



**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE PASSIFLORAS
EN EL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ CON FINES DE
APROVECHAMIENTO Y CONSERVACIÓN**

Requisito para optar por el título de Magister en Ciencias Biológicas

MARIA ANTONIA MARTINEZ CAMARGO

Tunja
Noviembre, 2020



UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE PASSIFLORAS
EN EL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ CON FINES DE
APROVECHAMIENTO Y CONSERVACIÓN

Requisito para optar por el título de Magister en Ciencias Biológicas

MARIA ANTONIA MARTINEZ CAMARGO

DIRECTORA

ANA CRUZ MORILLO CORONADO Ph.D

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
Grupo de investigación Competitividad, Innovación y Desarrollo Empresarial
(CIDE)

Tunja
Noviembre, 2020



CERTIFICADO DE ORIGINALIDAD

Ana Cruz Morillo Coronado Doctora en Ciencias Agropecuarias con énfasis en Fitomejoramiento, docente titular de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia

CERTIFICA:

Que el trabajo de grado realizado bajo mi dirección por la estudiante “**MARIA ANTONIA MARTINEZ CAMARGO**”, titulado “**CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE PASSIFLORAS EN EL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ CON FINES DE APROVECHAMIENTO Y CONSERVACIÓN**”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al título de **Magister en Ciencias Biológicas** otorgado por la **Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Maestría en Ciencias Biológicas.**

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en Tunja, 25 de Noviembre de 2020.

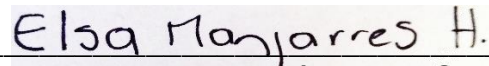
ANA CRUZ MORILLO CORONADO I.A, PhD
Director
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
Grupo de investigación CIDE



Ana Cruz Morillo Coronado. I.A. Ph.D
Director



Diana Marcela Arias Moreno. MSc. PhD
Jurado 1



Elsa Helena Manjarres Hernández. MSc. PhD (c)
Jurado 2



A Dios, cuyos caminos siempre son sabios, gracias por concederme la oportunidad de alcanzar mis metas.

A mis padres, por su apoyo y amor incondicional.

A ti mamá, por ser siempre fiel escucha en los momentos difíciles, mi soporte y animadora para continuar.

A mi papa, que en paz descansa, porque ha estado presente en mi corazón y pensamiento y sé que donde estas te sientes feliz por mí.

A mis hermanos, por su apoyo y buena energía.



Agradecimientos

A la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y al grupo de investigación Competitividad, Innovación y Desarrollo Empresarial (CIDE), por permitirme hacer parte de su grupo de trabajo y por el apoyo profesional y logístico para alcanzar los objetivos propuestos en este trabajo de investigación.

Al laboratorio de Biotecnología Vegetal del Servicio Nacional de Aprendizaje SENA - Cedeagro (Regional Boyacá), institución donde laboro por brindarme la posibilidad de realizar los ensayos de propagación y micropropagación del material vegetal.

A la Doctora Ana Cruz Morillo, quien me brindó su apoyo, comprensión y asesoría. Gracias porque sus conocimientos y calidad humana hicieron posible la realización de este trabajo.

Al Doctor Jorge Blanco, por la sugerencia para trabajar en este grupo de plantas tan fascinantes.

A Carlos Suarez y Edilberto Cepeda, por su ayuda en la fase de campo.

A Lorena Reyes Ardila por su colaboración en la fase de procesamiento de muestras para los análisis moleculares.

A mis compañeras de la Maestría, Nataly Poveda y Mary. Los estudios en la maestría no solo me permitieron conocerlas como compañeras de clase sino como amigas en la vida. Gracias por los momentos de escucha, desveladas y las palabras de ánimo.

A mis amigas Marcela Pinto, Claudia Domínguez y Lina Ramírez por su amistad y aliento en todo este proceso.

A los productores de Passifloras en el departamento de Boyacá, por permitirme tomar las muestras y la obtención de frutos, además de compartir su conocimiento y experiencia. A la Secretaria de Agricultura del Departamento de Boyacá por facilitarme los datos del Censo Agropecuario del Departamento y los contactos de los fruticultores.



TABLA DE CONTENIDO

RESÚMEN	1
CAPITULO I. GENERALIDADES	2
1. INTRODUCCION	3
2. MARCO CONCEPTUAL	5
2.1 Recursos Fitogenéticos	5
2.1.1 Bancos de Germoplasma	5
2.2 Marcadores moleculares en plantas	5
2.2.1 SSR (Simple Sequence Repeats).....	6
2.2.2 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats).....	6
2.3 Germinación	7
2.3.1 Parámetros que definen la calidad.....	8
2.3.2 Dormancia	9
2.3.3 Tratamientos pregerminativos.....	11
3. ESTADO DEL ARTE	12
3.1 Passifloras.....	12
3.2 Recursos Fitogenéticos en el Género Passiflora	16
3.3 Investigaciones en caracterización molecular en el género Passiflora ..	17
3.4 Tratamientos pregerminativos en semillas del género Passiflora.....	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
4.1 Pregunta de Investigación	23
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo General.....	23
5.2 Objetivos Específicos	23
6. METODOLOGIA	24
6.1 Material Vegetal.....	24
6.2 Caracterización molecular	25
6.2.1 Extracción de ADN	25
6.2.2 Amplificación con marcadores moleculares ISSR.....	25
6.2.3 Análisis de datos moleculares.....	26
6.3 Tratamientos pregerminativos de semillas de Passiflora edulis f. edulis ..	27
6.3.1 Material vegetal	27
6.3.2 Morfología de los frutos y semillas.....	28
6.3.3 Tratamientos pregerminativos.....	28
6.3.4 Condiciones de germinación.....	28
6.3.5 Índices germinativos	29
6.3.6 Análisis estadístico	29
7. PRODUCTOS	30
8. IMPACTO	31
9. REFERENCIAS	31
 CAPÍTULO II Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) in Passiflora spp in the Boyacá Department, Colombia	 40



ABSTRACT	41
1. INTRODUCTION	41
2. MATERIALS AND METHODS	43
2.1 Plant material.....	43
2.2 Molecular characterization	45
2.3 Statistical data analysis	46
3. RESULTS AND DISCUSSION	46
4. CONCLUSIONS	53
REFERENCES	53

**CAPITULO III. Evaluation of pregerminative treatments in gulupa seeds
(*P. edulis f. edulis* Sims).....**

ABSTRACT	58
1. INTRODUCTION	58
2. MATERIALS Y METHODS	60
2.1 Plant Material.....	60
2.1.1 Morphology of fruits and seeds.	60
2.2 Pre-germinative treatment	60
2.3 Germination conditions	61
2.4 Germination indices	61
2.5 Statistical analysis.	62
3 RESULTS AND DISCUSSION	62
3.1 Morphology of fruits and seeds	62
3.2 Seed germination.....	62
3.3 Evaluation of pre-germinative treatments.....	63
4 CONCLUSIONS	68
REFERENCES	68

CONCLUSIONES GENERALES	73
Anexos	74



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Categorías de la dormancia de una semilla y condiciones para su rompimiento.	11
Tabla 2. Sitios de colecta de materiales de <i>Passiflora</i> en las principales zonas productoras del departamento de Boyacá.	26
Tabla 3. Cebadores a evaluar en la técnica microsatélites ISSR.	27
Tabla 4. Condiciones de amplificación de los marcadores moleculares ISSR.	28
Tabla 5. Collection sites for <i>Passiflora</i> spp. in the Department of Boyacá	46
Tabla 6. Primers used in the ISSR technique.	48
Tabla 7. Percentage of polymorphic loci and average expected heterozygosity (He) for the eight ISSRs evaluated in <i>Passiflora</i> materials.	52
Tabla 8. Molecular variance analysis for groups formed with the eight ISSR markers)	53
Tabla 9. Effect of germinative pretreatments on germination percentage (PG), mean germination time (TMG) and mean speed of germination (MSG) of gulupa seeds (<i>Passiflora edulis f edulis</i> Sims).	65



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustración cronológica de los principales marcadores moleculares y su referencia inicial 19
- Figure 2.** Dendrogram for the 70 *Passiflora* spp. genotypes based on the Nei-Li (1978) similarity coefficient and calculated with eight ISSR markers with the UPGMA, SAHN and TREE of NTSYs-pc (version 2.02g, 1998) classification methods..... 50
- Figure 3.** Amplification patterns generated by the ISSR TG in which inter and intraspecific variation in *Passiflora* material evaluated 51
- Figure 4.** Effect of pretreatments evaluated in the germination percentage (PG) of seeds of *P. edulis* f. *edulis* at 24, 33, 39 and 43 days from planting 66



Uptc[®]
Universidad Pedagógica y
Tecnológica de Colombia

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS - POSGRADOS
PROGRAMA DE POSGRADO: MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS





RESÚMEN

Las passifloras son un grupo de especies de importancia económica para Colombia, debido a su potencial productivo y propiedades nutricionales, farmacéuticas y agroindustriales. Los resultados de este estudio abarcan la caracterización de la diversidad genética de los materiales de *Passiflora* spp. cultivadas en el departamento de Boyacá, utilizando marcadores ISSRs como contribución al estudio de la caracterización molecular de este grupo de plantas y a futuros programas de mejoramiento genético, principalmente en lo relacionado a la resistencia a factores bióticos y abióticos y otras características de interés para cultivares más productivos. Además, se presentan resultados relacionados con la aplicación de tratamientos pregerminativos a semillas de *Passiflora edulis* f. *edulis*, que pueden ser aplicables a otras especies del género con la finalidad de obtener material vegetal de siembra con estándares técnicos de calidad.

Los resultados de esta investigación se presentan en tres capítulos, en los cuales se pretende abordar el conocimiento sobre la diversidad genética de especies de *Passifloras* spp y la estandarización de protocolos de germinación, como una primera aproximación hacia el planteamiento de estrategias de conservación y manejo de este recurso fitogenético.

El primer capítulo está relacionado con las generalidades del trabajo de investigación incluyendo la formulación del problema, la justificación, los objetivos, el estado del arte y metodología de la propuesta y demás información necesaria para el desarrollo de este trabajo. El segundo capítulo describe la caracterización de la diversidad genética de las Passifloras, cultivadas y en estado silvestre, colectadas en el departamento de Boyacá utilizando marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Se evaluaron 8 marcadores ISSR los cuales generaron 138 bandas, del análisis molecular de los resultados a un coeficiente de similaridad de 0.60 se conformaron 7 grupos con una distribución laxa de los individuos, el valor de heterocigosidad fue de 0,56 con un F_{st} de 0,16 indicando una gran variabilidad genética, pero sin estructura poblacional. Este capítulo corresponde al primer artículo resultado de esta investigación publicado en la revista internacional indexada *Chilean journal of agricultural research*.

El tercer capítulo describe los ensayos de propagación en *P. edulis* f. *edulis* mediante la evaluación de tratamientos pregerminativos en semillas. Los resultados sugieren que su inmersión en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno H_2O_2 permiten obtener mayores porcentajes de germinación de aprox. el 88%. Este tercer capítulo corresponde al segundo artículo producto de la investigación, publicado en la revista internacional indexada *Revista Brasileira de Fruticultura* (RBF).



CAPÍTULO I

GENERALIDADES



1. INTRODUCCION

El género *Passiflora* está conformado por un grupo de especies que son conocidas como las frutas de la pasión. Este comprende más de 500 especies, distribuidas en regiones tropicales y subtropicales desde el nivel del mar hasta los 4300 m, de las cuales aproximadamente 167 se han diversificado en el territorio colombiano (Jorgensen, Muchhala y MacDougal, 2012; Ocampo & Merlin, 2014). Algunas cuentan con una gran importancia comercial, tanto en el contexto nacional como internacional, ya que se reportan cerca de 80 pasifloras con frutos comestibles, apetecidos por su alto valor nutricional, para consumo en fresco o para procesarlo y por su interés fitofarmacéutico, por lo cual son ampliamente cultivadas en diferentes regiones colombianas, y en particular se distribuyen a lo largo de la región Andina (Bonilla, 2014).

Cifras oficiales del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2017) indican que actualmente existen 15.200 hectáreas cultivadas con pasifloras en Colombia, las que generan más de 20.000 empleos. La cosecha de pasifloras, como la badea (*Passiflora quadrangularis*), granadilla, maracuyá, gulupa (*Passiflora edulis Sims f. edulis*), curuba y la cholupa o congolo (*Passiflora maliformis L.*), se estiman en alrededor de las 150.000 toneladas cada año, de las cuales cerca de 6.000 ton son exportadas actualmente.

Las especies silvestres de *Passiflora* tienen características de interés para el mejoramiento de las especies cultivables incluyendo la longevidad, adaptación a condiciones climáticas adversas, períodos florales extendidos, alta concentración de químicos de interés farmacéutico, cosmético y resistencia a enfermedades (Meletti, 2011), siendo este último uno de los principales objetivos de los programas de mejoramiento en estas plantas (Yockteng, 2011; Cerqueira-Silva, 2016).

En este sentido, a pesar de la importancia de este cultivo y del gran número de especies encontradas en Colombia, todavía hay un conocimiento escaso acerca de la diversidad de este género, comparado con otras especies. La caracterización y evaluación de poblaciones silvestres y cultivadas de *Passifloras* tiene una alta prioridad en los países andinos debido a su potencial para el desarrollo y diversificación de cultivos, mejoramiento de plantas y programas de conservación. Por tanto, se evidencia la importancia de preservar y estudiar especies silvestres y cultivadas que permitan a futuro establecer bancos de germoplasma debido no solamente a su uso potencial en el mejoramiento, sino también a la posible generación de usos potenciales aplicaciones al aumentar el conocimiento sobre las especies conservadas.

En Boyacá, existen cerca de 1.115 ha cultivadas de *Passifloras* principalmente, representadas en especies de gulupa, maracuyá, curuba y granadilla, también se han reportado silvestres como cóngolo, en varios municipios. Dentro de las herramientas biotecnológicas para la caracterización de germoplasma y la



identificación de materiales élite, se encuentran los marcadores moleculares, los cuales permiten estimar la variabilidad genética de las especies, ya que estos pueden detectar diferencias significativas a nivel de ADN con gran precisión y a gran escala (Paiva et al., 2014).

Entre los marcadores moleculares los de Inter-Secuencia Simple Repetida (ISSR), cuyo fundamento es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), combina las características de la técnica RAPD y microsatélite, permite el análisis multilocus con un único cebador basado en regiones de repetición de secuencia simple (SSR), presentan buena reproducibilidad, bajo costo, sencillez, no necesita información previa del genoma (Muñoz et al., 2008), por lo cual pueden ser útiles para la caracterización de los materiales silvestres y cultivables de *Passifloras* de la región, para así contribuir al conocimiento y conservación de este recurso fitogenético y ampliar la oferta de materiales de siembra para los agricultores.

Es evidente la necesidad de disponer de material vegetal de gran calidad, suficiente y que cumpla con los requerimientos técnicos para el establecimiento de cultivos comerciales como para la conservación de especies silvestres con potencial cultivable y con características de interés para programas de mejoramiento vegetal. La propagación de *Passifloras* en general se lleva a cabo vía semilla, cuya viabilidad es variable debido a que su desarrollo y germinación están separados por un período de baja actividad metabólica referida como latencia o dormancia. En el género *Passiflora*, algunas especies, exhiben una latencia exógena debido a una cubierta impermeable y gruesa. Al aplicar tratamientos pregerminativos que incluyan agentes químicos, choques térmicos (frío-calor), entre otros, se busca desarrollar e implementar protocolos de germinación viables y efectivos que estén a la mano del agricultor y del productor de plantas, así como también contribuir a la conservación de las especies silvestres y cultivables de la región de Boyacá.

Teniendo en cuenta lo anterior, y que para el departamento de Boyacá no existen estudios que incluyan caracterización molecular en las cinco especies de passifloras mencionadas, con el tipo de marcadores moleculares ISSRs, nosotros (i) caracterizamos la diversidad genética de las especies pertenecientes al género *Passiflora* colectadas en zonas productoras del departamento de Boyacá y (ii) evaluamos tratamientos pregerminativos en semillas de *Passiflora edulis f. edulis* con la finalidad de estandarizar una metodología efectiva y reproducible para la obtención de material vegetal con estándares de calidad para el sector fruticultor de la región.



2. MARCO CONCEPTUAL

2.1 Recursos Fitogenéticos

Es el material genético de origen vegetal que tiene un valor real o potencial destinado a la alimentación y a la agricultura, estos recursos han sido conservados y desarrollados por los agricultores de forma tradicional y son la base para desarrollar nuevas variedades y tecnologías. La diversidad de los recursos fitogenéticos incrementa las opciones contra futuras condiciones adversas, sin embargo, aprovechar estas posibilidades depende de la capacidad para mejorar variedades a través de la genética (FAO, 2010).

2.1.1 Bancos de Germoplasma

Los bancos de semillas o genéticos alrededor del mundo contienen colecciones de un amplio rango de recursos fitogenéticos, con el objetivo de la conservación a largo plazo y accesibilidad del germoplasma a mejoradores, investigadores y otros usuarios. Los recursos fitogenéticos son el material base utilizado en el mejoramiento y conservación y su uso es crítico para la seguridad alimentaria y nutricional a nivel global. La conservación sustentable de esos recursos genéticos depende del manejo efectivo y eficiente de los bancos de semillas, a través de la aplicación de estándares y procedimientos que aseguren la continua supervivencia y disponibilidad de los recursos genéticos (FAO, 2013).

Las Normas para Bancos de Germoplasma de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, preparadas bajo la dirección de la Comisión de la FAO, establecen las normas que se deben seguir para la conservación de los recursos fitogenéticos (FAO, 2013):

- Estándares para semillas ortodoxas: Adquisición de germoplasma, secado de semillas y almacenamiento, monitoreo de la viabilidad, regeneración, caracterización, evaluación, documentación, distribución, duplicación.
- Estándares para Bancos de semillas en campo: Seleccionar la localización, adquisición de germoplasma, establecimiento en campo de colecciones, manejo, regeneración y propagación, caracterización, evaluación, documentación, distribución, seguridad y duplicados.
- Estándares para bancos de semillas en cultivo *in vitro* y la criopreservación: Adquisición del germoplasma, evaluación para el comportamiento de semillas no ortodoxas y evaluación del contenido de agua, vigor, viabilidad, almacenamiento hidratado para semillas recalcitrantes, cultivo *in vitro* y almacenamiento en crecimiento reducido, criopreservación, documentación, distribución e intercambio, seguridad y duplicados.

2.2 Marcadores moleculares en plantas



Los marcadores moleculares son secuencias genómicas que pueden ser monitoreados a través de la progenie de una especie. Algunos de ellos pueden ser ubicados referenciando posiciones definidas dentro del genoma y son los más útiles para certificación y caracterización de especies, así como para la selección y monitoreo de los programas de mejoramiento genético (Lateef, 2015).

El análisis de la variación de la secuencia de ADN constituye uno de los estudios genéticos de mayor importancia. En este contexto, los marcadores moleculares son herramientas útiles para evaluación de la variación genética, y han sido ampliamente estudiados en los análisis genéticos de especies cultivadas y silvestres. Una variedad de marcadores moleculares, incluyendo los polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD), polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), y microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR), se han desarrollado en diferentes plantas (Henry, 2012; Govindaraj et al., 2015).

2.2.1 SSR (Simple Sequence Repeats)

Los marcadores microsatélites son arreglos de secuencias de nucleótidos repetidos consecutivamente en el genoma, se presentan en motivos di, tri o tetranucleótidos, están presentes en todos los organismos (Vieira et al., 2016).

Estos marcadores han sido ampliamente utilizados en muchas especies de organismos por ser considerados ideales en trabajos de identificación varietal, análisis de pedigrí, cartografía de genomas y detección de QTLs, para mejoramiento asistido por marcadores, mapeo genético, medidas de diversidad, estructura poblacional, debido a que son altamente variables, permiten distinguir entre cultivares estrechamente relacionados (Grover y Sharma, 2016).

Los marcadores moleculares tipo microsatélite son eficientes debido a que representan genes transcritos y una función putativa, por lo cual pueden deducirse frecuentemente por medio de la búsqueda por homologías. Debido a que ellos son derivados de transcritos, son útiles para evaluar la diversidad funcional en poblaciones naturales o colecciones de germoplasma (Andersen y Lübberstedt, 2003). Además son codominantes, multialélicos, polimórficos y reproducibles, generándose un amplio contenido informativo de las especies en estudio (Vieira et al., 2016).

2.2.2 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)



Los ISSR son marcadores moleculares polimórficos utilizados en identificación de especies, variedades, estudios de diversidad genética y taxonómica, mapeo de genes, biología evolutiva y evaluación de fidelidad clonal de plantas procedentes de cultivo *in vitro* (Reddy et al., 2002; Heidari et al., 2016). Esta técnica fue reportada primero por Zietkiewicz et al. (1994) e involucra la amplificación de segmentos de ADN presente en una distancia amplificable entre dos regiones microsatélites repetidas idénticas orientadas en direcciones opuestas. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como (CT) n ó (CA) n , ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. Los microsatélites repetidos, llamados también SSRs (Simple Sequence Repeats) pueden ser penta-, tetra-, tri- y dinucleótidos. Los primers usados puede ser no anclados o anclados a los extremos 5' o 3' con 1 a 4 bases degeneradas extendidas dentro de las secuencias flanqueantes (Zietkiewicz et al., 1994; Reddy et al., 2002). La amplificación del fragmento de ADN intermedio entre las dos secuencias repetidas, se considera un "locus".

Los ISSR tienen una alta reproducibilidad, segregan principalmente como marcadores dominantes (Reddy et al., 2002). La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homocigoto o heterocigoto), mientras que su ausencia representa el genotipo homocigoto recesivo. En una sola reacción de amplificación pueden generarse de 25 a 50 bandas (Zietkiewicz et al., 1994).

Entre las ventajas que presenta la aplicación de esta técnica se encuentran: i) La alta variabilidad que detecta, ii) No se requiere información previa información de la secuencia del ADN para generar los polimorfismos ISSR, iii) requieren bajas cantidades/concentración de ADN, iv) su visualización puede realizarse en geles de agarosa y acrilamida. Además, son sencillos de manejar, tienen una amplia cobertura del genoma, eficientes y accesibles en relación a los costos (Zietkiewicz et al., 1994; Reddy et al., 2002; Heidari et al., 2016).

La técnica se ha utilizado con éxito en vegetales como uchuva (*Physallis peruviana* (Espinosa et al., 2004), mora (*Rubus* sp., Morillo et al., 2003), guayaba (*Psidium guajava*) (Sanabria et al., 2006), nacedero (*Trichantera gigantea*, Posso 2010); Erytrina (Gómez, 2012), gulupa (Londoño, 2012), durazno (*Prunus*, Morillo et al., 2014), palma (*Elaeis guineensis*) (Cardona et al., 2016), tubérculos andinos (*Tropaeolum tuberosum* y *Oxalis tuberosa*) (Morillo et al., 2016), entre otros.

2.3 Germinación

La semilla es la primera fase del desarrollo de una nueva planta. Hartmann et al. (2011), la definen como un ovulo maduro. En el momento de la separación de la planta madre, esta consiste en un embrión y una fuente de almacenamiento de alimento, ambas encerradas en una cubierta protectora (testa). La germinación, se define como el conjunto de procesos que se



producen en la semilla desde que el embrión comienza a crecer hasta que se forma una pequeña planta que puede vivir por sí misma, independientemente del alimento almacenado en la semilla. Para que tenga lugar la germinación deben reunirse una serie de condiciones, tanto en la semilla como en el ambiente que la rodea. Inicia con la imbibición de agua por parte de la semilla seguida de un incremento trifásico de peso fresco, debido al incremento en la toma de agua. Las tres fases de acuerdo a Hartmann et al. (2011), corresponden a:

Etapas

- **Fase I. *Imbibición*:** Es el período en el cual la semilla absorbe agua y hay ganancia de tamaño. El agua que rodea la semilla pasa a través de las envueltas seminales, penetra en su interior y al llegar al embrión, en cantidad suficiente, este se activa y comienzan los procesos que terminarán en el desarrollo de la planta. Muchas semillas están secas (presentan menos del 10% de humedad) después de completar su desarrollo. El resultado es un muy bajo potencial de agua en las semillas secas de cerca de -100 a 350 MPa. El potencial de agua, está relacionado con la germinación de la semilla, es una medida de la capacidad que tiene una célula de tomar agua del ambiente que la rodea.
- **Fase II. *Fase lag de Germinación*:** Es una fase fisiológicamente activa, aunque la toma de agua es reducida o nula después de la imbibición. En esta etapa la actividad metabólica prepara a la semilla para la germinación. Las actividades celulares críticas para una normal germinación durante la fase lag incluyen: i) Maduración de las mitocondrias; ii) síntesis de proteínas; iii) metabolismo de almacenamiento de reserva; iv) producción de enzimas, incluyendo las responsables del ablandamiento de la pared celular en el embrión o en tejidos circundantes a este.
- **Fase III. *Elongación celular*:** Tiene lugar la emergencia de la radícula, primera evidencia visible de la germinación, resultado de un segundo período de ganancia de peso fresco conducido por una toma de agua adicional.

La emergencia de la semilla inicia con la elongación de los meristemas radicular y apical en el eje embrionario, seguido por la expansión de las estructuras de la plántula. El embrión consiste de un eje apical que soporta uno o dos cotiledones y un eje radicular, la radícula. El tallo de la plántula se divide en hipocótilo, nodo cotiledonar y el epicótilo. Una vez se inicia el crecimiento, el peso fresco y seco de la nueva plántula se incrementa, y el peso de los tejidos de reserva disminuye.

2.3.1 Parámetros que definen la calidad de una semilla



Los factores más influyentes que definen la calidad de una semilla son: *i. Poder germinativo*: Expresa la capacidad de la semilla de producir plántulas normales en condiciones favorables (las mejores condiciones de temperatura y humedad). *ii. Vigor*: Es la capacidad de la semilla de producir plántulas que emerjan en forma rápida y uniforme en una amplia gama de condiciones; *iii. Pureza físico-botánica*: Está determinada por la presencia de materia inerte, semillas extrañas, semilla dañada, pureza genética, entre otros. *iv. Sanidad*: Determina el porcentaje de semillas infectadas por microorganismos, principalmente fúngicos (Hartmann et al., 2011; Baskin y Baskin, 2014).

Se distinguen dos tipos de condiciones para que la semilla germine: Condiciones externas a la semilla: es decir, las que debe reunir el medio ambiente circundante:

- a. Disponibilidad del agua
- b. Temperatura de la semilla
- c. Presencia o ausencia de luz
- d. Aireación, el intercambio de gases entre el sustrato de germinación y el embrión, que es esencial para una germinación rápida y uniforme.

Y las condiciones internas de la semilla o condiciones intrínsecas:

- a) La semilla debe estar viva: viabilidad de la semilla y poder germinativo
- b) La semilla debe haber alcanzado un estado de madurez adecuado
- c) La semilla debe estar sujeta a condiciones ambientales apropiadas: disponibilidad de agua, un rango de temperatura óptimo, suministro de oxígeno, y en algunos casos, exposición a la luz.

2.3.2 Dormancia

La dormancia o también denominada por varios autores como latencia, dormición, letargo, reposo o vida latente, en un sentido general, ha sido definida como una suspensión temporal de crecimiento de cualquier estructura visible de la planta que contenga un meristemo (Land, 1987). No obstante, en relación a la semilla y su proceso de germinación, la dormancia se define como la condición donde no germinan aun cuando las condiciones ambientales son favorables (Baskin y Baskin, 2014).

Clases de Dormancia

En algunos casos, las semillas pueden ser no dormante, cuando ellas son separadas de la planta madre, y necesitan solamente ser imbibidas a una temperatura permisiva para iniciar la germinación. En otros casos las semillas presentan dormancia primaria. La dormancia es una condición en la cual las semillas podrían no germinar aun cuando las condiciones ambientales son permisivas para la germinación. La dormancia previene inmediatamente la germinación, pero también regula el tiempo, las condiciones, y el lugar en el que ésta podría tener lugar, es una condición que existe en la semilla procedente de la planta.



La dormancia secundaria es un mecanismo de sobrevivencia que puede ser inducido bajo condiciones ambientales desfavorables, y además retrasar el tiempo en que ocurra la germinación, ocurre en semillas que fueron previamente no dormantes, pero vuelven a entrar en este estado debido a que las condiciones ambientales son desfavorables para la germinación. Algunas semillas podrían ciclar entre el estado dormante y no dormante numerosas veces antes de la germinación (Baskin y Baskin, 1998). La dormancia se ha enfocado usando el sistema adaptado por Crocker (1916) y Nikolaeva (1977), el cual posteriormente fue modificado por Baskin y Baskin (2014) (Tabla 1). Las categorías mayores incluyen:

- I. Dormancia primaria
 - a. Exógena
 - b. Endógena
 - c. Combinada
- II. Dormancia secundaria
 - a. Termodormancia
 - b. Condicional

Tabla 1. Categorías de la dormancia de una semilla y condiciones para su rompimiento (Modificada de Baskin y Baskin, 2014; Hartmann et al., 2011).

Tipos de dormancia	Causas	Condiciones para romper la dormancia
I. Dormancia primaria	Condición al final del desarrollo de la semilla	
a. Dormancia exógena	Impuesta por factores externos al embrión	
i. Física	Cubierta o testa impermeable	Escarificación
ii. Química	Inhibidores presentes en las cubiertas seminales	Remoción de la cubierta seminal o testa Lixiviación.
b. Endógena	Impuesta por factores en el embrión	
i. Fisiológica	Factores dentro del embrión que inhiben la germinación	
1. No –Profunda	El potencial de crecimiento del embrión es inadecuado para escapar de la semilla. Puede ser ligeramente sensible a la luz.	Periodos cortos de exposición a frío. Después del estado de maduración (almacenamiento en seco)
2. Intermedia	Potencial de crecimiento del embrión es inadecuado para escapar de la semilla. El embrión germina si es separado de la testa.	Periodos moderados (hasta 8 semanas) de exposición a frío (estratificación)
3. Profunda	El embrión no germina cuando se remueve de la semilla la testa o podría formar un desvío fisiológico.	Largos periodos de estratificación en frío (más de 8 semanas)
ii. Morfológica	El embrión no está completamente desarrollado al tiempo que la semilla es separada de la planta	Estratificación con calor o frío.
iii. Morfo-fisiológica	Combinación de un embrión no completamente desarrollado y una dormancia fisiológica.	Ciclos de estratificación en presencia de frío y calor.
c. Dormancia Combinacional	Combinación de condiciones de dormancia exógena y endógena. Por ejemplo: física (testa dura) más dormancia fisiológica.	Combinación secuencial de tratamientos para sobrepasar la dormancia. Por ejemplo, escarificación seguida de estratificación en frío.
II. Dormancia Secundaria		
a. Termodormancia	Después de la dormancia primaria es superada, temperaturas altas inducen dormancia	Reguladores de crecimiento o estratificación en frío.
b. Dormancia condicional	Cambios en la habilidad para germinar relacionada con la época del año.	Estratificación en frío



2.3.3 Tratamientos pregerminativos

Los tratamientos pregerminativos, son todos aquellos procedimientos necesarios para romper la dormancia que exhiben las semillas de una especie, esto es, el estado en que se encuentran algunas tal que, estando vivas, no son capaces de germinar sino hasta que las condiciones del medio sean las adecuadas para ello (Arnold, 1996; Baskin y Baskin, 2014). Cada especie requiere un tratamiento específico y con una intensidad diferente, de acuerdo al tipo de dormancia que la afecte y a las características propias de la especie (Tabla 1). Los métodos pregerminativos más comunes son los siguientes: Estratificación, escarificación (Mecánica) y química (Lixiviación y combinación de tratamientos) (Baskin y Baskin, 2014).



3. ESTADO DEL ARTE

3.1 Passifloras

La familia passifloraceae, que corresponde al orden Passiflorales, tribu Passiflorae, comprende más de 600 especies que corresponden a 18 géneros. Son especies herbáceas o semileñosas; presentan zarcillos axilares. La mayoría de las especies agrupadas en esta familia son frutas comestibles. Están distribuidas en Norteamérica y Suramérica, la región caribe, las islas Galápagos, África, Asia, Oceanía, Filipinas y Australia. Nuestro continente es el centro de diversidad del género *Passiflora*, que comprende 95% de todas las especies (Arias et al., 2016). Colombia y Brasil son centros de diversidad, con un 30% de especies registradas (150 en Brasil y 170 en Colombia) (Ocampo et al., 2010; Arias et al., 2016).

El género *Passiflora*, caracterizado por la diversidad de germoplasma, es prácticamente endémico en el nuevo mundo; el mayor número de especies están presentes en Colombia, debido a la variedad de hábitats y climas. Muchas de estas especies se destacan por su valor económico, medicinal y ornamental. Entre las especies cultivadas del género *Passiflora* se encuentran maracuyá (*P. edulis* var. *flavicarpa*), granadilla (*P. ligularis*), gulupa (*P. edulis* var. *edulis*), curuba de Castilla (*P. mollisima*) y badea (*P. quadrangularis*). Entre las características más importantes de algunas de sus especies se encuentran su sabor, aroma, contenido nutricional, aplicaciones nutraceuticas y farmacéuticas, además de la presencia de sustancias antioxidantes alcaloides, entre otras, muchas especies también son de valor ornamental (Yockteng et al., 2011).

Origen

El género *Passiflora* fue establecido por Linnaeus (1737) y el nombre está relacionado con la mística imagen católica de la pasión de Jesucristo. Cuando los primeros misioneros españoles desembarcaron en América fueron sorprendidos al descubrir en la morfología floral de las passifloras (*P. incarnata* L.) los signos de la crucifixión de Cristo (Killip 1938). Estos representan los tres estigmas capitados como los clavos que sostuvieron a Cristo en la cruz, las cinco anteras como sus llagas, los filamentos de la corona color blanco y morado como la corona de espinas salpicada de sangre, los diez pétalos (5 pétalos y 5 sépalos) los apóstoles, excluyendo a Judas el traidor y Pedro el negador. Adicionalmente, en los zarcillos representaron los látigos que azotaron a Cristo de camino al calvario, las hojas viejas las manos de los que le persiguieron y las hojas nuevas la punta de lanza que atravesó su costado. En 1745, Johan Hallman en su tesis describió 22 especies con referencias tempranas de sinónimos y entabló una discusión sobre la historia de tales especies, nombres vernáculos, clasificación, distribución, supersticiones y usos (Ulmer y MacDougal, 2004). Linnaeus, en 1757, describió 24 especies de acuerdo a la nomenclatura binomial, catalogándolas en su obra culmen



Species Plantarum, y en 1789 el número de especies incrementó a 35 gracias a los aportes de Lamarck.

Especies cultivables

Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss)



La granadilla es una planta perenne, de hábito trepador, debido a la presencia de zarcillos, y de rápido crecimiento. El tallo es semileñoso en el cuello de la planta, y herbáceo en el resto. Su sistema radical es superficial con raíces fibrosas y ramificadas. Las hojas son alternas de forma acorazonada. Su tamaño es de 10 a 25 cm de largo con un ancho de 10 a 15 cm. Las flores son de color violeta dispuestas en pares y de maduración asincrónica, lo cual favorece el ingreso de polinizadores. La polinización es cruzada (Cerdas y Castro, 2002).

El fruto de granadilla es una baya, ovoide o elipsoidal, con un pedúnculo de 6 a 8 cm de largo. En este fruto, cerca del 50% es cáscara, el resto forma la parte comestible que incluye, el arilo, semilla y jugo. La fruta tiene cerca de 200 semillas, de color negro y acorazonado de unos 5 a 6 mm de largo. Cada semilla está dentro de un envoltorio transparente, que se llama arilo. (Miranda et al., 2009).

Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*)



El maracuyá es originario de Brasil, se produce principalmente en Brasil, Perú, Ecuador, Colombia, Bolivia y Venezuela. También se tiene en Australia, Nueva Zelanda, Hawái, Sur África e Israel. En Colombia se manejan tres ecotipos: Hawái, que es de fruto grande, color amarillo y un peso promedio de 100 gramos, Brasil - Venezuela que es de fruto pequeño, color amarillo y peso promedio de 66 gramos y África que es de fruto mediano, color púrpura y peso promedio de 80 gramos (Vásquez et al., 2008).

El maracuyá es una planta trepadora, leñosa y vigorosa. Sistema radicular ramificado y superficial, tallos redondos, zarcillos, hojas simples, alternas ovaladas, lamina foliar palmeada, frutos redondos y semilla de color negro o marrón oscuro. Las flores son hermafroditas y autoincompatibles, es decir, no se autofecundan, deben ser polinizadas por la acción de los insectos o de forma manual. Están provistas de cinco pétalos y una corona de filamentos radiante de color púrpura en la base y blanca en el ápice, posee cinco estambres y tres estigmas (Vásquez et al., 2008).



El fruto es una baya redonda u ovalada, con un promedio de 6 cm de diámetro, pesa entre 60 y 100 gramos, es de color amarillo; la pulpa es gelatinosa y tiene pequeñas semillas (entre 200 a 300 por fruto), de color oscuro. Las semillas tienen alto contenido de aceite, con un gran valor nutricional y fácilmente digeribles (Betancourt et al., 2014).

Gulupa (*Passiflora edulis* Sims.)



Originaria de Brasil, en el siglo XIX distribuida a otros países del continente asiático, el Caribe, África, India y Australia.

La planta es una liana trepadora semiperenne, con un tallo glabro, herbáceo y leñoso hacia la base. Las ramas pueden alcanzar hasta 50 m de longitud, entrenudos de los cuales se origina una yema floral, dos estípulas lineares, una hoja y un zarcillo. Las hojas son pecioladas, glabras, alternas, de color verde, semicoriáceas, con nervaduras pronunciadas y trilobuladas, margen aserrad. El sistema radicular de la gulupa es fasciculado, fibroso y ramificado. La flor es generalmente solitaria, semirecta, pentámera, hermafrodita, vistosa y de aroma agradable. Están provistas de cinco pétalos y cinco sépalos, reflexos, oblongos, de color blanco y verduzcos con márgenes blancos en el envés. La corona está distribuida en dos series exteriores de color blanco y púrpura hacia la base (Ocampo *et al.*, 2012).



El fruto es una baya de forma esférica u ovoide de 5.2 a 8.0 cm de longitud por 4.7 a 7.2 de diámetro, con un pericarpio de consistencia dura. En estado inmaduro es de color verde pálido y púrpura oscuro cuando está maduro. Presenta en su interior un promedio de 135 a 243 semillas recubiertas por un mucílago o arilo de color amarillo casi anaranjado con agradable aroma, donde se encuentran los azúcares, vitaminas y minerales. (Ocampo y Wyckhuys, 2012).

La semilla es de forma ovalada o acorazonada de color negro o violeta oscuro, de 4.8 a 6.0 mm de longitud por 3.1 a 4.0 mm de ancho, y con una testa que presenta entre 45 a 50 foveas o hendiduras que van desapareciendo hacia el borde. Las semillas están constituidas por aceites entre un 18-20%, un 10% de proteína y un 55% de fibra (Nyanzi et al., 2005).



Curuba (*Passiflora Tripartita Mollissima*)



Las curubas pertenecen al subgénero *Tacsonia* del género *Passiflora* (*Passifloraceae*), el cual cuenta con 21 especies en Colombia, según la lista publicada por Hernández y Bernal (2000), dos de ellas ampliamente cultivadas a nivel comercial o del huerto casero. La más importante es *P. tripartita* var. *mollissima* Holm-Nielsen & Møller Jørgensen o curuba de Castilla (anteriormente conocida como *P. mollissima* (Kunth) Bailey), cuyo cultivo comercial se inició a fines de los años 50 en el altiplano cundiboyacense (Primot et al., 2005).

Es una planta trepadora, tallo cilíndrico, corteza fibrosa, entrenudos de 6 a 12 cm de longitud, con pubescencia blanca o blanco-grisáceo, estípulas aciculares, auriculadas y aristadas. Las hojas pecioladas, láminas trilobadas, lóbulos ovados, acuminados, margen serrado, lámina pubescente (Duarte y Paull, 2015). Las flores son axilares, solitarias y péndulas. El Fruto tiene un diámetro de 10-14 x 3.5-4.5 cm, frutos jóvenes con pelos, al madurar se caen los pelos y se vuelve amarillo, con pericarpio amarillo, arilo color naranja, succulento, dulce, semillas asimétricas (Duarte y Paull, 2015).

Especie silvestre

Cóngolo (*Passiflora maliformis* L.)



Nombres comunes: granadillas de piedra, cholupa, (*Passiflora maliformis* L.) es originaria del norte de Ecuador, Colombia, Venezuela y las Antillas, e introducida a Europa como planta ornamental en jardines botánicos (Ulmer y MacDougal, 2004). La especie puede crecer hasta los los 2.200 m.s.n.m. en forma silvestre en los bordes de caminos y zonas perturbadas (Ocampo, 2007). En el Huila se conoce como cholupa o fruto de piedra y se ha adaptado como cultivo (Ocampo et al., 2015), en Boyacá se le conoce comúnmente como

cóngolo y se encuentra en estado silvestre.

El sistema radicular es fasciculado, fibroso y ramificado. La planta es una liana trepadora semiperenne, con un tallo cilíndrico, de color verde, estriado, herbáceo y leñoso hacia la base con hasta 12 cm de diámetro. Hojas son pecioladas, lanceoladas u oblongolanceoladas de un solo lóbulo, aristada en el ápice, sub-acorazonada en la base, ligeramente aserrada, glabra o pubescente en el envés y de color verde. La flor es solitaria o raramente en pares, pendular, pentámera, hermafrodita, de color blanco y por dentro intensamente moteados de rojo-purpúreo. (Ocampo et al., 2015).



El fruto es una baya de forma esférica u ovoide de 40 a 97 mm de longitud por 42 a 86 mm de diámetro, con una cáscara (pericarpio) de consistencia extremadamente dura, lisa y cerosa, de unos 3.0 a 4.5 mm de espesor. El fruto en estado inmaduro es generalmente de color verde pálido o amarillo con puntos blancos diminutos y toma una coloración verde amarillento cuando está maduro. El peso del fruto varía entre 21 y 23 g, y presenta en su interior un promedio de 135 a 243 semillas recubiertas por un arilo. La semilla es ovalada o acorazonada de color gris metálico, finamente reticulada y de 4.4 a 5.1 mm de longitud por 3.3 a 4.3 mm de ancho. Así mismo, el contenido de aceites en la semilla puede alcanzar el 28.3% (Nyanzi et al., 2005).

3.2 Recursos Fitogenéticos en el Género *Passiflora*

La variabilidad inherente al género *Passiflora* no está restringida a sus características morfológicas y la composición química de frutas y flores sino que también incluye rasgos importantes para su sobrevivencia en condiciones ambientales naturales y/o cultivables, tales como la resistencia de especies silvestres a estreses biótico (hongos, bacterias, nemátodos y virus) y abióticos (variación en las condiciones edafoclimáticas de las micro y macro regiones en las cuales *Passiflora* se encuentra naturalmente o como cultivo) (Junqueira et al., 2003, Oliveira et al., 2013).

De acuerdo a Bonilla (2014) a nivel nacional, existen diversas instituciones que tienen bancos de germoplasma de *Passifloras* en forma de semilla o *in vivo*:

- i. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira en forma de semilla 70 accesiones para 40 especies.
- ii. Universidad de Nariño con 47 accesiones de 12 diferentes especies compuesto principalmente por *P. tripartita* var. *mollissima* en San Juan de Pasto (Nariño).
- iii. Universidad de Caldas *in vivo* tiene 80 accesiones de dos especies, granadilla y gulupa.
- iv. Casa Luker, en Caldas tiene 50 accesiones para una especie, maracuya *in vivo*, localizada en la Granja Luker, y,
- v. Corpoica: 141 accesiones de *passifloras* en forma de semilla, en Rionegro, Antioquia, de las cuales dos son de gulupa y 26 de granadilla (Posada, 2013).

Sin embargo en el departamento de Boyacá no se tiene conocimiento de bancos de germoplasma o colecciones, por lo cual este trabajo constituye una primera aproximación hacia el conocimiento de la diversidad genética de este recurso fitogenético.



3.3 Investigaciones en caracterización molecular en el género *Passiflora*

El género *Passiflora* es altamente diverso, Brasil y Colombia, en particular, son centros de diversidad de estas especies; aproximadamente el 30% de ellas están localizadas en estos países (aproximadamente 150 en Brasil y 170 en Colombia) (Ocampo, Coppens D'Eeckenbrugge y Jarvis, 2010). Cerqueira et al. (2016) muestran la importancia de la caracterización de la variabilidad genética para la conservación y biodiversidad de las Pasifloráceas, a pesar de la importancia y el número de especies de *Passifloras* la caracterización genética y los programas de mejoramiento aún son reducidos. Los estudios taxonómicos y filogenéticos reportados principalmente durante los últimos 10 años, utilizando marcadores moleculares y técnicas de secuenciación han permitido organizar la clasificación taxonómica de especies del genero *Passiflora* en 4 subgéneros: *Astrophaea*, *Decaloba*, *Deidamiodes*, y *Passiflora* (Ocampo et al., 2010) .

Los estudios genéticos asociados con marcadores moleculares en el género *Passiflora* han sido reportados desde hace casi dos décadas (Figura 1). A pesar de la disponibilidad de aproximadamente 5.762 fragmentos de secuencias de ADN y ARN (NCBI 2017), los estudios genéticos han utilizado las técnicas de marcadores moleculares en diferentes etapas de los programas de mejoramiento y para estimaciones de la diversidad de un número limitado de especies de *Passiflora* (por ejemplo, Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), RAPD, polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), repetición de secuencia inter-simple (ISSR), repetición de secuencia simple (SSR) y marcadores SNP (Cerqueira-Silva et al., 2014).

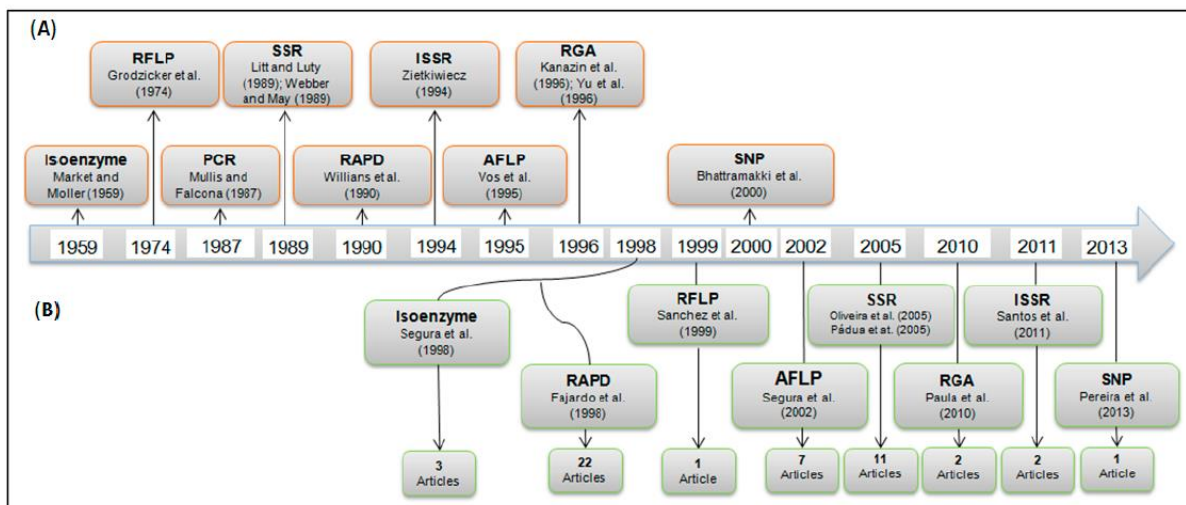


Figura 1. Ilustración cronológica de los principales marcadores moleculares y su referencia inicial (Tomada de Cerqueira-Silva et al., 2014).



La caracterización molecular de algunas especies de passifloras ha sido evaluada: en gulupa, *P. edulis* f. *edulis*, empleando marcadores moleculares tipo RAMs, donde se encontró una alta diversidad de los materiales evaluados (Fonseca et al., 2009). En este contexto, marcadores tipo RAPD y AFLP han sido utilizados para demostrar una alta variabilidad entre accesiones de *P. edulis* así como una baja correlación entre las distancias genéticas estimadas y los lugares de procedencia de las accesiones evaluadas (Ganga et al., 2004; Bellon et al., 2007). En contraste, la estimación de la diversidad mediante RAPD en accesiones comerciales de esta especie indican una baja variabilidad (Cerqueira et al., 2010). Resultados similares fueron encontrados en accesiones de gulupa procedentes de distintas zonas geográficas en Colombia evaluadas mediante marcadores AFLP y SSR (Ortiz, 2010).

En maracuyá, marcadores moleculares tipo microsatélite SSR han sido desarrollados para *P. edulis* f. *flavicarpa* (Oliveira et al., 2005) y *P. alata* (Pádua et al., 2005), como herramientas para análisis de estructura genética de poblaciones silvestres, sistemas reproductivos y diversidad genética. Ponciano-Samayoa et al. (2012) evaluaron 9 genotipos cultivados en Guatemala para *P. edulis* variedad amarilla y morada, encontraron un flujo genético alto principalmente para maracuyá debido a su naturaleza. Castro et al. (2016), utilizaron microsatélites para estudiar su aplicación en la caracterización de especies de *Passifloras* (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *P. cincinnata*, *P. alata* y *P. setacea*) y verificar el efecto de la selección al azar de los individuos en parámetros que caracterizan la variabilidad genética del germoplasma con propósitos de conservación. Recientemente, Carmo et al. (2017), evaluaron siete accesiones de la especie silvestre *P. cincinnata*, con un gran potencial para programas de mejoramiento de *P. edulis* f. *flavicarpa* debido a su resistencia a enfermedades, se utilizaron descriptores morfológicos, agronómicos y marcadores moleculares tipo ISSR, con la finalidad de identificar la variabilidad morfoagronómica, genética y potencial de uso en programas de mejoramiento.

Ocampo et al. (2015), realizaron colecta e identificación de genotipos élite de ganadilla (*P. ligularis* Juss.) en Colombia, permitiendo identificar seis accesiones élite con alta calidad para la comercialización, procedentes de cinco departamentos.

En otras especies de passifloras, características morfológicas y moleculares han sido estudiadas en especies silvestres de *Passifloras* (*P. palmeri* var. *sublanceolata*, *P. morifolia*, *P. foetida* var. *foetida*, *P. coriacea* and *P. micropetala*, y *P. suberosa*.), la variabilidad intraespecífica fue observada para el número de flores, frutos, e semillas, tamaño y amplitud del fruto, y área foliar. Los análisis aplicando marcadores RAPD (15 cebadores) mostraron una variabilidad morfológica y molecular alta a nivel intra e interespecífica (Viana et al., 2010). En otras investigaciones, la distancia genética de 12 especies pertenecientes a los subgéneros *Passiflora*, *Decaloba* y *Tacsonia* se determinó empleando marcadores RFLP y ADN cloroplasmático, evidenciándose una alta variabilidad interespecífica en las especies evaluadas (Sánchez et al.,



1999). Ramaiya et al. (2014), utilizaron caracterización morfológica y análisis filogenético de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN nuclear ribosomal para investigar la filogenia y diversidad de las especies de *Passifloras*, las muestras fueron colectadas en varias regiones del este de Malasia.

Los estudios anteriores ponen de manifiesto la existencia de diversidad genética en las especies de *Passifloras* spp, en diferentes condiciones agroclimatológicas y evaluada con diferentes marcadores moleculares y su uso dentro de programas de mejoramiento, de ahí la importancia de la colecta y caracterización del germoplasma que nos permitirá en un futuro un uso sostenible de este recurso fitotegénico dentro de sistemas productivos más competitivos.

3.4 Tratamientos pregerminativos en semillas del género *Passiflora*

En semillas del género *Passiflora* diversos tratamientos pregerminativos han sido aplicados, puesto que el período para la germinación se ha estimado entre 10 días y tres meses, con bajas tasas de germinación e irregular formación de plántulas en algunos casos (Delanoy et al., 2006; Marostega et al., 2017). Las semillas tienen una testa dura cubierta por una resina que la hace impermeable induciendo dormancia exógena, lo cual es probablemente una combinación de mecanismos mecánicos y químicos, que conducen a bajos porcentajes de germinación (Ellis et al., 1985; Gutiérrez et al., 2011; Ramírez et al., 2015). Se ha reportado dormancia en especies de *P. quadrangularis*, *P. suberosa*, *P. nítida*, *P. foetida*, *P. alata*, (Marostega et al., 2017), *P. edulis var edulis*, *P. ligularis* y *P. maliformis* (Gutiérrez et al., 2011), *P. edulis var flavicarpa* (Ramírez et al., 2015) Hartmann y Kessler (2011), indican que para *P. xalatocaerulea*, *P. mollisima* y *P. tricuspsis* se presenta una combinación de dormancia mecánica y fisiológica.

Por otro lado, se tienen estudios que demuestran el uso de diversos tratamientos pregerminativos en diferentes *Passifloras* como los que se presentan a continuación: A nivel internacional, en Brasil Marostega et al. (2017) evaluaron en *Passifloras* ornamentales (*P. quadrangularis*, *P. nítida*, *P. foetida*, *P. eichleriana*, *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. mucranata*, *P. micropetala*, *P. suberosa*, *P. morifolia*, *P. tenuifila*) tratamientos pregerminativos que incluían inmersión en ácido giberélico a 1.000 ppm por horas, inmersión en nitrato de potasio al 0.2% por 24 horas, y escarificación de la testa parcial. El tratamiento más efectivo fue el uso de GA₃ obteniéndose entre un 54 y 86% de germinación para las especies evaluadas. En gulupa, Mabunza et al. (2010), en Suizilandia, emplearon escarificación química con H₂SO₄ al 98% durante 5 minutos o fermentación en solución de sacarosa al 10%, generando porcentajes de germinación de 94 y 85%. Ellis et al., 1985 reportaron que las semillas dormantes de *Passiflora* spp. Requieren escarificación y temperatura alterna (20/30 °C) para promover la germinación.



En Colombia, diversas investigaciones relacionadas con la evaluación de pretratamientos germinativos se han realizado para la propagación de plantas por semilla de gulupa, maracuyá y cholupa. Ramírez et al. (2015), reportan que debido a que las tasas de germinación son variables cuando se aplican los protocolos disponibles en *P. edulis f. edulis*, evaluaron tratamientos pregerminativos tales como: cortes apicales y basales en la semilla, alternancia de temperaturas, aplicación de ácido giberélico e inmersión en ácido sulfúrico al 96% y la inoculación de micorrizas (*Glomus fasciculatum*). En los resultados encontraron que el tratamiento de mayor efectividad para romper la dormancia fue la inmersión en ácido sulfúrico al 96% con un 67.9 % de germinación reduciendo el tiempo de germinación en 18 días en comparación con los demás tratamientos.

Velásquez et al. (2012), en gulupa (*P. edulis var. edulis*) evaluaron tratamientos que incluyeron remoción de la parte apical de la semilla con aplicación de ácido giberélico a 400 ppm por 24 horas, alternancia de temperaturas de 12 h (18°C/25°C), escarificación química con ácido sulfúrico al 96% con duración variable de exposición, inmersión en ácido salicílico, pretratamiento en frío a 4°C durante 15 días y siembra posterior en invernadero a 25°C. Este último registró el mayor porcentaje de germinación, del 75%, los demás tratamientos menores al 17%.

En estudios de tres especies de *Passiflora*, Gutiérrez et al. (2011) aplicaron tratamientos pregerminativos para sobrepasar la dormancia mediante escarificación mecánica (despunte basal, despunte apical y punción de la testa), escarificación química (inmersión en H₂SO₄ al 49% y 98%) promoviendo una rápida y uniforme germinación en gulupa de hasta el 94%, en granadilla de hasta el 52%, y en cholupa ningún tratamiento de los ensayados superó el 42% registrado para el control. En otras investigaciones en gulupa, la imbibición en ácido giberélico durante 24 horas a una concentración de 1mg/ml, también registró porcentajes altos de germinación, del 94% (Montero y Camargo, 2011).

Es evidente que al aplicar los métodos pregerminativos, reportados por los investigadores mencionados anteriormente, los resultados de porcentajes de germinación, en la misma especie de *Passiflora* o en otras pertenecientes al mismo género, han sido variables aun cuando los pretratamientos evaluados fueron iguales o similares. Otra sustancia que se ha probado en algunas especies vegetales para escarificación química es el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las especies reactivas al oxígeno (ROS) tienen un rol transcendental en los procesos fisiológicos, de desarrollo y en la defensa de la planta (Laguiret et al., 2013). El peróxido de hidrógeno hace parte de esta familia, y en especies como guisante y melón se ha demostrado la estimulación de la germinación y el crecimiento temprano, articulando una interacción entre el estado redox celular y las hormonas vegetales durante dicho proceso (Barba et al., 2012). Debido a sus características químicas también podría ser empleado para escarificación de la semilla ablandando la testa y estimulando a su vez la germinación del embrión viable de las pasifloras. Tratamientos pregerminativos que incluyan escarificación con peróxido de hidrógeno no han sido reportados en la familia Passifloraceae.



4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Colombia es un país privilegiado por su ubicación geográfica, esta característica se refleja en diversas condiciones agroecológicas lo cual se aprecia en la variedad de especies frutales que produce con enormes ventajas comparativas. Es importante destacar que las frutas son la base esencial para la alimentación de la población humana debido a la fuente de vitaminas, antioxidantes, minerales, azúcares, proteínas y fibras, además de compuestos específicos para cada especie (Slavin y Lloyd, 2012; Chaparro et al., 2015)).

En un esfuerzo estratégico por recuperar y redireccionar la producción del país, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural diseñó la apuesta exportadora agropecuaria 2006-2020, que busca la modernización y la especialización de la estructura productiva a través del aprovechamiento del potencial del campo y las oportunidades de mercado de cada producto promisorio exportable (Fischer y Miranda, 2012). Esta apuesta priorizó 10 grupos de productos, entre los que se encuentran frutales exóticos como las passifloras, principalmente maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), granadilla (*Passiflora ligularis*) y gulupa (*Passiflora edulis* Sims) (Ramírez y Salazar, 2012; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2016).

El género *Passiflora* L., con cerca de 576 especies es económicamente el más importante de la familia Passifloraceae, distribuido desde el nivel del mar hasta los páramos andinos (Killip, 1938; Ulmer y MacDougal, 2004). A nivel mundial los principales países productores son Brasil, Colombia y Ecuador. En 2016, los principales destinos de exportación del maracuyá, gulupa y granadilla fueron: Francia, Países bajos, España, Alemania, Bélgica y Canadá (ProColombia, 2017).

Colombia, es centro de diversidad de especies de Pasifloráceas en el mundo, algunas de ellas cuentan con una alta importancia comercial, tanto en el contexto nacional como internacional. Las passifloras, como maracuyá, gulupa, granadilla, curuba, cholupa y badea, están presentes en 24 departamentos y 422 municipios. Según datos proporcionados por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Boyacá cuenta con 11.833 hectáreas que representan el 5.3 % del área nacional de producción de frutales, se reporta para el año 2019 una producción de 9.876 toneladas y un área sembrada de 1.532 hectáreas de gulupa, curuba, maracuyá y granadilla. Además, Boyacá, es el principal productor de curuba a nivel nacional (SIOC, 2019).

Passiflora maliformis es una especie promisoriosa por sus exquisitos frutos, siendo una especie poco estudiada, y con problemas de producción comercial a gran escala en Colombia, en el departamento del Huila, denominada como cholupa, viene siendo cultivada desde hace cerca de una década, con progresos en la selección de materiales con características deseables, sin



embargo, en Boyacá conocida como cóngolo o granadilla piedra, se encuentra en forma silvestre en varios municipios. Según Meletti et al. (2005), especies como *P. maliformis* son aún inexploradas y representan un potencial interés con respecto a ser incluidas en programas de mejoramiento genético por presentar resistencia a enfermedades y plagas. Fischer et al. (2010) identificó a *P. maliformis* como una planta candidata para su uso como portainjerto en cultivos de *P. edulis* f. *edulis* y otros híbridos susceptibles como forma de manejo sostenible ante la enfermedad de la pudrición del cuello causada por *Fusarium solani*. Forero et al. (2015) encontraron que desde estados fenológicos tempranos tiende a adquirir niveles de resistencia/tolerancia al ataque de *Fusarium oxysporum*.

A pesar de la alta productividad, los cultivos son afectados por graves problemas fitosanitarios como virosis, bacteriosis, fusariosis y mosca del ovario; degeneración genética y la falta de mejoramiento genético en las especies del género *Passiflora*, han ocasionado disminución de la vida útil de las plantaciones, pasando de 36 a 18 meses y de 40 a 16 t/ha de fruto por año. Dentro de los cultivos actuales existe una alta variabilidad en forma y tamaño de los frutos, lo que obliga al productor a seleccionar fenotípicamente aquellos destinados a mercado, ocasionando un aumento en los costos de producción (Ocampo et al., 2009).

En Colombia, a pesar de la importancia de especies representativas del género y de su alto número, el conocimiento sobre su diversidad especialmente en la región de Boyacá es reducido, comparado con otras especies, siendo las más representativas a nivel comercial la gulupa, maracuyá, granadilla y curuba; en este departamento no existen estudios de caracterización morfológica y molecular de estas especies ni tampoco se conoce la similaridad genética entre los genotipos cultivados y silvestres; por lo anterior, se hace necesario establecer la diversidad genética de este recurso fitogenético, con miras a futuros programas de mejoramiento que solucionen los problemas que se presentan en los cultivos.

Los problemas sanitarios en los cultivos también hacen necesario el establecimiento de metodologías de propagación, que permitan ofrecer al agricultor, material de buena calidad y que cumpla con las expectativas del mercado, ya que en solo cinco años la producción de material vegetal y su transporte sin ningún tipo de supervisión, ha diseminado por más de 15 departamentos, 11 especies de virus, los cuales afectan económicamente las pasifloras a nivel mundial y que ya están en Colombia afectando cultivos de este género, en los viveros de multiplicación de material vegetal de frutales exóticos en varios departamentos, donde en plántulas es común observar síntomas de mosaicos, amarillamientos, manchas y puntos cloróticos. En campo, adicionalmente se perciben pérdidas económicas por decoloraciones y deformaciones en frutos. Todo ello ocasiona una disminución significativa del potencial productivo, reducciones en la exportación, problemas sociales y económicos, entre otros (Rodríguez et al., 2016).

Para cumplir con las expectativas de demanda de frutos con las características



técnicas exigidas, es importante el uso de material de propagación de excelente calidad, el cual está relacionado directamente con el rendimiento de los cultivos. En gulupa, especie cultivable, y cóngolo, especie silvestre, son escasos los estudios sobre metodologías de propagación, los métodos actuales generan materiales de siembra de calidad heterogénea, con bajos y variables porcentajes de germinación, baja población de plantas establecidas y por ende rendimientos reducidos (Gutiérrez *et al.*, 2011). La principal vía de propagación es a través de semilla, la cual presenta dificultades de tipo físico y químico, denominada también como latencia exógena, es decir que la testa es de textura pétreo y posee una resina que la hace impermeable (Ellis *et al.*, 1985; Jiménez, 2006; Hartmann *et al.*, 2002), por lo que el embrión difícilmente puede romper esta cubierta. Por tanto, se hace necesario aplicar tratamientos pregerminativos que permitan superar la dormancia impuesta por las cubiertas y promuevan la germinación rápida y uniforme de las semillas, así como evaluar las condiciones ambientales favorables, para lograr altos porcentajes de germinación y disponibilidad de material vegetal suficiente para el agricultor en el momento que lo requiera.

4.1 Pregunta de Investigación

Teniendo en cuenta lo anterior, se plantearon las siguientes preguntas de investigación:

- ¿La información obtenida a partir del uso de los marcadores moleculares ISSR permitirán determinar la diversidad genética de los materiales de *Passiflora* spp colectados en el departamento de Boyacá?
- ¿Cuáles de los tratamientos pregerminativos aplicados para la propagación de *Passiflora edulis* f. *edulis* vía semilla permitirán obtener material vegetal en condiciones técnicas adecuadas con mayores porcentajes de germinación?

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Caracterizar la diversidad genética de las passifloras silvestres y cultivadas en el departamento de Boyacá con fines de conservación y aprovechamiento.

5.2 Objetivos Específicos



- Identificar la variabilidad genética existente en los materiales de *Passiflora* spp. colectados en los principales municipios productores del departamento de Boyacá, mediante el uso de marcadores moleculares ISSR (Inter-Secuencia Simple Repetida).
- Propagar *P. edulis f. edulis* a partir de semillas procedentes de frutos de árboles seleccionados, mediante la aplicación de tratamientos pregerminativos.

6. METODOLOGIA

6.1 Material Vegetal

La colecta de los genotipos cultivados y silvestre de *Passiflora* spp. se llevó a cabo en las principales zonas productoras del departamento de Boyacá (Tabla 2). En el caso de las especies cultivables las seleccionadas corresponden a maracuyá, granadilla, curuba y gulupa, mientras que la silvestre es el cóngolo o cholupa. En cada una de las fincas visitadas se seleccionaron 4 plantas al azar, las cuales eran vigorosas, sin problemas fitosanitarios y según los fruticultores con alta productividad, de cada una de ellas se tomaron 4 hojas jóvenes y sanas para la caracterización molecular.

Tabla 2. Sitios de colecta de materiales de Pasiflora en las principales zonas productoras del departamento de Boyacá.

Municipio	Cultivo	Localización
Firavitoba	Gulupa	5°40'10"N 72°59'34"O
Ramiriquí	Gulupa, Granadilla	5°24'03"N 73°20'08"O
Umbita	Curuba	5°13'14"N 73°27'26"O
Turmequé	Curuba, Granadilla	5°19'25"N 73°29'23"O
Sutamarchán	Curuba, Gulupa	5°37'14"N -73°37'17"O
Tinjacá	Granadilla, gulupa, Cóngolo, injerto (Cóngolo-Gulupa)	5°34'51"N -73°38'46"O
Nuevo colon	Cóngolo	5°21'15"N -73°27'23"O
Buenavista	Gulupa	4°21'35"N -75°44'21"O
Miraflores	Maracuyá	12°07'03"S-77°02'35"O
Briceño	Maracuyá	5°41'29"N 73°55'20"O
Tununguá	Maracuyá	5°43'49"N 73°55'56"O

Las hojas jóvenes de las plantas de passifloras colectadas, se etiquetaron y rotularon con los datos correspondientes a la especie, sitio de colecta y coordenadas geográficas y otros aportados por los fruticultores. Para evitar la deshidratación se envolvieron en papel aluminio y en bolsas ziploc y se conservaron en una nevera portátil con nitrógeno líquido hasta su ingreso al laboratorio.



6.2 Caracterización molecular

La caracterización molecular de los materiales vegetales de passifloras se llevó a cabo en los laboratorios de investigación en Biología Molecular de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, UPTC, Tunja.

6.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN el tejido vegetal se maceró con nitrógeno líquido y se almacenó en tubos eppendorf a -70°C. La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de Dellaporta et al. (1983). La cuantificación y visualización de la calidad del ADN obtenido se realizó en geles de agarosa al 0.8% y la determinación de la concentración de ADN se realizó en el fluorómetro Hoefer Dyna Quant 200.

6.2.2 Amplificación con marcadores moleculares ISSR

Se evaluaron ocho cebadores ISSR descritos en la tabla 3, y probados en estudios de diversidad genética en diferentes especies como mora, uchuva, guayaba y heliconias (Muñoz *et al.*, 2008), cítricos (Morillo *et al.*, 2009), guadua (Rúgeles, 2011), y algunas especies del genero *Erythrina* (Gómez, 2012), y del genero *Passiflora* se han probado para gulupa (Londoño, 2012), y recientemente para evaluar diversidad genética en tubérculos andinos como ibias y cubios (Morillo *et al.*, 2016).

Tabla 3. Cebadores a evaluar en la técnica microsatélites ISSR

Cebador	Secuencia 5´-> 3´
CCA	DDB(CCA) ₅
CGA	DHB(CGA) ₅
ACA	5'BDB(ACA) ₅
GT	VHV(GT) ₅ G
AG	VHV(GT) ₅ G
CT	DYD(CT) ₇ C
TG	DYD(CT) ₇ C
CA	DBDA(CA) ₇

Las siguientes designaciones se utilizan para los sitios degenerados: H (A ó T ó C), B (G ó T ó C), V (G ó A ó C) y D (G ó A ó T).

Para la reacción de amplificación con ISSRs se utilizó un volumen final de 25 µl, la mezcla de reacción se preparó con buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq Polimerasa 1U, cebador 2 µM y ADN genómico aprox 10 ng. La amplificación se realizó en termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller de MJ Research, Inc., las condiciones están relacionadas con el cebador seleccionado y las recomendaciones del fabricante, en la tabla 4 se presentan las condiciones de amplificación de la PCR para los marcadores moleculares ISSRs evaluados.



Tabla 4. Condiciones de amplificación de los marcadores moleculares ISSR

Ciclo	Temperatura (°C)			Tiempo	Etapa
	CA, AG, ACA	CT, CCA, TG	GT, CGA		
1		95		5 min	Desnaturalización inicial
2		95		30 seg	Desnaturalización
3	50	55	58	45 seg	Hibridación
4		72		2 min	Extensión
5		37 ciclos desde el paso 2			
6		72		7 min	Extensión final
7		16		5 min	Fin

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 3 % a 100 voltios durante 3 horas y visualizados en un transiluminador.

6.2.3 Análisis de datos moleculares

Los perfiles en los geles de agarosa obtenidos por los ISSR se transformaron en una matriz de datos binarios de 1 (presencia) y 0 (ausencia). Estas matrices de similitud se convierten en distancias entre individuos. La medida de similitud utilizada corresponde al coeficiente de Nei y Li (1979), que mide la probabilidad que una banda amplificada en una muestra sea amplificada en otra.

$$S_{ij} = \frac{2a}{(2a+b+c)}$$

Donde S_{ij} = Similitud entre el individuo i y el j

a = Bandas compartidas por ambos individuos,

b = Bandas presentes en el individuo (1) pero no en (2),

c = Bandas presentes en el individuo (2) pero no en (1).

A partir de los coeficientes hallados anteriormente se construyó un dendrograma (diagrama de árbol) de ligamiento uniando en grupos (*cluster*) las muestras que son más similares genéticamente a las muestras de otros grupos. Los grupos son unidos a otros a medida que disminuye el nivel de similitud hasta que todas las muestras analizadas son incluidas en un grupo individual. El análisis de grupos se realizó mediante el algoritmo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages* (UPGMA) utilizando el software NTSYSpc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* Versión 2.02) (Rohlf, 2000).

Para estimar la diversidad genética se utilizaron los parámetros de heterocigosidad promedio (H_e) y el porcentaje de loci polimórficos (%P), los



cuales se estiman sobre todos los loci y el promedio de los mismos de acuerdo con la fórmula no sesgada de Nei (1987) así:

$$H = 1 - \sum f(i)^2$$

F(i): Frecuencia del alelo i en la población.

f(i)²: Probabilidad de que dos individuos tomados al azar tengan el alelo i.

H: Probabilidad de que dos individuos tomados al azar tengan diferente alelo,

H, es el valor con el que se representa la diversidad de la población.

Para determinar los parámetros de diversidad genética se utilizó el programa TFPGA (*Tools For Population Genetic Analices*) versión 1.3, 1997.

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los grupos formados con los materiales de *Passiflora* para evaluar si existe diferenciación genética entre y dentro de las poblaciones, se utilizó el programa GenAlEx 6.41 (1998), también se determinó el F estadístico insesgado con un intervalo de confianza del 95%.

6.3 Tratamientos pregerminativos de semillas de *Passiflora edulis* f *edulis*

Esta etapa de la investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de desarrollo de Agropecuario y Agroindustrial CEDEAGRO Sena Regional (Boyacá).

6.3.1 Material vegetal

Las semillas usadas fueron seleccionadas de frutos maduros cosechados de plantas de cultivos comerciales ubicados en el municipio de Ramiriquí (Boyacá), vigorosas y buen estado fitosanitario. Se seleccionaron 10 plantas al azar, polinizadas naturalmente, los frutos fueron cosechados directamente de la planta. Después de la polinización, para la formación del fruto se requieren 28 – 35 días, y para el llenado de los mismos, 90 días. Es decir, los frutos fueron cosechados a los 120 días aproximadamente después de la polinización.

La extracción manual de las semillas se llevó a cabo previo proceso de fermentación durante 72 horas, posteriormente se removió el arilo. Para prevenir proliferación de hongos las semillas se sumergieron en solución de Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% por 15 minutos, seguido por tres lavados con agua destilada, un minuto cada vez y almacenadas a temperatura ambiente hasta su utilización.



6.3.2 Morfología de los frutos y semillas

Se seleccionaron 10 frutos al azar de los cosechados en campo. Para la caracterización de los frutos, el diámetro, peso y número de semillas por fruto se registró de acuerdo a Orjuela et al (2011) y la norma Icontec NTC 4101 de 1997, emitidas para gulupa y granadilla. El análisis morfológico de las semillas se realizó por observación al estereoscopio.

6.3.3 Tratamientos pregerminativos

Los tratamientos evaluados corresponden a:

- i. Control – Sin tratamiento (ST), semillas que fueron extraídas, fermentadas, y el arilo removido fueron sembradas en condiciones de invernadero.
- ii. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): Las semillas se sumergieron en peróxido de hidrógeno a una concentración de 15 y 20 % (v/v), diluciones con respecto a la concentración comercial de 30 % w/v (volúmenes), durante 24 y 48 horas.
- iii. Hipoclorito de sodio al 5.25% (w/v), las semillas se sumergieron por 24 y 48 horas.
- iv. Semillas en solución en ácido giberélico (GA_3) en concentraciones de 50 y 100 ppm, por 24 horas y 48 horas,
- v. Imbibición en agua: Las semillas permanecieron en agua destilada por 24 y 48 horas.
- vi. Estratificación en frío a 4 °C, por 7 y 14 días. Las semillas se colocaron en recipientes plásticos con papel filtro humedecido con agua destilada.

Todas las semillas, posterior a la aplicación del tratamiento pregerminativos fueron lavadas con agua destilada tres veces, un minute cada vez, y posteriormente sembradas en las condiciones descritas en invernadero.

6.3.4 Condiciones de germinación

La siembra en condiciones de invernadero se llevó a cabo en sustrato turba estéril, marca Pindstrup plus, pH 5.5. y 6.0, tipo de abono medio, cuya composición corresponde por cada Kg de turba a: 0.18 de NPK, 0.00090 kg de microelementos, 1.27 g de nitrato, 0.99 g de amonio. Se utilizaron bandejas de germinación de 250 alveolos. Los riegos se efectuaron para conservar la humedad requerida y suficiente sin adición de fertilizantes. Temperatura aproximada de 25 °C día and 18 °C noche, en condiciones de oscuridad. Una semilla fue considerada como germinada, cuando en la bandeja de germinación se observó la emergencia de la plúmula o cotiledones. Para la verificación de la presencia y longitud de la raíz, se extrajeron de la bandeja plántulas al azar.



6.3.5 Índices germinativos

El experimento fue llevado a cabo en un diseño completamente al azar con 15 tratamientos y tres réplicas de 50 semillas cada uno, para un total de 150 semillas por tratamiento.

La evaluación de la germinación se determinó cada 48 h durante 45 días siguiendo la metodología ISTA (2013). Los datos obtenidos fueron utilizados para hallar el tiempo medio de germinación siguiendo la fórmula de Thompson (1970) y Cárdenas (2011):

$$TMG = \frac{\sum_{i=1}^k n_i * t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

Donde t_i = tiempo transcurrido desde la siembra, n_i = número de semillas germinadas en los intervalos $t_i - (t_i - 1)$.

Velocidad media de germinación:

$$VMG = \sum (n_i/t_i)$$

Donde, n_i = número de semillas germinadas en el día i ; y t_i = tiempo en días para la germinación en el día i .

Porcentaje de Germinación de acuerdo a Ranal y Santana (2006), y Cárdenas (2011):

$$PG = (N/N_s) \times 100$$

Dónde: N = Numero de semillas germinadas y N_s = Numero de semillas totales

Datos adicionales de la altura de plántula se registraron al final del término del periodo de germinación.

6.3.6 Análisis estadístico

Para el análisis de las variables pregerminativas se aplicó un diseño experimental completamente al azar con 15 tratamientos y tres repeticiones de 50 semillas por tratamiento. Los datos obtenidos para las variables pregerminativas se evaluaron mediante un análisis de varianza siguiendo el modelo estadístico:

$$Y_i = \mu + \tau_i + E_j$$



Donde:

Y_i = Variable respuesta

μ = Media general

T_i = Efecto del tratamiento i -ésimo tratamiento

ϵ_j = Error experimental

Cuando existían diferencias significativas entre tratamientos, se realizó la comparación de medias mediante una prueba de Scott Knott con un nivel de significancia del 5%. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la utilización del programa estadístico Sisvar[®] software (Ferreira, 2014)

7. PRODUCTOS

La difusión de los resultados de esta investigación dentro de la comunidad científica, se realizó mediante la publicación de dos artículos en revistas indexadas internacionalmente (Q2) así como la participación en congresos nacionales en la modalidad de ponencia oral.

Artículos

María A. Martínez, Ana C. Morillo y Wendy Reyes-Ardila. Characterization of the genetic diversity in *Passiflora* spp. in the Boyacá Department, Colombia. Chil. j. agric. res. vol.80 no.3 Chillán Sept. 2020. (PUBLICADO)
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392020000300342>

María Antonia Martínez Camargo, Ana Cruz Morillo Coronado, Edilberto Cepeda Mora, Sandra Yaneth Mesa Fernández. Evaluation of pregerminative treatments in gulupa seeds (*P. edulis* f. *edulis* Sims). Rev. Bras. Frutic. vol.42 no.3 Jaboticabal 2020 Epub June 05, 2020 (PUBLICADO)
<http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452020590>

Ponencia: Evaluación de tratamientos pregerminativos en semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), granadilla (*P. ligularis*) y gulupa (*P. edulis* var. *edulis*). María Antonia Martínez Camargo, Ana Cruz Morillo2, Edilberto Cepeda & Sandra Mesa Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Fecha: 18 al 22 de agosto de 2020. Florencia, Caquetá.

Nombre del evento: X Congreso Colombiano de Botánica, Simposio Reproductive studies with South American *Passiflora* species. **Modalidad Oral ponente.**



8. IMPACTO

Los sectores beneficiados con esta investigación serán el sector científico, el sector académico-investigativo y el sector agrícola. Al caracterizar molecularmente los materiales de *Passifloras* spp. de las distintas zonas productoras, la información constituye un paso importante para que, a futuro, complementado con caracterizaciones morfológicas y agronómicas, se puedan seleccionar individuos élite que exhiban características de interés para programas de mejoramiento. Además, la información sobre los tratamientos pregerminativos para lograr una alta eficiencia en la germinación, estará disponible para el sector agrícola lo que permitirá implementar producción de material vegetal en óptimas condiciones fitosanitarias.

9. REFERENCIAS

Andersen, J. R., & Lübberstedt, T. (2003). Functional markers in plants. *Trends in plant science*, 8(11), 554-560.

Arias Suárez, J. C., Ocampo Pérez, J., & Urrea Gómez, R. (2016). Pollination systems in sweet granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) as a basis for genetic and conservation studies. *Acta Agronómica*, 65(2), 197-203.

Arnold, R. M., Arnold, J. A., & Arnold, T. H. (1996). Germination of *Chaenorrhinum minus* Seeds in Response to Gibberellin Treatments. *Journal of plant physiology*, 148(6), 677-683.

Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 147-173.

Barba, E.G., Hernández, J. A. & Diaz-Vivancos, P. Role of H₂O₂ in pea seed germination. *Plant Signal and Behavior*, Georgetown, v.7, n.2, p.193–195, 2012.

Baskin, C. C. and J. M. Baskin. (1998). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. San Diego, CA: Academic Press.

Baskin C.C. and Baskin J.M. (2014) *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. 2nd Edition. San Diego, Academic Press.

Bellon, G., Faleiro, F. G., Junqueira, K. P., Junqueira, N. T. V., dos Santos, E. C., Braga, M. F., & Guimaraes, C. T. (2007). Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. *Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.



Betancurt, E., García, E., Giraldo, M., Quejada, O., Rodríguez, H., & Arroyave, I. (2014). Manual técnico del cultivo de maracuyá bajo buenas prácticas agrícolas. *Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). Medellín-Colombia.*

Bonilla, M. (2014). *Diversidad y Biogeografía de Passiflora L. supersección Tacsonia (Passifloraceae) del trópico andino* (Doctoral dissertation, Tesis de maestría) Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira).

Cárdenas, J. (2011). *Morfología y tratamientos pregerminativos de semillas de granadilla (Passiflora ligularis Juss.)*. (Doctoral dissertation, Tesis (Maestría en Ciencias Agrarias)-Universidad Nacional de Colombia, Bogotá)

Cardona, C. C., Coronado, Y. M., Coronado, A. C. M., & Ochoa, I. Diversidad genética de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) mediante RAMs (Random Amplified Microsatellites).

Carmo, T. V. B., Martins, L. S. S., Musser, R. D. S., Silva, M. M. D., & Santos, J. P. O. (2017). Genetic diversity in accessions of *Passiflora cincinnata* Mast. based on morphoagronomic descriptors and molecular markers. *Revista Caatinga*, 30(1), 68-77.

Castro, J. A., Oliveira, E. J., Jesús, O. N., Soares, T. L., & Margarido, G. R. A. (2016). Molecular markers for conservation genetic resources of four *Passiflora* species. *Scientia Horticulturae*, 212, 251-261.

Chaparro, D. C., Maldonado Celis, M. E., Urango, L. A., & Rojanol, B. A. (2015). Propiedades quimiopreventivas de *Passiflora mollissima* (Kunth) LH Bailey (curuba larga) contra cáncer colorrectal. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 62-74.

Cerdas M. y Castro J. (2002). Manual práctico para la producción, cosecha y manejo poscosecha del cultivo de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss). San José, Costa Rica. 64 p.

Cerqueira-Silva, C. B. M., Conceição, L. D. H. C. S., Santos, E. S. L., Cardoso-Silva, C. B., Pereira, A. S., Oliveira, A. C., & Corrêa, R. X. (2010). Genetic variability in wild genotypes of *Passiflora cincinnata* based on RAPD markers. *Genet. Mol. Res*, 9, 2421-2428.

Cerqueira-Silva, C. B. M., Jesús, O. N., Santos, E. S., Corrêa, R. X., & Souza, A. P. (2014). Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. *International journal of molecular sciences*, 15(8), 14122-14152.

Cerqueira-Silva, C. B. M., Faleiro, F. G., de Jesús, O. N., dos Santos, E. S. L., & de Souza, A. P. (2016). The genetic diversity, conservation, and use of passion fruit (*Passiflora* spp.). In *Genetic Diversity and Erosion in Plants* (pp. 215-231). Springer International Publishing.



Crocker, W. (1916). Mechanics of dormancy in seeds. *American Journal of Botany*, 99-120.

DANE. (2016). Encuesta nacional agropecuaria ENA 2015 Boletín técnico. Departamento Administrativo Nacional de Estadística, Bogotá, Colombia

Delanoy, M., Van Damme, P., Scheldeman, X., & Beltrán, J. (2006). Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) LH Bailey, *Passiflora tricuspidata* Mast. and *Passiflora* nov sp. seeds. *Scientia Horticulturae*, 110(2), 198-203.

Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1(4), 19-21.

Duarte, O., & Paull, R. (2015). *Exotic fruits and nuts of the new world*. CABI.

Ellis, R. H., Hong, T. D., & Roberts, E. H. (1985). *Handbook of seed technology for genebanks. Volume I. Principles and methodology*. International Board for Plant Genetic Resources. Handbooks for Genebanks, No. 2.

Espinosa, K., Bonilla, M. L., Muñoz, J. E., Posso, A. M., & Vásquez, H. D. (2004). Colección, caracterización fenotípica y molecular de poblaciones de uchuva *Physalis peruviana*. *Biotecnol. Sector Agropec. Agroind*, 2, 72-78.

Fischer, I. H., Almeida, A. D., Fileti, M. D. S., Bertani, R. D. A., Arruda, M. D., & Bueno, C. J. (2010). Avaliação de passifloráceas, fungicidas e *Trichoderma* para o manejo da podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. *Rev. Bras. Frutic*, 32(3), 709-717.

FAO, Commission on Genetic Resources for Food. (2010). *The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture*. Food & Agriculture Org. Rome. ISBN 978-92-5-106534-1. 370p.

FAO (2013). Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture. Food and agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Fischer, G., & Miranda, D. (2012). Manual para el Cultivo de Frutales en el Trópico. *Produmedios*, Bogotá, Colombia, 443-473.

Fonseca-Trujillo, N., Márquez-Cardona, M. D. P., Moreno-Osorio, J. H., Terán-Pérez, W., & Schuler-García, I. (2009). Caracterización molecular de materiales cultivados de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*). *Universitas Scientiarum*, 14(2), 135-140.

Forero, R., Ortiz, E., De León, W., Gómez, J. C., & Hoyos-Carvajal, L. (2015). Analysis of resistance to *Fusarium oxysporum* in *Passiflora maliformis* L. plants. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(2), 197-208.

Ganga, R. M. D., Ruggiero, C., Lemos, E. G. D. M., Grili, G. V. G., Gonçalves, M. M., Chagas, E. A., & Wickert, E. (2004). Genetic diversity in yellow passion fruit utilizing AFLP molecular markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(3), 494-498.



Gutiérrez, M. I., Miranda, D., & Cárdenas-Hernández, J. F. (2011). Effect of pre-germination treatments on the germination of seeds of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.), sweet granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) and cholupa (*Passiflora maliformis* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 209-219.

Gómez, A. (2012). Caracterización con marcadores moleculares rams (Random amplified microsatellites) de algunas especies del género *Erythrina* presentes en Colombia. *Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira*.

Govindaraj, M., Vetriventhan, M., & Srinivasan, M. (2015). Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genetics research international*, 2015.

Grover, A., & Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 290-302.

Gutiérrez, M. I., Miranda, D., & Cárdenas Hernández, J. F. (2011). Efecto de tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y cholupa (*Passiflora maliformis* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 209-219.

Hantula, J., Dusabenyagasani, M., & Hamelin, R. C. (1996). Random amplified microsatellites (RAMS)—a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Forest Pathology*, 26(3), 159-166.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies Jr, F. T., & Geneve, R. L. (2002). Techniques of propagation by seed. *Plant propagation, principles and practices 7th edition*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 249-274.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., & Geneve, R. L. (2011). *Hartmann & Kesters Plant propagation: principles and practices* (No. Ed. 8). Upper Saddle River: Prentice-Hall/Pearson.

Heidari, E. F., Rahimmalek, M., Mohammadi, S., & Ehtemam, M. H. (2016). Genetic structure and diversity of ajowan (*Trachyspermum ammi*) populations based on molecular, morphological markers, and volatile oil content. *Industrial Crops and Products*, 92, 186-196.

Henry, R. J. (Ed.). (2012). *Molecular markers in plants*. John Wiley & Sons.

ICONTEC, Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (1997). Frutas frescas; granadilla. NTC 4101. Bogotá, D.C.

International Seed Testing Association (ISTA), (2013). *ISTA Handbook on Seedling Evaluation*. 3rd Edition. Basserdorf, Switzerland.

Jiménez, R. (2006). El cultivo de la gulupa *Passiflora edulis* Sims. *Bogotá, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia*. 156p.



Jørgensen, P. M., Muchhala, N., & MacDougal, J. M. (2012). *Passiflora unipetala*, a new bat-pollinated species of *Passiflora* supersect. *Tacsonia* (Passifloraceae). *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 22(2), 174-179.

Killip, E. P. (1938). The American species of Passifloraceae. *The American species of Passifloraceae.*, (407).

Lariguet, P.; Ranocha, P.; De Meyer, M.; Barbier, O.; Penel, C.; Dunand, C. (2013). Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in *Arabidopsis*. *Planta, Germany*, v.238, n.2, p.381-395.

Londoño Aramburo, J. *Evaluación de la resistencia genética de especies de Passiflora spp A Fusarium spp, agente causal de la "Secadera"* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira).

Mabundza, R. M., Wahome, P. K., & Masarirambi, M. (2010). Effects of different pre-germination treatment methods on the germination of passion (*Passiflora edulis*) seeds. *J. Agric. Soc. Sci*, 6, 57-60.

Maguire, J. D. (1962). Speed of germination—aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop science*, 2(2), 176-177.

Martin, A. C. (1946). The comparative internal morphology of seeds. *The American Midland Naturalist*, 36(3), 513-660.

Meletti, L. M. M., Soares-Scott, M. D., Bernacci, L. C., & Passos, I. D. S. (2005). Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados*, 1, 55-78.

Meletti, L. M. M., Soares-Scott, M. D., Bernacci, L. C., Alvares, V., & de Azevedo Filho, J. A. (2011). Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam.: nova alternativa de maracujá ornamental. *Ornamental Horticulture*, 17(1), 87-95.

Miller, M. P. (1997). Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) 1.3: a Windows Program for the Analysis of Elysium and Molecular Population Genetic Data. <http://www.marksgeneticsoftware.net/>.

Miller, M. P. (1998). AMOVA-PREP 1.01: A program for the preparation of AMOVA input files from dominant-markers raw data. *Computer software distributed by author*, 22, 927-934.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2016). Apuesta exportadora Agropecuaria 2006-2020. República de Colombia. Ed. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. En: <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/handle/11348/6004>; consulta: Octubre de 2017.



Miranda, D. (2009). Manejo integral del cultivo de la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.). *Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba*. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Bogotá, 121-157.

Mohammadi, S. A., & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. *Crop science*, 43(4), 1235-1248.

Morillo Coronado, A. C., Morillo Coronado, Y., Sandoval, P., & Hernando, E. (2014). Characterization with RAMs of the peaches (*Prunus persica* L. Batsch) collection at the Pedagogical and Technological University of Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 367-376.

Morillo, C. A. C., Morillo, C. Y., Hernando, P. E., & Ávila, M. I. A. (2015). Molecular characterization of the plum collection [*Prunus domestica* (L.) Borkh] of the Pedagogical and Technological University of Colombia. *African Journal of Biotechnology*, 14(3), 257-263.

Morillo, A. C., Morillo, Y., & Leguizamo, M. F. (2016). Diversidad genética de ibias (*Oxalis tuberosa* Molina) y cubios (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón) en Boyacá. *Temas Agrarios*, 21(1), 44-53.

Muñoz Flórez, J. E., Morillo Coronado, A. C., & Morillo Coronado, Y. (2008). Microsatélites amplificadas al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica*, 57(4), 219-226.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>: consultado el 30 de octubre de 2017

Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273.

Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press.

Nikolaeva, M. G. (1977). Factors controlling the seed dormancy pattern. pp. 51–74 in A. A. Khan (Ed.) *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*.

Nyanzi, S. A., Carstensen, B., & Schwack, W. (2005). A comparative study of fatty acid profiles of *Passiflora* seed oils from Uganda. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(1), 41-44.

NTSYS-PC, Rohlf FJ. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, v. 2.1. New York: Exceter Software, 2000.

Oliveira, E. D., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Camargo, L. E. A., Fungaro, M. H. P., & Vieira, M. L. C. (2005). Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Molecular Ecology Resources*, 5(2), 331-333.



Ocampo, J. (2007). *Study of the genetic diversity of genus Passiflora L. and its distribution in Colombia* (Doctoral dissertation, Ph. D. thesis. Centre International d'Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques–SupAgro Montpellier, Francia).

Ocampo, J., Coppens d'Eeckenbrugge, G. & Jaramillo, N. (2009). Caracterización agro-morfológica del Maracuyá amarillo (*P. edulis f. flavicarpa* Degener) y la Gulupa (*P. edulis f. edulis* Sims). El cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: Maracuyá, Granadilla, Gulupa, y Curuba, Seminario Nacional de Pasifloráceas, Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. 345 p.

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(11), 1158-1180.

Ocampo, J., Melo, D., Rendón, J., Arias, J. C., & Marín, V. (2012). Aspectos fisiológicos de la gulupa. *Tecnología para el cultivo de la gulupa*, 13-15.

Ocampo, J., & Wyckhuys, K. (2012). Tecnología para el cultivo de la gulupa (*Passiflora edulis f. edulis* Sims) en Colombia. *Centro Bio-Sistemas Universidad Jorge Tadeo Lozano, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR). Bogotá, Colombia.*

Ocampo-Pérez, J., & Merlín-Uribe. (2015). *Passiflora de Colombia*. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira/Centro Internacional de Agricultura Tropical, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México. <http://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/616%20Passiflora%20de%20Colombia.pdf>

Ocampo, J., Rodríguez, A., Puentes, A., Molano, Z., & Parra, M. (2015). El cultivo de la Cholupa (*Passiflora maliformis* L.): Una alternativa para la fruticultura colombiana (p.). Corporación Centro de Desarrollo de Pasifloras - Cepass.

Ortiz, D. (2010). Estudio de la variabilidad genética en materiales comerciales de gulupa (*Passiflora edulis f. edulis* Sims) en Colombia (tesis de maestría). *Bogotá DC Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia.*

Pádua, J. G., Oliveira, E. J., Zucchi, M. I., Oliveira, G. C. X., Camargo, L. E. A., & Vieira, M. L. C. (2005). Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). *Molecular Ecology Resources*, 5(4), 863-865.



Paiva, C. L., Viana, A. P., Santos, E. A., Freitas, J. C. D. O., Silva, R. N. O., & Oliveira, E. J. D. (2014). Genetic variability assessment in the genus *Passiflora* by SSR markers. *Chilean journal of agricultural research*, 74(3), 355-360.

Ponciano-Samayoa, K. M., de León, L., & Pedro, J. (2012). Genetic diversity of passion fruits in Guatemala revealed by AFLP markers. *Agronomía Mesoamericana*, 23(1), 73-80.

Posso Terranova, A. M. Diversidad genética y estructura poblacional de *Guadua angustifolia Kunth* en el eje cafetero colombiano (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira).

Primot, S., d'Eeckenbrugge, G. C., Rioux, V., Pérez, J. A. O., & Garcin, F. (2005). Variación morfológica de tres especies de curubas (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*, *P. tarminiana* y *P. mixta*) y sus híbridos en el Valle del Cauca (Colombia). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27(3), 467-471.

Procolombia, (2017). Colombia an export and investment platform in the Americas. Consultado en:

http://www.portmanatee.com/wp-content/uploads/2017/06/PPT_April-20-2017.pdf

Ramaiya, S. D., Bujang, J. S., & Zakaria, M. H. (2014). Genetic diversity in *Passiflora* species assessed by morphological and ITS sequence analysis. *The Scientific World Journal*, 2014.

Ramírez Castañeda, L., & Salazar Arrieta, F. (2012). Estado actual de la configuración de la cadena productiva de pasifloras en Colombia. *Ingeniería Industrial. Actualidad y Nuevas Tendencias*, (9).

Ranal, M. A., & Santana, D. G. D. (2006). How and why to measure the germination process? *Brazilian Journal of Botany*, 29(1), 1-11.

Rao, N. K., Hanson, J., Dulloo, M. E., & Ghosh, K. (2007). *Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma (Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8)*. Bioversity International.

Reddy, M. P., Sarla, N., & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9-17.

Rodríguez, M. H., Niño, N. E., Cutler, J., Langer, J., Casierra-Posada, F., Miranda, D., & Büttner, C. (2016). Certification of healthy plant material in Colombia: A critical analysis of opportunities and challenges to control virus diseases. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(1), 164-175.

Rugeles Silva, P. A. (2011). Genotipificación mediante marcadores moleculares RAMs (microsatélites amplificados al azar) y multiplicación de



materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira).

Sanabria, H. L. (2006). Caracterización molecular con marcadores RAM de árboles nativos de *Psidium guajava* (guayaba) en el Valle del Cauca. *Acta Agronómica*, 55(1), 23-30.

Sánchez, I., Ángel, F., Grum, M., Duque, M. C., Lobo, M., Tohme, J., & Roca, W. (1999). Variability of chloroplast DNA in the genus *Passiflora* L. *Euphytica*, 106(1), 15-26.

Sioc. (2019). Cadena de pasifloras. Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Pasifloras/Documentos/2019-06-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>

Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3(4), 506-516.

Ulmer, T., MacDougal, J. M., & Ulmer, B. (2004). *Passiflora: passion flowers of the world*. Portland, Or.: Timber Press 430p.-illus., col. illus. ISBN, 881926485.

Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology*, 23(1), 48-55.

Vásquez, J. J., Rocha, J. C., & Ávila, J. O. (2008). Manual sobre el cultivo del maracuyá (*Passiflora edulis*) en Colombia. Bogotá DC: CORPOICA.

Viana, A. J. C., Souza, M. M., Araújo, I. S., Corrêa, R. X., & Ahnert, D. (2010). Genetic diversity in *Passiflora* species determined by morphological and molecular characteristics. *Biologia Plantarum*, 54(3), 535-538.

Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. D. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and molecular biology*, 39(3), 312-328.

Yockteng, R., d'Eeckenbrugge, G. C., & Souza-Chies, T. T. (2011). *Passiflora*. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (pp. 129-171). Springer Berlin Heidelberg.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.



CAPÍTULO II

Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) in *Passiflora* spp in the Boyacá Department, Colombia

Publicado en: Chil. j. agric. res. vol.80 no.3 Chillán set. 2020

<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392020000300342>



ABSTRACT

Passiflora is a group of species of economic importance in Colombia because of their productive potential and nutritional, pharmaceutical and industrial properties; therefore, it is necessary to study the genetic diversity of the species cultivated in principal productive departments, such as Boyacá. The use of molecular markers has become a fundamental tool for germplasm characterization, which effectively complements morphological and agronomic information. This research aimed to characterize the genetic diversity of *Passiflora* spp. grown in the Department of Boyacá using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. The eight ISSRs generated a total 138 bands with molecular weights between 250 and 1350 kb. With a similarity coefficient of 0.60, seven groups were formed, showing lax distribution of the individuals. The percentage of polymorphic loci was between 56% (TG) and 90% (AG). The average value of heterozygosity was 0.56 with a genetic differentiation coefficient (F_{ST}) of 0.16, which indicated great genetic diversity but without a defined population structure. The AMOVA showed that 64% of the observed genetic variation was due to the component within the groups. The results suggested levels of hierarchy and subdivision finer than those considered in this study, in addition to a complementary morphoagronomic characterization that established the total genetic diversity, which can be used to implement a breeding program for more productive cultivars that are resistant to the principal phytosanitary problems.

Key words: Fruit trees, genetic diversity, microsatellites, variability.

1. INTRODUCTION

The *Passiflora* genus is the most representative one of the Passifloraceae family, with around 520 species distributed in the tropical regions of the Americas, Asia and Africa (Araya et al., 2017). Cultivated species have great nutritional, medicinal and ornamental value since they are a source of minerals, vitamins A, C and D, alkaloids, flavonoids and carotenoids, which are beneficial for human health. These species have compounds with anxiolytic, antihypertensive, sedative and analgesic properties (Konta et al., 2014). The seeds are a source of essential fatty acids that can be used in food and cosmetic industries (Malacrida and Neuza, 2012). In spite of the economic importance and various potential uses, studies on the characterization of the diversity of the germplasm of cultivated passionflower in Colombia, specifically in the Department of Boyacá, are limited.

Colombia is the center of diversity of an important group of these species. *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg. known as passion fruit, *P. edulis* Sims f. *edulis* (gulupa), *P. tripartita* (Juss.) Poir. var. *mollissima* (Kunth) Holm-Niels. & P. Jørg. (*curuba*), *P. maliformis* L. (*cholupa*), and *P. ligularis* Juss.



(granadilla) have acquired economic importance because of their production and export potential. *Passiflora* production in the country increased 34% in the last 3 yr, reaching 227 813 t during 2018, the principal production departments include Antioquia and Meta (Agronet, 2019). Boyacá has increased area and production for *Passiflora*; by 2018, it had a planted area of 1532 ha, with a yield of 10.5 t ha⁻¹. Despite the productive potential, a limiting factor in the development of this crop in Colombia is the incidence of pests and diseases, generating significant losses in yield (Ocampo et al., 2013). On the other hand, there is a need for breeding programs that offer cultivars with higher genetic and phytosanitary quality that respond to the needs of farmers (Ocampo et al., 2017).

The genetic diversity in the *Passiflora* genus is very wide, both within the genus and within the most cultivated species (Vianna et al., 2019), so the characterization of the genetic variation is essential for the conservation, management and efficient use of germplasm in genetic breeding programs (Oluoch et al., 2018). Traditionally, diversity in *Passiflora* is estimated by observing variations in morphological or agronomic characteristics or tolerance to biotic or abiotic factors, which does not reflect the genetic relationship between evaluated materials and is affected by environmental changes and dependence on the stage of development (Pereira et al., 2015). DNA markers overcome these limitations and are a useful tool for the evaluation and characterization of germplasm (Vieira et al., 2019).

The genetic diversity in *Passiflora* has been studied with different molecular techniques, such as random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) (Oluoch et al., 2018; Vieira et al., 2019); however, simple sequence repeat (SSR) markers are the most used techniques for the characterization of germplasm in different crops since they are highly polymorphic, reproducible and co-dominant, with wide genome coverage (Gramazio et al., 2018). Among the microsatellite markers, inter-simple sequence repeat (ISSR), which combines characteristics of the RAPD and microsatellites techniques, facilitates multilocus genomic analysis with a single primer based on regions of SSR, presents good reproducibility, has a low cost, is simple, does not need previous genome information (Morillo et al., 2018), and has proven to be polymorphic and informative in studies on genetic diversity in *Passiflora* (Santos et al., 2011; Sousa et al., 2015; Batista et al., 2017; Oliveira et al., 2019; Vianna et al., 2019).

In Colombia, genetic diversity studies conducted by Santos et al. (2011) with ISSR markers in *P. edulis* (purple and yellow type) and *P. alata* have shown that there is no structure in the evaluated populations; however, these studies provided information for genetic improvement. Other research conducted in Colombian on *P. ligularis* accessions (sweet granadilla) suggests that the cultivated germplasm has high variability ($H_e = 0.96$), with a slight genetic structure (Bernal et al., 2014).



Ocampo et al. (2017) studied the genetic diversity and population structure of 51 Colombian passion fruit accessions (*P. edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg.) using microsatellite markers, where there was little geographic structuring and high differentiation between individuals of the same accession. Galeano et al. (2018) conducted an agronomic evaluation of 60 accessions of *P. edulis* Sims from the Agrosavia germplasm bank, where 30 promising accessions were identified; however, this information must be complemented with biochemical and molecular data. Fonseca-Trujillo et al. (2019) characterized cultivated gulupa materials (*P. edulis* f. *edulis*) collected in the Departments of Boyacá, Cundinamarca and Huila using ISSR markers, finding high genetic diversity, probably as a result of the method of propagation, provenance and short time of crop establishment. Studies of genetic diversity in the *Passiflora* spp. germplasm in the department of Boyacá are necessary for the sustainable use of its genetic resource with a view to increasing the profitability of the crop by identifying elite materials that have good yields, with tolerance to biotic and abiotic factors and adapted to local conditions.

In this context, it is necessary to continue with genetic studies in order to gather more information on the current genetic diversity of *Passiflora* and the relationships between individuals of the germplasm. For this reason, the objective of this research was to evaluate the genetic diversity in 71 cultivated *Passiflora* materials from the Department of Boyacá in order to provide the information for the management, conservation and efficient use of this plant genetic resource.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

The sampling of the *Passiflora* spp. was carried out in the main producing municipalities in the Department of Boyacá (Firavitoba, Ramiriquí, Umbita, Turmeque, Sutamarchán, Tinjacá, Buenavista, Miraflores, Briceño, Tunungua and Nuevo Colón), in total 11 municipalities and 19 farms were sampled. In each of the municipalities, production farms with a tradition in cultivation were visited, where taking into account sanitary quality and phenotypic variation, four plants were selected at random per species. Table 5 shows the specific geographical location of the sampling points according to the species sampled and the selected plants. The identification of the species was made in situ according to the information provided by the farmers and was corroborated by the herbarium of the Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (ANEXO 1).



Table 5. Collection sites for *Passiflora* spp. in the Department of Boyacá

Nº	Specie	Municipality	Geographic location
1	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Firabitoba	5°40'08" N 72°59'38" W
2	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Firabitoba	5°40'08" N 72°59'38" W
3	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Firabitoba	5°40'08" N 72°59'38" W
4	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
5	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
6	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
7	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
8	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
9	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
10	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
11	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
12	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
13	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
14	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
15	<i>Passiflora ligularis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
16	<i>Passiflora ligularis</i>	Ramiriquí	5°25'1" N 73°19'59" W
17	<i>Passiflora mollisima</i> red flower	Umbita	5°13'1" N 73°28'1" W
18	<i>Passiflora mollisima</i> red flower	Umbita	5°13'1" N 73°28'1" W
19	<i>Passiflora mollisima</i> white flower	Umbita	5°13'1" N 73°28'1" W
20	<i>Passiflora mollisima</i> red flower	Umbita	5°13'1" N 73°28'1" W
21	<i>Passiflora mollisima</i> red flower	Turmeque	5°19'20" N 73°29'21" W
22	<i>Passiflora mollisima</i> red flower	Turmeque	5°19'20" N 73°29'21" W
23	<i>Passiflora mollisima</i> red flower	Turmeque	5°19'20" N 73°29'21" W
24	<i>Passiflora mollisima</i> white flower	Turmeque	5°19'20" N 73°29'21" W
25	<i>Passiflora ligularis</i>	Turmeque	5°19'20" N 73°29'21" W
26	<i>Passiflora ligularis</i>	Turmeque	5°19'20" N 73°29'21" W
27	<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollisima</i>	Turmeque	5°19'20" N 73°29'21" W
28	<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollisima</i>	Turmeque	5°19'20" N 73°29'21" W
29	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Sutamarchán	5°38'3" N 73°37'12" W
30	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Sutamarchán	5°38'3" N 73°37'12" W
31	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Sutamarchán	5°38'3" N 73°37'12" W
32	<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollisima</i>	Sutamarchán	5°38'3" N 73°37'12" W
33	<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollisima</i>	Sutamarchán	5°38'3" N 73°37'12" W
34	<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollisima</i>	Sutamarchán	5°38'3" N 73°37'12" W
35	Graft <i>Passiflora maliformis</i>	Tinjacá	5°34'54" N 74°38'53" W
36	Graft <i>Passiflora maliformis</i>	Tinjacá	5°34'54" N 74°38'53" W
37	Graft <i>Passiflora maliformis</i>	Tinjacá	5°34'54" N 74°38'53" W
38	<i>Passiflora maliformis</i>	Tinjacá	5°34'54" N 74°38'53" W
39	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Tinjacá	5°34'54" N 74°38'53" W
40	<i>Passiflora ligularis</i>	Tinjacá	5°34'54" N 74°38'53" W
41	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Buenavista	5°30'60" N 73°57'59" W
42	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Buenavista	5°30'60" N 73°57'59" W
43	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Buenavista	5°30'60" N 73°57'59" W
44	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
45	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W



46	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
47	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
48	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
49	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
50	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
51	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
52	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
53	<i>Passiflora maliformis</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
54	<i>Passiflora maliformis</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
55	<i>Passiflora maliformis</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
56	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
57	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
58	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
59	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
60	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Miraflores	5°13'1" N 73°8'47" W
61	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Briceño	5°43'25" N 73°56'24" W
62	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Briceño	5°43'25" N 73°56'24" W
63	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Briceño	5°43'25" N 73°56'24" W
64	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Tunungua	5°43'59" N 73°55'59" W
65	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Tunungua	5°43'59" N 73°55'59" W
66	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Tunungua	5°43'59" N 73°55'59" W
67	<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Tunungua	5°43'59" N 73°55'59" W
68	<i>Passiflora maliformis</i>	Nuevo Colón	5°21'30" N 73°27'38" W
69	<i>Passiflora maliformis</i>	Nuevo Colón	5°21'30" N 73°27'38" W
70	<i>Passiflora maliformis</i> in vitro	Nuevo Colón	5°21'30" N 73°27'38" W

2.2 Molecular characterization

The molecular characterization was carried out in the Molecular Biology research laboratories of the Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja. The protocol of Dellaporta et al. (1983) was used for the DNA extraction, which was visualized in 0.8% agarose gels prepared with 0.5% TBE in an electrophoresis gel system (EC 340, Maxicell Primo, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The concentration was determined with a fluorometer (Dyna Quant 200, Hoefer, Holliston, Massachusetts, USA), diluted in HPLC water to a total volume of 100 mL at 10 ng mL⁻¹ and stored at -20 °C. For the ISSR analysis, eight primers synthesized by Technologies Inc. Bioneer Corporation (Alameda, California, USA) were selected (Table 6) because they are highly polymorphic and efficient in determining intra and interspecific genetic diversity in genetic diversity in plants like *Passiflora* spp. (Oliveira et al., 2019; Vianna et al., 2019).

For the amplification, the cocktail was prepared in a sterile microcentrifuge tube (1.5 mL) for a final volume of 25 µL. Reaction components are indicated as final concentration. The reaction mixture was prepared with 1X buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 U Taq Polymerase, 2 µM primer and 10 ng genomic DNA. The amplification was carried out in a programmable thermal controller



thermal cycler (PTC-100, MJ Research, St. Bruno, Canada). The initial denaturation was 95 °C for 5 min; 37 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, and hybridization: 58 °C (GT, CGA), 50 °C (AG, CA, ACA), and 55 °C (CCA, TG, CT) for 45 s, with an extension of 72 °C for 2 min. The final extension was at 72 °C for 7 min. The amplification products were separated using electrophoresis in 3% high resolution agarose gels prepared with 1% TBE, at 100 V for 3 h and displayed on a transilluminator.

Table 6. Primers used in the ISSR technique

Primer	Sequence (5' to 3')
CCA	DDB(CCA) ₅
CGA	DHB(CGA) ₅
GT	VHV(GT) ₅ G
AG	HBH(AG) ₇ A
CT	DYD(CT) ₇ C
TG	HVH(TG) ₇ T
CA	DBDA(CA) ₇
ACA	BDB(ACA) ₅

2.3 Statistical data analysis

A binary matrix of presence (1) and absence (0) was generated. The genetic similarity between the evaluated materials was calculated with the coefficient of Nei and Li (1979). Clustering analysis was performed using the UPGMA method, and a dendrogram was generated using the NTSYS statistical package (Numerical Taxonomy System for Personal Computer, version 2.02 PC, Setauket, New York, USA). The parameters of genetic diversity were estimated with the TFPGA program (Tools for Population Genetic Analysis, version 1.3, 1997, Miller, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona, USA), where the percentage of polymorphic loci and the heterozygosity were unbiased. The unbiased statistical “F” value was determined with a 95% confidence interval. The molecular variance analysis (AMOVA, Excoffier, Rutgers University, New Jersey, USA) was done with the GenAlEx 6.5 program (Peakal, Australian National University, Canberra, Australia).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The analysis with the Nei-Li coefficient (Nei and Li, 1979) at a similarity level of 0.60 showed that the first group mainly included the gulupa materials from the municipalities Firabitoba and Ramiriquí. No grouping by species was observed



since the other gulupa materials from the municipality Miraflores were distributed in other groups (Figure 2). Group II, at a similarity of 0.50, was made up of eight materials, including granadilla, curuba red flower, gulupa and passion fruit, and was highly variable. Also, at a similarity of 0.50, Group III mainly contained the gulupa species from Miraflores and the calabash species from Miraflores and Turmeque, in addition to the white and red flower curuba. Group IV had all the passion fruit materials from the municipality of Tunungua, the white and red flower curuba of Umbita and Turmeque and the granadilla of Tinjacá. At a similarity of 0.60, Group V included the most passion fruit materials from different geographical origins (Miraflores, Briceño and Tunungua). Group VI had the most materials, especially gulupa and curuba from Turmequé, Sutamarchán and Tinjacá, at a similarity of 0.55. Finally, Group VII contained the materials that presented a lower degree of similarity (0.40), 15 (granadilla), 64 (maracuyá) and 41 and 42 (gulupa) from Ramiriquí, Tunungua and Buenavista, probably because the origin was wild or spreading distribution.

In general, the clusters reflected the phenotypic variability observed in these species (Torres et al., 2019). The similarity rates were not so high since they are allogamous species, with sexual reproduction preferred, so there was manifest variability with no consistent formation of groups in terms of geographical origin or species, but there was lax distribution of the materials in terms of the evaluated municipalities, with inter- and intraspecific variability that can be used to obtain new planting materials. The lack of group structuring according to the geographical origin or species probably derive from the self-incompatibility found in most *Passiflora* species and the cross-pollination (Ocampo et al., 2017). The presence of exotic species such as gulupa or curuba also made a great contribution to the total genetic diversity observed in each group (Figure 2).

The gulupa (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) is a neotropical species, known as purple passion fruit. In Colombia it is cultivated between 1800 and 2400 m a.s.l. and its fruit is considered promising, with high potential in the Colombian agricultural and export market. Its flavor, appearance, nutritional value, availability, accessibility and medicinal properties, in addition to its exotic connotation, make it a product in high demand in the international market (Checa et al., 2011; Meneses et al., 2019). On the other hand, curuba (*P. tripartita* var. *mollissima*) materials are characterized by a fruit tree native to the northern Andes, introduced to countries such as Chile, Mexico, New Zealand, Australia, and USA, classified as one of the best edible *Passifloras* spp. for its appetizing organoleptic characteristics and its high nutritional content. Additionally, it has nutraceutical importance given its high antioxidant potential (Meneses et al., 2019).

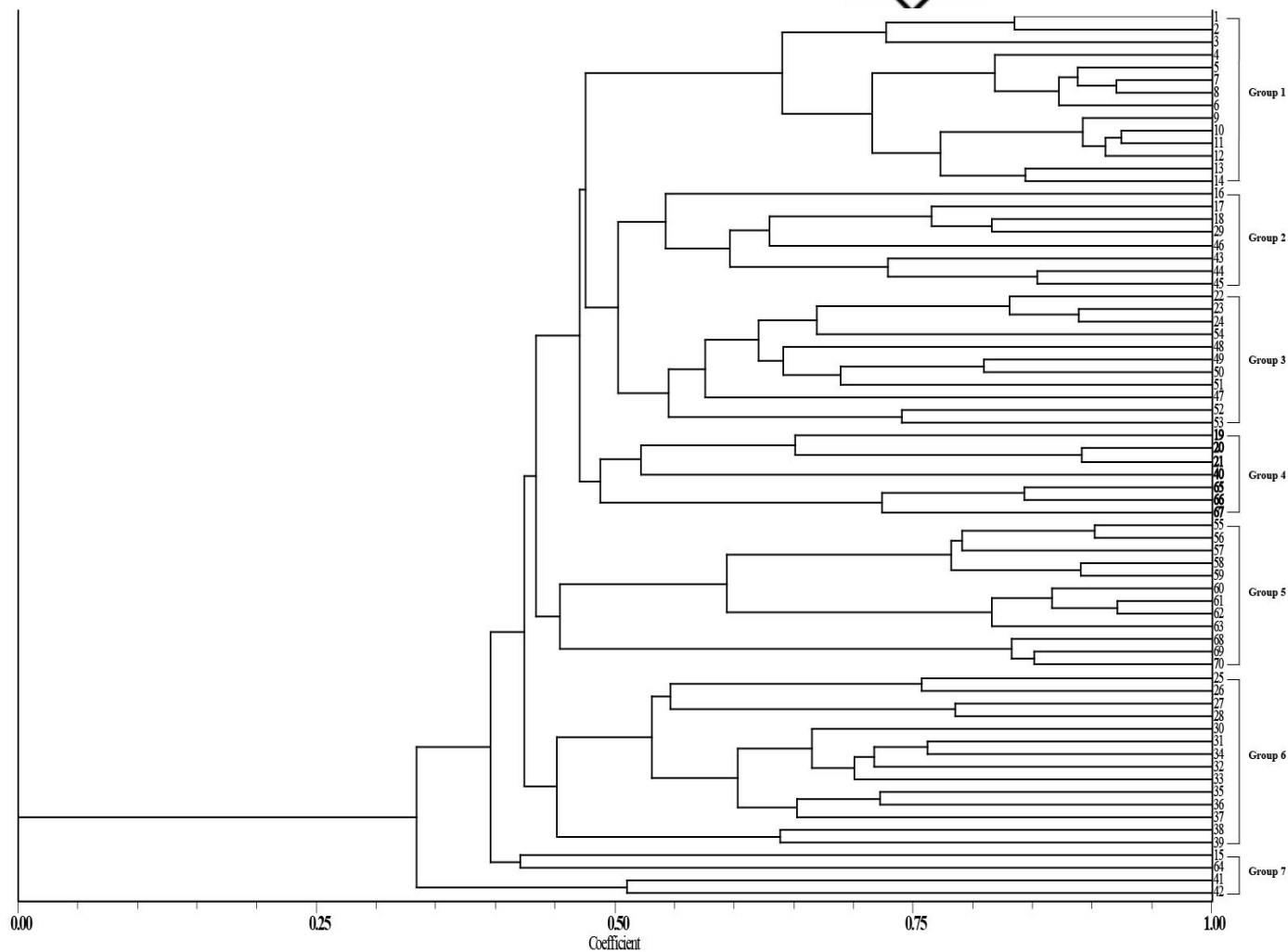


Figure 2. Dendrogram for the 70 *Passiflora* spp. genotypes based on the Nei-Li (1978) similarity coefficient and calculated with eight ISSR markers with the UPGMA, SAHN and TREE of NTSYs-pc (version 2.02g, 1998) classification methods.

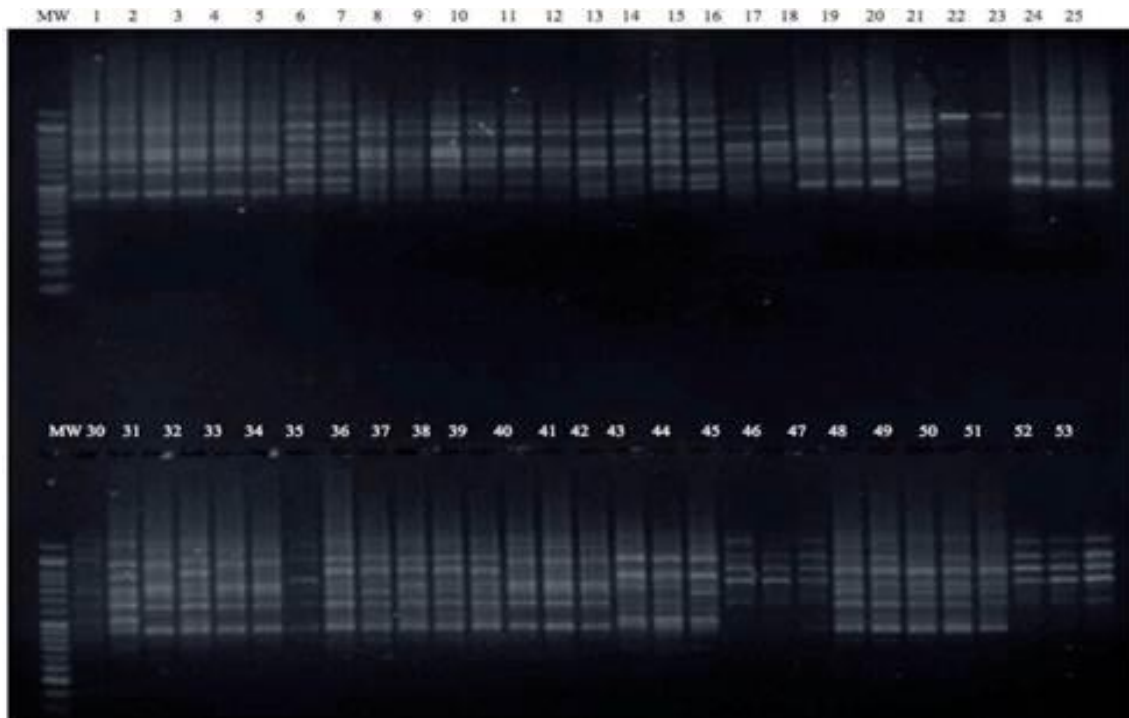


Figure 3. Amplification patterns generated by the ISSR TG in which inter and intraspecific variation in *Passiflora* material evaluated

The coefficient of cogenetic correlation was 75%, demonstrating a relationship between the genetic distances and the groups. Similar results were obtained by Batista et al. (2017) when evaluating genetic diversity in *P. cincinnata* accessions based on morphological descriptors and molecular markers and by Oliveira et al. (2019) when evaluating the genetic diversity of *Passiflora* spp. using ISSR and RAPD markers. Sousa et al. (2015) used ISSR markers in wild species of *Passiflora* spp. as a tool for the selection of taxa in the improvement of ornamentals and found that, despite a high coefficient of cogenetic correlation ($r = 0.94$) that suggested fidelity in the representation of the dendrogram, some taxa were distributed without taxonomic support; therefore, the species were separated into different groups.

The average value of Nei-Li genetic diversity was 0.40, consistent with that expected for cross-pollinated species and with the values observed in studies on genetic diversity in *Passiflora* (Santos et al., 2011; Oluoch et al., 2018; Oliveira et al., 2019; Vianna et al., 2019). Ocampo et al. (2017), when evaluating the diversity and genetic structure of *P. edulis* f. *flavicarpa* in Colombia with microsatellites, found an average genetic distance of 0.683 and that the structuring of the groups was not consolidated and could vary, just as in this study it was observed that the internal branches of the dendrogram were moderately compatible (bootstrap $\geq 50\%$) and ratified the grouping between some materials of the same department. The relationship between individuals of



the same species was low and did not present a geographical pattern according to the origin of each material. In most cases, this instability occurs when some individuals show intermediate similarity values compared to other groups when they are grouped and, therefore, are not assigned to a specific one and can belong to several compound branches (Oliveira et al., 2019).

The eight ISSR markers (Table 6) used to characterize the genetic diversity of *Passiflora* materials from the Department of Boyacá produced a total of 138 bands. The number of bands per primer varied from 10 for CA to 24 for GT, with molecular weights between 250 and 1320 kb (Table 7). The number of bands obtained in this study was adequate for estimating genetic parameters when compared to other studies on genetic diversity in *Passiflora* where these markers have been used (Sousa et al., 2015; Oliveira et al., 2019; Vianna et al., 2019). Considering the high rate of dinucleotide SSR describe in others studies for *Passiflora* spp. (Santos et al., 2011; Sousa et al., 2015) we chose the ISSR markers to characterize the genetic diversity present in the evaluated materials. The percentage of polymorphic loci for the eight ISSR primers was between 56% (TG) and 90% (AG), with an expected average heterozygosity of 0.17 to 0.38 for the CGA and AG primers, respectively (Table 6). The first TG showed a greater genetic differentiation between the materials, with a genetic differentiation coefficient (F_{ST}) of 0.47, which means that it can be useful for studies on genetic diversity in *Passiflora* (Figure 3).

Table 7. Percentage of polymorphic loci and average expected heterozygosity (H_e) for the eight ISSRs evaluated in *Passiflora* materials

Primer	Number of bands	% Polymorphic loci	H_e	F_{ST}	Standard deviation
ACA	18	72	0.56	0.41	0,04
AG	20	90	0.58	0.21	0,01
CA	10	70	0.28	0.35	0,02
CCA	18	61	0.51	0.43	0,04
CGA	16	50	0.57	0.41	0,04
CT	14	71	0.38	0.38	0,02
TG	18	56	0.54	0.47	0,03
GT	24	79	0.48	0.30	0,02
Total	138	75	0.56	0.16	0.01

F_{ST} : Genetic differentiation coefficient.

For the total population, the percentage of polymorphic loci and the expected average heterozygosity (H_e) were 75.4% and 0.56, respectively (Table 7), because of the genetic nature of the materials, the type of marker, and the genome coverage, among others. The F_{ST} obtained when evaluating the *Passiflora* materials with the eight ISSR markers was 0.16, with a standard deviation of 0.01 (Table 7). According to Wright (1978), values greater than 0.25 show great genetic differentiation, so there was not a population genetic structure in the evaluated materials.

The AMOVA showed that 64% of the variation observed in the evaluated *Passiflora* materials was explained by the component within the groups, and



36% was explained by the differentiation between the groups, so it is necessary to consider subdivision levels and hierarchy greater than those contemplated in this study, in addition to the high levels of variation at the intraspecific level, which should be used for management and conservation strategies of this plant genetic resource (Table 8), which has also been reported in other genetic diversity studies on *Passiflora* using this marker (Ocampo et al., 2017; Oluoch et al., 2018; Fonseca-Trujillo et al., 2019). In interspecific analyses, a higher polymorphism rate in combination with a higher average number of bands amplified per primer is indicative of high genetic diversity (CerqueiraSilva et al., 2012). However, there was also high intraspecific genetic diversity among the evaluated *Passiflora* materials.

In studies on genetic diversity in *Passiflora*, it has been found that ISSR markers are highly polymorphic and informative (Batista et al., 2017; Oliveira et al., 2019; Vianna et al., 2019); in addition, heterozygosity values greater than those found in this study have been reported by Lougon et al. (2014) when evaluating the genetic diversity in the *Passiflora* genus with SSR markers, finding an average heterozygosity of $H_e = 0.57$. These values show broad genetic variability in the *Passiflora* genus. Similar values were found by Cerqueira-Silva et al. (2012), who evaluated *P. cincinnata* accessions and obtained $H_e = 0.51$, and Cazé et al. (2012), who used seven microsatellite loci to study the genetic structure.

In Colombia, genetic diversity studies on *Passiflora*, such as those carried out by Fonseca-Trujillo et al. (2009), who used ISSR markers, have characterized the cultivated gulupa materials collected in the Departments of Boyacá, Cundinamarca and Huila, finding that these molecular markers were efficient at detecting polymorphisms in this species (89%), evidencing broad genetic diversity that is distributed in the areas where gulupa is grown. The gulupa materials evaluated in this study showed high genetic diversity, probably because of the propagation method, origin and short time of establishment of these crops in this country.

Table 8. Molecular variance analysis for groups formed with the eight ISSR markers

Source	DF	SS	MS	SV	%
Between group	10	677.33	67.73	8.62	36
Within group	59	909.15	15.41	15.40	64
Total	69	1586.48		24.05	

DF: Degrees of freedom; SS: sum of squares; MS: middle square; SV: standard variation.

Ocampo et al. (2017), in the study on the diversity and genetic structure of passion fruits in Colombia using microsatellite markers, found that six microsatellite loci amplified a total of 58 alleles, including nine unique and 31 rare ones. The diversity indices showed a polymorphic information content (PIC) of 0.74, an average observed heterozygosity of $H_o = 0.52$ and an



expected $H_e = 0.78$, evidencing a poor geographical structuring and high diversity in the accessions, which could be explained by the allogamy and the constant exchange of seeds among farmers.

Studies on collection and morphoagronomic characterizations in *Passiflora* in Colombia have demonstrated the wide phenotypic variation that exists in cultivated and wild materials, as reported by Checa et al. (2011), who collected and morphoagronomically characterized 91 materials of the subgenus *Tacsonia* and eight materials of the subgenus *manicata*, finding that the characteristics that contributed most to the phenotypic variation were associated with the fruit and the phytosanitary state of the materials. Similar results were obtained by Ocampo et al. (2013) in the exploration of the genetic variability of passion fruits as a basis for a breeding program in Colombia, in which quality parameters were taken into account and eight elite accessions from Caldas, Valle del Cauca and Antioquia were identified. The classification analysis showed high variability, with little structuring by geographical origin. Galeano et al. (2018), when characterizing the production and physicochemical variables of 60 passion fruit accessions conserved at the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), obtained results from the grouping and principal components that showed broad genetic diversity in the entire collection without any population substructure, as seen in this study 30 promising accessions were identified as parental for the first cycle of recurrent selection. These results are the basis for initiating a process of genetic improvement from the superior genotypes of the elite accessions identified. However, these materials have not been identified for the Department of Boyacá, which is why this study, together with morphoagronomic and quality data, is vital to starting a breeding program that leads to new and better materials.

In this study, it was found that there is high genetic diversity among the *Passiflora* materials grown in the Department of Boyacá. Most of these materials showed different genetic backgrounds and were probably derived from a number of introductions from Hawaii (USA) and Brazil that started in the 1960s, along with the flow of genes through seed exchanges between farmers with different geographical origins and the allogamy of these species, resulting in an increase in allele distribution between different accessions; as well as its way of reproduction, since in general terms the species belonging to the genus *Passiflora* are spread asexually through grafts, cuttings and tissue culture in vitro; and sexual route from the seed, however the latter is the most used method in most of these species in Colombia (Faleiro et al., 2019). This is consistent with the results found in others, such as *P. peruviana* (Morillo et al., 2018), who argued that genetic polymorphism can be associated with the allogamous nature of the species and the exchange of seeds between producers, which tend to favor the conservation of a high percentage of heterozygous genotypes.

Knowledge on inter- and intraspecific genetic diversity provides useful information for effective conservation, management of plant genetic resources and breeding programs (Oluoch et al., 2018). Variability between genotypes is



important for breeders in the selection of high-yield varieties, so the existence of variability among individuals is a prerequisite for the production of new varieties aimed at improving crop productivity, with the ability to resist the impacts of biotic or abiotic stress (Oliveira et al., 2019).

4. CONCLUSIONS

The ISSR markers allowed to determine the existence of an important genetic variability in the *Passiflora* spp. material collected in the department of Boyacá, which is presented mainly at the intraspecific level, which suggests higher levels of hierarchy and subdivision than those considered in this study.

There is a genetic potential in the evaluated material that must be exploited in conservation and plant breeding strategies of *Passiflora* spp. in the main producing municipalities of the department of Boyacá.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their sincere thanks to the *Passiflora* producers in the department of Boyacá, the research group Competitividad, Innovación y Desarrollo Empresarial (CIDE) and the Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia for their financial support of this research.

REFERENCES

Agronet. 2019. Área, producción y rendimiento de *Passifloras* en Colombia. Agronet, Bogotá, Colombia. Available at <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1> (accessed December 2019).

Araya, S., Martins, A.M., Junqueira, N., Costa, A.M., Faleiro, F.G., and Ferreira, M.E. 2017. Microsatellite marker development by partial sequencing of the sour passion fruit genome (*Passiflora edulis* Sims). *BMC Genomics* 18:549-567. doi:10.1186/s12864-017-3881-5.

Batista, T., Martins, L., Dos Santos, R., Da Silva, M., and Oliveira, J. 2017. Genetic diversity in accessions of *Passiflora cincinnata* Mast. based on morphoagronomic descriptors and molecular markers. *Revista Caatinga* 30:68-77. doi:10.1590/1983-21252017v30n108rc.



Bernal, N., Ocampo-Pérez, J., y Hernández-Fernández, J. 2014. Caracterización y análisis de la variabilidad genética de la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) en Colombia empleando marcadores microsatélites. Revista Brasileira de Fruticultura 36:598-611. doi:10.1590/0100-2945-251/13.

Cazé, A.L.R., Kriedt, R.A., Beheregaray, L.B., Bonatto, S.L., and Freitas L.B. 2012. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Passiflora contractu*. International Journal of Molecular Sciences 13:11343-11348.

Cerqueira-Silva, C.B.M., Santos, E.S.L., Souza, A.M., Mori, G.M., Oliveira, E.J., Correa, R.X., et al. 2012. Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). American Journal of Botany 99:170-172. doi:10.3732/ajb.1100477.

Checa, O., Rosero, E., y Eraso, I. 2011. Colección y caracterización morfoagronómica del subgénero *Tacsonia* en la zona andina del departamento de Nariño, Colombia. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín 64:5893-5907.

Dellaporta, S., Wood, J., and Hicks, J. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.

Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Junghans, T.G., Jesus, O.N., Miranda, D., and Otoni, W.C. 2019. Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal 41:2-17. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452019155>.

Fonseca-Trujillo, N., Márquez, M., Moreno, J., Terán, W., y Schuler, I. 2009. Caracterización molecular de materiales cultivados de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*). Universitas Scientiarum 14:135-140. doi:10.11144/javeriana.SC14-2-3.ccmdm.

Galeano, C., Cerón, I., and Arango, V. 2018. Agronomic evaluation of a Colombian passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) germplasm collection. Agronomy Research 16:1-12. doi:10.15159/ar.18.190.

Gramazio, P., Plesa, I., Truta, A., Sestras, A., Vilanova, S., Plazas, M., et al. 2018. High informative SSR genotyping reveals large genetic diversity and limited differentiation in European larch (*Larix decidua*) populations from Romania. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 422:165-175. doi:10.3906/tar-1801-4.1.

Konta, E.M., Almeida, M.R., Amaral, M.R., Darin, J.D.C., Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., et al. 2014. Evaluation of the antihypertensive properties of yellow passion fruit pulp (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) in spontaneously hypertensive rats. Phytotherapy Research 28:28-32. doi.org/10.1002/ptr.4949.



Lougon, C., Vianna, A., Azevedo, E., De Oliveira, J., Nonato, R., and De Oliveira, J. 2014. Genetic variability assessment in the genus *Passiflora* by SSR markers. *Chilean Journal of Agricultural Research* 74:355-360. doi:10.4067/S0718-58392014000300015.

Malacrida, C.R., and Neuza, J. 2012. Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): physical and chemical characteristics. *Brazilian Archives of Biology Technology* 55:127-134. doi.org/10.1590/S1516-89132012000100016.

Meneses, M., Nixon, A., Herrera, E., y Tarazona, M. 2019. Caracterización y estabilidad de un extracto rico en antocianinas a partir del epicarpio de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims). *Revista Colombiana de Química* 48:1-15. doi:10.15446/rev.colomb.quim.v48n2.76682.

Morillo, A.C., González, J., y Morillo, Y. 2018. Caracterización de la diversidad genética de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 16:26-33. doi:10.18684/bsaa.v16n1.631.

Nei, M., and Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:5269-5273.

Ocampo, J., Acosta, N., and Hernández, J. 2017. Variability and genetic structure of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) in Colombia using microsatellite DNA markers. *Agronomía Colombia* 35:135- 149. doi:10.15446/agron.colomb.v35n2.59973.

Ocampo, J., Urrea, R., Wyckhuys, K., y Salazar, M. 2013. Exploración de la variabilidad genética del maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) como base para un programa de fitomejoramiento en Colombia. *Acta Agronómica* 62:352-360.

Oliveira, J., Gelape, F., Vilela, N., Da Fonseca, G., and Araya, S. 2019. Genetic variability of *Passiflora* spp. base on ISSR and RAPD. *Asian Journal of Science and Technology* 10:9375-9378.

Oluoch, P., Nyaboga, E., and Bargul, J. 2018. Analysis of genetic diversity of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes grown in Kenya by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. *Annals of Agrarian Science* 16:367-375. doi:10.1016/j.aasci.2018.08.003.

Pereira, D.A., Correa, R.X., and Oliveira, A.C. 2015. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of "somnus" passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): Implications for conservation and pre-breeding. *Biochemical Systematics and Ecology* 59:12-21. doi.org/10.1016/j.bse.2014.12.020.

Santos, L.F., Oliveira, E.J., Santos, A.S., Carvalho, F.M., Costa, J.L., and Padua, J.G. 2011. ISSR markers as a tool for the assessment of genetic



diversity in *Passiflora*. *Biochemical Genetics* 49:540-554. doi:10.1007/s10528-011-9429-5.

Sousa, A., Souza, M., Melo, C., and Sodr , G. 2015. ISSR markers in wild species of *Passiflora* L. (Passifloraceae) as a tool for taxon selection in ornamental breeding. *Genetics and Molecular Research* 14:18534-18545. doi:10.4238/2015.

Torres, G.X., Viana, A.P., Vieira, H.D., Rodrigues, D.L., and dos Santos, V.O. 2019. Contribution of seed traits to the genetic diversity of a segregating population of *Passiflora* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research* 79:288-295. doi:10.4067/S0718-58392019000200288.

Vianna, L., Pereira, T., Santos, E., Vianna, A., Pereira, M., Ramos, H., et al. 2019. ISSR and SSR markers for determining genetic relationships among three wild species of *Passiflora*. *Genetic and Molecular Research* 18:1-10. doi.org/10.4238/gmr18040.

Vieira, A., Peixoto, J., Gelape, F., Souza, M., and Carvalho, M. 2019. Molecular characterization and genetic diversity of yellow passion fruit based on RAPD markers. *Journal of Agricultural Science* 11:575-580. doi:10.5539/jas.v11n3p575.

Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.



CAPÍTULO III

Evaluation of pregerminative treatments in gulupa seeds (*P. edulis* f. *edulis* Sims).

Publicado en: Rev. Bras. Frutic. vol.42 no.3 Jaboticabal 2020
Epub June 05, 2020 <https://doi.org/10.1590/0100-29452020590>



ABSTRACT

The genus *Passiflora*, commonly known as fruits of passion, includes numerous species, including gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*), of nutraceutical and economic importance, both for consumption in nature and for its agro-industrial applicability. This research was developed to evaluate the effects of various pre-germinative treatments on the germination of gulupa seeds from the municipality of Ramiriquí (Boyacá), such as: exposure to hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorite of sodium (NaOCl), gibberellic acid (GA_3), distilled water imbibition and stratification at 4 °C, in varying concentrations and exposure times (24 and 48 hours), using an experimental design completely random, with three repetitions of 50 seed each one. Statistical analysis showed significant differences between treatments, with H_2O_2 being 15% the most effective, with a germination percentage (PG) of 88% in exposed seeds for 48 hours. In the presence of NaOCl the percentages were lower 36 -40%. GA_3 at 100 ppm for 24 hours recorded 51% PG, at the other concentrations of this growth regulator and exposure times this value was lower. The use of H_2O_2 has not been reported as a treatment to induce germination in the genus *Passiflora*. Considering the results obtained in this research its application for the treatment of seeds in plant species can be a viable, effective, economical and easily applicable alternative.

Terms for indexing: *Passiflora*, gulupa, germination, hydrogen peroxide, gibberellic acid, sodium hypochlorite.

1. INTRODUCTION

Passifloras stand out for their economic, medicinal and ornamental value, especially for the fruit that is used for its flavor characteristics, aroma, nutritional content, antioxidant activity, nutraceutical and pharmaceutical applications (SILVA; BOTTOLI, 2014). Among the cultivated species of the genus *Passiflora* are passion fruit (*P. edulis* var. *flavicarpa*), granadilla (*P. ligularis*), gulupa (*P. edulis* f. *edulis*), curuba (*P. tripartita* var. *mollissima* (Kuth) Holm-Nielsen & Jorgensen) and badea (*P. quadrangularis*). The genus *Passiflora* comprises more than 500 species. They are distributed in North and South America, the Caribbean region, the Galapagos Islands, Africa, Asia, Oceania, the Philippines and Australia. Colombia and Brazil are centers of diversity; with 30% of registered *passiflora* species (150 in Brazil and 170 in Colombia) (CERQUEIRA-SILVA et al., 2018).

In general, species belonging to the genus *Passiflora* are spread asexually through grafting, cuttings and *in vitro* culture of tissues; and sexual pathway from seed, method most commonly used in most of these species (SILVA et al.,



2018; FALEIRO et al., 2019). The period for germination has been estimated between 10 days and three months, with low germination rates and irregular seedling formation in some cases (DELANOY et al., 2006; MAROSTEGA et al., 2017). In this sense, Gutierrez et al. (2011) indicate that these methodologies generate planting materials of heterogeneous quality, with low and variable germination percentages, low population of established plants and therefore reduced yields. Despite the greater variability for plant germination and seed unevenness, seed propagation is the most widely used for most *passiflora* species due to the ease of the method compared to others, the difficulty in vegetative propagation of some species and high cost in other forms of propagation. In addition, as most species are allogamous, the use of clones or genetically similar materials would make production difficult. This point is necessary for the basis of seed propagation and the alternative would be the selection of genetically superior materials and uniformity in the establishment of seedlings.

The seed of these species presents physical and chemical difficulties, called latency or exogenous dormancy, that is to say that the testa is of stony context and has a resin that makes it waterproof, leading to low germination percentages (ELLIS et al., 1985; HARTMANN et al., 2002; GUTIERREZ et al., 2011; RAMÍREZ et al., 2015,). Dormancy has been reported in species of *P. quadrangularis*, *P. suberosa*, *P. nitida*, *P. foetida*, *P. alata*, *P. cincinnata* (MAROSTEGA et al., 2017), *P. edulis f edulis*, *P. ligularis* and *P. maliformis* (GUTIÉRREZ et al., 2011), *P. setacea* (PADÚA et al., 2011), *P. edulis var flavicarpa* (RAMIREZ et al., 2015), *P. actinia* (GRZYBOWSKI et al., 2019). Hartmann and Kessler (2011) indicate that a combination of mechanical and physiological dormancy is present for *P. xalatocaerulea*, *P. mollissima* and *P. tricuspsis*. Due to the dormancy problems present in the cover of *passiflora* seeds, various pregerminative treatments have been applied with the aim of inducing rapid and uniform germination.

Methodologies for overcoming dormancy include stratification (temperature variation) and scarification (mechanical and chemical) (HARTMANN et al., 2002). Pre-germinative treatments that have been evaluated in species of the genus *Passiflora* include: fermentation in sucrose, immersion in gibberellic acid (GA₃), potassium nitrate (KNO₃), immersion in sulphuric acid (H₂SO₄), salicylic acid, scarification of partial testa by performing apical, basal and seed punctures, temperature alternation, combinations of temperature and lighting regimes, cold stratification and mycorrhizal inoculation (*Glomus fasciculatum*) (MABUNDA et al., 2010; GUTIERREZ et al., 2011; VELASQUEZ et al., 2012; RAMIREZ et al., 2015; GRZYBOWSKI et al., 2019) in which the results obtained to break the dormancy were variable in terms of the germination time and the germination percentage obtained (PG). Another substance that has been tested in some plant species for chemical scarification is hydrogen peroxide (H₂O₂). Oxygen-reactive species (ROS) play a major role in physiological, developmental and plant defense processes (FICHMAN et al., 2019).



Hydrogen peroxide is part of this family, and in species such as *Pisum sativum* and *Cucumis melo* stimulation of early germination and growth has been demonstrated, articulating an interaction between cellular redox state and plant hormones during (BARBA et al., 2012). Due to its chemical characteristics it could also be used for seed scarification by softening the testa and in turn stimulating the germination of the viable embryo of the pasifloras. Pregerminative treatments that include hydrogen peroxide scarification have not been reported in the family Pasifloracea. Due to the variability of results obtained in applying the methodologies available in several species of *Passiflora* and the need to determine a viable and reproducible germination protocol for the production of uniform quality plant material with technical criteria of species of economic interest, the objective of this research was to evaluate the effect of chemical-type pre-germline treatments with gibberellic acid, sodium hypochlorite and hydrogen peroxide, at times and concentrations variables, in gulupa seeds.

2. MATERIALS Y METHODS

2.1 Plant Material

The seeds used were selected from ripe fruits harvested from plants from commercial crops in the municipality of Ramiriquí (Boyacá) and in good phytosanitary condition, 10 plants were chosen randomly, pollinated naturally, the fruits were directly harvested from the plant. After the pollination, it is required within 28-35 days for the fruit formation, and for filling them, 90 days. In summary, the fruits were harvested at 120 days approximately after the pollination (Anexo 2A).

In the Plant Biotechnology laboratory of the National Learning Service (SENA) (Boyacá - Colombia), manual extraction of seeds was carried out, subsequently they underwent a fermentation process for 72 hours, after this aril was removed, to prevent fungal proliferation, submerged in NaOCl at 3% (Commercial concentration 5.25% w/v) for 15 minutes, followed by three washes with distilled water, 1 minute at a time and stored at room temperature until use.

2.1.1 Morphology of fruits and seeds. 10 fruits were chosen randomly from the ones harvested in the field (Anexo 2 B y C). For the characterization of the fruits, the diameter, weight and number of seeds per fruit were recorded according to Orjuela et al (2011) and Icontec NTC 4101 standards of 1997, issued for passifloras such as gulupa and granadilla. The morphological analysis of the seeds was performed by observation to the stereoscope.

2.2 Pre-germinative treatment

Treatments are:

- i. Control – untreated (ST), seeds that were extracted, fermented, removed aril and sown in greenhouse conditions.



- ii. Hydrogen peroxide (H₂O₂): The seeds were immersed in the hydrogen peroxide solution at concentrations of 20 and 15% (v/v), dilutions with respect to the commercial concentration of 30 % w/v (100 volumes), for 24 and 48 hours.
- iii. Sodium hypochlorite at 5.25% (w/v), the seeds were submerged for 24 and 48 hours.
- iv. Seeds in gibberellic acid (GA₃) solution at concentrations of 50 and 100 ppm, for 24 hours and 48 hours,
- v. Water imbibition: The seeds were immersed in distilled water for 24 and 48 hours.
- vi. Cold stratification at 4 °C, for 7 and 14 days prior to planting in greenhouse conditions.

All seeds after being subjected to the various pre-germinative treatments were washed with distilled water three times, 1 minute at a time, and subsequently sown under described greenhouse conditions.

2.3 Germination conditions

The planting under greenhouse conditions was carried out in sterile peat substrate brand Pindstrup plus, pH 5.5 - 6.0, type of fertilizer medium, which composition corresponds for each Kg of peat to: 0.18 of NPK, 0.00090 kg of microelements, 1.27 g of nitrate, 0.99 g of ammonium. Germination trays of 250 sockets were used. The volume of peat was 2.5g equivalent to 3.12 ml per socket. Irrigation was carried out to conserve the required and sufficient moisture without the addition of fertilizers. Approximate temperature, 25 °C during the day and 18 °C at night, in dark conditions. A seed was considered germinated, when the presence of the seeds with plumules or cotyledons emerged was observed (Anexo 2 D). For the verification of presence and length of the root, plantlets from the tray were extracted randomly.

2.4 Germination indices

The experiment was conducted in a completely random design with 15 treatments and three replicas of 50 seeds each, for a total of 150 seeds per treatment. Germination assessment was recorded every 48 h for 45 days following the ISTA methodology (2013). The data obtained were used to find the mean germination time (TMG) following the formula of Thompson (1970) and Cardenas (2011):

$$TMG = \frac{\sum_{i=1}^k n_i \times t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

where t_i = time elapsed since planting, n_i = number of seeds germinated in the interval t_i - (t_i-1).

The Germination Percentage (PG) and mean speed of germination (MSG) was estimated to have been found according to Ranal and Santana (2006), and Cárdenas (2011): $PG = (N/N_s) \times 100$;

where: N= Number of germinated seeds y N_s = Number of total seeds;



$MSG = \sum (n_i / t_i)$; where, n_i number of seeds germinated on the i -th day and t_i time in days for germination on the i -th day. . Additional data of plantlets' height shoot were registered at the end of the term of germination.

2.5 Statistical analysis. The data recorded to quantify the germination percentage and the average germination time were analyzed using ANOVA variance analysis. When the test showed differences between the treatments, the Scott Knott's test ($P \leq 0.05$) was applied to determine the treatments that affect gulupa seed behavior. Statistical analyses were performed using Sisvar[®] software (FERREIRA, 2014).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Morphology of fruits and seeds

The collected gulupa fruits had a dark purple coloration and a smooth bark. The weight of the selected fruits ranged from 35 to 54 grams, the measurements of the equatorial diameter between 4.4 and 5.1 cm, and the polar diameter between 5.1 and 5.8 cm. The number of seeds counted per fruit had values between 110 and 186 seeds. Overall, the average weight of the fruits was 45.68 grams, polar diameter of 4.9 cm, and the equatorial diameter of 5.41 cm and 155.9 seeds per fruit. The seeds observed had hard testa, endosperm and heart-shaped shape, reticulated or slit in dark to black. These results differ somewhat from those reported by Carvajal et al. (2012), who evaluated gulupa fruits from six locations, whose equatorial diameter was between 5.5 and 5.76 cm and polar diameter of 5.53 and 6.6 cm. The number of seeds per fruit was 167 to 183. Franco et al. (2014) concluded that the polar diameter was greater than the equatorial diameter in gulupa fruits evaluated at 112 days after flowering, 5.72 and 5.32 cm, respectively. The authors concluded that the characteristics of the fruits at the end of their growth and development depend on their provenance.

3.2 Seed germination

Germination is epigeal and the emergence of seedlings is fanerocotilar (Anexo 2 E). In the greenhouse conditions evaluated, germination was recorded 24 days after planting, starting with the emergence of the radicle and the cotyledonous leaves observed in the germination trays. In this sense, Silva et al. (2018) found that for six species of *Passiflora*, germination occurred between 14 and 28 days after planting. Other reports suggest that the estimated period is between 10 and 90 days (DELANOY et al., 2006). Therefore, the germination times of the gulupa materials evaluated in this study are within the reported range for species of the genus *Passiflora* and it can be inferred that this depends on the origin of the fruit, and treatments pre-germinations to which the seeds are subjected.



3.3 Evaluation of pre-germinative treatments.

Analysis of germination percentages (PG) obtained in the various pretreatments shows statistically significant differences (Table 9). In general, the minimum germination values for the whole experiment were 33% and the maximum values were 88.7%. These results are in the PG range obtained by Marostega et al. (2017) from 54 to 86%, Ramírez et al. (2015) with 67.9% and Gutierrez et

Table 9. Effect of germinative pretreatments on germination percentage (PG), mean germination time (TMG) and mean speed of germination (MSG) of gulupa seeds (*Passiflora edulis f. edulis* Sims).

Treatment	Exposure time (hours)	Shoot length (cm)	Germination Indexes		
			%PG	TMG	MSG
H ₂ O ₂ 20%	24	2,9 a	82,7 a	31,3	1,36 a
H ₂ O ₂ 20%	48	2,8 a	80,7 a	28,7	1,46 a
H ₂ O ₂ 15%	24	2,7 a	80,0 a	29,4	1,41 a
H ₂ O ₂ 15%	48	2,4 b	88,7 a	32,9	1,39 a
NaOCl 5.25%	24	2,6 b	36,0 b	24,9	0,74 b
NaOCl 5.25%	48	1,4 d	40,7 b	30,5	0,70 b
GA ₃ 50 ppm	24	2,7 a	33,3 b	30,5	0,56 b
GA ₃ 50 ppm	48	2,4 b	39,3 b	29,3	0,69 b
GA ₃ 100 ppm	24	2,5 b	51,3 b	27,1	0,94 b
GA ₃ 100 ppm	48	2,2 c	46,7 b	30,1	0,78 b
H ₂ O	24	2,3 c	33,3 b	27,7	0,61 b
H ₂ O	48	2,8 a	52,0 b	31,5	0,84 b
ST		2,3 b	41,3 b	28,5	0,77 b
Cold stratification 4 °C	7 days	1,8 c	62,6 b	39,9	0,85 b
Cold stratification 4 °C	14 days	1,4 d	46,0 b	40,3	0,57 b
CV (%) *		7,87	7,07	4,87	20,0

Means not followed by the same letter on the column differ from each other, according to the Scott-Knott test, $p < 0.05$. * Coefficient variation percentage.

al. (2011) of up to 94% PG in immersion with 96% sulfuric acid. In contrast, Velázquez et al. (2012) obtained 17% of PG with chemical pretreatments, however, when the seeds were stored at 4 °C for 15 days prior to planting, the PG was 75%. It is clear that the results of PG, in the same species of *Passiflora* or in others belonging to the same genus, have not been uniform even though the pregerminative treatments were the same or similar. In various species of *Passiflora* there are problems in the germination of seeds, related to the presence of dormancy, recalcitrance, among others (FALEIRO et al., 2019). The breakdown of dormancy in the seed, is controlled by endogenous physical factors and growth-regulating hormones (ABA and GA₃) (WILLIS et al., 2014;



NONOGAKI, 2017). The use of chemicals to break dormancy has been widely referenced in the literature, with variable results between species belonging to the genus *Passiflora* and even among research reported in the same species. In all evaluated treatments, including untreated seeds (ST), variable germination percentages were presented depending on the chemical used as pretreatment (Hydrogen Peroxide - H₂O₂, Gibberellic Acid - GA₃, Sodium Hypochlorite- NaOCl), the concentration and/or exposure time of the seeds. Treatments with better PG responses by chemical concentration and exposure time correspond to hydrogen peroxide. The days on which the onset of seed germination was recorded were 24 days after planting and the last at 43 days. No seedling emergency was observed prior to day 24 and no new emergencies were reported in the germination trays after day 43. Figure 4 shows cumulative PG data at 25, 32, 39 and 43 days after planting, evidenced that at 25 days, seeds imbibed in water for 48 h obtained the lowest PG value (9.3%) while seeds in H₂O₂ had values between 20 and 38.7%, pre-treatments in GA₃ and NaOCl recorded similar GPs, between 10 and 32%. Germination values were presented 33 days after planting throughout the test, in a range between 32 and 76% of PG. At 39 and 43 days the largest PG achieved was 80 and 88%, respectively, corresponding to seeds exposed to H₂O₂.

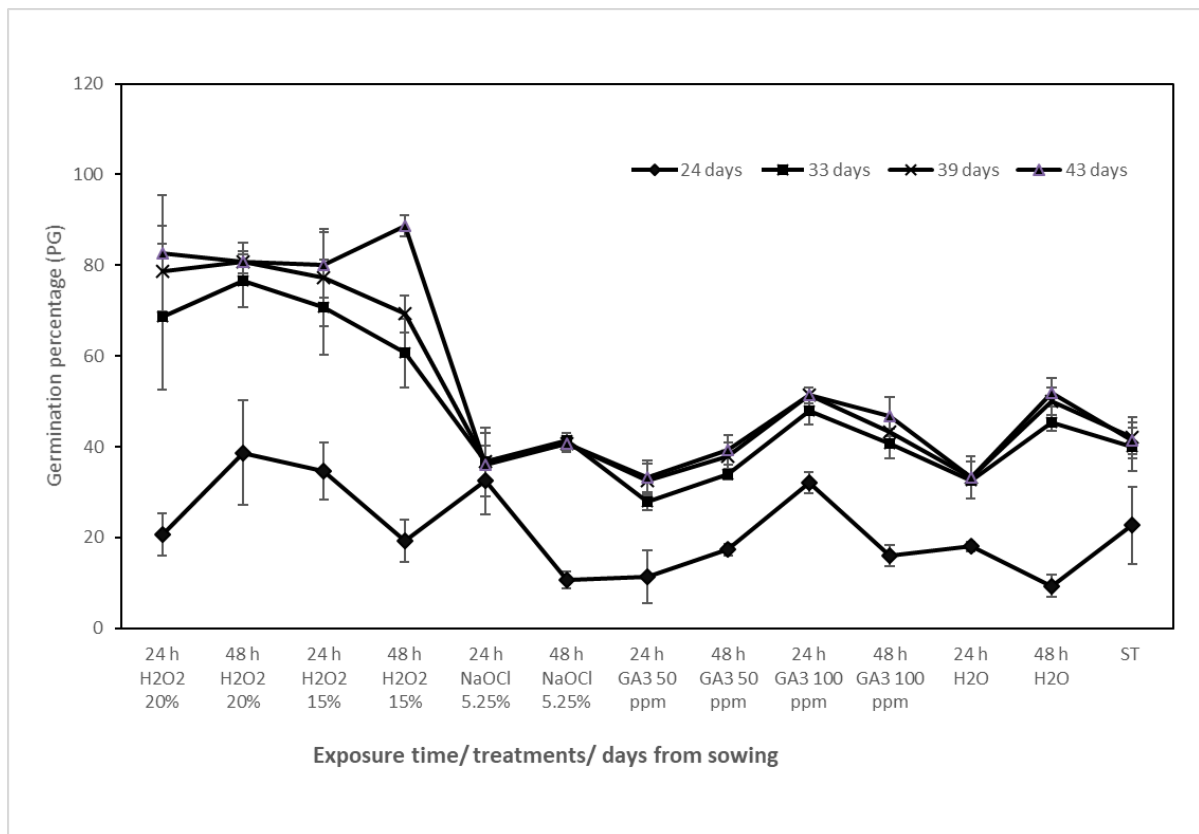


Figure 4. Effect of pretreatments evaluated in the germination percentage (PG) of seeds of *P. edulis f. edulis* at 24, 33, 39 and 43 days from planting.



In other research and species, the effect of H₂O₂ had already been reported at different concentrations, on the increase in the germination percentage. Nandi et al. (2017), they observed that the use of H₂O₂ to 1% in *Capsicum annuum* seeds was the most effective concentration in relation to the increase in PG, vigor rate and percentage of mycelial inhibition. In this regard, Szopinska (2014) evaluated the germination, vigor and health of *Zinnia elegans* seeds, found that depending on the concentration of H₂O₂ and time, fungal infestation was significantly reduced, thus checking the effect and property peroxide antimicrobials, thus showing that the treatment of this species with H₂O₂ at 3% for 20 minutes positively affected germination. However, a drop-off effect was observed in *zinnia* cultivar named Kirke, when the concentration of H₂O₂ was high, reducing germination and vigor in some of its trials. Similar results are reported by Sasaki et al. (2005) in rice seeds, who found that treatments with high concentrations of H₂O₂ (500 and 1000 mM) significantly decreased the fresh weight of seedlings, while treatments with concentrations between 5 and 100 mM of H₂O₂ had the against effect. Pretreatments with GA₃, bleaching solution, and H₂O₂ with exposure time for 24 hours were evaluated in *Psidium guajava* seeds. The best results were obtained at 300 ppm GA₃ with 40% PG, while H₂O₂ obtained PG values close to 25% (HEJAZI et al., 2018). In pea seeds imbibition with hydrogen peroxide at 20 mM to 12 and 24 hours increased germination, obtaining a PG of 75% compared to the control treatment as well as the growth of the seedling. Although, the authors indicate that concentrations between 40 and 100 Mm stimulate germination may also influence abnormal plant growth (BARBA-ESPIN et al., 2012). This research did not show that the highest concentrations of 15 and 20% of H₂O₂ produced malformations in the seedlings of *P. edulis f. edulis*, the subsequent transplantation performed from the germination trays to the head-on phase, did not register abnormalities (Anexo 2 F y G).

H₂O₂ is a reactive molecule that plays a dual role in the physiological and developmental processes of the plant, and in the mechanisms of stress resistance. The negative or positive functions involving H₂O₂ in biological systems depend on their concentration, physiological conditions and the specificities of the processes affected by H₂O₂ (WOJTYLA et al., 2016). Barba et al. (2012), they showed that H₂O₂ coordinates the onset of germination in pea, acting as a priming factor involving specific changes at the protein, transcriptomic and hormonal level, via MAPK (mitogen-activated protein kinases route) accelerating the process germination probably due to the invigoration of the seed.

Several research revised and reported by Bailly (2019) indicate that the probable site of reactive oxygen species (ROS) production might be either the mitochondria or the NADPH oxidases of the plasma membrane. It is proposed that the inhibition of NADPH oxidase leads to delayed germination. It is suggested that after imbibition, the resurgence of mitochondrial respiration in the seed might leading to ROS production Accumulation of H₂O₂ may increase the rates of protein carbonylation and protein turnover, as well as decreasing the electron pressure in the mitochondrial electron transport chain, allowing the



provision of reducing equivalents (NADPH) to the thioredoxin system (via the pentose phosphate pathway), which is involved in the regulation of seed germination and seedling development. In addition, H₂O₂ accumulation may influence the hormone balance by increasing gibberellins (GAs) and decreasing abscisic acid (ABA) and ethylene via 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) (BARBA et al., 2012; BAILLY, 2019).

In this research, according to the studies conducted and the available literature, we can infer that H₂O₂ could act through the molecular mechanisms described above to increase the PG of gulupa seeds, in which the presence of a thick, waterproof testa is related to the reported dormancy for this species. In this sense, peroxide could also act at the level of softening the testa and subsequent rupture allowing to improve the PGs. Lariguet et al. (2013), in *Arabidopsis* indicate that ROS molecules (reactive oxygen species) and especially H₂O₂ would have an important role during the rupture of the testa and endosperm prior to the protrusion of the radicle, by regulating the expression of genes that encode hydrolyzing enzymes of these structures. In the presence of 5.25% sodium hypochlorite, PG was presented in the range between 36 and 40%, in 24 to 48 hours of exposure, respectively.

The use of sodium hypochlorite had not been reported as a treatment inducer in pasiflora seeds, but in species with germination difficulties by the presence of a thick and waterproof testa as in the genus *Rubus* had already been tested its effect had already been proven inductor and others that had the presence of chemical compounds possibly inhibitory of germination as in *Carica papaya*. In seeds of *Rubus glaucus* immersed in NaOCl 5.25% for 16 hours, improved germination by 88.33% (DÍAZ et al., 2013) and 58.28% (VASQUEZ et al., 2019). It seems that sodium hypochlorite works by disintegrating the testa and accelerating the germination process to 10 days while the treatment witnesses germination starts at 90 days. In seeds of *Carica papaya*, the presence of phenolic compounds in the exotesta negatively affects germination, immersion for 24 hours in NaOCl to 2% of active chlorine, increased and accelerated the emergence of seedlings registering values between 60 to 80% PG (JESUS et al., 2016).

Additionally, the use of NaOCl in seed disinfection processes is widely known. In contrast, in this research treatments with 24 and 48 hour sodium hypochlorite had lower PG, 36 and 40% values to pretreatments with hydrogen peroxide and similar to those observed with GA₃ at 50 ppm, but lower than those recorded with water imbibition for 48 hours which recorded up to 52% PG. In the case of GA₃, a growth regulator used in most published trials as a germination inducer, the PG achieved, in concentrations of 50 ppm, in 24 and 48 hours of exposure, was 33.3 and 39.3%, respectively. At higher concentrations, 100 ppm, PG increased, registering between 51.3 and 46.7%, to 24 to 48 hours of exposure.

In this research with respect to gibberellins, the highest PG values were presented in pretreatment with 100 ppm of GA₃, with PG recorded of 51 and



46%, in exposure times of 24 and 48 hours. At a lower concentration, 50 ppm, in 24 and 48 hours of exposure, PG was 33.3 and 39.3%, respectively. Similar results were obtained by Marostega et al. (2017) when evaluating pre-germinative treatments for six species of ornamental pasifloras, including immersion in gibberellic acid (GA_3), obtaining between 54 and 86% germination for the evaluated species. In contrast, in other research, the imbibition in gibberellic for 24 hours at $1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, recorded high germination rates, 94%, much higher than that recorded for our tests.

The gibberellins control different states of plant development, including seed germination, seedling growth, stem elongation, among these is the gibberellic acid that stimulates seed germination, has a vital role in plant growth and development, flower development and fruit expansion, pollination, among others (VISHAL and KUMAR, 2018). Several studies have shown that gibberellins shades play a vital role in a large number of biological and physiological activities, when applied exogenously. Treatments in the presence of different GA_3 concentrations for dormancy rupture and/or germination induction with varying effectiveness in the percentages obtained have been evaluated in numerous reports. Effectiveness depends on the genus, species, concentration and time of immersion or exposure of the seed (CAVUSOGLU and SULUSOGLU, 2015).

The seeds that were extracted from the fruit (No treatment. ST), washed and sown directly, under the same substrate and irrigation conditions as the seeds used in the other treatments, had relatively high values and comparable to some of the chemical treatments, 41% PG. Water imbibition, from the physiological point of view is the first phase of germination and rehydration is from the physio-biochemical point of view (HARTMANN et al., 2002; DORIA, 2010). The ingress of water into the seed is due exclusively to a difference in water potential between the seed and the surrounding medium (MATILLA, 2008). In most trials water imbibition is used as a control treatment, in this investigation the imbibition in distilled water at the same exposure times evaluated in the other treatments, show a slight increase in the PG with respect to control (ST), quantifying a PG of 52% with exposure time of 48 hours. However, this value is much lower than the 88% achieved with pretreatment in hydrogen peroxide. The results for the shoot length of gulupa, seedling are in agreement with those observed for germination percentage, treatments with peroxide of hydrogen offered, in general shoot length between 2,7 to 2,9 cm. The lowest values were recorded in pretreatments with cold stratification and sodium hypochlorite for 48 hours.

Statistical analysis of the TGM germination index showed that there were no significant differences in this parameter between the different treatments. The treatment in which germination occurred in a shorter time, 24.9 days, compared to the others was that of NaOCl with exposure time of 24 hours and the highest TMG was presented in H_2O_2 at 15% for 48 hours, 32 days. However, in these treatments for the NaOCl presented one of the lowest PG and for H_2O_2 at 15%



the PG was the highest. During the seed stratification process of some species, there is a decrease in the physiologically active form of abscisic acid - ABA (ABA-free), with the consequent increase in germination capacity (MATILLA, 2008). The results quantified in stratification at 4 °C for 7 days with a PG of 62%, are higher than those obtained with some of the chemical treatments in this research, however the 15-day trial under the same temperature conditions decreased the value PG to 46%. In contrast, Velasquez et al (2012) found that seeds evaluated in cold pretreatment at 4 °C for 15 days and subsequent sowing in the greenhouse at 25 °C, recorded a PG of 75%.

4 CONCLUSIONS

The results of this research indicate that gulupe seeds treated in immersion with hydrogen peroxide, at the concentrations and exposure times assessed, quantified the best germination rates, compared to other treatments. However, the evaluation of lower concentrations and variable exposure times is necessary to optimize the production protocol of gulupa plants sexually by pretreatment with hydrogen peroxide.

REFERENCES

- BARBA, E.G.; HERNÁNDEZ, J. A.; DIAZ-VIVANCOS, P. Role of H₂O₂ in pea seed germination. *Plant Signal and Behavior*, Georgetown, v.7, n.2, p.193–195, 2012.
- BAILLY, C. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochemical Journal*, London, v.476, n.20, p. 3019-3032, 2019.
- CERQUEIRA, S.C.B.M.; FALEIRO, F.G.; de JESUS, O.N.; DOS SANTOS, E.S.L.; de SOUZA, A.P. Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Breeding. In: Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (Eds.). *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits*. Springer, Cham, 2018, 988p.
- CARDENAS, J. Morfología y tratamientos pregerminativos de semillas de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.). 2011. 110p. Tesis (Maestría en Ciencias Agrarias)-Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2011.
- CARVAJAL, V.; ARISTIZABAL, M.; VALLEJO, A. Caracterización del crecimiento del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims). *Agronomía, Manizales*, v.20, n.1, p.77-88, 2012.
- CAVUSOGLU, A.; SULUSOGLU, M. The Effects of Exogenous Gibberellin on Seed Germination of the Fruit Species. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi DERLEME*, Turkey, v.8, n.1, p.6-9, 2015.
- DELANOY, M.; VAN DAMME, P.; SCHELDEMAN, X.; BELTRAN, J. Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) LH Bailey, *Passiflora tricuspidis*



Mast. and *Passiflora nov sp.* seeds. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.110, n.2, p.198-203, 2006.

DÍAZ, D.C.A.; LOBO, A.M.; CARTAGENA, V.J.R.; MEDINA, C.C.I. (2013). Dormancy and germination of Castilla blackberry seeds (*Rubus glaucus* Benth). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, Medellín, v.66, n.1, p.6855-6864, 2013.

DORIA, J. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*, La Habana, v.31, n.1, p. 74-85, 2010.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. (1985). Handbook of seed technology for genebanks. Volume I. Principles and methodology. Italy: International Board for Plant Genetic Resources. Handbooks for Genebanks (IBPGR), No. 2. 456p.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; JUNGHANS, T.G.; JESUS, O.N.; MIRANDA, D.; OTONI, W.C. Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.41, n.2, e-155, 2019.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, V. 38, n.2, p. 109-112, 2014.

FICHMAN, Y.; MILLER, G.; MITTLER, R. Whole-plant live imaging of reactive oxygen species. *Molecular Plant*, Shanghai, v.12, n.9, p.1203-1210, 2019.

FRANCO, G.; CARTAGENA, J.R.; CORREA, G. ANÁLISIS DE CRECIMIENTO DEL FRUTO DE GULUPA (*Passiflora edulis* Sims), EN LAS CONDICIONES ECOLÓGICAS DEL BOSQUE HÚMEDO MONTANO BAJO DE COLOMBIA. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, Bogotá, v.17, n.2, p.391-400, 2014.

GUTIÉRREZ, M.I.; MIRANDA, D.; CÁRDENAS H.J.F. 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 Horticolas*, Tunja, v.5, n.2, p.209-219, 2011.

GRZYBOWSKI, C.R.S.; SILVA, R.C.; BELNIAKI, A.C.; PANOBIANCO, M. Investigation of dormancy and storage potential of seeds of yellow passion fruit. *Journal Seed Science*, Londrina, v.41, n. 3, p.367-374, 2019.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES Jr, F.T.; GENEVE, R.L. Techniques of propagation by seed. *Plant propagation, principles and practices* 7th edition. New Jersey: Prentice Hall, 2002, 249-274p.

HEJAZI, Z.; SADAT, M.; RAGHIB, M.; ZERAK, A.; FITRAT, K. Effect of Different Concentrations of GA₃, H₂O₂ and Bleach Solutions on Seed



Germination of Guava (*Psidium guajava* L). International Journal of Chemical Studies, New Delhi, v.6, n.5, p.2679-2681, 2018.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). International Rules for Seed Testing. 1st ed. Switzerland: International Seed Testing Association, 2013, 284p.

ICONTEC, Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Frutas frescas; granadilla. NTC 4101. Bogotá: ICONTEC, 1997. 20p.

JESUS, V.A.M.D.; ARAÚJO, E.F.; NEVES, A.A.; SANTOS, F.L.; DIAS, L.A.D.S.; SILVA, R.F.D. Ratio of seeds and sodium hypochlorite solution on the germination process of papaya seeds. Journal of Seed Science, Londrina, v.38, n.1, p.57-61, 2016.

LARIGUET, P.; RANOCHA, P.; DE MEYER, M.; BARBIER, O.; PENEL, C.; DUNAND, C. Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in *Arabidopsis*. Planta, Germany, v.238, n.2, p.381-395, 2013.

MABUNDZA, R.M.; WAHOME, P.K.; MASARIRAMBI, M.T. Effects of different pre-germination treatment methods on the germination of passion (*Passiflora edulis*) seeds. Journal of Agriculture and Social Sciences, Faisalabad, v.6, n.1, p.57-60, 2010.

MAROSTEGA, T.N.; LUZ, P.B.; TAVARES, A.R.; NEVES, L.G.; SOBRINHO, S.P. Methods of breaking seed dormancy for ornamental passion fruit species. Ornamental Horticulture, Campinas, v.23, n.1, p.72-78, 2017.

MATILLA, A.J. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. In: J. AZCÓN-BIETO AND M. TALÓN. Fundamentos de Fisiología Vegetal. (Eds.), Barcelona: McGraw-Hill-InterAmerican, 2008. p.537-558.

NANDI, M.; PERVEZ, Z.; ALAM, M.S.; ISLAM, M.S.; MAHMUD, M.R. Effect of Hydrogen Peroxide Treatment on Health and Quality of Chilli Seed. International Journal of Plant Pathology, Malaysia, v.8, n.1, 8-13, 2017.

NONOGAKI, H. Seed biology updates - Highlights and new discoveries in seed dormancy and germination research. Frontiers in Plant Science, Switzerland, v.8, n.524, p.1-16, 2017.

ORJUELA, B.N.M.; CAMPOS, A.S.; SÁNCHEZ, N.; MELGAREJO, L.M.; HERNÁNDEZ, M.S. Propuesta de Norma Técnica Colombiana, Frutas Frescas, Gulupa, Especificaciones. In: L.M. Melgarejo and M.S. Hernández (Eds.), Poscosecha de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2011, 14p.

PÁDUA, J.G. Germination of *Passiflora setacea* seeds and storage induced dormancy. Revista Brasileira de Sementes, Brasilia, v.33, n.1, p.80-85, 2011.



RAMÍREZ, J.G.; MUÑOZ, M.; OSORNO, L.; OSORIO, N.W.; MORALES, J.G. Germination and growth of purple passion fruit seedlings under pre-germination treatments and mycorrhizal inoculation. *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, Brasilia, v.45, n.3, p.257-265, 2015.

RANAL, M.A.; SANTANA, D.G.D. How and why to measure the germination process?. *Brazilian Journal of Botany*, Brazil, v.29, n.1, p.1-11, 2006.

SASAKI, K.; KISHITANI, S.; ABE, F.; SATO, T. Promotion of seedling growth of seeds of rice (*Oryza sativa* L. cv. *Hitomebore*) by treatment with H₂O₂ before sowing. *Plant production science*, Nagoya, v.8, v.5, p.509-514, 2005.

SILVA, G.C.; BOTTOLI, C.B.G. Analyses of *Passiflora* Compounds by Chromatographic and Electrophoretic Techniques, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, London, v.45, n.1, p.76-95, 2014.

SILVA, R. M.; AGUIAR, A.V.M.; GARCIA, K.G.V.; FALEIRO, F.G.; MENDONÇA, V.; CARDOSO, E. Germination and interspecific grafting of passion fruit. *Comunicata Scientiae*, Brazil, v.9, n.3, p.531-534, 2018.

SZOPIŃSKA, D. Effects of hydrogen peroxide treatment on the germination, vigour and health of *Zinnia elegans* seeds. *Folia Horticulturae*, Krakow, v.26, n.1, p.19-29, 2014.

THOMPSON, P.A. Characterization of the germination, response to temperature of species and ecotypes. *Nature*, London. v.225, n.1, p.827-831, 1970.

VÁSQUEZ, W.; PUPIALES, P.; VITERI, P.; SOTOMAYOR, A.; FEICAN, C.; CAMPAÑA, D.; VIERA, W. Escarificación química y aplicación de ácido giberélico para la germinación de semillas de cultivares de mora (*Rubus glaucus* benth). *Interciencia*, Santiago, v.44, n.3, p.161-166, 2019.

VELÁSQUEZ J.D.; MELGAREJO L.M.; STANISLAV M. Tratamientos pregerminativos en semillas de Gulupa *Passiflora edulis* Sims. In: Melgarejo, L.M. (Ed.). *Ecofisiología del cultivo de la gulupa (Passiflora edulis Sims)*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2012. p.84-89.


VISHAL, B.; KUMAR, P. P. Regulation of seed germination and abiotic stresses by gibberellins and abscisic acid. *Frontiers in plant science*, Switzerland, v.9, n.838, p.1-15, 2018.

WILLIS, C.G.; BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M.; AULD, J.R.; VENABLE, D.L.; CAVENDER-BARES, J.; DONOHUE, K.; RUBIO DE CASAS, R.; ... WILCZEK, A. The evolution of seed dormancy: Environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytologist*, Lancaster, v.203, n.1, p.300-309, 2014.



WOJTYLA, Ł.; LECHOWSKA, K.; KUBALA, S.; GARNCZARSKA, M. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Frontiers in plant science*, Switzerland, v.7, n.66, p.1-16, 2016.

Received: December 15, 2019; Accepted: March 05, 2020

 This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



CONCLUSIONES GENERALES

- La variabilidad genética encontrada de las especies de *Passifloras* evaluadas en este estudio amplia nuestro conocimiento sobre la base genética de las especies, ofreciendo así una oportunidad para su uso sostenible en programas de conservación y mejoramiento genético.
- Los ocho marcadores ISSR utilizados para la caracterización de la diversidad genética de los materiales passifloras procedentes del departamento de Boyacá, permitieron evaluar la diversidad genética entre los materiales colectados, siendo el primer TG el que mostró una mayor diferenciación genética entre los materiales con un FST de 0.47, lo cual permite inferir que podría utilizarse para estudios de diversidad genética en las passifloras.
- La alta variabilidad genética encontrada entre los materiales de passifloras cultivadas en el departamento de Boyacá, puede deberse a que son especies alogamas y autocompatibles, al intercambio de semillas entre agricultores, método predominante de propagación.
- Los tratamientos pregerminativos evaluados en este estudio indican que las semillas de gulupa pueden presentar una dormancia exógena que puede ser superada sumergiendo las semillas en una solución de peróxido de hidrogeno en concentraciones y tiempos determinados, obteniéndose altos porcentajes de germinación cercanos al 88%.



Anexos



A



B



C



D



E



F



G



H



I

Continuación anexo 1



J



K



L

Anexo 1. Especies de Passifloras spp evaluadas en las distintas zonas productoras. *Passiflora edulis* f. *edulis* –flor (A) y planta (B); *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* – Flor (C) y planta (D); *Passiflora ligularis* – Flor (E) y planta (F); *Passiflora tripartita* var *mollissima* – Flor (G) y planta (H): *Passiflora maliformis* - Flor (I) y planta (J); Injerto *Passiflora maliformis* x *Passiflora edulis* f. *edulis* (K); *Passiflora maliformis in vitro* (L).



A



B



C



D



E



F



G

ANEXO 2. Germinación en *P. edulis f. edulis*. Plantas madre de donde proceden los frutos (A); Frutos (B); Germinación de semillas – emergencia (C) y germinación epigea (E); plántulas (F); material vegetal trasplantado (G).