



Morfología y optimización de prueba de viabilidad en semillas de *Passiflora* spp. de Costa Rica¹

Morphology and viability test optimization in seeds of *Passiflora* spp. from Costa Rica

Elizabeth Vega-Corrales², Verónica Campos-Sánchez², Andrés Antonio Monge-Vargas²,
Sonia Bertsch-Hernández³, Ester Vargas-Ramírez²

¹ Recepción: 28 de junio, 2022. Aceptación: 13 de septiembre, 2022. Este trabajo forma parte del Trabajo Final de Graduación de la primera autora para optar por el título de Licenciada en Agronomía. Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

² Universidad de Costa Rica, Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, San Pedro, Montes de Oca, San José, Costa Rica. elizabeth.vegacorrales@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-4430-2700>), mariaveronica.campos@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-7555-2331>), andresantonio.monge@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-4596-5637>), ester.vargas15@ucr.ac.cr (autor para la correspondencia; <https://orcid.org/0000-0002-7651-1961>).

³ Mariposario Kekoldi, Tres Ríos, La Unión, Cartago, Costa Rica. bertschsonia@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0001-5109-5984>).

Resumen

Introducción. En Costa Rica existen 51 especies nativas de pasifloras que poseen potencial comercial por sus características fitoquímicas. En *Passiflora* las características seminales pueden ser utilizadas para clasificar sus especies a nivel taxonómico. La identificación del material vegetal y el desarrollo de metodologías que permitan conocer su calidad es esencial para la propagación, producción y conservación. **Objetivo.** Caracterizar las semillas de *Passiflora biflora* y *Passiflora adenopoda* con base en su morfología y optimizar el protocolo para la determinación de su viabilidad por medio de la prueba de tetrazolio. **Materiales y métodos.** La caracterización morfológica y los ensayos de viabilidad se realizaron en 2022, en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica. Se evaluaron doce caracteres morfológicos externos y se caracterizaron las estructuras internas de semillas de *P. biflora* y *P. adenopoda*. Para la optimización del protocolo de la prueba de tetrazolio se evaluó el efecto de dos tipos de corte (longitudinal y angular), dos concentraciones de sal de tetrazolio (0,5 % y 1 %), tres temperaturas (30, 35 y 40 °C) y cuatro tiempos de incubación (3, 6, 12 y 24 horas). **Resultados.** Los caracteres morfológicos evaluados permitieron clasificar las semillas como *P. biflora* y *P. adenopoda*. Al utilizar sal de tetrazolio al 1 %, un corte longitudinal, una temperatura de 40 °C y un tiempo de incubación de tres horas, se logró obtener un porcentaje de viabilidad similar (90 % en *P. biflora* y 91 % en *P. adenopoda*), y una tinción de la misma calidad, que el obtenido con el método internacional estandarizado. **Conclusiones.** Las características seminales evaluadas permitieron clasificar las semillas analizadas como *P. biflora* y *P. adenopoda*. Además, se logró optimizar el protocolo de la prueba de tetrazolio al disminuir el tiempo de incubación de 24 a 3 horas.

Palabras clave: prueba de tetrazolio, *Passiflora adenopoda*, *Passiflora biflora*.



Abstract

Introduction. In Costa Rica there are 51 native species of passion fruit plants that have commercial potential due to their phytochemical characteristics. In *Passiflora* the seminal characteristics can be used to taxonomically classify the genus species. The identification of plant material and the development of methodologies that enable quality assessment is essential for propagation, production, and conservation. **Objective.** To characterize *Passiflora biflora* and *Passiflora adenopoda* seeds based on their morphology and to optimize the protocol for determining their viability by means of the tetrazolium test. **Materials and methods.** Morphological characterization and viability trials were carried out in 2022, at the Centro de Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica. Twelve external morphological characters and the internal structures of *P. biflora* and *P. adenopoda* were characterized. For the optimization of the tetrazolium test protocol, the effect of two types of cutting (longitudinal and angular), two concentrations of tetrazolium salt (0.5 % and 1 %), three temperatures (30, 35, and 40 °C), and four incubation times (3, 6, 12, and 24 h) were assessed. **Results.** The morphological characters evaluated allowed the seeds to be classified as *P. biflora* and *P. adenopoda*. By using 1 % tetrazolium salt, a longitudinal cut, a temperature of 40 °C, and an incubation time of 3 h, similar viability percentage was obtained (90 % in *P. biflora* and 91 % in *P. adenopoda*), and a staining of the same quality, as that obtained with the international standardized method. **Conclusions.** The seminal characteristics assessed allowed the classification of the analyzed seeds as *P. biflora* and *P. adenopoda*. In addition, the tetrazolium test protocol was optimized by reducing the incubation time from 24 to 3 hours.

Keywords: tetrazolium test, *Passiflora adenopoda*, *Passiflora biflora*.

Introducción

La familia Passifloraceae posee alrededor de 630 especies que se encuentran distribuidas en dieciocho géneros (Miranda et al., 2009; Pérez-Cortéz et al., 2005), de los cuales *Passiflora* comprende al menos unas quinientas especies y la mayoría se encuentran en el continente americano (cerca del 96 %). Sin ser la excepción, Costa Rica cuenta con una amplia diversidad de especies de esta familia, en donde se ha reportado la presencia de 51 especies nativas (Estrada, 2009). Las especies pertenecientes a esta familia poseen un alto valor comercial por sus llamativas propiedades gastronómicas, farmacológicas y ornamentales (Sharan et al., 2011).

En los frutos de algunas de estas especies, se reporta un alto potencial nutraceutico, debido al contenido de fitoquímicos (Viera et al., 2022). Además, el contenido y la composición del aceite en sus semillas son una fuente de grasa vegetal de alta calidad para la industria (Carvalho de Santana et al., 2015). Estas especies también poseen un importante valor ecológico, relacionado con las heliconidas, que son un grupo de mariposas cuyas larvas se alimentan de plantas de este género. Esta relación ecológica es tan estrecha que es uno de los primeros modelos en ser utilizados para respaldar la teoría de la coevolución (de Castro et al., 2018).

Passiflora biflora Lam. y *Passiflora adenopoda* DC. tienen una distribución natural en el trópico de América, lo que incluye a Costa Rica. *P. biflora* pertenece al subgénero Decaloba y se puede encontrar desde los 0 hasta los 1700 m s.n.m. *P. adenopoda* también pertenece al subgénero Decaloba y su distribución geográfica va desde los 650 a los 1800 m s.n.m. (Estrada, 2009). Los principales compuestos reportados en especies del género *Passiflora* son flavonoides, glucósidos, alcaloides, compuestos fenólicos y constituyentes volátiles (Dhawan et al., 2004). En *P. biflora* se aislaron e identificaron seis flavonoides, dos de los cuales no habían sido identificados con anterioridad (McCormick & Mabry, 1983). En términos ecológicos y de conservación, *P. biflora* es una planta hospedera de al menos once especies de mariposas heliconidas: *Agraulis vanillae vanillae*, *Dione juno juno*, *Dryas iulia moderata*, *Dryadula phaetusa*, *Heliconius charithonia charithonia*, *Heliconius cydno galanthus*, *Heliconius cydno chioneus*,

Heliconius clysonymus montanus, *Heliconis erato petiverana*, *Heliconius hecale zuleika* y *Heliconius hecalesia formus* (Estrada, 2009), por lo que es valorada por los mariposarios costarricenses. *P. adenopoda* mantiene una relación estrecha con tres especies de mariposas heliconidas (*Dione moneta poeyii*, *Dryas iulia moderata* y *Heliconius charithonia charithonia*) y, en Costa Rica, está clasificada como una especie vulnerable, debido a su limitada distribución en el territorio (Estrada, 2009). Ambas especies se encuentran en estado silvestre, por lo que es importante desarrollar estrategias que permitan su conservación.

La semilla es el principal órgano de propagación de las plantas, por lo tanto, esta juega un papel trascendental en la renovación, persistencia y conservación de las especies, al mismo tiempo que es fuente de alimento para animales y es esencial para la producción agrícola (Doria, 2010). La caracterización de las semillas permite la clasificación taxonómica de las especies, por ejemplo, por medio de la cubierta seminal se pueden identificar familias, géneros y, en algunos casos, especies. Este es el caso de las semillas del género *Passiflora*, las cuales poseen características anatómicas que permiten su clasificación taxonómica hasta el nivel de especies (Pérez-Cortez et al., 2005). En Colombia encontraron que cultivares comerciales de *Passiflora edulis* Sims. presentaron semillas con un mayor número de concavidades y germinación superior que los cultivares locales (Rodríguez Castillo et al., 2020). También, al analizar siete especies del género *Passiflora* en Venezuela, se encontraron patrones morfológicos y anatómicos diferentes que permitieron a los autores hacer distinciones entre las especies, con base en sus características seminales (Pérez-Cortez et al., 2009).

En términos de propagación, producción agrícola y mejoramiento genético, es esencial conocer la calidad de las semillas de las que se dispone, ya que el uso de semillas de alta calidad es la base de una producción exitosa (de Barros França-Neto & Krzyzanowski, 2019). Esta calidad está determinada por diferentes factores, entre ellos la viabilidad, que se refiere al período en el que las semillas conservan la capacidad para germinar (Gutiérrez et al., 2011). La viabilidad es uno de los parámetros mediante los cuales se puede determinar la calidad fisiológica de un lote de semillas y estimar su porcentaje de germinación (Ubidia Peralta, 2021).

Uno de los métodos mediante los cuales se puede determinar la viabilidad es por medio de la prueba de tetrazolio (TZ). Esta prueba se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas que reducen la sal de tetrazolio en las partes vivas de la semilla y forman el compuesto conocido como trifenilformazan, que produce una coloración roja, la cual es indicativo de respiración y viabilidad del embrión (Salazar Mercado & Botello Delgado, 2018). La prueba de tetrazolio ha sido utilizada para la determinación de la viabilidad de las semillas de algunas especies de pasifloras, como lo son *Passiflora foetida* L. (Rangel Costa et al., 2016), *Passiflora elegans* Mast. (da Silva et al., 2019), *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg., *Passiflora ligularis* Juss. (Aguacía et al., 2015) y *Passiflora setacea* DC. (Gomes Pádua et al., 2011), sin embargo, no se encontraron reportes de su uso en semillas de *P. biflora* o *P. adenopoda*. Además, los protocolos son variables entre las diferentes especies, lo que hace indicar que para especies del género *Passiflora* se deben investigar protocolos específicos para un resultado certero.

Para la conservación y reproducción de las especies, tanto comerciales como silvestres, es de suma importancia contar con herramientas que permitan asegurar la identidad de las plantas con las que se trabaja (Byregowda et al., 2015). Además, para desarrollar estrategias de manejo y propagación de semillas, es necesario contar con metodologías que permitan conocer de forma confiable y eficiente características relacionadas con su calidad (McDonald, 1998). En *Passiflora*, la morfología de las semillas ha demostrado ser un método confiable para la caracterización de sus especies, sin embargo, hay poca información relacionada con las características seminales de especímenes nativos de Costa Rica. Con base en la amplia variabilidad existente en este género de plantas (Ocampo Pérez & Coppens d'Eeckenbrugge, 2017) y el potencial productivo e industrial de *P. biflora* y *P. adenopoda*, es que el objetivo de este trabajo fue caracterizar las semillas de *Passiflora biflora* y *Passiflora adenopoda* con base en su morfología y optimizar el protocolo para la determinación de su viabilidad por medio de la prueba de tetrazolio.

Materiales y métodos

Material vegetal

Esta investigación se realizó en el Laboratorio Oficial de Análisis de Calidad de Semillas del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica (San José, Costa Rica), entre los meses de marzo y abril del año 2022. La caracterización morfológica y los ensayos de viabilidad se realizaron con semillas de *P. adenopoda* y *P. biflora* almacenadas por un periodo de un año en cámara de almacenamiento a 7 °C y 60 % de humedad relativa.

Para obtener las semillas de ambas especies, se recolectaron frutos maduros frescos (Figura 1C y 1F), entre los meses de febrero y marzo del año 2021, en el mariposario Kekoldi ubicado en Tres Ríos de la Unión de Cartago, Costa Rica (9° 54' 44,60" N, 83° 59' 11,37" O). Los frutos maduros de *P. adenopoda* presentaron forma ovoide, color púrpura o morado uniforme, ancho de 3 a 4,5 cm y longitud de 3,2 a 4,9 cm. En *P. biflora* los frutos maduros eran de forma circular, con una coloración morada oscuro uniforme y midieron entre 1,5 y 2,5 cm de ancho y 1,8 a 2,5 cm de longitud.



Figura 1. Escala de maduración en frutos de *P. adenopoda* (A-C) y *P. biflora* (D-F). A y D: frutos inmaduros (verdes). B y E: grado de maduración intermedia. C y F: frutos maduros. Mariposario Kekoldi, Costa Rica, 2021.

Figure 1. Fruit ripening scale of *P. adenopoda* (A-C) and *P. biflora* (D-F). A y D: unripe fruits (green). B and E: intermediate maturation degree. C and F: ripe fruits. Kekoldi Butterfly Farm, Costa Rica, 2021.

Una vez obtenidos los frutos, se extrajeron las semillas, en promedio 128 por fruto de *P. adenopoda* y 50 por fruto de *P. biflora*. Luego, se les removió el arilo por medio de fermentación, según el protocolo descrito para *P. edulis* por Vargas et al. (2018), modificado con el aumento del tiempo de fermentación de 5 a 6 días a temperatura ambiente de laboratorio ($25,0 \pm 1,0$), debido a que pruebas preliminares indicaron que en *P. adenopoda* y *P. biflora*

este incremento de un día en la fermentación facilita la remoción del arilo. Las semillas se secaron a temperatura ambiente ($25,0 \pm 1,0$) de laboratorio durante cinco días sobre papel toalla. Una vez secas, el contenido de humedad de las semillas de *P. adenopoda* fue de $10,6 \pm 0,17$ % y de *P. biflora* de $7,6 \pm 0,3$ %.

Se realizó también una limpieza y selección de las semillas. Se seleccionaron las semillas llenas y con coloración café o café oscuro, esta selección se realizó con ayuda de un soplador de laboratorio (Baalbaki et al., 2012), se utilizó una calibración de 4 cm de apertura en *P. biflora* y de 6 cm en *P. adenopoda*, en ambos casos, el soplador se accionó por dos minutos.

Caracterización morfológica de la semilla

La caracterización morfológica de la semilla se realizó con base en la determinación del ancho en milímetros, grosor en milímetros (ambos medidos en la parte media de la semilla), largo en milímetros, la relación ancho-grosor, el tipo de margen, la forma de la base, la presencia o ausencia de apéndices en el ápice, la forma de la sección transversal media (forma en St) y la descripción de la ornamentación presente en la superficie (Pérez-Cortéz et al., 2002). Además, se determinó el peso de 1000 semillas en gramos, para lo cual se utilizaron semillas de *P. adenopoda* con un contenido de humedad de $10,6 \pm 0,17$ % y semillas de *P. biflora* con una humedad de $7,6 \pm 0,3$ %. Para esta caracterización se utilizaron treinta semillas por especie. Las mediciones de largo, ancho y grosor se realizaron con un Vernier digital. Los caracteres cualitativos se evaluaron mediante la observación visual de las semillas en un microscopio estereoscópico. Además, para la identificación de las estructuras, tanto internas como externas, se realizó un registro microfotográfico de las semillas embebidas en agua corriente (durante 24 horas). El peso de 1000 semillas se estimó con base en el peso de diez repeticiones de diez semillas por especie.

Protocolo base de la prueba de tetrazolio

Para determinar la viabilidad de las semillas de *P. adenopoda* y *P. biflora* y optimizar el protocolo de la prueba de tetrazolio, se utilizó como base la metodología establecida por la Association of Official Seed Analysts/ Society of Commercial Seed Technologists [AOSA/SCST] (2010) para especies del género *Passiflora*. Esta metodología consiste en colocar las semillas en un recipiente con agua a 20-25 °C por un periodo de 24 h (fase de preacondicionamiento de las semillas). Transcurrido este tiempo, las semillas fueron seccionadas a nivel longitudinal, de tal forma que se dejó la semilla intacta en el extremo distal para mantener ambas mitades juntas, los embriones que se extrajeron de estas semillas presentaron un corte en la parte radicular y en parte de los cotiledones (Figura 2 A-C). Una vez cortadas, se colocaron en una solución de tetrazolio (Cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio) al 1 % por 24 h a una temperatura de 35 °C. Una vez finalizado el periodo de tinción, se lavaron las semillas con agua destilada y se mantuvieron en el agua del último lavado hasta su evaluación.

Experimentos para la optimización del protocolo de la prueba de tetrazolio

Para optimizar el protocolo de la prueba de tetrazolio, se evaluó el efecto de modificar cuatro factores del protocolo base, los cuales fueron: el tiempo de inmersión en la solución de tetrazolio, el tipo de corte (Figura 2), la concentración de la solución de tetrazolio y la temperatura de la prueba. Para esto se realizaron cuatro experimentos, cada uno con cuatro repeticiones de veinticinco semillas cada una (100 semillas en total) por tratamiento.

Primero, se evaluó el efecto de modificar el tiempo de inmersión en la solución de tetrazolio sobre el porcentaje de viabilidad (Cuadro 1, experimento 1). La inmersión se realizó en 30 ml de solución y se evaluaron cuatro tratamientos de tiempos de inmersión: 3, 6, 12 y 24 h. Luego, se evaluaron dos factores más, el efecto del tipo de corte y de la concentración de tetrazolio sobre el porcentaje de viabilidad (Cuadro 1, experimento 2). En relación con el tipo de corte,

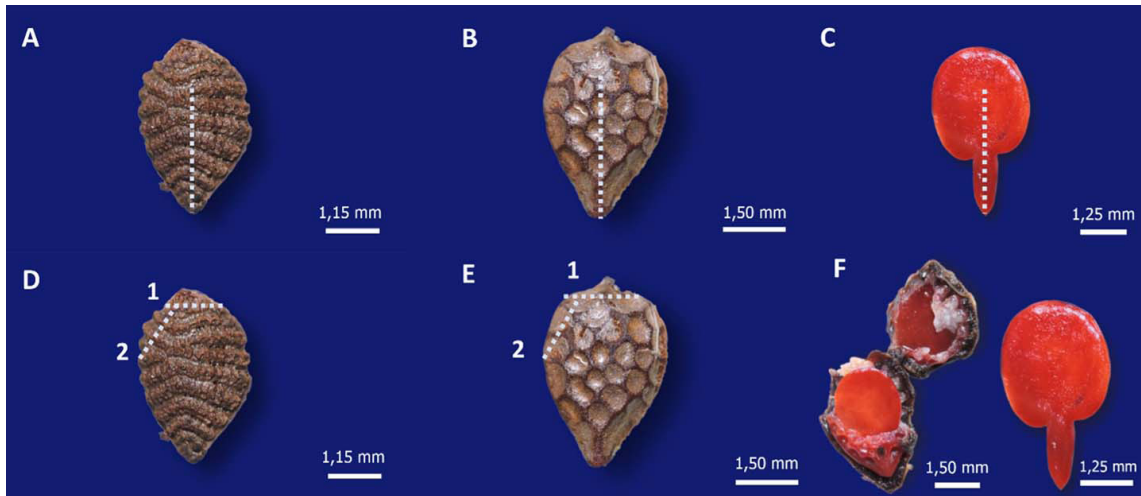


Figura 2. Cortes evaluados para la optimización del protocolo de la prueba de tetrazolio en semillas de *P. biflora* (A y D) y *P. adenopoda* (B y E). A y B: Corte longitudinal (AOSA/SCST (2010)). Los embriones que se extraen de estas semillas presentaron un corte en la parte radicular y en parte de los cotiledones (C). D y E: Eliminación del segmento distal antes de la imbibición (1), después de esta y antes de la tinción, se realizó un corte angular (2). Los embriones que se extraen de estas semillas se mantuvieron íntegros (F). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Figure 2. Cuts assessed for the optimization of the tetrazolium test protocol in *P. biflora* (A and D) and *P. adenopoda* (B and E) seeds. A and B: Longitudinal cut (AOSA/SCST (2010)). The embryos extracted from these seeds show a cut in the radicle part and part of the cotyledons (C). D and E: Elimination of the distal segment before imbibition (1), after imbibition, and before staining, an angular cut was made (2). The embryos extracted from these seeds remained intact (F). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Cuadro 1. Modificaciones evaluadas para la optimización del protocolo para la determinación de viabilidad por tetrazolio (TZ) en *P. biflora* y *P. adenopoda*. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Table 1. Changes assessed for the optimization of the protocol for the determination of viability by tetrazolium test (TZ) in *P. biflora* and *P. adenopoda*. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Experimento	Preacondicionamiento (h)	Temperatura (°C)	Tiempo inmersión (h)	Concentración TZ (%)	Corte
Protocolo estándar	16-24	30-35	24	1	Longitudinal
1	16	35	3, 6, 12, 24	1	Longitudinal
2	24	35	24	1	Longitudinal y angular
3	24	30, 35, 40	3	0,5	Longitudinal
4	24	40	3	0,5 y 1	Longitudinal

se evaluaron dos tratamientos: en el primero se utilizó el corte establecido en el protocolo base (corte longitudinal) y en el segundo, se realizó un corte antes de la fase de preacondicionamiento de la semilla (imbibición 24 h), se cortó el segmento distal. Luego, una vez transcurrido el preacondicionamiento, se realizó un corte angular (Figura 2 D-E). Una vez cortadas las semillas se colocaron en dos concentraciones de tetrazolio (tratamientos): 0,5 % y 1 %.

Se determinó también el efecto de la temperatura durante la inmersión en la solución de tetrazolio (Cuadro 1, experimento 3). El periodo de preacondicionamiento fue de 24 h a temperatura ambiente de laboratorio ($25,0 \pm 1,0$),

se realizó el corte utilizado en el protocolo base (longitudinal) y luego las semillas se colocaron en una solución de tetrazolio al 0,5 % durante 3 h en tres tratamientos de temperatura: 30 °C, 35 °C y 40 °C.

Se evaluó el efecto de la concentración de tetrazolio al utilizar una temperatura de 40 °C, el corte del protocolo base (longitudinal) y un periodo de inmersión de 3 h. Se evaluaron dos tratamientos: concentraciones de tetrazolio de 0,5 % y 1 % (Cuadro 1, experimento 4).

Una vez concluido el tiempo de incubación en cada uno de los experimentos, las semillas se retiraron de la solución de TZ, se lavaron y se mantuvieron en agua destilada durante el periodo de evaluación, para evitar su deshidratación. Luego, con la ayuda de una pinza, se extrajo el embrión de cada una de las semillas y se determinó el porcentaje de viabilidad.

Determinación de la viabilidad de las semillas de *P. adenopoda* y *P. biflora*

La evaluación de la viabilidad se realizó según los criterios establecidos por AOSA/SCST (2010) para semillas del género *Passiflora*. De esta forma, se consideró embrión viable aquel que presentó una coloración roja o rosa brillante, limpia y distribuida de forma uniforme. Los embriones que presentaron coloraciones blancas en el área de la radícula y en más del 50 % del área de los cotiledones o en su totalidad (cotiledones y radícula), se consideraron como embriones (semillas) no viables.

Análisis estadístico

Los datos de los experimentos 1 y 4, de ambas especies, fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) a un nivel de significancia del 95 % y una prueba post hoc de Tukey al 95 % de confianza. El tercer experimento de *P. biflora* también se analizó de esta forma.

El experimento 2 fue analizado mediante un ANDEVA bifactorial, mientras que, los datos de viabilidad de *P. adenopoda* del experimento 3 se analizaron mediante un ANDEVA no paramétrico Kruskal-Wallis. Además, se aplicó una prueba de comparaciones múltiples no paramétrica de Bonferroni con un 95 % de confianza para realizar la comparación de las medias. Todos los análisis fueron realizados en la interfaz RStudio (RStudio Team, 2021) del programa R (R Core Team, 2021).

Resultados

Caracterización morfológica de la semilla

Al caracterizar la morfología de las semillas de *P. biflora* y *P. adenopoda* se encontró que, dentro de la población estudiada de plantas de cada especie, hubo poca variación en el ancho, grosor, largo y peso de las semillas. A pesar de esto, se evidenció una mayor variación intraespecífica entre las semillas de las plantas analizadas de *P. biflora*. *P. adenopoda* mostró, en general, semillas de una mayor dimensión que *P. biflora*, sin embargo, ambas mantuvieron la misma relación ancho-grosor. La misma tendencia se observó en relación con el peso de las semillas, ya que *P. adenopoda* presentó más del doble de peso que *P. biflora* (Cuadro 2).

La forma de la sección transversal media (forma en St) en semillas de *P. biflora*, presentó una forma oval-rómbica (trulada), mientras que la forma St de *P. adenopoda* fue elíptica. Las semillas de ambas especies presentaron márgenes enteros, una base aguda y una coloración oscura (café). Al presentar una superficie reticulada, la coloración de la semilla de *P. adenopoda* no fue uniforme. Las aréolas (concauidades) presentaron una

Cuadro 2. Dimensiones y peso (promedio $\pm$ desviación estándar, CV: coeficiente de variación) de las semillas de *Passiflora biflora* y *Passiflora adenopoda*. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Table 2. *Passiflora biflora* and *Passiflora adenopoda* seeds dimensions and weight (mean $\pm$ standard deviation, CV: variation coefficient). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Especie	Ancho (mm)	CV	Grosor (mm)	CV	Largo (mm)	CV	Relación ancho-grosor	Peso 1000 semillas (g)	CV
<i>Passiflora biflora</i>	2,3 $\pm$ 0,32	14,09	1,2 $\pm$ 0,15	12,17	3,5 $\pm$ 0,38	10,89	2:1	4,78 $\pm$ 0,26	5,38
<i>Passiflora adenopoda</i>	3,0 $\pm$ 0,12	4,18	1,5 $\pm$ 0,09	6,13	4,6 $\pm$ 0,21	4,62	2:1	9,36 $\pm$ 0,45	4,75

tonalidad más clara. La superficie de la semilla de *P. biflora* también fue ornamentada, sin embargo, esta presentó costillas distanciadas y paralelas. En cuanto al ápice, *P. adenopoda* evidenció la presencia de una protuberancia sobresaliente o cuerno, mientras que en *P. biflora* no se encontró la presencia de esta estructura (Figura 3).

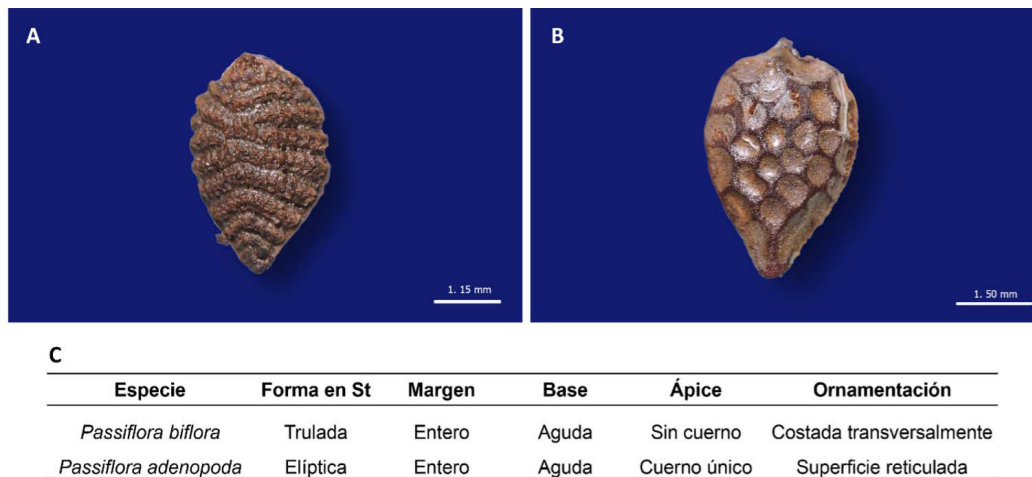


Figura 3. Caracterización morfológica externa (C) de las semillas de *Passiflora biflora* (A) y *Passiflora adenopoda* (B). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Figure 3. External morphological characterization (C) of *Passiflora biflora* (A) and *Passiflora adenopoda* (B) seeds. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

En las estructuras internas (Figura 4) de las semillas de ambas especies se encontró la presencia de un embrión que abarca la mayor parte de la semilla, con cotiledones prominentes, no obstante, también se observó la presencia de endosperma. En *P. biflora* se encontró una mayor cantidad de endosperma que en *P. adenopoda*, donde el embrión ocupa un mayor espacio. Ambas especies presentaron una testa de textura dura. En *P. biflora*, a pesar de que su estructura externa no evidenció la presencia de cuerno en el ápice, al analizar la parte interna de la semilla, sí se encontró la presencia de una protuberancia, sin embargo, se observó cubierta e integrada con el resto del margen de la semilla por la testa.

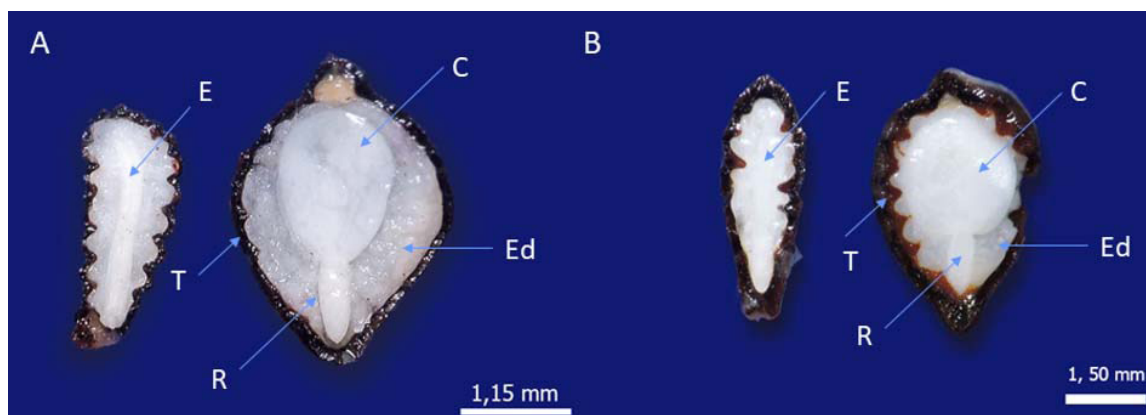


Figura 4. Estructuras internas de las semillas de *Passiflora biflora* (A) y *Passiflora adenopoda* (B). E: embrión, T: testa, R: radícula, C: cotiledones, Ed: endosperma. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Figure 4. Internal structures of *Passiflora biflora* (A) and *Passiflora adenopoda* (B) seeds. E: embryo, T: testa, R: radicle, C: cotyledons, Ed: endosperm. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Viabilidad y optimización del protocolo de la prueba de tetrazolio

La viabilidad de las semillas, aún después de un año de almacenamiento, fue alta, superior al 85 % (Cuadro 3). En el primer experimento realizado para la optimización del protocolo de la prueba de tetrazolio (Cuadro 3), se encontró que disminuir el tiempo de inmersión en la solución de tetrazolio no afectó la determinación de la viabilidad en ambas especies. Esto debido a que no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad obtenido entre los tiempos evaluados ($p > 0,05$), lo que permitiría disminuir el tiempo de inmersión a 3 h.

Cuadro 3. Viabilidad de las semillas de *Passiflora biflora* y *Passiflora adenopoda* obtenida al modificar el tiempo de inmersión en la solución de tetrazolio (experimento 1). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Table 3. *Passiflora biflora* and *Passiflora adenopoda* seeds viability obtained by modifying the immersion times in the tetrazolium solution (experiment 1). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Tratamiento Tiempo (h)	Viabilidad (%) ¹	
	<i>P. biflora</i>	<i>P. adenopoda</i>
3	88 a	86 a
6	94 a	87 a
12	85 a	86 a
24 (control)	87 a	93 a

¹No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos según un análisis de varianza (ANDEVA) a un nivel de significancia del 95 %, $n=4$ (*P. biflora* $p=0.403$; *P. adenopoda* $p=0.368$). / ¹No significant differences between treatments were detected according to an analysis of variance (ANDEVA) at a significance level of 95 %, $n=4$ (*P. biflora* $p=0.403$; *P. adenopoda* $p=0.368$).

Al modificar la concentración de tetrazolio de 1 % a 0,5 % y el tipo de corte, no se encontró una interacción entre estos dos factores y no se observaron diferencias en ninguna de las dos especies, en el porcentaje de viabilidad (Cuadro 4). Con respecto al tipo de corte, se evidenció que la metodología del corte angular no causó daños que

Cuadro 4. Viabilidad de las semillas de *Passiflora biflora* y *Passiflora adenopoda* obtenida al modificar la concentración de la solución de tetrazolio y el tipo de corte (experimento 2). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Table 4. *Passiflora biflora* and *Passiflora adenopoda* seeds viability obtained by modifying the concentration of the tetrazolium solution and the type of cut (experiment 2). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Tratamiento TZ (%)	Viabilidad (%) ¹		
	Corte	<i>P. biflora</i>	<i>P. adenopoda</i>
0,5	Angular	93 a	91 a
	Longitudinal	95 a	98 a
1	Angular	97 a	97 a
	Longitudinal (control)	95 a	93 a

¹No se detectaron diferencias significativas según un análisis de varianza (ANDEVA) bifactorial a un nivel de significancia del 95 %, n=4 (*P. biflora*: concentración p= 0,147, corte p= 1,000, concentración: corte p= 0,147; *P. adenopoda*: concentración p= 0,871, corte p= 0,628, concentración: corte p= 0,093). / ¹No significant differences were detected according to a bifactorial analysis of variance (ANOVA) at a significance level of 95 %, n=4 (*P. biflora*: concentration p= 0.147, cut p= 1.000, concentration:cut p= 0.147; *P. adenopoda*: concentration p= 0.871, cut p= 0.628, concentration: cut p= 0.093).

comprometieran la viabilidad de las semillas al retirar el embrión. Sin embargo, la extracción de los embriones a partir del corte angular es más difícil y laboriosa, por lo que se tarda más tiempo en obtener el resultado.

Para definir las condiciones de optimización del protocolo para *P. biflora* y *P. adenopoda*, con base en los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2, se evaluó si la temperatura tenía un efecto sobre la viabilidad al utilizar un corte longitudinal, una solución de tetrazolio al 0,5 % y un periodo de inmersión de 3 h. Los resultados obtenidos en el experimento 3 (Cuadro 5) evidenciaron que, en ambas especies, la temperatura utilizada afectó el porcentaje de viabilidad obtenido. Al utilizar las condiciones antes mencionadas, solo en la temperatura de 40 °C se obtuvo un porcentaje de viabilidad similar al que se determinó en el experimento 1 con el protocolo de referencia (superior al 85 %). En *P. adenopoda* al colocar la prueba en una temperatura de 35 °C el porcentaje de viabilidad fue mayor al 85 %, sin embargo, este fue significativamente menor a la viabilidad determinada al utilizar 40 °C.

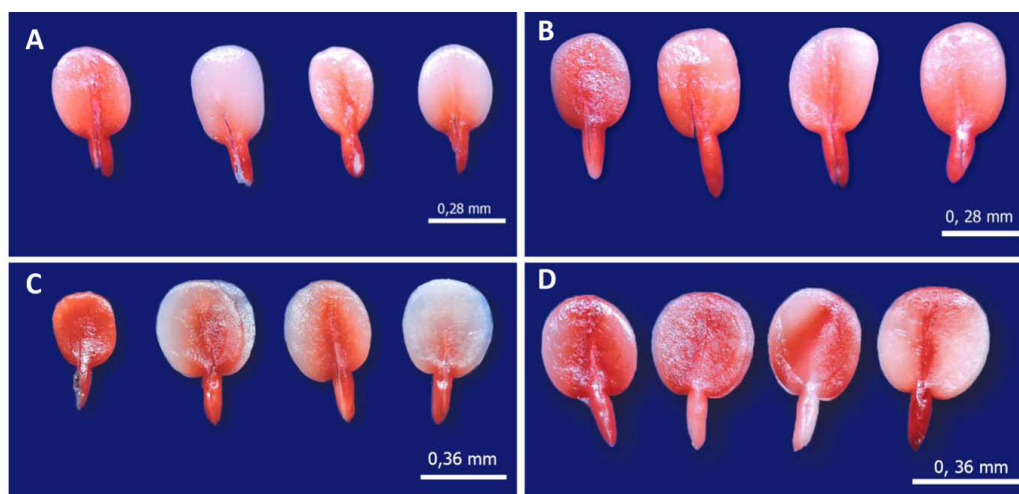
Cuadro 5. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de viabilidad determinado en semillas de *Passiflora biflora* y *Passiflora adenopoda* al utilizar una solución de tetrazolio a una concentración de 0,5 %, un corte longitudinal y un tiempo de inmersión de 3 h (experimento 3). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Table 5. Effect of temperature on the percentage of viability determined in *Passiflora biflora* and *Passiflora adenopoda* seeds when using a tetrazolium solution at a concentration of 0.5%, a longitudinal cut, and an immersion time of 3 hours (experiment 3). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

Tratamiento Temperatura (°C)	Viabilidad (%)	
	<i>P. biflora</i> ¹	<i>P. adenopoda</i> ²
30 °C	32 c	49 b
35 °C	69 b	89 b
40 °C	88 a	96 a

¹ Comparación de medias con una prueba Post-hoc de Tukey; valores dentro de una columna que no comparten una letra en común son significativamente diferentes con un p <0,05, n=4. ² Comparación de medias con una prueba de comparaciones múltiples no paramétrica de Bonferroni; valores dentro de una columna que no comparten una letra en común son significativamente diferentes con un p <0,05, n=4. / ¹ Means comparison with Tukey's post-hoc test; values within a column that do not share a common letter are significantly different at p <0.05, n=4. ² Means comparison with Bonferroni's non parametrical multiple comparisons test; values within a column that do not share a common letter are significantly different at p <0.05, n=4.

Los resultados de los experimentos 2 y 3 mostraron que la solución de tetrazolio al 0,5 % permitió la tinción del embrión en ambas especies estudiadas. Sin embargo, la tinción en estos dos experimentos no fue limpia y uniforme cuando el periodo de inmersión fue de 3 h y la temperatura de 40 °C. Debido a esto y en busca de optimizar la tinción, se evaluó una solución al 1 % por 3 h a 40 °C (experimento 4, Figura 5). Los resultados de esta prueba confirman los obtenidos en los experimentos anteriores, ya que, en términos de porcentaje de viabilidad, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de tetrazolio evaluadas, en ninguna de las dos especies estudiadas. En cuanto a la calidad de la tinción, se observó que al utilizar una solución de tetrazolio al 1% la tinción presentó una mayor uniformidad en la distribución del color que la concentración del 0,5 % (Figura 5).



Concentración (%)	Viabilidad (%) ¹	
	<i>P. biflora</i>	<i>P. adenopoda</i>
0,5	93 a	92 a
1	90 a	91 a

Figura 5. Efecto de la concentración de la solución de tetrazolio (A y C: 0,5 %; B y D: 1 %) sobre el porcentaje de viabilidad determinado en semillas de *Passiflora biflora* (A y B) y *Passiflora adenopoda* (C y D) al utilizar una temperatura de 40 °C, un corte longitudinal y un tiempo de inmersión de tres horas (experimento 4). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

¹No se detectaron diferencias significativas según el análisis de varianza (ANDEVA) a un nivel de significancia del 95 %, n=4 (*P. biflora* p= 0,387; *P. adenopoda* p= 0,750).

Figure 5. Effect of the concentration of the tetrazolium solution (A and C: 0.5%; B and D: 1%) on the percentage of viability determined in *Passiflora biflora* (A and B) and *Passiflora adenopoda* (C and D) seeds when using a temperature of 40 °C, a longitudinal cut, and an immersion time of 3 hours (experiment 4). Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Costa Rica, 2022.

¹No significant differences were detected according to the analysis of variance (ANOVA) at a significance level of 95 %, n=4 (*P. biflora* p= 0.387; *P. adenopoda* p= 0.750).

Discusión

La caracterización de un material vegetal es requerida para su adecuada identificación, propagación y conservación. Los marcadores morfológicos, que son características que se pueden distinguir a nivel visual, pueden ser utilizados como herramienta para la caracterización (Sattar Khan et al., 2015). En *Passiflora* las características morfológicas de las semillas han demostrado ser útiles para la clasificación taxonómica de sus especies (Fachi et al., 2019; Mezzonato-Pires et al., 2017; Torres et al., 2019).

Existen pocas investigaciones donde se ha estudiado la morfología de semillas de *P. biflora* y *P. adenopoda*. Las dimensiones y características morfológicas externas de la semilla de *P. biflora* descritas por Pérez-Cortéz et al. (2002) en semillas recolectadas en Venezuela, concuerdan con las evaluadas en este trabajo (Cuadro 2 y Figura 3). En cuanto a *P. adenopoda*, las características externas de las semillas recolectadas en este estudio (Figura 3) concuerdan con las descritas por MacDougal (1994) para semillas recolectadas en diferentes localidades de América tropical e identificadas como *P. adenopoda*. En Costa Rica, se describió la semilla de *P. adenopoda* como reticulada con dimensiones de 6 x 4 mm y las semillas de *P. biflora* como acostilladas con una dimensión entre 3-4 x 2,5-3 mm (Estrada, 2009). La caracterización externa coincide con la información obtenida en esta investigación para ambas especies, sin embargo, las dimensiones descritas por Estrada (2009) de la semilla de *P. adenopoda*, son mayores a las descritas en el Cuadro 2. Se ha encontrado que las dimensiones (largo, ancho y grosor) no son consideradas como caracteres de valor taxonómico, ya que pueden ser variables, por el contrario, la ornamentación de la superficie sí se considera un marcador morfológico con valor taxonómico (Pérez-Cortéz et al., 2002).

Se ha reportado que, en general, las semillas de este género presentan un endosperma blanquecino (Bonilla Morales et al., 2015) y un embrión grande con una radícula recta (MacDougal, 1994). Esta morfología también se encontró en *P. biflora* y *P. adenopoda* (Figura 4). La semilla de *P. adenopoda*, además de tener una mayor dimensión, presentó un embrión que ocupa un mayor espacio interno en comparación con el embrión de *P. biflora*.

En términos agrícolas, ecológicos y de conservación, las semillas juegan un papel fundamental, por lo que es determinante conocer su estado fisiológico, es decir, su capacidad para generar una nueva planta (Waterworth et al., 2015). Las semillas de *P. biflora* y *P. adenopoda* de este estudio, después de un año de almacenamiento, conservaron una alta viabilidad (Cuadro 3), lo que comprueba su comportamiento ortodoxo (Gutiérrez et al., 2011). Este comportamiento también fue reportado para semillas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. ligularis* y *P. edulis* f. *edulis* (Posada et al., 2014). Una forma rápida de determinar la viabilidad de las semillas es mediante la prueba de tetrazolio, la cual se ha optimizado para un importante número de especies (de Barros França-Neto & Krzyzanowski, 2022), sin embargo, no se encontraron reportes previos sobre el desarrollo de las condiciones adecuadas de esta prueba para *P. biflora* y *P. adenopoda*. Al utilizar la metodología estandarizada por AOSA/SCST (2010) para especies del género *Passiflora*, se encontró que es efectiva para determinar la viabilidad en ambas especies (Cuadro 3). No obstante, es necesario optimizar y actualizar las metodologías para hacer un uso más eficiente de los recursos y analizar un mayor número de muestras a un menor costo y tiempo (Carvalho da Silva et al., 2013), que fue lo que se buscó con este trabajo.

Para que la prueba se lleve de forma adecuada, la sal de tetrazolio debe penetrar los tejidos de la semilla para que pueda ser reducida en las células vivas y formar el trifenilformazán o formazán. Esta es una sustancia de color rojo, estable y no difusible, lo que permite identificar la viabilidad de cada uno de los tejidos que conforman la semilla (AOSA/SCST, 2010). Debido a la importancia que tiene una correcta penetración de los tejidos para una adecuada interpretación, es que se deben optimizar los factores que permiten el ingreso y el movimiento de la solución en los tejidos como lo son el corte, la concentración de la sal, la temperatura de incubación y el tiempo de inmersión, ya que estos pueden influenciar los resultados obtenidos (Carvalho et al., 2017). Para *P. biflora* y *P. adenopoda*, se encontró que los cortes evaluados no favorecieron una mejor tinción de los embriones (Cuadro 4).

A pesar de que el corte angular ayudó a mantener el embrión extraído de forma íntegra, el tiempo que consumió la extracción afectó la eficiencia del protocolo.

Se ha demostrado en algunos casos que temperaturas superiores a 30 °C permiten obtener tinciones adecuadas en menor tiempo (de Barros França-Neto et al., 2018). Sin embargo, también se ha encontrado un efecto sobre la tinción resultante de la concentración de la sal, el tiempo y la temperatura utilizados. En *P. foetida* la mejor tinción se obtuvo al utilizar 1 % de sal de tetrazolio a 30 °C por 2 h (Rangel Costa et al., 2016). En *P. elegans* se utilizó una concentración de sal de tetrazolio de 0,05 % a 36 °C por 24 h (da Silva et al., 2019). En *P. edulis* y *P. ligularis* se encontró una coloración uniforme y estable al utilizar una concentración de tetrazolio de 0,5 % a 32 °C por 24 h (Aguacía et al., 2015). Para *P. setacea*, se utilizó una concentración de sal de 0,75 %, a 30 °C por 24 h (Gomes Pádua et al., 2011). Estas investigaciones evidencian la variabilidad de respuestas que se presentan en torno a la metodología requerida para realizar el análisis de viabilidad por tetrazolio en las especies del género *Passiflora* y la necesidad de estandarizar protocolos para las especies de Costa Rica.

Conclusiones

En este trabajo fue posible optimizar las condiciones de la prueba de tetrazolio para las especies *P. biflora* y *P. adenopoda*, al disminuir el tiempo de duración de la prueba de 24 a 3 h. Esto al utilizar una concentración de solución de tetrazolio al 1 %, un corte longitudinal y una temperatura de 40 °C. Estas condiciones permitieron obtener una tinción uniforme de los tejidos igual a la que se obtiene a través del método internacional estandarizado, pero en menor tiempo, lo cual es importante en la actualidad, a nivel de laboratorio y empresarial para brindar un resultado expedito y confiable sobre la viabilidad de un lote de semillas.

La identidad taxonómica de las especies *P. biflora* y *P. adenopoda* fue corroborada mediante la caracterización morfológica ampliada de la descripción de propiedades seminales, las cuales se pueden utilizar para su identificación en futuros proyectos de investigación. Además, el protocolo de la prueba de tetrazolio optimizado en este trabajo permite determinar la viabilidad de la semilla de ambas especies en un período máximo de 3 h después del acondicionamiento de las semillas.

Referencias

- Aguacía, L. M., Miranda, D., & Carranza, C. (2015). Effect of fruit maturity stage and fermentation period on the germination of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) and sweet granadilla seeds (*Passiflora ligularis* Juss.). *Agronomía Colombiana*, 33(3), 305–314. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v33n3.52460>
- Association of Official Seed Analysts / Society of Commercial Seed Technologists. (2010). *Tetrazolium testing handbook* (2010 ed.). AOSA/SCST.
- Baalbaki, R. Z., McDonald, M. B., Copeland, L. O., & Elias, S. G. (2012). *Seed testing: principles and practices*. Michigan State University Press.
- Bonilla Morales, M. M., Aguirre Morales, A. C., & Agudelo Varela, O. M. (2015). Morfología de *Passiflora*: una guía para la descripción de sus especies. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 91–109. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/issue/view/124/84>

- Byregowda, M., Girish, G., Ramesh, S., Mahadevu, P., & Keerthi, C. M. (2015). Descriptors of Dolichos bean (*Lablab purpureus* L.). *Journal of Food Legumes*, 28(3), 203–214. <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:jfl&volume=28&issue=3&article=004>
- Carvalho, I. L., Meneghello, G. E., Tunes, L. M. D., Jácome, C. C., & Soares, V. N. (2017). Ajustes metodológicos para o teste de tetrazólio em sementes de arroz. *Journal of Seed Science*, 39(1), 41–49. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v39n1169643>
- Carvalho da Silva, R., de Souza Grzybowski, C. R., de Barros França-Neto, J., & Panobianco, M. (2013). Adaptação do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de girassol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(1), 105–113. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000100014>
- Carvalho de Santana, F., Branco Shinagawa, F., Da Silva Araujo, E., Costa, A. M., & Mancini-Filho, J. (2015). Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Brazilian *Passiflora* Seed Oils. *Journal of Food Science*, 80(12), C2647–C2654. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13102>
- da Silva, A. L., Hilst, P. C., Fernandes dos Santos Dias, D. C., & Rogalski, M. (2019). Overcoming dormancy of *Passiflora elegans* Mast. (Passifloraceae) seeds. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 14(3), 406–411. <https://doi.org/10.18378/rvads.v14i3.6552>
- de Barros França-Neto, J., & Krzyzanowski, F. C. (2018). *Metodologia do teste de tetrazólio em semente de soja* (Documentos 406). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Soja. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/193315/1/Doc-406-OL.pdf>
- de Barros França-Neto, J., & Krzyzanowski, F. C. (2019). Tetrazolium: an important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science*, 41(3), 359–366. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n3223104>
- de Barros França-Neto, J., & Krzyzanowski, F. C. (2022). Invited Review: Use of the tetrazolium test for estimating the physiological quality of seeds. *Seed Science and Technology*, 50(1–2), 1–2. <https://doi.org/10.15258/sst.2022.50.1.s.03>
- de Castro, E. C., Zagrobelny, M., Cardoso, M. Z., & Bak, S. (2018). The arms race between heliconiine butterflies and *Passiflora* plants—new insights on an ancient subject. *Biological Reviews*, 93(1), 555–573. <https://doi.org/10.1111/brv.12357>
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). *Passiflora*: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74–85. <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/125>
- Estrada, A. (2009). *Flores de la pasión de Costa Rica: Historia natural e identificación* (1ª ed.). Instituto Nacional de Biodiversidad.
- Fachi, L. R., Krause, W., Vieira, H. D., Araújo, D. V., Luz, P. B., & Viana, A. P. (2019). Digital image analysis to quantify genetic divergence in passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds. *Genetics and Molecular Research*, 18(3), Article gmr18331. <https://bit.ly/3RTedO0>
- Gomes Pádua, J., Castelo Schwingel, L., Caldas Mundim, R., Nassif Salomão, A., & Barrios Roverijosé, S. C. (2011). Germinação de sementes de *Passiflora* setacea e dormência induzida pelo armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 33(1), 80–85. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222011000100009>

- Gutiérrez, M. I., Miranda, D., & Cárdenas-Hernández, J. F. (2011). Efecto de tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y cholupa (*Passiflora maliformis* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 209–219. <http://doi.org/10.17584/rcch.2011v5i2.1268>
- McCormick, S., & Mabry, T. J. (1983). O-and C-glycosylflavones from *Passiflora biflora*. *Phytochemistry*, 22(3), 798–799. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86996-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86996-4)
- McDonald, M. (1998). Seed quality assessment. *Seed Science Research*, 8(2), 265–276. <https://doi.org/10.1017/S0960258500004165>
- MacDougal, J. M. (1994). *Revision of Passiflora subgenus Decaloba, section Pseudodysosmia (Passifloraceae)* (Vol. 41). American Society of Plant Taxonomists. <https://www.jstor.org/stable/pdf/25027834.pdf>
- Mezzonato-Pires, A. C., Ferreira Mendonça, C. B., Milward-De-Azevedo, M. A., & Gonçalves-Esteves, V. (2017). The taxonomic significance of seed morphology in the *Passiflora* subgenus *Astrophea* (Passifloraceae). *Acta Botanica Brasilica*, 31(1), 68–83. <https://doi.org/10.1590/0102-33062016abb0414>
- Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Magnitskiy, S., Casierra, F., Piedrahíta, W., & Flórez, L. (2009). *Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba* (1ª ed.). Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.
- Ocampo Pérez, J., & Coppens d'Eeckenbrugge, G. (2017). Morphological characterization in the genus *Passiflora* L.: An approach to understanding its complex variability. *Plant Systematics and Evolution*, 303, 531–558. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1390-2>
- Pérez-Cortéz, S., Escala, M., & Tillett, S. (2005). Anatomía de la cubierta seminal de ocho especies de *Passiflora* L. subgénero *Passiflora*. *Acta Botanica Venezuelica*, 28(2), 337–348. http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_abv/article/view/758
- Peréz-Cortéz, S., Escala, M., & Tillett, S. (2009). Morfoanatomía de la cubierta seminal en siete especies de *Passiflora* L., subgénero *Passiflora* (Passifloraceae). *Hoehnea*, 36(1), 131–137. <https://doi.org/10.1590/S2236-89062009000100007>
- Pérez-Cortéz, S., Tillett, S., & Escala, M. (2002). Estudio morfológico de la semilla de 51 especies del género *Passiflora* L. *Acta Botanica Venezuelica*, 25(1), 67–96. http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_abv/article/view/714
- Posada, P., Ocampo, J., & Santos, L. G. (2014). Estudio del comportamiento fisiológico de la semilla de tres especies cultivadas de *Passiflora* L. (Passifloraceae) como una contribución para la conservación *ex situ*. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(1), 9–19. <https://doi.org/10.17584/rcch.2014v8i1.2796>
- R Core Team (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rangel Costa, P., Bestete de Oliveira, J. P., Alves de Araújo, A. G., Lopes, J. C., Romais Schmildt, E., Campos Otoni, W., & Sobreira Alexandre, R. (2016). Morphometry, 'in vitro-ex vitro' germination and tetrazolium testing of stinking passionflower [*Passiflora foetida* var. 'glaziovii' Killip] (Passifloraceae) seeds. *Australian Journal of Crop Science*, 10(8), 1075–1082. <https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.08.p7175>
- RStudio Team. (2021). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio. <http://www.rstudio.com>
- Rodríguez Castillo, N., Melgarejo, L. M., & Wohlgemuth B. M. (2020). Seed Structural Variability and Germination Capacity in *Passiflora edulis* Sims f. *edulis*. *Frontiers in Plant Science*, 11, Article 498. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00498>

- Salazar Mercado, S. A., & Botello Delgado, E. A. (2018). Viabilidad de semillas de *Glycine max* (L.) utilizando la prueba de tetrazolio. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(2), 89–98. <https://bit.ly/3V2ZMZx>
- Sattar Khan, A., Ali, S., & Ahmad Khan, I. (2015). Morphological and molecular characterization and evaluation of mango germplasm: An overview. *Scientia Horticulturae*, 194, 353–366. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.031>
- Sharan, S., Soni, H., Mishra, K., & Kumar, A. (2011). Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. *International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology*, 1(1), 1–16.
- Torres, G. X., Viana, A. P., Duarte Viera, H., Lima Rodrigues, D., & Oliveira dos Santos, V. (2019). Contribution of seed traits to the genetic diversity of a segregating population of *Passiflora* spp. *Chilean journal of agricultural research*, 79(2), 288–295. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000200288>
- Ubidia Peralta, J. I. (2021). *Evaluación de dos tipos de escarificación para incrementar el porcentaje de germinación de gulupa (Passiflora edulis sims F. edulis), badea (Passiflora quadrangularis) y taxo (Passiflora tarminiana) bajo invernadero* [Tesis de bachiller, Universidad San Francisco de Quito] Repositorio digital de la Universidad San Francisco de Quito. <https://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/10960>
- Vargas, A., Assis, A., Nadal, M., Schuch, M., & Tunes, V. (2018). Storage temperature effect on seed emergence and substrates during the initial development of yellow passion fruit. *Agronomy Science and Biotechnology*, 4(1), 22–27. <https://doi.org/10.33158/ASB.2018v4i1p22>
- Viera, W., Shinohara, T., Samaniego, I., Sanada, A., Terada, N., Ron, L., Suárez-Tapia, A., & Koshio, K. (2022). Phytochemical composition and antioxidant activity of *Passiflora* spp. germplasm grown in Ecuador. *Plants*, 11(3), Article 328. <https://doi.org/10.3390/plants11030328>
- Waterworth, W. M., Bray, C. M., & West, C. E. (2015). The importance of safeguarding genome integrity in germination and seed longevity. *Journal of Experimental Botany*, 66(12), 3549–3558. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv080>