de este regulador de crecimiento, lo cual genera acumulación en el embrión después de 24 horas, estimulando síntesis de amilasa en la capa aleurona (Davis, 2004). Dicha enzima está involucrada en productos de almacenamiento del escutelo para la promoción del crecimiento de las plantas, cuya función está asociada a la división celular para la activación metabólica antes de la germinación embrionaria y ruptura de la latencia (Gutiérrez *et al.*, 2011). Se ha evidenciado en algunos estudios, como el de Passos *et al.* (2004), el uso del AG₃ generó influencia positiva en la tasa germinativa de las semillas de *P. nítida*.

Figura 1-31: Germinación *in vitro* promedio para semillas de *P. quimbayensis* bajo diferentes tipos de escarificación.

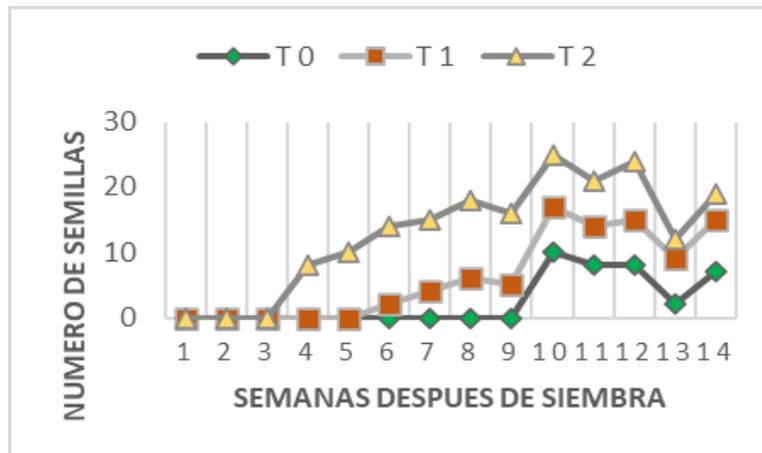
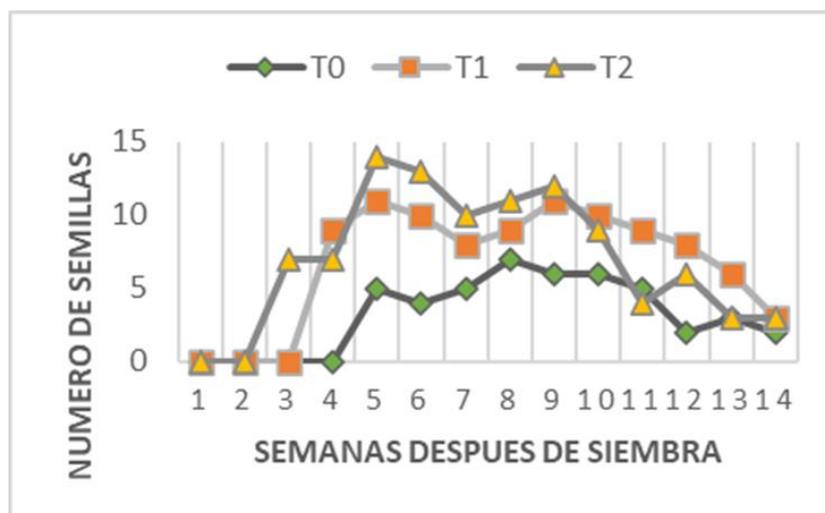


Figura 1-32: Germinación *in vitro* promedio para semillas de *P. ligularis* bajo diferentes tipos de escarificación.



Respecto a las especies de *Passiflora*, son varios estudios que hacen referencia a la latencia de sus semillas (Delanoy *et al.*, 2006). Copete (2011), menciona que en las especies de pasifloras debido a factores endógenos y exógenos asociados se pueden presentar niveles bajos de germinación, de los cuales los más comunes son la latencia mecánica, física y química, por ejemplo en *P. edulis* se presenta latencia mecánica, debido a la rigidez de su cubierta seminal. En *P. sp. nov.* se observó una viabilidad significativa en sus embriones, pero con una germinación totalmente nula, lo cual sugiere la presencia de latencia exógena en esta especie y concuerda con reportes en otras especies como *P. maliformis* L. y *P. quadrangularis* L (Baskin y Baskin, 2014). Como lo documento De Jesús *et al.* (2022) para las especies *P. coccinea* y *P. tenuifila*, en las cuales evidencio un porcentaje de emergencia radicular con presencia de latencia tegumentaria. Marostega *et al.* (2017) también reporta latencia para varias especies silvestres de *Passiflora* como *P. quadrangularis*, *P. nitida*, *P. foetida*, *P. eichleriana*, *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. mucronata*, *P. micropetala*, *P. suberosa*, *P. morifolia* y *P. tenuifila*. Para lograr romper la latencia de las semillas en las especies de *Passiflora* se debe realizar una alternancia de temperaturas, un método de escarificación e incorporar a un papel filtro durante seis semanas (Ellis *et al.*, 1985). Otro proceso que se recomienda para este tipo de latencia es el pretratamiento en frío (Mantilla, 2008; Balaguera *et al.*, 2010), lo cual permite la degradación de ABA presente en las semillas, aumentando la relación AG₃/ABA para que ocurra la germinación (Baskin y Baskin, 1998; Davis, 2004). Por otro lado, Delanoy *et al.* (2006) encontró que las

especies con semillas con testa más delgada tienen mayor capacidad de germinación y en este estudio y lo reportado por Fernando (2011) fue evidente en *P. ligularis* en comparación con las especies silvestres evaluadas.

En la etapa de estimulación y desarrollo de brotes axilares, al transferir las plantas a nuevos recipientes con medio de cultivo MS sin fitorreguladores, solo *P. ligularis* logró el desarrollo de brotes adventicios (Figura 1-33), mientras que en *P. quimbayensis* no hubo un desarrollo favorable, debido al poco material obtenido y la presencia de callo.

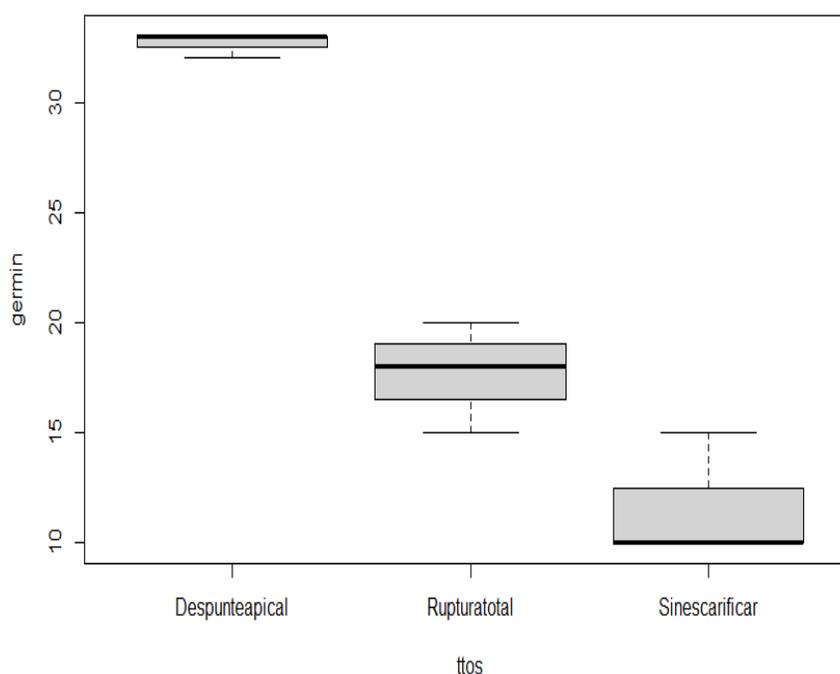
Figura 1-33: Desarrollo de brotes axilares de *P. ligularis*..



El análisis de varianza para *P. quimbayensis* generó un valor de F de 5,14 significativo al nivel de 0.05 de probabilidad (Tabla 1-10). La “f calculada” (Fc) obtenida para los tratamientos fue de 70,2 y la “f tabulada” (Ft) fue de 5,14. Por lo tanto, si $F_c > F_t$, se establece que existe diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 1-10). En cuanto a los tipos de escarificación (T1 despunte apical, T2 ruptura total y T3 sin escarificar) la prueba de Tukey mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Figura 1-34 y Tabla 1-11). En términos generales, se observa que el mejor tratamiento pregerminativo para *P. quimbayensis* es el de despunte apical.

Tabla 1-10: Análisis de varianza (ANDEVA) en *P. quimbayensis*.

| F de V | Gl | SC | CM | FC | Probabilidad | Ft |
|--------------|----|--------|--------|-------|--------------|---------|
| Tratamientos | 2 | 702,00 | 351,00 | 70,20 | 6,88E-05 | 5,14*** |
| Error | 6 | 30,00 | 5,00 | | | |
| Total | 8 | 732,00 | 91,50 | | | |

Figura 1-34: Porcentaje de germinación vs tratamientos pregerminativos de *P. quimbayensis*.**Tabla 1-11:** Prueba de comparación de medias de Tukey ($p > 0,05$) en *P. quimbayensis*.

| Tratamientos | <i>P. quimbayensis</i> | Prueba Tukey ($p > 0,05$) |
|-----------------|------------------------|-----------------------------|
| Despunte apical | 32,66 | a |
| Ruptura total | 17,66 | b |
| Sin escarificar | 11,66 | c |

De acuerdo con el análisis de varianza para *P. ligularis* generó un valor de F de 5,14 significativo al nivel de 0.05 de probabilidad (Tabla 1-12). La "f calculada" (FC) obtenida

para los tratamientos fue de 78,6 y la “f tabulada” (Ft) fue de 5,14. Por lo tanto, si $F_c > F_t$, se establece que existe diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 1-12). En cuanto a los tipos de escarificación (T1 despunte apical, T2 ruptura total y T3 sin escarificar) la prueba de Tukey mostró que no se presenta diferencia significativa entre los tratamientos pregerminativos de despunte apical y ruptura total, pero sí se presentan diferencias altamente significativas respecto al tratamiento de no escarificación (Figura 1-35 y Tabla 1-13). En términos generales, se observa que los mejores tratamientos pregerminativos para *P. ligularis* son el despunte apical y la ruptura total.

Tabla 1-12: Análisis de varianza (ANDEVA) en *P. ligularis*.

| F de V | gl | SC | CM | FC | probabilidad | Ft |
|--------------|----|--------|--------|-------|--------------|---------|
| Tratamientos | 2 | 593,55 | 296,77 | 78,55 | 4,98E-05 | 5,14*** |
| Error | 6 | 22,66 | 3,77 | | | |
| Total | 8 | 616,22 | 77,02 | | | |

Figura 1-35: Porcentaje de germinación vs tratamientos pregerminativos de *P. ligularis*.

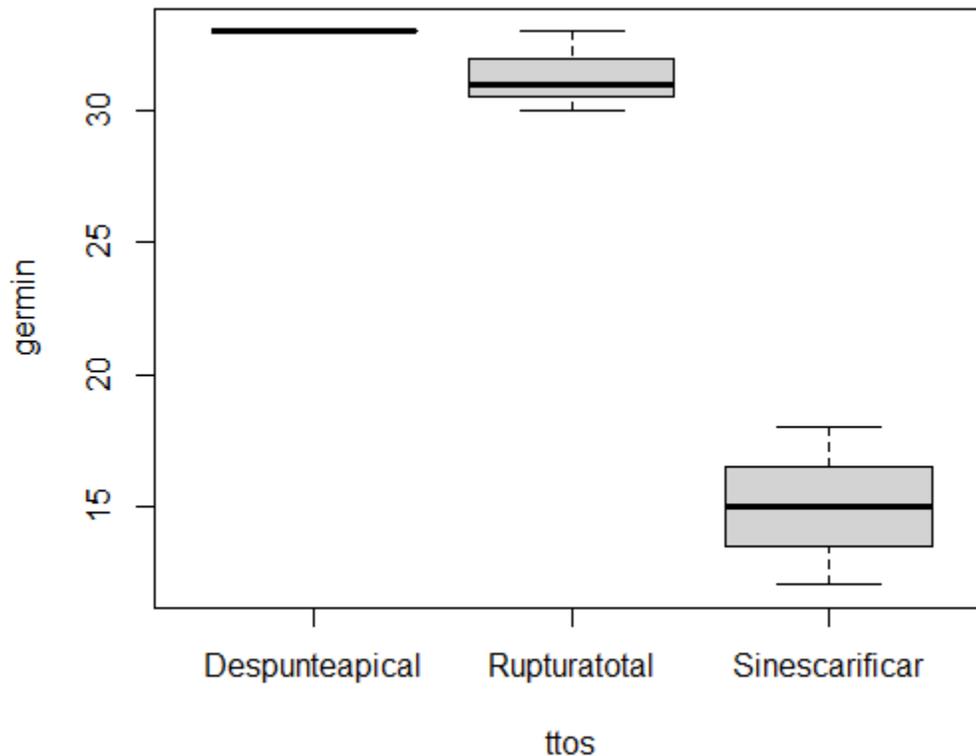


Tabla 1-13: Prueba de comparación de medias de Tukey ($p > 0,05$) de *P. ligularis*.

| Tratamientos | <i>P. ligularis</i> | Prueba Tukey ($p > 0,05$) |
|-----------------|---------------------|-----------------------------|
| Despunte apical | 33,00 | a |
| Ruptura total | 31,33 | a |
| Sin escarificar | 15,00 | b |

Estos hallazgos obtenidos que emplean la escarificación de despunte apical para la germinación de semillas en pasifloras han sido también obtenidos por otros autores. Entre estas investigaciones, Cardozo (1988) obtiene resultados satisfactorios con un 64% de germinación en semillas de *P. tripartita* var. *mollissima* con la inmersión previa en AG₃. Los resultados anteriores y los obtenidos en este estudio sugieren que las barreras físicas son uno de los principales factores que impide la germinación de las semillas con viabilidad en las especies de *Passiflora* estudiadas (Torres, 2018).

Por otro lado, es importante mencionar que los métodos de cultivo de tejidos también brindan medios potenciales para multiplicar especies amenazadas y propagadas clonalmente con una posible reintroducción en sus hábitats originales para las especies que se encuentra en peligro crítico (Rajasekharan y Sahijram, 2015).

En otras especies como *P. caerulea* L (Severin *et al.*, 2011), *P. alata*, *P. foetida* L. etc. Se ha evidenciado que los métodos de propagación *in vitro* en el que el material vegetal a propagar se almacena en medios de condiciones artificiales, es un método que se usa con mayor frecuencia para conservar especies que presentan amenazas latentes (Fay, 1994)

A diferencia de lo observado en el cultivo *in vitro*, al sembrar bajo casa de malla en la especie *P. quimbayensis* se observó un bajo porcentaje y velocidad de germinación, en *P. ligularis* el porcentaje de germinación estuvo en los picos más altos y posee un tiempo de germinación igual al presentado en el cultivo *in vitro*, en la especie *P. sp. nov.* no se observa germinación dando un resultado fuerte en lo discutido frente a un caso de latencia exógena. Estas diferencias pueden estar soportadas por las características ambientales particulares donde estas especies están distribuidas, como la altura sobre el nivel del mar y la temperatura. Aunque todas las especies estudiadas provienen de la región Andina entre 2000 y 3000 donde fueron colectadas, las preferencias climáticas son marcadas y el comportamiento de la germinación de la semilla puede variar.

Los resultados obtenidos en este estudio son la base y complemento para futuros trabajos en semillas en el género *Passiflora* con especial énfasis en la conservación *in vitro* de las especies con algún grado de amenaza. Es importante establecer e implementar estrategias de conservación en las pasifloras colombianas, debido al alto grado de diversidad y endemismo en nuestro país. Estos esfuerzos de conservación deben ser realizados desde la conservación *in situ* en áreas protegidas y *ex situ* en jardines botánicos o en bancos de germoplasma que permitan asegurar la supervivencia de estas especies para un futuro que se verá afectado por la deforestación y el cambio climático global.

6. Conclusiones

- Las características morfológicas de las semillas en las especies estudiadas exhibieron alta variabilidad en forma, tamaño y ornamentación de la testa, lo cual fue determinado con base en su taxonomía. Igualmente, en la estructura las semillas presentan un embrión de forma espatulada y con variaciones en el tamaño entre las especies comparadas y específicamente en el grosor del endospermo.
- La prueba de viabilidad de tinción con tetrazolio permitió identificar las semillas de *P. quimbayensis*, *P. ligularis* y *P. sp. nov.* con capacidad potencial de germinación, lo cual facilita un método rápido de viabilidad antes de utilizar las semillas para ser sembradas o almacenadas con propósitos de conservación.
- El protocolo de asepsia con NaOCl al 6% para el acondicionamiento de las semillas para el cultivo *in vitro* impide la proliferación de agentes contaminantes como hongos y bacterias en *P. quimbayensis* y *P. ligularis*.
- El método de cultivo *in vitro* permitió la regeneración de las semillas de *P. quimbayensis*, aunque en las raíces hubo formación de células no definidas con callosidades, mientras que en *P. ligularis* el enraizamiento fue normal sin presencia de callo.
- El cultivo de embriones demostró un mayor porcentaje de germinación en *P. ligularis* y *P. quimbayensis*, por lo que la latencia en especies como *P. sp. nov.* podría atribuirse a la impermeabilidad o presencia de inhibidores de la testa, para lo cual se requieren mayores estudios.
- El método de germinación *in vitro* desarrollado en esta investigación muestra resultados positivos para la regeneración y conservación de *P. ligularis* y debe ser ajustado para las especies silvestres.

Referencias

- Aguacía, L., Miranda, D., & Carranza, C. (2015). Effect of fruit maturity stage and fermentation period on the germination of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) and sweet granadilla seeds (*Passiflora ligularis* Juss.). *Agronomía Colombiana*, 33(3), 305–314. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v33n3.52460>
- Agronet, (2011). *Estadísticas, Reportes estadísticos, Principales departamentos productores de maracuyá ordenados por área 2010*. <http://www.agronet.gov.co/agronetweb1/Estad%C3%ADsticas/ReportesEstad%C3%ADsticos.aspx>
- Albacete, S. (2007). Cultivo *in vitro* de *Passiflora alata*, una forma de conservación genética. 1, 69–72.
- Amugune, N., Gopalan, H., & Bytebier, B. (2011). Leaf Disc Regeneration of Passion Fruit. *African Crop Science Journal*, 1(2). <https://doi.org/10.4314/acsj.v1i2.69896>
- Arias, J., Ocampo, J., & Urrea, R. (2014). La polinización natural en el maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* degener) como un servicio reproductivo y ecosistémico. *Revista Agronómica Mesoamericana*. 25 (1), 73-83. Doi: 10.15517/am.v25i1.14200
- Arias, J., Ocampo, J., & Urrea, R. (2015). Sistemas de polinización en la Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) como base para estudios genéticos y de conservación. *Acta Agron.*
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Balaguera, H., Álvarez, J., & Cárdenas, J. (2010). Efecto de la estratificación fría y la cobertura plástica en semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) para la obtención de plántulas. *Rev. UDCA Actualidad & Divulgación Científica*. 13(2):89-97.
- Baskin, C., & Baskin, J. (1998). *Seeds: ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination*. Elsevier.
- Baskin, J., Baskin, C. (2014). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, v.14, n.1, p.1-16. DOI: <<https://doi.org/10.1079/SSR2003150>>
- Becerra, D. (2003). Efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad morfogénica de dos especies de *Passiflora* (*Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) cultivadas *in vitro*. (“Efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad ...”) 177.

- Bellon, G., Faleiro, F., Junqueira, K., Junqueira, N., dos Santos, C., Braga, M., & Guimaraes, C. (2007) Genetic variability of wild and commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) accessions using RAPD markers. *Rev Bras Frutic* 29:124–127
- Benson, W., Brown, K., & Gilbert, L. (1976). Coevolution of plants and herbivores: Passion vine butterflies. *Evolution* 29: 659-680.
- Bernal, C., Duarte, L., Bohórquez, M., Johanna, E., & Constantino, J. (2018). Embriogénesis no zigótica en *Passiflora maliformis* Nonzygotic. *Revista peruana de biología*, 25(3), 281-290.
- Bewley, J., & Black, M. (1982). Physiology and biochemistry of seeds in relations to germination. Vol. 2. Viability, dormancy and environmental control. Springer-Verlag, Berlin.
- Bonilla, M., Aguirre, A., & Agudelo, M. (2015). Morfología de *Passiflora*: una guía para la descripción de sus especies. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 91–109. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/issue/view/124/84>
- Bruckner, C., & Otoni, W. (1999). Hibridação em maracujá. In: Borém, A. (Ed.), Hibridação artificial de plantas. UFV, Viçosa: 379-399.
- Büchert, A., & Mogens, J. (2001). The fragility of extreme specialization: *Passiflora mixta* and its pollinating hummingbird *Ensifera ensifera*. *Journal of Tropical Ecology* 17: 323-329.
- Buitrago, A., MacDougal, J., & Coca, L. (2018). *Passiflora kumandayi* (Passifloraceae), a new species from the colombian Andes in a new section within subgenus *Decaloba*. *Phytotaxa*, 344(1), 13–23. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.344.1.2>
- Cardozo, H. (1988). efecto de la escarificación y la dosis del ácido giberélico (ag 3) en la germinación de semilla de curuba (*Passiflora mollisima*). *Acta Biológica Colombiana* 1 (4):127-132.
- Checa, O., Rosero, E., & Eraso, I. (2011). Colección y caracterización morfoagronómica del subgénero *Tacsonia* en la zona Andina del departamento de Nariño, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín* 64(1): 5893-5907.
- Copete, A. (2011) Efecto de acondicionamientos sobre la calidad fisiológica de semillas y plántulas de *Passiflora edulis*. Universidad Javeriana
- Coppens, G., Lironde, B., & Ps, T. (2003). Promesas de las pasifloras. *Memorias X Seminario Nacional y IV Internacional Sobre Especies Promisorias (CD)*, 1–35.
- Córdoba, S., Guzmán, J., Pérez, B., Zuñiga, P., & Pacheco, R. (2010). Propagación de Especies Nativas de la Región Andina, 238. Retrieved from <http://jbbrepositorio.metabiblioteca.org/bitstream/001/151/2/1-36.pdf>
- da Silva, A., Hilst, P., Fernandes, D., & Rogalski, M. (2019). Overcoming dormancy of *Passiflora elegans* Mast. (*Passifloraceae*) seeds. *Revista Verde de Agroecología e Desenvolvimento Sustentável*, 14(3), 406–411. <https://doi.org/10.18378/rvads.v14i3.6552>
- Davis, P. (2004). *Plants hormones*. First Edition. Kluwer Academic Publishers, United States.

-
- De Candolle, A. (1828). *Memoires de la Societé de Physique et d'Histoire Naturelle de Geneve (Memoires of the Society of Physics and Natural History of Geneva)*, 1,434-436.
- De Jesus, J., Junghans, T., da Silva Ledo, A., de Lima Silva, F., Souza, E., Hongyu, K., & Souza, F. (2022). Cryopreservation and germinative behavior of *Passiflora spp.* seeds. *3 Biotech*, 12(10). <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03329-6>
- De Klerk, G., Arnholdt-Schmitt, B., Lieberei, R., & Newmann, K. (1997). Regeneration of roots, shoots, and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum* 39(1), 53-66.
- Delanoy, M., van Damme, P., Scheldeman, X., & Beltran, J. (2006). Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey, *Passiflora tricuspidis* Mast. and *Passiflora nov. sp.* seeds. *Scientia Horticulturae*, 110(2), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.007>
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2004.02.023>
- Dodds, J. (1991). *In vitro* Methods for Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman and Hall.
- Dornelas, M. & Carneiro, M. (1994). Estudios de cultivo de tejidos en especies de *Passiflora*. *Cultivo de tejidos y órganos de células vegetales*, 36, 211-211..
- Ellis, R., Hong, T., & Roberts, E. (1985). Handbook of seed technology for genebanks. Vol. II: Compendium of specific germination. Information and test recommendations. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Roma.
- Escobar, L. (1988a). *Passifloraceae*. Flora de Colombia 10. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. 138pp.
- Escobar, L. (1991). La Sistemática y evolución de las pasifloras. Memorias Primer Simposio Internacional de pasifloras, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 51 p.
- Fajardo, D., Angel, F., Grum, M., Tohme, J., Lobo, M., Roca, W., & Sanchez, I. (1998). Genetic variation analysis of the genus *Passiflora L.* using RAPD markers. *Euphytica*, 101(3), 341–347. <https://doi.org/10.1023/A:1018395229851>
- FAO. (1996). Conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura: Plan de acción mundial e informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Italia. 10p.
- FAO. (Ed.). (2000), Políticas y programas de semillas en América Latina y el Caribe, Merida, Mexico, FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, estudio FAO producción y protección vegetal 164.
- Fay, M. (1994) In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation* 3, 176-183.
- Fernando, J., Vieira, M., MacHado, S., & Appezzato-Da-Glória, B. (2007). New insights into the *in vitro* organogenesis process: The case of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(1), 37–44. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9275-7>

-
- Fernando, J., (2011). Morfología y tratamientos pregerminativos de semillas de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss).
- Ferreira, F. (2005) Recursos genéticos de *Passiflora*. In: Faleiro FG (ed) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético Embrapa Cerrados, Planaltina, Brazil. Embrapa, Planaltina, pp 41–51
- Feuillet, C. (2002). A new series and three new species of *Passiflora* subgenus *Astrophea* from Guianas. *Brittonia* 54: 18-29.
- Feuillet, C. (2004). *Passiflora phellos*, a new species in subgenus *Passiflora* (*Passifloraceae*). *Novon* 14: 285-287.
- Fick, S. & Hijmans, R. (2017). Worldclim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 37: 4302–4315.
- Franco, Y., Alzate, F., & Peláez, J. (2007). Factores ambientales incidentes en la población de *Xylocopa* y su efecto en el cultivo de granadilla en tres veredas del municipio de Guarne (Colombia). *Rev. Uni. Cat. Ori.* 24, 73-88.
- García, O. & Pacheco, G., Vianna, M. & Mansur, E. (2011). *In vitro* conservation of *passiflora suberosa* L. Slow growth and cryopreservation. *Cryo letters.* 32. 377-88.
- Gremillion, K. (1989). The development of a mutualistic relationship between humans and maypops (*Passiflora incarnata* L.) in the Southeastern United States. *Journal of Ethnobiology* 9: 135–158.
- Gonzales, C. (2004). propagación *in vitro* de especies nativas con potencial agroalimético pertenecientes a las familias *passifloraceae* y *solanaceae*. Proyecto de uso sostenible de los recursos vegetales del distrito capital y la región, JBB.
- Gutiérrez M., Miranda D., & Cárdenas J. (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* (Colombia) 5(2): 209-219.
- Harms, H. (1925). *Passifloraceae*. In *Die natürlichen Pflanzenfamilien* 21, 470-507.
- Hartmann, H., Kester, D., Davies, F., & Geneve, R. (2002). *Plant propagation: principles and practices*. 7th ed. Prentice Hall, New Jersey, NJ.
- Hidalgo, R. (1991). Conservación *ex situ*. En: Técnicas para el manejo y uso de los recursos genéticos vegetales (R. Castillo, J. Estrella y C. Tapia, eds.). Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Ecuador. p. 71-87.
- Ho, W., & Shii, C. (1986). Universidade Estadual Paulista. Botucatu. Incompatibility system in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Acta Horticulturae* 194: 31–38.
- Hong, T., & Ellis, R.H. (1996). *A protocol to determine seed storage behaviour* (No. 1). Bioversity International.

-
- Hudson, T., & Dale, L. (1997). Fredsland, Principles of tissue culture for micropropagation, 17: 549-589. In: Plant propagation. Prentice Hall, New Jersey.
- Imig, D. (2013). Estudo taxonômico da família *Passifloraceae* Juss. no Distrito Federal, Brasil. Tesis. Maestría en Ciencias Biológicas Área de Botánica. Universidade Federal do Paraná. pp. 103.
- IPGRI, International Plant Genetics Resources Institute. (1991). Dictionary of plant genetic resources. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. 187 p.
- ISTA. (2009). International Seed Testing Association. International rules for seed testing, Chapter 5 Germination test. Bassersdorf, Suiza.
- ISTA. (1996). *Internationnl Rules for Seed Teszing*. International Seed Testing Association, Zürich, 335 pp.
- Jiménez, Y. (2006). El cultivo de la gulupa *Passiflora edulis* Sims. Trabajo de grado - Horticultura. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Manizales, Colombia.
- Jørgensen, P. (2009) Preliminary conservation status of accepted species in *Passiflora* subg. *Decaloba*: http://www.mobot.org/mobot/research/passiflora/conservation_status_accepted_species.shtml. Accessed 29 Mar 2009
- Jørgensen, M., Sheth, S., Consiglio, T., & Jimenez, I. (2009) Assessing conservation status of *Passiflora*. <http://www.mobot.org/mobot/research/passiflora/conservation.shtml>. Accessed 13 Feb 2009
- Jussieu, A. (1805). Second Mémoire sur la famille des Passiflorées, et particulièrement sur quelques espèces Nouvelles du genre Tacsonia (Second dissertation of the genus *Passiflora* family, and particularly on some new species of the genus *Tacsonia*). *Annales du museum d'Historie Naturelle*, 6: 388-96://botanicus.org/page/1535245
- Karp A (1989) Can genetic instability be controlled in plant tissue culture? IAPTC Newsl 58:2–11
- Kay, E. (2001). Observations on the pollination of *Passiflora penduliflora*. *Biotropica* 33: 709– 713.
- Killip, E. (1938). The American species of *Passifloraceae*. *Field Mus Nat Hist Bot Series*. 19: 613.
- Krosnick, S., Ford, A., & Freudenstein, J. (2009). Taxonomic revision of *Passiflora* subgenus *Tetrapathea* including the monotypic genera *Hollrungia* and *Tetrapathea* (*Passifloraceae*), and a new species of *Passiflora*. *Systematic Botany*, 34(2), 375–385. <https://doi.org/10.1600/036364409788606343>
- Kugler, E. & King, L. (2004). A brief history of the Passionflower. 15-26 pp. In Ulmer T., and MacDougal J.M. (eds). *Passiflora: passionflowers of the word*. Timber Press Portland, Oregon. 430 p.
- Larkin, P., & Scowcroft, W. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied genetics*, 60(4), 197-214.

-
- Leal, C. (2003). Organogénesis *in vitro* a partir de discos de hoja de *Passiflora mollissima* HBK Bailey (curuba) infectados con *Agrobacterium tumefaciens*. *Trabajo de Grado para la optar por el título de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá*.
- Lobo, M. (2006). Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual. *Rev. Cor-poica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 7(2), 40-54
- Lombardi, S., da Silva Passos, I., Nogueira, M., & Appezzato-Da-Glória, B. (2007). *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* mast. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(2), 239–247. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132007000200009>
- Lorenz-Lemke, A., Muschner, V., Bonatto, S., Cervi, A., Salzano, F., & Freitas, L. (2005). Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (*Passifloraceae*) based on ITS (nrDNA) variation. *Ann Bot* 95:799–806
- MacDougal, J. (1992). New species of *Passiflora* subg. *Plectostemma* (*Passifloraceae*). *Novon* 2(4): 358-367.
- MacDougal, J. (1994). Revision of *Passiflora* section *Decaloba*, *Pseudodysosmia* (*Passifloraceae*). *Systematic Botany Monographs* 14: 146 p.
- Manjarrés, E., & Perea, M. (2012). Establecimiento de un protocolo de propagación de Gulupa (*Passiflora edulis* SIMS.) a partir de embriones cigóticos y yemas axilares. *Agronomía Colombiana*, 20(2), 53–64.
- Mantilla, A. (2008). Desarrollo y germinación de semillas. pp. 537-558. En: Azcón-Bieto, J. & Talon, M. (eds.). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid.
- Marostega, T., Luz, P., Tavares, A, Neves, L & Paiva, S., (2017). Methods of breaking seed dormancy for ornamental passion fruit species, *Ornam Hort* 23(1):72-78. <https://doi.org/10.14295/oh.v2311.982>
- Masters, M. (1871). XIX. Contributions to the natural history of the *Passifloraceae*. *Trans. Linn. Soc. London* 27:593-645, tab. 64, 65.
- McCormick, S. (1982). Flavonoid chemistry of *Passiflora* subgenus *Plectostemma*. Ph. D. dissertation, Department of Botany, The University of Texas, Austin, Texas.
- Medina, C., & Lobo, M. (2000a). Curuba (*Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey). En: *Caracterização de Frutas Nativas da América Latina. Edição comemorativa do 30º aniversário da Sociedade Brasileira de Fruticultura*. pp.35-37.
- Medina, C., & Lobo, M. (2000b). Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.). En: *Caracterização de Frutas Nativas da América Latina. Edição comemorativa do 30º aniversário da Sociedade Brasileira de Fruticultura*. pp. 38-40.
- Medina, C., Lobo, M., & Correa, R. (2000). Caracterización morfológica y química de pasifloras andinas como apoyo al desarrollo de estas especies. En: *Memorias 3er Seminario de*

-
- Frutales de Clima Frío Moderado. Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales, C.D.T.F. Manizales, noviembre 15 al 17 de 2000. pp. 13-18.
- Medina, C., & Lobo, M. (2004). Conocimiento de la variabilidad morfológica y química de *Passifloras* andinas (*Passifloraceae*). En: Memorias VIII Congreso Venezolano de Fruticultura, 6 al 9 de julio de 2004. Mara-caibo, Estado Zulia, Venezuela.
- Miller, A. L., & Peters, J. (2010). *Tetrazolium Testing HandBook*. Association of Official Seed Analysts (AOSA) / Society of Commercial Seed Technologists (SCST).
- Miranda D., Perea M., & Magnitskiy S. (2009). Propagación de especies pasifloráceas. En: Miranda D., Fischer G., Carranza C., Magnitskiy S., Casierra F., Piedrahita W., Flárez L. (Ed). Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. Bogotá, Colombia. p: 69-96.
- Moreno, E. (1984). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. 3a. ed. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant*, 15, 473-497.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1), 135-166.
- Nishida, T. (1958). Pollination of the passion fruit in Hawaii. *Journal of Economic Entobotanic* 51: 146–149.
- Ocampo, J., Coppens D'eeckenbrugge, G., Restrepo, M., Jarvis, A., Salazar, M., & Caetano, C. (2007.). *Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation*. <http://www.igac.gov.co>
- Ocampo, J. (2007). *Study of the genetic diversity of genus Passiflora L. (Passifloraceae) and its distribution in Colombia*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1073.7126>
- Ocampo, J., Coppens D'eeckenbrugge, G., & Jarvis, A. (2010). Distribution of the Genus *Passiflora* L. Diversity in Colombia and Its Potential as an Indicator for Biodiversity Management in the Coffee Growing Zone. *Diversity*, 2, 1158–1180. <https://doi.org/10.3390/d2111158>
- Ocampo, J., & Merlín, Y. (2014). *Passiflora* de Colombia. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 1(March), 7. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ocampo, J., Arias, J., & Urrea, R. (2016). Interspecific hybridization between cultivated and wild species of genus *Passiflora* L. *Euphytica*, 209(2), 395-408
- Ocampo, J., & Coppens d'Eeckenbrugge, G. (2017). Morphological characterization in the genus *Passiflora* L.: an approach to understanding its complex variability. *Plant Systematics and Evolution*, 303(4), 531–558. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1390-2>
- Ocampo, J., Forero, L., & MacDougal, J. (2018). Morphological analysis reveals a new species of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (*Passifloraceae*): *Passiflora quimbayensis*, an endemic species from Colombia. *Systematic Botany*, 43(1), 231-239.

-
- Ocampo, J., Hurtado, A., & López, W. (2021) Chapter 1: *Passiflora*: Genetic_Grafting and Biotechnology Approaches. ISBN-13: 978-1536191080. Nova Science Pub Inc, 1-93
- Otahola, V., & Diaz, M. (2010). Regeneración *in vitro* de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* y *Passiflora quadrangularis* utilizando dos tipos de explante provenientes de plantas adultas y bencilaminopurina. *Udo*, 10(1), 23–28.
- Pacheco, G., Gagliardi, R., Valls, J., & Mansur, E. (2009) Micropropagation and *in vitro* conservation of wild *Arachis* species. *Plant Cell Tiss Org Cult*99:239–249
- Parra, M. (2013). Acuerdo de competitividad para la cadena productiva de pasifloras en Colombia. Asohofrucol, Cepass, Consejo Nacional de Pasifloras, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá
- Perea, M. & Tirado, A. (2011). Cultivo de tejidos *in vitro*. Manual de prácticas de laboratorio. Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia
- Pérez, S., Tillett, S., & Escala, M. (2002). Estudio morfológico de la semilla de 51 especies del género *Passiflora* L. *Acta Botánica Venezuelica*, 25(1), 67-96.
- Pierik, R. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Posada, P. (2012). *Estudios del comportamiento fisiológico de la semilla del maracuyá (p. edulis f. flavicarpa degener), la granadilla (p. ligularis juss.) y la gulupa (p. edulis f.edulissims) y zonificación agroecológica como estrategia para una agricultura ecoeficiente y de conservación. Tesis para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.*
- 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. <https://doi.org/10.17584/rcch.2014v8i1.2796>
- Rache, L., & Pacheco, J. (2012). Establecimiento de un protocolo de propagación de *Physalis peruviana* L. a partir de yemas axilares adultas. *Ciencia en Desarrollo*. 4(1).
- Rajasekharan, P., & Sahijram, L. (2015). *In Vitro* Conservation of Plant Germplasm Volume 2 View project Adaptation and Development of Medicinal Plant Technologies for Income Generation, *Agricultural Diversification and Export Promotion View project*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283>
- Rangel, P., Bestete, J., Alves, A., Lopes, C., Romais, E., Campos, W., & Sobreira, R. (2016). Morphometry, *in vitro-ex vitro* germination and tetrazolium testing of stinking passionflower [*Passiflora foetida* var. *glaziovii* Killip] (*Passifloraceae*) seeds. *Australian Journal of Crop Science*, 10(8), 1075–1082. <https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.08.p7175>

-
- Rêgo, M., Rêgo, E., Bruckner, C., Da Silva, E.A., Finger, F. & Pereira, K. (2000) es. Pollen tube behavior in yellow passion fruit following compatible and incompatible crosses. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 685–689.
- Restrepo, J. (2000). Perspectivas de mejoramiento genético de pasifloras. En: *Memorias 3er Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado*. Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales. Manizales, noviembre 15 al 17 de 2000. pp. 37-50.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* (No. 151). Ciat.
- Roca, W. & Mroginski, L. (1997). *Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones*. CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.
- Romero, J (2018). Conservación *ex situ* de semillas de cuatro especies andinas de *Passiflora*. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, Subdirección Científica, Grupo Especies y Propagación. *Agro productividad*: Vol. 11, Núm. 3, marzo. 2018. pp: 75-81. Bogotá, Colombia.
- Salazar, E., Torrealba, D., Castro, L., & Torrealba, M. (2005). La caseína hidrolizada inhibe el desarrollo de callos provenientes de anteras de cacao cultivadas *in vitro*. *Agronomía Tropical*, 55(4), 497-505.
- Salazar, R. (2010). Historia del cultivo de tejidos vegetales. *Recuperado el*, 27, 09-13.
- Sánchez, I., Angel, F., Fajardo, D., Castillo, M., Lobo, M., Tohme, J., & Roca, W. (2002). Caracterización molecular, base sólida para el mejoramiento genético de *Passifloraceae* Juss. *Fitotecnia Colombiana* 2(1): 1-10.
- Sandoval, A., Forero, F., Cabrera, S., Rivera, J., & Parra, M. (2010). Caracterización de extractos a partir de hojas y flores del maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y cholupa (*Passiflora maliformis* L.) del departamento del Huila. In *Primer Congreso Latinoamericano de Passiflora* (p. 114).
- Santos, A., Almaguer, F & Barrientos, A. (1994). Tratamientos de semillas y evaluación del crecimiento en plántulas de granada china (*Passiflora ligularis* Juss) *Revista Chapingo* 2(1),157-160.
- Sazima, M. & Sazima, I. (1978). Bat pollination of the passionflower, *Passiflora mucronata*, in southeastern Brazil. *Biotropica* 10: 100-109.
- Segura, S., Coppens, G., & Ollitrault, P. (1998) Isozyme variation in five species of *Passiflora* subgenus *Tacsonia* and *P. manicata*. *P Inteamer Soc Trop Hortic* 42:260–266
- Segura, S., d'Eeckenbrugge, G., Bohorquez, A., Ollitrault, P., & Tohme, J. (2002) An AFLP diversity study of the genus *Passiflora* focusing on subgenus *Tacsonia*. *Genet Resour Crop Evol* 49:111–123

- Segura, S., Coppens-D'eeckembrugge, G., López, L., Grum, M., & Guarino, L. (2003). Mapping the potential distribution of five species of *Passiflora* in Andean countries. *Gen. Res. Crop Evol.* 50: 555-566
- Segura, S., d'Eeckenbrugge, G., Ocampo, C., & Ollitrault P (2005) Isozyme variation in *Passiflora* subgenus *Tacsonia*: geographic and interspecific differentiation among the three most common species. *Genet Resour Crop Evol* 52:455–463
- Severin, C., Bueno, M., Santín, F., & Giubileo, G. (2011). *In vitro* response of different biotypes and explants of *Passiflora caerulea* L. In *Rev. Colomb. Biotecnol* (Vol. 1).
- Severin, C., Salinas, A., Gattusso, S., Gattusso, M., Busilacchi, H., Giubileo, G., & Aguirre, A. (2004). Estimulación de la germinación de semillas de *Passiflora caerulea* cultivadas *in vitro*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. UNR*, 4 (VI): 55-58.
- Silva, J., Campos, A., Ferreira, L., Aranha, J., Thiede, A., Zago, F., Bertoli, L., Ferreira, M., Trubian, P., & Freitas, A. (2006) Extract of *Passiflora edulis* in the healing process of gastric sutures in rats: a morphological and tensiometric study. *Acta Cir Bras* 21(Suppl 2):52–60
- Silva, T., Gomes, H., & Scherwinski-Pereira, J. (2017) Designing ex-situ conservation strategies for seeds storage of *Piper aduncum* and *P. hispidinervum* through cryopreservation and low-temperature techniques. *J for Res* 22:380–385. <https://doi.org/10.1080/13416979.2017.1381494>
- Snow, A. (1982) Pollination intensity and potential seed set in *Passiflora vitifolia*. *Oecologia* 55: 231-237.
- Snow, N., & MacDougal, J. (1993). New chromosome reports in *Passiflora* (*Passifloraceae*). *Syst. Botany* 18(2), 261-273. Doi: 10.2307/2419402
- Taylor Son, R. & Hendricks S. (1976) Dormancy in Seeds. *Ann Rev. Plan. Physiology.* 28. 331-354.
- Thorpe, T. (1980). Organogénesis *in vitro*: Structural, physiological and biochemical aspects. Nueva York.: International Review of Cytology, Supplement 1 1 A. Academic Press
- Tillett, S. (1988). *Passionis passifloris* II. Terminología. *Ernstia* 48: 1–40.
- Torres, G. (2018). Latencia y germinación de semillas de dos especies cultivadas de *Passifloraceae*. *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. U. Caldas.* 22(1): 15-27, DOI: 10.17151/bccm.2018.22.1.1
- UICN. (2003). Directrices para emplear los criterios de la Lista Roja de la UICN a nivel regional: Versión 3.0. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. UICN, Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido.
- UICN. (2017). Directrices para emplear los criterios de la Lista Roja de la UICN a nivel regional: Versión 3.0. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. UICN, Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido.
- Ulmer, T., & MacDougal, J. (2004). *Passiflora*: Passion flowers of the world, Timber Press, Inc. 430pp.

-
- Uribe, L. (1955). Pasifloráceas y Begoniáceas de la Real Expedición Botánica del Nuevo Reino de Granada. Ediciones Cultura Hispánica. Madrid 26: 1-98.
- Valencia, R., Lobo, M., & Adolfo Ligarreto, G. (2010). *State of Research of Plant Genetic Resources in Colombia: Germplasm Banks System*.
- Varassin, I., Trigo J., & Sazima, M. (2001). The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (*Passifloraceae*) in south eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 136: 139–152.
- Vasconcellos, M. (1991). Biología floral do maracujá doce *Passiflora alata* Dryan nas condições de Botucatu-SP. Tesis Faculdade de Ciencias Agrarias.
- Vega, E., Campos, V., Monge, A., Bertsch, S., & Vargas, E. (2022). Morphology and viability test optimization in seeds of *Passiflora* spp. from Costa Rica. *Agronomia Mesoamericana*, 33. <https://doi.org/10.15517/am.v33iEspecial.51567>
- Veiga, L., Mira, S., González, M., Souza, M., Meletti, L., & Pérez, F. (2013). Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of *Passiflora* species. In *Seed Sci. & Technol* (Vol. 41).
- Velásquez J., Melgarejo L., & Stanislav M. (2012). Tratamientos pregerminativos en semillas de Gulupa *Passiflora edulis* Sims. En: Melgarejo LM (Ed) *Ecofisiología del cultivo de la gulupa (Passiflora edulis Sims)*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p: 84-89.
- Vilain, Y. (2011). Benefecits of the Passion fruit. *Passiflora on line* 34-36.
- Vieira M & Carneiro M. (2004) *Passiflora* ssp. Passion fruit. In: Litz RE (ed) *Biotechnology of fruits and nuts crops*. CABI, Wallingford, Oxon, UK, pp 436–453
- Vieira, L., Rocha, D., Taquetti, M., da Silva, L., de Campos, J., Viccini, L., & Otoni, W. (2014). *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* D.C. (*Passifloraceae*): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50(6), 738–745. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9650-0>
- Villalobos, V., & Thorpe, T. (1991). *Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados*. err Cali, Colombia: Biblioteca Jardin Botanico José Celestino Mutis.
- Waterworth, W., Bray, C., & West, C. (2015). The importance of safeguarding genome integrity in germination and seed longevity. *Journal of Experimental Botany*, 66(12), 3549–3558. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv080>
- Yockteng, R., G. Coppens d'Eeckenbrugge & T. Souza Chies. (2011). *Passiflora* L. pp. 129-171. En: Chittaranjan, K. (ed.). *Wild crop relatives: Genomic and breeding resources. tropical and subtropical fruits*. Springer Verlag, Berlin