

CAPÍTULO 4

TRATAMIENTOS PREGERMINATIVOS EN SEMILLAS DE GULUPA *Passiflora edulis* Sims

Juan David Velásquez¹, Luz Marina Melgarejo^{1,3}, Stanislav Magnitskiy^{2,3}

¹Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia

²Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia

³Autores para correspondencia: Immeltgarejom@unal.edu.co, svmagnitskiy@unal.edu.co

La gulupa (*Passiflora edulis* Sims) se cultiva entre los 1.400 y los 2.200 msnm, con temperaturas que oscilan entre los 15 a 20 °C (Nakasone y Paull, 1998). El fruto maduro presenta peso fresco entre 38 y 75 g, diámetro longitudinal de 48-63 mm y diámetro ecuatorial de 45-56 mm; posee corteza lisa de grosor entre 4,4-6,3 mm, de color púrpura oscuro; la pulpa presenta pequeñas semillas de color negro, cubiertas por un arilo jugoso de color amarillo-naranja (Orjuela *et al.*, 2011). Las semillas de gulupa son de forma lenticular, aplanada u ovoide con unos 6 mm de largo. El endospermo contiene dos cotiledones ricos en aceite semise-co. Reportes de literatura indican que la semilla fresca posee un porcentaje de germinación del 84% hasta el 96%, pero disminuye a medida que transcurre el almacenamiento (Jiménez, 2006). La cáscara, la pulpa y la semilla representan alrededor del 46-52%, 37-44% y 9-11%, respectivamente, del peso del fruto (Pruthi, 1963; Orjuela *et al.*, 2011).

Según Pruthi (1963), la propagación de la gulupa se realiza con semillas frescas de menos de un año, debido a que estas pierden la viabilidad muy rápido. La germinación tarda entre 20 y 30 días; sin embargo, esta presenta dificultades de tipo físico y químico, ya que la testa es dura y posee una resina que la hace impermeable.

Muchas semillas presentan latencia, que según reportan Morley-Bunker (1974), Hartman *et al.* (1997) y Madueño-Molina *et al.* (2006) puede ser por condiciones como: presencia de una testa dura que el embrión no puede romper, testa impermeable que impide la entrada del agua y del aire al embrión, embrión rudimenta-

rio o no totalmente formado, embrión fisiológicamente inmaduro, o presencia de inhibidores en la testa o en el endospermo que impiden el desarrollo inicial del embrión. Cuando la latencia se debe a condiciones de la testa, el letargo termina en el momento en que esta se agrieta o debilita por acciones mecánicas o químicas (escarificación), o por efecto del ambiente (Morley-Bunker 1974; Madueño-Molina *et al.*, 2006).

Ellis *et al.* (1985) reportaron que las semillas latentes de una *Passiflora* sp. requieren escarificación y temperaturas entre 20 a 30 °C durante 16 h y 8 h, respectivamente, por seis semanas para promover la germinación. La alternancia de temperatura puede producir cambios físicos en la testa de las semillas que favorecen la absorción de agua e inducen la germinación. Las semillas de *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* mostraron diferentes grados de latencia, presentando germinación en períodos que van desde los 15 hasta los 45 días, tiempo en el cual las semillas se encuentran viables (Camacaro *et al.*, 2005).

Debido a la importancia económica de la gulupa, se hace necesario mejorar las técnicas de producción vegetativa de este cultivo. Las características de sus semillas cuya testa es dura e impermeable originan problemas de germinación y de vigor germinativo. Por tanto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar diferentes tratamientos pregerminativos en semillas de gulupa, con el fin de aumentar el porcentaje de germinación. La gulupa se propaga a partir de semillas, pero la dureza e impermeabilidad de su testa conlleva a problemas de germinación.

4.1. Análisis fisiológico

Las semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) fueron recolectadas a partir de frutos maduros de edad entre 115 y 125 días después de floración (cáscara color púrpura entre 95%-100%), sin aparentes daños mecánicos y libres de enfermedades, cosechados de un cultivo de gulupa en Tena (Cundinamarca, Colombia). Las semillas fueron extraídas con base en lo descrito por Rivera *et al.* (2002) con algunos ajustes: se extrajo la pulpa con las semillas de los frutos seleccionados, se colocaron en un recipiente plástico y se dejaron fermentar en el mismo jugo durante 48 horas, en un sitio aireado y a la sombra; las semillas se lavaron y friccionaron contra un tamiz con abundante agua hasta que el arilo se removió completamente; luego las semillas que flotaron se eliminaron y posteriormente se colocaron sobre papel periódico y se dejaron secar a temperatura ambiente a la sombra durante 48 horas (aquellas semillas demasiado pequeñas y deformes se eliminaron). Una vez obtenidas las semillas libres de arilo, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,25% durante 10 minutos, seguido de enjuagues con abundante agua destilada.

4.1.1. Prueba de viabilidad

Se realizó con solución de cloruro de trifeníl tetrazolium con base en lo descrito por Delouche *et al.* (1971), Moreira *et al.* (1992), Suárez y Melgarejo (2010). Se realizaron cortes longitudinales a las semillas y se estableció la posición del embrión. En una caja de Petri se vertieron 10 ml de cloruro de trifeníl tetrazolium al 1% y sobre esta solución se colocaron las mitades de 25 semillas con el embrión expuesto, de manera que la superficie de corte quedara en contacto con la solución. En seguida se dejaron en las cajas de Petri por 24 horas, al cabo de las cuales se observaron y contaron las semillas cuyo embrión se coloreó. Se calculó el porcentaje de viabilidad. *Passiflora edulis* Sims presentó un porcentaje de viabilidad del 88%.

4.1.2. Tratamientos pregerminativos

El experimento se estableció bajo diseño completamente al azar; cada tratamiento con 4 repeticiones. En cada repetición se evaluó un lote de 50 semillas, para un total de 200 semillas por tratamiento. Luego de cada tratamiento se colocaron las respectivas semillas en la unidad experimental con caja Petri o sustrato: en el caso de caja de Petri con un fondo de doble capa de papel filtro marca Whatman 3, al cual se le adicionaron 7 ml de agua destilada quedando solo una pequeña parte de la semilla expuesta al aire; y en el caso del sustrato en materos con riego diario a capacidad de campo. Los tratamientos evaluados fueron:

- 1) Control (semillas colocadas en agua destilada)
- 2) Corte de la parte apical de la semilla (cerca al micropilo) con base en lo descrito por Delanoy *et al.* (2006).
- 3) Remoción de la parte apical de la semilla y posterior aplicación de ácido giberélico (marca Sigma), 400 ppm durante 24h, con base en lo descrito por Delanoy *et al.* (2006)
- 4) Siembra de semillas, manteniendo humedad del sustrato a capacidad de campo a) en arena normal, b) en medio estándar de germinación en caja Petri y c) en suelo natural. Posteriormente, se colocaron en incubadora con temperaturas alternantes de 12 h (18 °C/25 °C), con base en lo descrito por Taylor (1981) y Fairbrother (1991)
- 5) Escarificación química de las semillas con H₂SO₄ al 96% por 4, 5 y 6 minutos, y posterior lavado con abundante agua, con base en lo descrito por Mabundza *et al.* (2009)
- 6) Inmersión de las semillas en ácido salicílico (marca Sigma), 50 ppm y 100 ppm por 24 horas, con base en lo descrito por Basra y Farooq (2007)
- 7) Almacenamiento de las semillas completamente secas a 4 °C en nevera durante 15 días sin luz y posterior siembra en invernadero a 25 °C sobre sustrato

suelo y cubrimiento con plástico negro durante 30 días con el fin de mantener humedad óptima y ausencia de luz, con base en lo descrito por Taylor (1981) y Fairbrother (1991).

Para los tratamientos 1 al 6, diariamente se revisaron posibles contaminaciones por hongos en las unidades experimentales; en caso positivo las semillas fueron retiradas del medio, lavadas con hipoclorito al 0,25% durante 5 minutos y abundante agua destilada, y además el papel filtro también fue cambiado. Un nivel óptimo de humedad se mantuvo mediante la aplicación de riegos con agua destilada cada dos días. Las lecturas de germinación se realizaron cada 3 días durante 10 semanas bajo luz verde de longitud de onda 530 nm. Se determinó el porcentaje de germinación, que corresponde al momento cuando de la cubierta seminal emergió la radícula. Las semillas germinadas fueron retiradas de las cajas de Petri para facilitar los ulteriores conteos.

Para el tratamiento 7 se realizaron lecturas de emergencia de plántulas cada 5 días durante dos meses, levantando brevemente el plástico por un tiempo no mayor a 3 minutos. Se determinó el porcentaje de germinación, que corresponde al porcentaje de emergencia de las plántulas.

Luego de los tratamientos las semillas se mantuvieron en observación durante 10 semanas, realizándose las respectivas lecturas. Los datos obtenidos para los diferentes parámetros estudiados fueron sometidos a análisis estadístico por medio del programa Statistix, versión 9.0. Primero se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks, luego se sometieron a un análisis de varianza a una vía (ANOVA), y por último se hizo una comparación múltiple entre los tratamientos.

Con los tratamientos 1, 4, 5 y 6 no se observó germinación durante el tiempo de observación (Tabla 4.1). La comparación entre los tratamientos dio como resultado que el mejor tratamiento pregerminativo es el 7, seguido del 3 y por último el 2.

De acuerdo con Schmidt (2000), la prueba de viabilidad indica el potencial de germinación de un lote de semillas. En gulupa se encontró una viabilidad de las semillas del 88%; además, durante las pruebas de viabilidad se halló un porcentaje de semillas vacías (no se muestran datos), por lo que se recomienda eliminar todas las semillas que floten en el agua, ya que estas no son viables por no tener embrión desarrollado.

Las semillas sin algún tipo de tratamiento no presentaron germinación probablemente, debido a la dureza de su testa. Esto concuerda con lo reportado por Ellis

Tabla 4.1. Porcentajes de germinación obtenidos a partir de tratamientos pregerminativos para gulupa (*Passiflora edulis* Sims) y comparación estadística entre tratamientos representada en letras.

Tratamiento	Porcentaje de germinación (%)
1) Control	0 c
2) Corte de parte apical de la semilla	7 bc
3) Remoción de parte apical de la semilla y posterior aplicación de ácido giberélico	16,5 b
4) Semillas expuestas a cambios de temperatura en incubadora con temperaturas alternantes de 12 h (18 °C/25 °C) en arena normal, estándar de germinación en caja Petri y suelo natural	0 c
5) Escarificación química de las semillas con H ₂ SO ₄ al 96% por 4, 5 y 6 minutos y posterior lavado con abundante agua	0 c
6) Inmersión de las semillas en ácido salicílico 50 ppm y 100 ppm por 24 horas	0 c
7) Almacenamiento de las semillas completamente secas a 4 °C en nevera durante 15 días sin luz y posterior siembra en invernadero a 25 °C sobre sustrato suelo	75 a

et al. (1985), en donde el porcentaje de germinación en general para *Passiflora* sp. en tratamientos con agua es muy bajo, salvo en *Passiflora mollissima*, en la cual la imbibición en agua por 48 h antes de la puesta en medio de germinación incrementó el porcentaje significativamente.

Con los tratamientos 2 y 3 se obtuvo un porcentaje de germinación bajo, en tanto que con el tratamiento 7 se observó un porcentaje mayor pero por debajo de lo obtenido con la prueba de viabilidad de la semilla. Probablemente las semillas sufren algún tipo de dormancia, que según Schmidt (2000) conduce a baja germinación, por más que los embriones sean viables. La remoción parcial de la testa (tratamientos 2 y 3) por métodos mecánicos, y el cambio de temperatura drástico (tratamiento 7), lograron un efecto en la germinación de *Passiflora edulis* Sims, lo que indica la presencia de latencia exógena en las semillas. La utilización de ácido sulfúrico concentrado en diferentes tiempos no tuvo efecto en la germinación; sin embargo, se reportan estudios en los que el porcentaje de germinación con este método (ácido sulfúrico al 96% durante cinco minutos) alcanza el 96% de germinación (Mabundza et al., 2009).

Aunque para estas semillas de gulupa se ha sugerido usar temperaturas para germinación en cajas de Petri en un rango entre 20 °C-30 °C (Miranda et al, 2009),

con el presente estudio no se logró tener una buena respuesta por parte de las semillas; en cambio en invernadero, sembradas en suelo natural, se observaron resultados positivos.

De las pruebas que arrojaron resultados positivos, el corte apical (tratamientos 2 y 3) permitió una germinación más temprana de las semillas, comparado con el tratamiento en siembra sobre sustrato suelo que tuvo resultados después de 45 días. Dado que en *Passiflora* sp. la germinación es lenta, y para el caso particular de gulupa se ha reportado emergencia hasta 17 días después de iniciado el tratamiento (Miranda *et al.*, 2009), el corte apical puede ser un procedimiento útil en la aceleración de la germinación. No obstante, la realización de este es lenta y requiere de pericia, dado que pueden darse algunos daños en el embrión si el corte de la testa no se realiza con cuidado, razón por la cual este método sería difícil de llevar a campo, donde el agricultor requiere de semillas listas para la siembra.

Tanto Delanoy *et al.* (2006) como Messiaen (1997), utilizando el método de corte apical de la semilla obtuvieron resultados de germinación mayores en *Passiflora tricuspidis* (57%) y una tasa de germinación más rápida con la aplicación de la hormona AG₃, aunque con un menor número de semillas germinadas (10%); en este estudio se obtuvo lo contrario: mayor cantidad de semillas germinadas con el corte más aplicación de AG₃ que con solo corte apical, lo que indica que estos resultados pueden estar sujetos a otros factores como la temperatura, la incidencia y calidad de la luz, o la calidad de la semilla en cuanto a la edad y tiempo de almacenamiento.

El hecho de que las semillas con corte apical más la aplicación de AG₃ tengan un porcentaje de germinación mayor al solo corte, sugieren que la semilla presenta algún grado de latencia química o fisiológica y que la imbibición de esta semilla en la hormona ayuda a la lixiviación de los inhibidores de la germinación (Ellis *et al.*, 1985; William, 1987; Hartmann *et al.*, 1997; Schmidt, 2000). No obstante, dado los resultados de este estudio y en concordancia con William (1987), la remoción del punto apical de la semilla es un método seco que sobrepasa el efecto de la dormancia química, por tanto la latencia física parece ser un poco más importante para el caso de gulupa.

La combinación de 15 días a 4 °C y la posterior siembra a 25 °C, junto con la puesta de plástico negro sobre la siembra (tratamiento 7), son necesarias para inducir la germinación en las semillas de gulupa, la que se observó luego de los 30 días de siembra; esto se da posiblemente porque el frío degrada el ácido absísico (ABA) presente en la semilla, lo que a su vez aumenta la relación GA₃/ABA para

que ocurra la germinación (Davies, 2004). Así mismo, se favorece la actividad enzimática, que promueve el debilitamiento y degradación de la testa, y físicamente como lo reportan Taylor (1981) y Fairbrother (1991) las fluctuaciones térmicas (dadas en el tratamiento de pasar de 4 °C a 25 °C) producen la expansión y contracción de los tejidos de la cubierta seminal, provocando fracturas que favorecen la entrada del agua necesaria para la germinación.

Siguiendo los resultados obtenidos, es probable que las semillas de gulupa sean fotoblásticas negativas, y por ende el porcentaje en la germinación sea mayor cuando germinan en condiciones de oscuridad que cuando lo hacen en presencia de luz (Maciel *et al.*, 1996).

Según dichos resultados, las semillas de gulupa presentan latencia exógena por la presencia de tegumentos en sus cubiertas seminales. Las pruebas estadísticas comprobaron diferencia significativa entre tratamientos (F 32,77; P 0,000). Los tratamientos de escarificación mecánica mediante la remoción parcial de la testa parecen ser tratamientos efectivos a la hora de propiciar la germinación de tales semillas; sin embargo, la combinación de frío a 4 °C por varios días y temperaturas de 25 °C en invernadero, junto con la utilización de plástico negro en la siembra, demostró ser el tratamiento más efectivo para activar la germinación de semillas de gulupa y lograr un alto porcentaje de germinación.

LITERATURA CITADA

- Basra, S. M. A.; Farooq, M. (2007). *Improving the germination and early seedling growth in melon (Cucumis melo L) by pre-sowing salicylic acid treatments*. International Journal of Agriculture and Biology. 9(4): 550-554.
- Camacaro, N.; Pérez, D.; De Miranda, M.; Carvajal, R.; Espinoza, M. (2005). *Métodos para la ruptura de latencia de semillas de parchita (Passiflora edulis Sims. f. flavicarpa)*. En: 51 Reunión Anual Sociedad Interamericana de Horticultura Tropical. República Dominicana: Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Estado Aragua. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). 22 p. Disponible en: <http://www.cedaf.org.do/eventos/ISTH2005/memoria/Martes/PDF/02.pdf>.
- Davies, P. (2004). *Plants hormones*. United States: Edition first. Kluner academis publishers. 750 pp.
- Delanoy, M.; Damme, P.; Scheldeman, X.; Beltrán, J. (2006). *Germination of Passiflora mollissima (Kunth) L.H Bailey, Passiflora tricuspidata Mast. and Passiflora nov sp. Seeds*. Scientia Horticulturae. 110: 198-203.
- Delouche, J.; Wayne, M.; Raspel, M.; Lienhard, M. (1971). *Prueba de la viabilidad de la semilla con tetrazol*. Mexico/Buenos Aires: Primera edición. 71 pp.
- Ellis, R. H.; Hong, T. D.; Roberts, E. H. (1985). *Handbook of seed technology for gene banks*. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Rome, IT. v. Engels, J.M.M. 163 pp.
- Fairbrother, T. E. (1991). *Effect of fluctuating temperatures and humidity on the softening rate of hard seed of subterranean clover Trifolium subterraneum L.* Zürich: Seed Science and Technology. 19(1): 93-105.
- Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies, F. T. (1997). *Plant Propagation: Principles and Practices*. New Jersey: Prentice Hall International.
- Jiménez, Y. (2006). *El cultivo de la gulupa Passiflora edulis Sims. Tesis (Maestría)*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. 86 pp.
- Mabundza, R. M.; Wahome, P. K.; Masarirambi, M. T. (2009). *Effects of different pre-germination treatment methods on the germination of passion (Passiflora edulis) seeds*. Journal of agriculture & social sciences. 6(3): 57-60.
- Maciel, N.; Bautista, D.; Aular, J. (1996). *Características morfológicas del fruto y la semilla y procesos de germinación y emergencia del Níspero, Manilkara achras (Miller) Fosberg*. Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort. 40: 188-194.
- Madueño-Molina, A.; García-Paredes, D.; Martínez-Hernández, J.; Rubio-Torres, C.; Navarrete-Valencia, A.; Bojórquez-Serrano, J. (2006). *Germinación de semilla de frijolillo, Rhynchosia minima (L) Dc., luego de someterla a tratamientos pregerminativos*. Bioagro 18(2): 101-105.
- Messiaen, S. (1997). *Vegetatieve en generatieve vermeerdering bij Passiflora spp. Faculteit landbouwkundige en toegepaste biologische wetenschappen*. Gent: Universiteit Gent.
- Miranda, D.; Pérez, M.; Magnitskiy, S. (2009). *Propagación de especies pasifloráceas*. P 69-95. En: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. *Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba*. Bogotá, Colombia.
- Moreira, A.; Gómez, A.; Duarte, A.; Coser, C.; Mendonça, L.; Souza, L.; Maia, N.; Duarte-Da Silva, P.; Vale, R. (1992). *Regras para análise de sementes*. Brasília-D.F.: Ministério da agricultura e reforma agrária. 365 pp.
- Morley-Bunker, M. J. S. (1974). *Some aspects of seed dormancy with reference to Passiflora sp. and other tropical and subtropical crops*. London: Univ. of London. 43 pp.
- Nakasono, H.; Paull, R. E. (1998). *Tropical fruits*. CAB Internacional, Washington, pp. 270-291.

- Orjuela, N. M.; Campos-Alba, S.; Sánchez-Nieves, J.; Melgarejo, L. M.; Hernández, S. (2011). *Manual de manejo poscosecha de la gulupa (Passiflora edulis Sims)*. pp. 7-21. En: Melgarejo, L. M.; Hernández, S. (Eds). *Poscosecha de la gulupa Passiflora edulis Sims*. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia. 58 pp.
- Pruthi, J. (1963). *Physiology, chemistry and tecnology of passion fruit*. *Advances in Food Research*. 12: 203-282.
- Rivera, B.; Miranda, D.; Ávila, L.; Nieto, A. (2002). *Manejo integrado del cultivo de granadilla Passiflora ligularis Juss*. Manizales: Editorial Litoas. 130 pp.
- Schmidt, L. (2000). *Guide to handling of tropical and subtropical forest seed*. Humlebaek, Denmark: Danida Forest Seed Centre.
- Suárez, D.; Melgarejo, L. M. (2010). *Biología y germinación de semillas*. Capítulo 1, pp. 13-24. En: Melgarejo, L. M. (Ed.). *Experimentos en fisiología vegetal*. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 277 pp.
- Taylor, G. B. (1981). *Effect of constant temperature treatments followed by fluctuating temperatures on the softening of hard seeds of Trifolium subterraneum L*. Melbourne: *Australian Journal of Plant Physiology*. 8(2): 547-558.
- William, R. L. (1987). *A guide to forest seed handling with special reference to the tropics*. FAO, Roma, Italia (FAO Forestry paper 20/2).