

**EFFECTO DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *CASEARIA CORYMBOSA*  
SOBRE LA GERMINACION DE *PASSIFLORA EDULIS* VAR. *EDULIS***

DANIEL ANTONIO VILLAMIL MONTERO

TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
para optar al título de

BIOLOGO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
CARRERA DE BIOLOGÍA

Bogotá, D.C  
Junio de 2009

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N°13 de julio de 1946: "La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado".

**EFFECTO DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *CASEARIA CORYMBOSA*  
SOBRE LA GERMINACION DE *PASSIFLORA EDULIS* VAR. *EDULIS***

DANIEL ANTONIO VILLAMIL MONTERO

**APROBADO**

---

**Dra. INGRID SHULER, Ph.D**

Decana Académica

Facultad de Ciencias Básicas

---

**Dra. ANDREA FORERO MSc**

Directora carrera de Biología

Facultad de Ciencias Básicas

**A mi padre.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi madre por traerme al mundo en este maravilloso País.**

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos utilizados en los ensayos de germinación.....	28
<b>Tabla 2.</b> Levene: resultados de la prueba estadística en R 2.8.1.....	37
<b>Tabla 3.</b> ANAVA: resultados de la prueba estadística en R 2.8.1.....	37
<b>Tabla 4.</b> LSD: resultados de la prueba estadística en R 2.8.1.....	38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Casearia corymbosa</i> en fructificación.....	16
<b>Figura 2.</b> Acido giberélico (GA3). Tomado de Life The science of Biology.....	18
<b>Figuras 3.</b> Morfología de las semillas de <i>P. edulis</i> var <i>edulis</i> Tamaño 2mm: (a) Externa testa lignificada y (b) Interna, endospermo ondulado.....	21
<b>Figura 4.</b> Obtención de la fracción giberélica por fraccionamiento fitoquímico.....	27
<b>Figura 5.</b> Distribución los tratamientos.....	29
<b>Figura 6.</b> Prueba de Tetrazolio en semilla dormante o poco viable de Gulupa.....	30
<b>Figura 7.</b> Prueba de tetrazolium en semilla viable de Gulupa.....	33
<b>Figura 8.</b> Patrón de coloración de los embriones de Gulupa al inicio del ensayo.....	34
<b>Figura 9.</b> Resultado de la germinación en Campo.....	34
<b>Figura 10.</b> Promedio y desviación estándar de germinación en cada tratamiento durante el transcurso del ensayo <i>in vitro</i> .....	36
<b>Figura 11.</b> Promedios de germinacion en las repeticiones de cada tratamiento e identificacion de los grupos según el resultado de la prueba de LSD.....	39
<b>Figura 12.</b> Germinación obtenida en los mejores tratamientos: (a) tratamiento G3 & (b) tratamiento S2.....	40
<b>Figura 13.</b> Prueba de tetrazolium con las semillas no germinadas al final del ensayo: (a) viabilidad de las semillas, (b) pérdida de viabilidad & (c) mortalidad.....	41

**Figura 14.** Viabilidad de las semillas almacenadas en seco a temperatura ambiente a los 100 días después de la colecta.....42

**Figura 15.** Cromatografía: izquierda, mancha fluorescente de la fracción giberélica; derecha, mancha fluorescente del patrón GA3 (derecha).....43

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AcOEt: Acetato de etilo.
- DDS: Días después de la siembra.
- EF: Extracto hojas frescas.
- ES: Extracto hojas secas.
- F1: EF 4mg/ml por 12 horas
- F2: EF 2mg/ml por 12 horas
- F3: EF 0.4mg/ml por 12 horas
- F4: EF 4mg/ml por 24 horas
- F5: EF 2mg/ml por 24 horas
- F6: EF 0.4mg/ml por 24 horas
- GAs: Giberelinas.
- GA3 : Ácido Giberélico.
- G1: GA3 1ml/ml por 5 horas.
- G2: GA3 1ml/ml por 12 horas.
- G3: GA3 1ml/ml por 24 horas.
- G%: Porcentaje de germinación.
- H1: H2O por 12 horas.
- H2: H2O por 24 horas.
- ISTA: International Seed Testing Association.
- PNN: Parque Natural Nacional.
- Rf: Factor de retención (cromatografía)
- S1: ES 5mg/ml por 12 horas
- S2: ES 2.5mg/ml 12 horas
- S3: ES 0.5mg/ml por 12 horas
- S4: ES 5mg/ml por 24 horas
- S5: ES 2.5mg/ml por 24 horas
- S6: ES 0.5mg/ml por 24 horas
- TLC: Thin layer chromatography (cromatografía en capa delgada).

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
2. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1. Las Giberelinas.....	17
2.2. Fitoquímica de <i>Casearia</i> .....	18
2.3. La Diversidad de <i>Passiflora</i> .....	19
2.3. Germinación en <i>Passiflora</i> .....	19
2.4. Anatomía de las Semillas de <i>Passiflora</i> .....	20
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	22
3.1. Formulación del problema.....	22
3.2. Pregunta de investigación.....	22
3.3. Justificación.....	22
3.3.1. Importancia de la investigación.....	22
3.3.2. Investigación en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>edulis</i> .....	23
3.3.3. Ventajas del Extracto de <i>C. corymbosa</i> .....	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1. Objetivo general.....	24
4.2. Objetivos específicos.....	24
5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. Diseño de la investigación.....	25
6.1.1. Población de estudio y lote de semillas.....	25
6.1.2. Variables del estudio.....	25
6.2. Métodos.....	26
6.2.1. Obtención del Extracto y la Fracción Giberélica.....	26
6.2.2. Pruebas de Germinación.....	27
6.2.2.1. Los tratamientos.....	27
6.2.2.3. Las semillas.....	28
6.2.2.4. Viabilidad de las semillas.....	29
6.2.2.5. Los ensayos.....	30
6.2.3. Cromatografía de capa delgada (TLC) para la detección de GA3.....	31
6.3. Recolección de la información.....	32
6.4. Análisis de la información.....	32
7. RESULTADOS.....	32

7.1. Viabilidad de las semillas.....	32
7.2. Ensayo de Campo.....	34
7.3. Ensayo <i>in vitro</i> . ....	35
7.4. Dormancia y pérdida de viabilidad. ....	41
7.5. Resultado de la Cromatografía.....	42
8. DISCUSIÓN.....	43
8.1. Variabilidad Intraespecífica & Germinación de <i>Passiflora</i> . ....	43
8.2. Pérdida de la Viabilidad & Ensayo de Campo.....	45
9. CONCLUSIONES. ....	45
9.1. El Conocimiento Tradicional. ....	45
9.2. Potencial del Extracto.....	46
9.3. Germinación en <i>Passiflora edulis</i> var. <i>edulis</i> .....	46
10. RECOMENDACIONES. ....	47
11. REFERENCIAS.....	47
12. ANEXOS.....	54

## RESUMEN

Basado en el conocimiento tradicional etnobotánico de comunidades campesinas del Tolima, se evaluó la actividad biológica del extracto acuoso de las hojas de *Casearia corymbosa* sobre la germinación de semillas de *Passiflora edulis* var. *edulis* (Gulupa). Paralelamente se comprobó por cromatografía de capa delgada (TLC) la presencia de ácido giberélico en la fracción giberélica (AcOEt-ácida) obtenida del extracto metanólico (80%). Se siguió el método tradicional para la obtención del extracto acuoso y el método de fraccionamiento fitoquímico con solventes orgánicos para la obtención de la fracción giberélica. El extracto acuoso fue diluido varias veces para preparar 12 tratamientos experimentales que fueron utilizados en dos ensayos de germinación (*in vitro* y en campo) y comparados con 3 tratamientos control (GA3) y 2 tratamientos control con agua destilada. Se trabajó con un lote de 2800 semillas maduras obtenidas de una planta seleccionada de Gulupa. Se realizó una prueba de tetrazolium para determinar la viabilidad de las semillas. Después se montó un ensayo en campo con 700 semillas usando un diseño en bloques de 7 tratamientos con 3 repeticiones y un ensayo *in vitro* con 1700 semillas usando un diseño completamente al azar (DCA) de 17 tratamientos con 5 repeticiones. El porcentaje de germinación (G%) se evaluó cada 10 días durante 70 días y los resultados se analizaron estadísticamente encontrando diferencias muy significativas con una prueba ANAVA. Se determinó con una prueba LSD, que los 2 mejores tratamientos no fueron diferentes entre sí, pero si fueron diferentes del resto de tratamientos. Los mejores resultados en el G% alcanzaron el 94% y 81% respectivamente. Los resultados sustentan la hipótesis de investigación la cual se relaciona con la presencia de giberelinas en las hojas de *C. corymbosa* que pueden ser tan efectivas como el GA3 en la promoción de la germinación. Adicionalmente, se realizó una prueba de tetrazolium al final del ensayo con las semillas que no presentaron germinación para determinar la pérdida de viabilidad.

### Palabras clave:

Etnobotánica, Fitoquímica, Giberelinas, Semillas, Gulupa.

## **ABSTRACT**

Based on traditional ethnobotanical knowledge of some rural communities from central Colombia, the biological activity of the leaf extract of *Casearia corymbosa* was evaluated on the germination of *Passiflora edulis* var. *edulis* seeds. Parallely, the presence of gibberellic acid, by thin layer chromatography (TLC) was confirmed in the gibberellic fraction (AcOEt-acid) obtained from the methanolic (80%) leaf extract. This gibberellic fraction was obtained by phytochemical fractionation method with organic solvents. Leaf extract was obtained by traditional water extraction and it was diluted several times to prepare 12 experimental treatments, which were compared with 3 GA<sub>3</sub> and 2 distilled water control treatments, in 2 germination tests (*in vitro* and field). 2800 matures seeds were used, collected from a selected plant of Passion fruit. A tetrazolium test was conducted at the beginning of essay to determine seed viability. Then, field essay was made with 700 seeds, using a Block design with 7 treatments and 3 replications; and *in vitro* assay with 1700 seeds was carried out, with DCA design, 17 treatments and 5 replications. The germination percentage (G %) was evaluated every 10 days during 70 days and the results were statistically analyzed with program R (2.8.1.). Highly significant differences between treatments were found by ANAVA, and the LSD test determined not differences between 2 best treatments, but they resulted to be different from the rest of treatments. Best germination obtained was of 94% and 81% respectively. The results support the research hypothesis, which is related to the presence of gibberellins in the leaf extract of *C. corymbosa*, and this can be as effective as GA<sub>3</sub> in promoting seed germination. Additionally, another tetrazolium test at the end of assay was realized with the seeds that not showed germination, to determinate loss of viability.

### **Key words:**

Ethnobotany, Phytochemistry, Gibberelins, Seeds, Passion Fruit.

## INTRODUCCIÓN

*Casearia corymbosa*. Kunth. (Figura 1) pertenece a la familia Flacourtiaceae y es una planta neotropical de amplia distribución. En Colombia se encuentra con facilidad en la región del Tequendama, entre las cordilleras Central y Oriental, en el Tolima y en el Huila. El género también aparece en el Cauca y en el Caribe. Comúnmente, se le conoce con el nombre de “ondequiera” o “dondequiera”, por la aparente capacidad de crecer en cualquier lugar. Rangel (1995) la reportó como dominante en un ecosistema del PNN de los Nevados aunque normalmente se le encuentra en pequeños parches de individuos a orillas de caminos y carreteras, creciendo como cerco vivo junto a herbáceas y arbustos (García-Barriga 1975, Rangel 1995).

Tradicionalmente, la planta “dondequiera” ha sido utilizada por campesinos del municipio de Venadillo (Tolima) para promover la germinación de los granos de maíz, empleados en la elaboración de chicha; envolviéndolos cuidadosamente en las hojas de *C. corymbosa* y dejándolos reposar en un lugar fresco. El fundamento de este conocimiento, producto de generaciones de consumidores de chicha, no se ha estudiado detenidamente y podría tener validez científica si se prueba metodológicamente (Acero en proceso).

La Gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) también conocida como “*Passiflora edulis* var. *edulis*”, “*Passiflora edulis* var. *purpurea*”, “Passion Fruit” o “Maracuyá Morado”, es una fruta neotropical perteneciente a la familia Passifloraceae. Su clasificación definitiva aún es un misterio botánico por la notable diversidad que ocurre en las pasifloras, particularmente en las especies cultivadas del género *Passiflora* y sus variedades e híbridos (Ocampo *et al.* 2004). La Fruta de la Pasión, se perfila en Colombia entre las 10 principales frutas de exportación, con un mercado creciente debido al fomento de su consumo en los países productores y al incremento en la demanda de sus flores y frutas en Europa y Norteamérica. La mayoría de las

pasifloras cultivadas, entre ellas la gulupa, se propagan por semilla, pero varios autores señalan que las pasifloras presentan semillas con germinación errática y una dormancia prolongada, que dificultan su propagación a escala comercial (Ramírez 2000, Ortega 2006).

Los ácidos giberélicos o giberelinas (GAs) son fitohormonas encargadas de varios procesos que resultan esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. La elongación de los tallos y el desarrollo de los frutos, son inducidos por la acción de giberelinas. Sin embargo, su función crítica está en el proceso germinativo de las semillas, al romper la dormancia del embrión y promover la germinación. Con el objetivo de responder si el extracto acuoso de las hojas de *C. corymbosa*, presenta una acción similar a la del Acido Giberélico (GA3) como promotor de la germinación, se evaluó el efecto del extracto en distintas concentraciones sobre semillas de *Passiflora edulis* var. *edulis* y se comparó con el efecto del GA3 comercial.



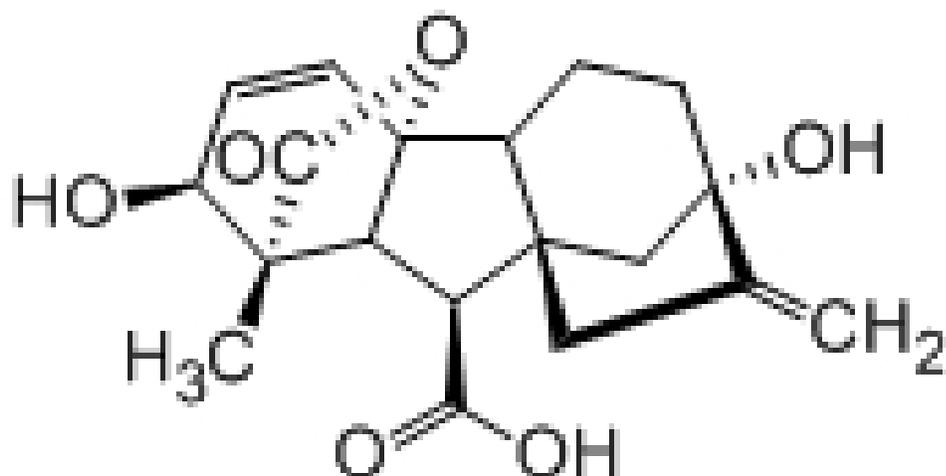
Foto: Daniel Villamil

**Figura 1.** *Casearia corymbosa* en fructificación (Viota-Cundinamarca).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Las Giberelinas.

Las GAs fueron descubiertas en Japón por Kurosawa en 1926, al analizar filtrados del hongo *Gibberella fujikuroi*. Su presencia en plantas superiores fue demostrada por Radley en 1956. En la actualidad se conocen las estructuras de aproximadamente 200 giberelinas diferentes y se acepta que son un constituyente normal de las plantas. Fisiológicamente juegan un papel fundamental en el ciclo de vida de los vegetales, principalmente en la germinación de las semillas. La giberelina mejor conocida y más empleada en el agro y la industria es el Acido Giberélico (GA<sub>3</sub>) (Figura 2). Esta hormona actúa en un proceso de activación enzimática, que rompe las moléculas de almacenamiento y estimula la transferencia de nutrientes desde los cotiledones o el endospermo a los meristemos, para la síntesis de nuevo material vegetal (Copeland & McDonald 1995). Muchas GAs presentes en hongos y plantas han sido identificadas y algunas se producen comercialmente, pues son empleadas en agronomía y biotecnología para promover procesos del desarrollo, como la maduración de flores y frutos, la elongación de meristemos y la germinación de semillas entre otros (Srivastava 2002, Sponsel & Hedden 2004). Extractos con giberelinas han sido descritos y analizados durante los últimos 50 años (Jones & Vaner 1967, Groot & Karssen 1987, Srivastava 2002, Sponsel & Hedden 2004) y se han diseñado diferentes bioensayos para evaluar la bioactividad de las giberelinas presentes en los extractos vegetales (Coombe & Cohen 1964, Jones & Vaner 1967, Ruddat *et al.* 1968). Se han realizado, por ejemplo, pruebas de germinación en donde se aplican directamente sobre las semillas, extractos vegetales para probar sus efectos alelopáticos en la germinación (Layne & Méndez 2006). También es común aplicar estos extractos sobre partes vegetativas de las plantas, para probar el efecto que tienen en la inducción de la floración o en el desarrollo de los meristemos aunque no todos presenta el mismo efecto o las mismas concentraciones (González *et al.* 2007).



**Figura 2.** Acido giberélico (GA3). Tomado de Life The science of Biology.

## 2.2. Fitoquímica de *Casearia*.

En algunos estudios fitoquímicos del género *Casearia* se encontraron y caracterizaron varios terpenoides (similares en estructura a las GAs) y otras sustancias como ligninas y cumarinas de interés para la ciencia por sus propiedades medicinales e industriales (Almeida *et al.* 1998, Kanokmedhakul *et al.* 2004, Gibbons *et al.* 1996, Oshima-Franco *et al.* 2005, Silva *et al.* 2008). Las GAs son un grupo de diterpenos ácidos tetracíclicos. Su biogénesis procede de la vía del kaurano (diterpeno hidrocarbon tetracíclico) y su concentración varía según el estado fenológico y el órgano de la planta. Generalmente las cantidades de GAs producidas por la mayoría de las plantas son de microgramos. (Dey & Harborne 1991, Azcon & Talon 2000). En *C. corymbosa* se encontró una familia entera de diterpenos (terpenoides) llamados corimbótidos que se caracterizan por tener un inusual anillo de carbono altamente oxidado y muy reactivo (Tong-Binc & Wiemer 1991).

### **2.3. La Diversidad de *Passiflora*.**

Colombia es el país con mayor número de pasifloras en el mundo, con 167 especies reportadas (58 endémicas), distribuidas desde el nivel del mar hasta los páramos (Ocampo *et al.* 2007). Muchas especies de *Passiflora* tienen importancia económica por la calidad nutricional y el sabor de sus frutos, las propiedades medicinales de sus flores (passiflorina) y su belleza como ornamentales. Las variedades del maracuyá (*P. edulis* var. *edulis* y *P. edulis* var. *flravicarpa*), la granadilla (*P. lingularis*) y la curuba (*P. mollissima*) son algunas de las pasifloras más importantes a nivel comercial, pero hay otras especies como *P. mariquitensis*, *P. rubra* o *P. magnifica*, que no tienen mercado pero son muy valiosas por su acervo genético y distribución restringida. (Escobar 1991, Ortega 2006, Ocampo *et al.* 2007).

### **2.3. Germinación en *Passiflora*.**

En Colombia el interés comercial por las semillas de *Passiflora* comenzó en la década de los 60s, con la introducción del maracuyá brasilero y los primeros trabajos del ICA sobre el manejo de su semilla. Desde entonces, en Colombia y en el Brasil se han realizado ensayos sobre la germinación de especies comerciales de *Passiflora*, buscando la manera de superar la dormancia de sus semillas y promover una germinación rápida y uniforme (Salazar 2000, Romero 2000, Zucareli *et al.* 2003, Ferreira 2005). En su trabajo sobre curuba, Jaramillo (1957) citado por Salazar (2000) menciona que las semillas germinan solo hasta las 14 o más semanas después de la siembra y concluye que la dormancia de estas semillas depende de factores hereditarios y ecológicos. Schoniger (1986) al estudiar la germinación y dormancia de semillas de 6 especies de *Passiflora* (incluyendo *P. edulis*), aplicando tratamientos químicos, mecánicos y combinados, encontró que los porcentajes de germinación fueron bajos y la dormancia variable. Cardozo (1988), también citado por Salazar (2000), trabajando la escarificación y la aplicación de GA3 en semillas de *P. mollissima*, concluyó que la testa actúa como controlador de la germinación al retrasar la absorción de agua; en contraste con el mismo Salazar (2000) quien afirma

al igual que Romero (2000) y Ferreira (2005), que la testa no influye directamente en la entrada del agua al interior de las semillas por su permeabilidad.

Los autores brasileiros se han enfocado principalmente en la aplicación de fitorreguladores como el GA3. Para esto han hecho estudios comparando diferentes concentraciones, formas de aplicación y en combinación con otros tratamientos pregerminativos con resultados variables y a veces contradictorios. La temperatura, luz, humedad, sustrato y otras variables ambientales también pueden incidir de manera significativa en la germinación, aunque esto no se han elucidado totalmente (Rossetto *et al.* 2000, Zucareli *et al.* 2003, Ferreira 2005).

Tanto en Colombia como en Brasil, los mejores resultados obtenidos en la germinación de *Passiflora* alcanzan porcentajes de germinación entre el 60% y el 90% al usar GA3 combinado con otras técnicas como la escarificación y la imbibición.

#### **2.4. Anatomía de las Semillas de *Passiflora*.**

Los frutos de *Passiflora*, poseen varias semillas adheridas a la pared del ovario, rodeadas por un arilo alrededor de la parte distal del rafe. Los pigmentos del arilo están localizados en los cloroplastos y las células de la sarcotesta de la pulpa forman el mucilago. Las pasifloras comunes presentan una testa generalmente lignificada (Figura 3a). La epidermis externa del tegmen consiste en células de parénquima en empalizada, prismáticas, lignificadas con paredes gruesas reticuladas, con depresiones en la superficie que forman proyecciones cónicas en el endospermo. La endotesta consiste en paredes gruesas, con células prismáticas, elongadas en las depresiones del tegmen y cuboides sobre los canales del mismo. El endospermo se observa ondulado, tanto en la sección longitudinal como en la trasversal (Figura 3b) (Romero 2000, Ortega 2006).



**a.**



**b.**

Fotos: Daniel Villamil

**Figuras 3.** Morfología de las semillas de *P. edulis* var *edulis*. Tamaño 2mm: (a) Externa, testa lignificada y (b) Interna, endospermo ondulado.

### **3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

#### **3.1. Formulación del problema.**

El conocimiento tradicional etnobotánico de comunidades campesinas del Tolima, sugiere que *C. corymbosa* puede presentar importantes concentraciones de promotores de la germinación (GAs) en sus partes vegetativas. El problema de investigación es la necesidad de desarrollar el método científico para probar de manera objetiva, la presencia y el efecto de las GAs de las hojas de *C. corymbosa*, sobre el desarrollo de semillas de *P. edulis* var. *edulis*.

#### **3.2. Pregunta de investigación.**

¿Presenta el extracto acuoso de las hojas de *C. corymbosa*, un efecto similar al del Acido Giberélico (GA<sub>3</sub>) sobre la germinación de semillas de *P. edulis* var. *edulis*?

#### **3.3. Justificación.**

##### **3.3.1. Importancia de la investigación.**

La riqueza de Colombia en términos de diversidad es enorme y mundialmente reconocida. En el Convenio de Diversidad Biológica firmado por Colombia se enmarca la diversidad bioquímica y metabólica, que hasta la fecha ha sido pobremente estudiada, poco valorada y escasamente aprovechada de manera sustentable. Según el Plan Nacional de Bioprospección la investigación en la búsqueda y el aprovechamiento sostenible de metabolitos novedosos es una prioridad nacional para contribuir con el desarrollo del país (Melgarejo 2003).

### **3.3.2. Investigación en *Passiflora edulis* var. *edulis*.**

En Colombia la superficie dedicada al cultivo de *P. edulis* varía entre 2,500 y 7,000 hectáreas y el 70% de la producción se exporta, dejando el 30% para el mercado interno. El rendimiento medio alcanza las 20 t/ha, marcando la punta mundial y su costo medio de producción en el ciclo de tres años es de US\$ 180/t. Actualmente la Gulupa ocupa el tercer renglón dentro de las frutas exportadas hacia el mercado europeo después del banano y la uchuva (Pinzón *et al.* 2007).

Los trabajos realizados en el tema de la germinación de *Passiflora edulis* var. *edulis* son escasos y sus resultados suelen ser contradictorios, producto de la inmensa diversidad inter e intra específica que existe en el género. La conclusión general es que la germinación errática y la dormancia prolongada de las semillas de *P. edulis* var. *edulis*, son factores que limitan su producción comercial. Con este trabajo se busca proponer un método efectivo y económico para promover la germinación de las semillas de *P. edulis* var. *edulis* utilizando un extracto vegetal novedoso.

### **3.3.3. Ventajas del Extracto de *C. corymbosa*.**

El valor comercial del GA3 (100g) oscila entre el \$1'000.000 y los \$2'000.000 de pesos colombianos. Esta condición es un factor limitante para la mayoría de los agricultores colombianos, que no cuentan con los recursos para poder acceder al GA3, afectando la producción de las especies con dormancia o de difícil germinación.

La elaboración de extractos vegetales es un proceso relativamente sencillo y económico que puede ser desarrollado prácticamente en cualquier lugar. Actualmente el uso de productos biológicos en el agro se ha fomentado mundialmente por la creciente necesidad de desarrollar una agricultura sustentable libre de agroquímicos y con miras en la certificación ecológica (Altieri 1999). De probarse la hipótesis de este trabajo, se podría empezar a trabajar en el desarrollo de una útil herramienta

agroecológica para mejorar la productividad y contribuir con el desarrollo agrícola de Colombia.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general.**

Evaluar el efecto promotor del extracto acuoso de las hojas de *C. corymbosa* sobre la germinación de *P. edulis* var. *edulis* y la presencia de ácido giberélico en la fracción giberélica (AcOEt-ácida) obtenida del extracto.

### **4.2 Objetivos específicos.**

-Obtener el extracto acuoso y la fracción giberélica de las hojas de *C. corymbosa*.

-Evaluar el efecto del extracto, sobre la germinación de semillas de *P. edulis* var. *edulis* sometidas a tratamientos experimentales y comparar los resultados con GA3 comercial.

-Determinar por cromatografía de capa fina (TLC) la presencia de GA3 en la fracción giberélica obtenida del extracto de las hojas de *C. corymbosa*.

## **5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN**

Las hojas de *C. corymbosa* presentan giberelinas capaces de promover la germinación de semillas de otras plantas. El extracto acuoso de las hojas de *C. corymbosa* tiene un efecto similar al del GA3 sobre la germinación de semillas de *P. edulis* var. *edulis*.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Diseño de la investigación.**

La investigación fue de tipo experimental, con un diseño completamente al azar (DCA). El factor de diseño fue la germinación y sus niveles: germinación de semillas con tratamientos experimentales (f1,f2,f3,f4,f5,f6,s1,s2,s3,s4,s5,s6) y germinación de semillas con tratamientos control (h1,h2,G1,G2,G3). La variable respuesta fue el porcentaje de germinación y la unidad experimental fueron las repeticiones de cada tratamiento.

#### **6.1.1. Población de estudio y lote de semillas.**

El material vegetal para la extracción fitoquímica (700g aprox.) se obtuvo de 2 individuos de *C. corymbosa* en el mismo estado fenológico y de la misma localidad.

El lote de semillas de *P. edulis* var. *edulis* fue de 2800 semillas obtenidas de 14 frutos cosechados de la misma planta el 20 de febrero de 2009.

#### **6.1.2. Variables del estudio.**

- A.** Concentración del extracto, medida en mg/ml.
- B.** Viabilidad de las semillas, medido en % de embriones teñidos con tetrazolium.
- C.** Tiempo de imbibición de las semillas, medido en horas.
- D.** Porcentaje de germinación, medido con el número de semillas eclosionadas por tratamiento.
- E.** Tiempo de germinación, medido en días desde la siembra hasta la germinación.
- F.** Factor de retención (Rf) en la cromatografía, medido en cm.

## **6.2. Métodos.**

### **6.2.1. Obtención del Extracto y la Fracción Giberélica.**

Se colectaron aproximadamente 700g (peso fresco) de hojas de 2 árboles de *C. corymbosa* en fructificación, que crecían juntos en un parche de unos cuantos individuos, a 2 km al oriente del municipio de Viotá (Cundinamarca-Colombia) siguiendo la margen derecha de la carretera que se dirige a Fusagasugá. En el Laboratorio de Investigación Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ) se limpiaron 350g de hojas frescas y se apartaron en refrigerador para la elaboración del extracto acuoso de hojas frescas (EF). El resto del material se seco al sol durante 3 días hasta que las hojas estuvieron crujientes. Del material seco se destinaron 100g para la obtención de la fracción giberélica y 120g para la obtención del extracto acuosos de hojas secas (ES). Se siguió el protocolo tradicional para la obtención los dos extractos acuoso (EF y ES).

Para la obtención de la fracción giberélica (Figura 4) se siguió el método de fraccionamiento fitoquímico con solventes orgánicos, como lo explica Dey & Harborne (1991):

Una vez deshidratados, molidos y pesados los 100g del material vegetal, fueron homogenizados con 1250ml de solución acuosa de metanol al 80%, durante 72 horas. Después de filtrar con embudo y papel filtro, el residuo fue re-extraído de la misma manera. Los extractos metanólicos combinados fueron evaporados bajo presión reducida con un rotavapor Butchi 2000, teniendo cuidado de mantener la temperatura por debajo de los 40°C. Esto llevó a un residuo acuoso, y en este punto los contaminantes no polares fueron removidos por medio del fraccionamiento con éter de petróleo, el cual fue recuperado con el rotavapor y reutilizado hasta eliminar la totalidad de las grasas solubles. Después del fraccionamiento con éter, la solución acuosa fue ajustada a pH 2.0 con HCl 0.1M y fraccionada varias veces con acetato de etilo hasta que el solvente paro de extraer. Esta fracción (AcOEt-ácida) se concentró

bajo presión reducida y se neutralizó con NaOH 0.1M hasta pH 6.5. El resultado final fue medido en mililitros y almacenado en un recipiente de cristal en cuarto oscuro. Según Dey & Harborne (1991), en esta fracción se encuentran la mayoría de las giberelinas, acompañadas de GAs-glucósidos conjugados.



Foto: Daniel Villamil

**Figura 4.** Obtención de la fracción giberélica por fraccionamiento fitoquímico.

## **6.2.2. Pruebas de Germinación.**

### **6.2.2.1. Los tratamientos.**

Una vez obtenidos los extractos, se prepararon 6 soluciones de diferentes concentraciones y a partir de ellas se elaboraron los tratamientos experimentales (Tabla 1 y Figura 5) que se aplicaron a las semillas por imbibición.

**Tabla 1.** Tratamientos utilizados en los ensayos de germinación.

	Tratamiento	Concentración.	
		Tiempo de imbibición	
<b>Extracto Hojas Frescas</b> <b>EF</b>	F1	12h	4mg/ml
	F2	12h	2mg/ml
	F3	12h	0.4mg/ml
	F4	24h	4mg/ml
	F5	24h	2mg/ml
	F6	24h	0.4mg/ml
<b>Extracto Hojas Secas</b> <b>ES</b>	S1	12h	5mg/ml
	S2	12h	2.5mg/ml
	S3	12h	0.5mg/ml
	S4	24h	5mg/ml
	S5	24h	2.5mg/ml
	S6	24h	0.5mg/ml
<b>GA3</b>	G1	5h	1ml/ml*
	G2	12h	1mg/ml
	G3	24h	1mg/ml
<b>H2O</b>	H1	12h	0ml/ml
	H2	24h	0mg/ml

\*Utilizado por Ferreira *et al.* 2005

### 6.2.2.3. Las semillas.

Se obtuvo un lote de 2800 semillas de Gulupa, de 14 frutos maduros de la misma planta, siguiendo el índice de madurez para frutos de Gulupa de Pinzón *et al.* (2007) y la metodología para la propagación por semilla de *Passiflora* de la American Horticultural Society (Toogood 1999). En cada ensayo se utilizaron 100 semillas por tratamiento, siguiendo la metodología de la Asociación Internacional para Ensayos de

Semillas (ISTA 2006). Las semillas fueron tratadas en el laboratorio de fisiología vegetal de la PUJ y se sembraron el 19 de marzo del 2009, 26 días después de ser colectadas.



**Foto:** Daniel Villamil.

**Figura 5.** Distribución los tratamientos.

#### **6.2.2.4. Viabilidad de las semillas.**

Se realizó una prueba de tetrazolium antes del montaje de los ensayos para comprobar la viabilidad de las semillas. Se usaron 100 semillas en 3 repeticiones (33, 33 y 34) las cuales fueron embebidas en agua por 24 horas. Posteriormente se cortaron a la mitad y se sumergieron en solución de tetrazolium al 0.1%. Según el protocolo de la ISTA (2006) y siguiendo a Ferreira *et al.* (2005). Los embriones total o parcialmente

teñidos se tomaron como viables mientras que los embriones blancos, sin teñir, se tomaron como no viables. Se elaboró un patrón de coloración registrando fotográficamente la tinción de los embriones. Al final del ensayo se realizó otra prueba de tetrazolium con las semillas de los tratamientos que no presentaron germinación (Figura 6), para determinar la mortalidad o la pérdida de vitalidad por efecto de los tratamientos, comparando los embriones de las semillas no germinadas con el patrón de viabilidad obtenido al inicio del ensayo y un nuevo patrón obtenido de semillas de la muestra almacenadas en seco.

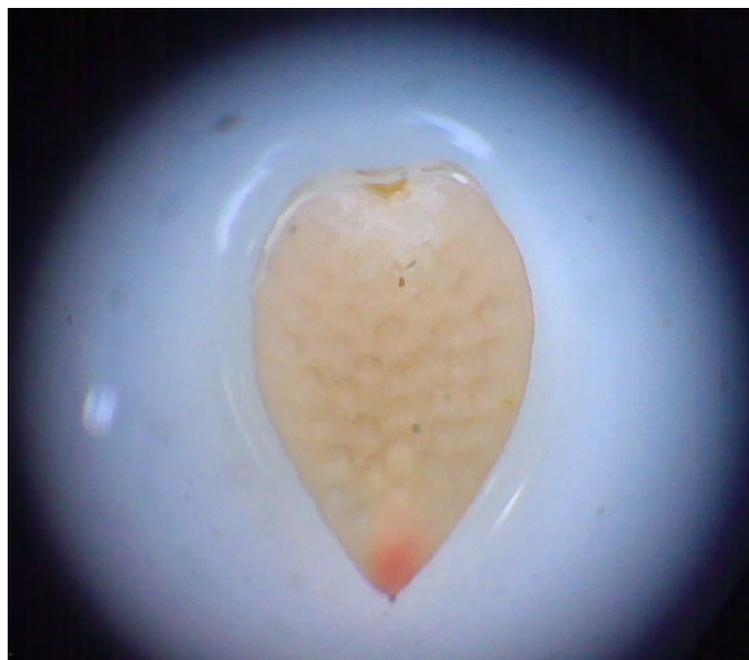


Foto: Daniel Villamil

**Figura 6.** Prueba de Tetrazolium en semilla dormante o poco viable de Gulupa.

#### **6.2.2.5. Los ensayos.**

Se realizaron 2 experimentos, uno en campo, en un lote experimental de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA), y otro *in vitro*, en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la PUJ. En el ensayo de campo se usaron 700

semillas, distribuidas en 3 bloques, de 7 tratamientos y 3 repeticiones cada una con 33 semillas.

En el ensayo *in vitro* se usaron 1700 semillas distribuidas en 17 tratamientos (Tabla 1) de 5 repeticiones usando 20 semillas por repetición. Cada repetición consistió en una caja de petri con una servilleta (Scott natural) humedecida con 10ml de agua destilada, donde se colocaron las 20 semillas después de ser embebidas en los respectivos tratamientos. Las cajas de petri se guardaron a temperatura ambiente ( $16^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ) en bandejas plásticas negras y se cubrieron con papel aluminio, el cual se perforó parcialmente con pequeños orificios para permitir que las semillas recibieran un poco de luz solar, lo que facilita su desarrollo según lo observado por Villamil *et al.* (2008). En cada tratamiento se aplicaron 10ml de agua destilada cada 20 días después de la siembra (dds) para prevenir la deshidratación. Finalmente las plántulas obtenidas se trasplantaron a bandejas de 38 unidades y fueron llevadas a invernadero.

### **6.2.3. Cromatografía de capa delgada (TLC) para la detección de GA3.**

Una vez obtenida la fracción giberélica, se realizó una cromatografía en capa delgada (TLC) para determinar la presencia de GA3 en la fracción, siguiendo las indicaciones de Bautista & Gallardo (2008). El cromatograma se realizó en placa de silica gel para detección de fluorescencia de 10 cm. X 4 cm. Se sembró en la placa 5 $\mu\text{l}$  de la fracción giberélica y 5 $\mu\text{l}$  de solución de GA3 (1g/ml) como control. La fase móvil fue Cloroformo: Acetato de Etilo: Acido Fórmico en proporción (35:55:10). Se dejó un frente de corrida de 6 cm y se retiró la placa de la cámara de TLC. Se dejó secar al ambiente y se revisó bajo luz UV de onda larga para verificar el movimiento de las muestras. Se reveló por aspersion con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  60% -  $\text{FeCl}_3$  28mM y se dejó secar en la cabina de extracción. Se volvió a realizar la lectura en luz UV de onda larga, se fotografió el resultado y se marcaron los puntos fluorescentes. Posteriormente se calentó en plancha a  $100^{\circ}\text{C}$  por 2 min y se midieron los Rf respectivos.

### **6.3. Recolección de la información.**

Las pruebas de tetrazolio y el resultado de la TLC se registraron fotográficamente y se anotó el número de embriones viables y el Rf de la cromatografía en la libreta de laboratorio. En los ensayos experimentales se definió la aparición de la radícula como el criterio para la germinación (ISTA 1999). Se revisaron las semillas 3 veces por semana y las lecturas se realizaron cada 10 días a partir del día en el cual se registró la primera semilla germinada. La información se registró en un formato prediseñado para la toma de datos (Anexo 1).

### **6.4. Análisis de la información.**

Con la información consignada en la libreta de laboratorio y en los formatos, se realizó una matriz de germinación en Excel (2007), para analizar los datos de germinación obtenidos en cada tratamiento. Posteriormente, la matriz fue analizada estadísticamente con el programa R.2.8.1 para determinar diferencias entre los tratamientos, aplicando las pruebas de Levene, Anava y LSD. La viabilidad y mortalidad de las semillas se analizó con base en los patrones de coloración obtenidos y en la observación de diferencias en el porcentaje de coloración de los embriones.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Viabilidad de las semillas.**

Según el patrón de coloración de tetrazolium obtenido antes del ensayo de germinación (Figuras 7 y 8), la viabilidad de las semillas fue del 99%. La mayoría de los embriones presentaron una tinción superior al 60% de su área total. Sólo un embrión se identificó como no viable. Las semillas tenían entonces 26 días de ser colectadas.



Foto: Daniel Villamil

**Figura 7.** Prueba de tetrazolium en semilla viable de Gulupa.

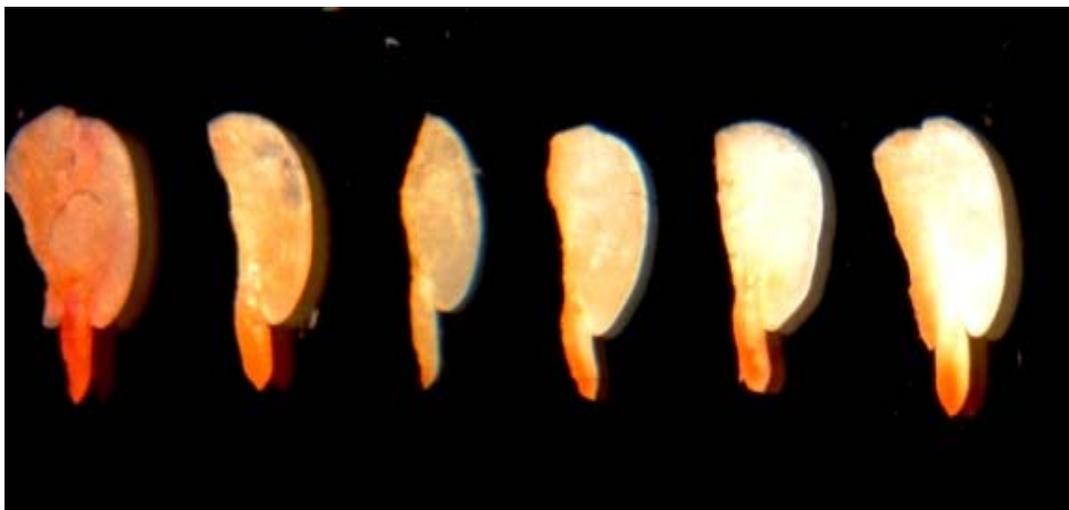


Foto: Daniel Villamil

**Figura 8.** Patrón de coloración de los embriones de Gulupa al inicio del ensayo.

## **7.2. Ensayo de Campo.**

Respecto a los resultados en campo (Figura 9), sólo germinó el 0.28% de las semillas sembradas, correspondiente a 2 semillas de los tratamientos F1 y G3 respectivamente. Por esta razón, el ensayo no se tuvo en cuenta para su análisis. Se utilizaron todos los tratamientos de EF y ES y el tratamiento control G3. La profundidad de siembra fue de 4 cm y la distancia entre semillas fue de 10 cm. El sustrato (arcilloso) fue el suelo típico de la sabana de Bogotá y la siembra coincidió con la temporada de lluvias.



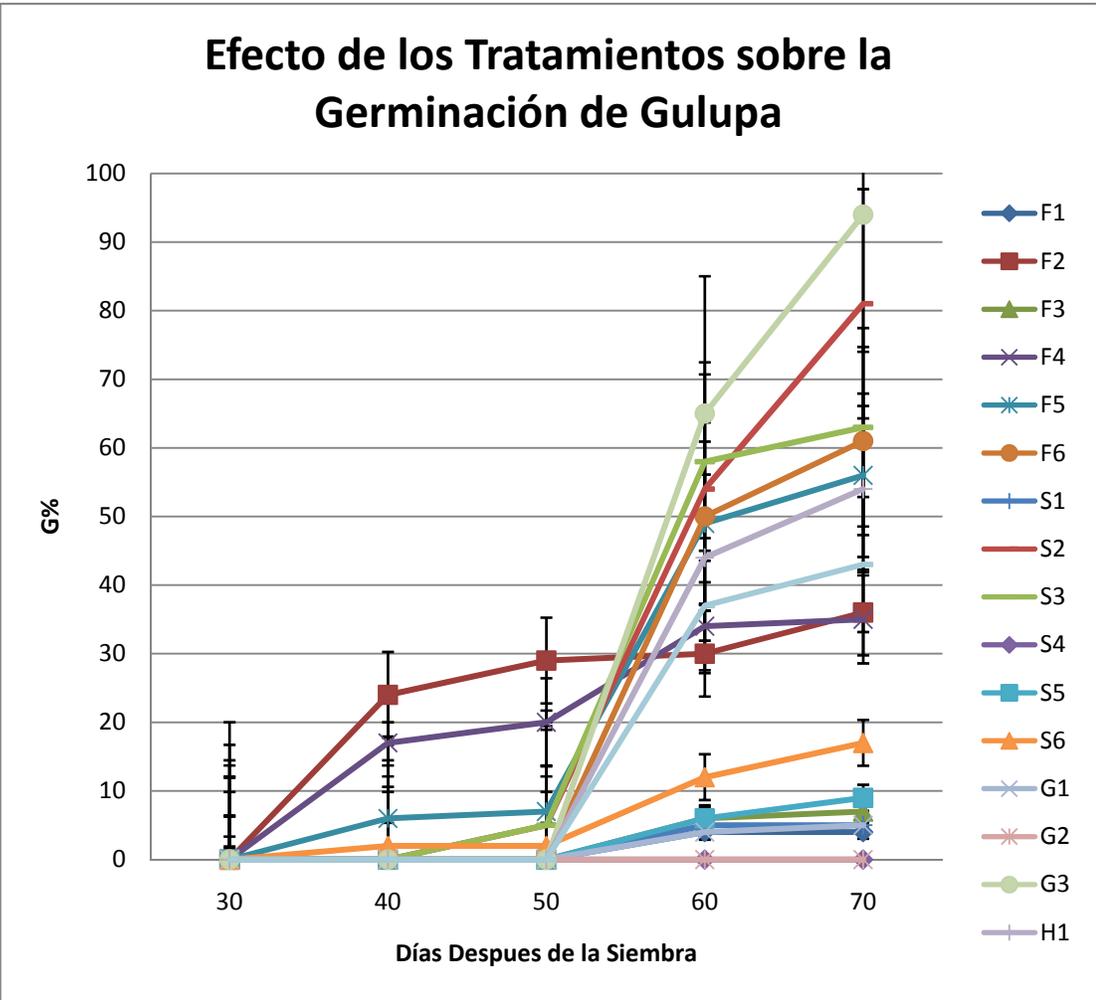
Foto: Daniel Villamil

**Figura 9.** Resultado de la germinación en Campo.

### 7.3. Ensayo *in vitro*.

En el ensayo *in vitro* se obtuvo una germinación total del 37.6%, correspondiente a 640 semillas repartidas en 15 tratamientos. En los tratamientos G2 y S4 no se registró germinación y las semillas fueron sometidas nuevamente a una prueba de tetrazolium para determinar la mortalidad y la pérdida de viabilidad. En los tratamientos F2 y F4 se obtuvieron las primeras semillas germinadas, con un promedio de 5 y 3 semillas por repetición, equivalentes al 24% y 17% a los 40 dds. Los mejores tratamientos fueron G3 y S2 (Figura 12) con un promedio de 18 y 16 semillas germinadas en cada repetición a los 70 dds, equivalentes al 94% y 81%, seguidos por los tratamientos S3 y F6 con poco más del 60% a los 70dds, y un promedio de 12 y 13 semillas germinadas por repetición. Los tratamientos F5, H1, H2, F2 y F4 presentaron germinación superior al 20% pero inferior al 60% a los 70dds; y los tratamientos S6, S5, F3, G1, F1 y S1 presentaron muy poca germinación (< 20%) con un promedio inferior a 5 semillas germinadas en cada repetición (Figura 10).

El análisis estadístico demostró que a los 70 dds los tratamientos son significativamente diferentes, con un resultado del ANAVA de  $P=2.2e-16 < 0.05\alpha$ . (Tabla 3). El resultado de la prueba de Leven fue  $P=0.1033 > 0.05\alpha$  (Tabla 2), validando el resultado del ANAVA. La prueba de LSD (4.129) concluyó que los mejores tratamientos (G3 y S2) no son significativamente diferentes entre sí, pero son significativamente diferentes del resto de los tratamientos a los 70 dds (Tabla 4).



**Figura 10.** Promedio y desviación estándar de germinación en cada tratamiento durante el transcurso del ensayo *in vitro*.

**Tabla 2.** Levene: resultados de la prueba estadística en R 2.8.1

Levene's Test for Homogeneity of Variance		
	Df	F value Pr(>F)
group	16	1.5644 0.1033
	68	

$P > \alpha$ , se aceptan los supuestos del modelo estadístico. Hay normalidad y homogeneidad de varianzas.

**Tabla 3.** ANAVA: resultados de la prueba estadística en R 2.8.1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ind	16	3223.3	201.5	18.817	< 2.2e-16 ***
Residuals	68	728.0	10.7		

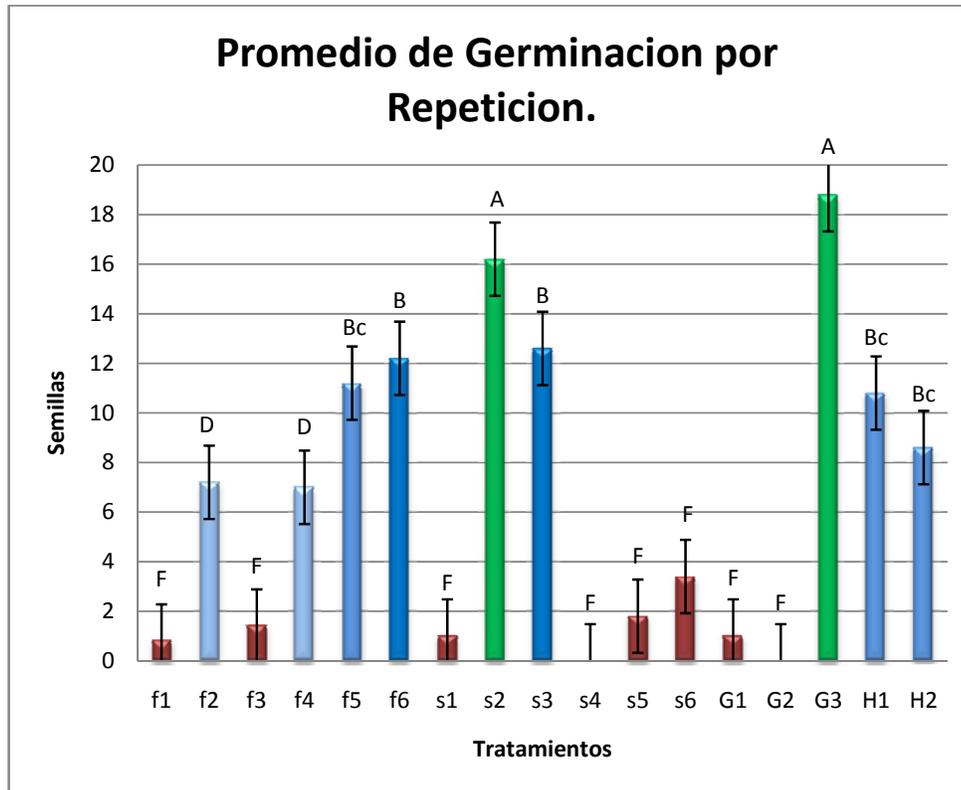
Signif. Codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

$P < \alpha$  Se rechaza la  $H_0$ . Existen diferencias en por lo menos uno de los tratamientos.

**Tabla 4.** LSD: resultado de la prueba estadística en R 2.8.1

LSD t Test for values		
Alpha	0.050000	
Error Degrees of Freedom	68.000000	
Error Mean Square	10.705882	
Critical Value of t	1.995469	
Least Significant Difference	4.129393	
Grupos	Tratamientos	$\mu$ (Repetición)
A	<b>g3</b>	<b>18.8</b>
A	<b>s2</b>	<b>18.2</b>
B	s3	12.6
B	f6	12.2
Bc	f5	11.2
Bcd	h1	10.8
Bcd	h2	8.6
Cd	f2	7.2
De	f4	6.8
Ef	s6	3
F	s5	1.8
F	f3	1.4
F	g1	1
F	f1	0.8
F	s1	0.6
F	g2	0

Las medias de los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes (Tabla 4 y Figura 11). El extracto acuoso de las hojas de *C. corymbosa* puede tener el mismo efecto promotor del GA3 sobre la germinación de *Passiflora edulis* var *edulis* dependiendo de la concentración y el tiempo de imbibición de las semillas.



**Figura 11.** Promedios y barras de error de la germinacion en las repeticiones de cada tratamiento e identificacion de los grupos según el resultado de la prueba de LSD.

La diferencia entre el grupo de tratamientos (G3 y S2) con respecto al segundo grupo (S3 y F6) fue del 25% y la diferencia con el grupo control (H1 y H2) fue del 39%. La diferencia con el resto de tratamientos fue superior al 50%.

Los resultados de %G obtenidos son diferentes a los reportados por Romero (2000), Rozzetto (2000) y Zucareli (2003) quienes sólo obtuvieron bajos G% usando diferentes tratamientos con GA3; y conformes con Ferreira (2005) y Ortega (2006), quienes también obtuvieron altos valores de G% en otras pasifloras. Se sustenta entonces que el extracto acuoso de las hojas secas de *C. corymbosa* [2.5mg/ml] y el GA3 [1mg/ml] pueden tener un efecto promotor significativamente alto sobre la germinación de *Passiflora edulis* var. *edulis*

cuando son aplicados por imbibición de las semillas durante 12h y 24h respectivamente.



**a.**



**b.**

Fotos: Daniel Villamil

**Figura 12.** Germinación obtenida en los mejores tratamientos: (a) tratamiento G3 & (b) tratamiento S2.

#### 7.4. Dormancia y pérdida de viabilidad.

Los tratamientos G2 y S4 no presentaron germinación al final del ensayo y una nueva prueba de tetrazolium con semillas no germinadas demostró la notable reducción de su viabilidad a los 100 días después de ser cosechadas (Figura 13. a, b y c). El 75% de las semillas no germinadas presentaron una tinción inferior al 20% del área total del embrión; el otro 35% no presentó tinción alguna. Al comparar el resultado con un patrón obtenido de semillas del lote inicial, almacenadas en seco a temperatura ambiente (Figura 14), se observa la misma coloración reducida y una alta mortalidad de embriones.



a.



b.



c.

Fotos: Daniel Villamil

**Figura 13.** Prueba de tetrazolium con las semillas no germinadas al final del ensayo: (a) viabilidad de las semillas, (b) pérdida de viabilidad & (c) mortalidad

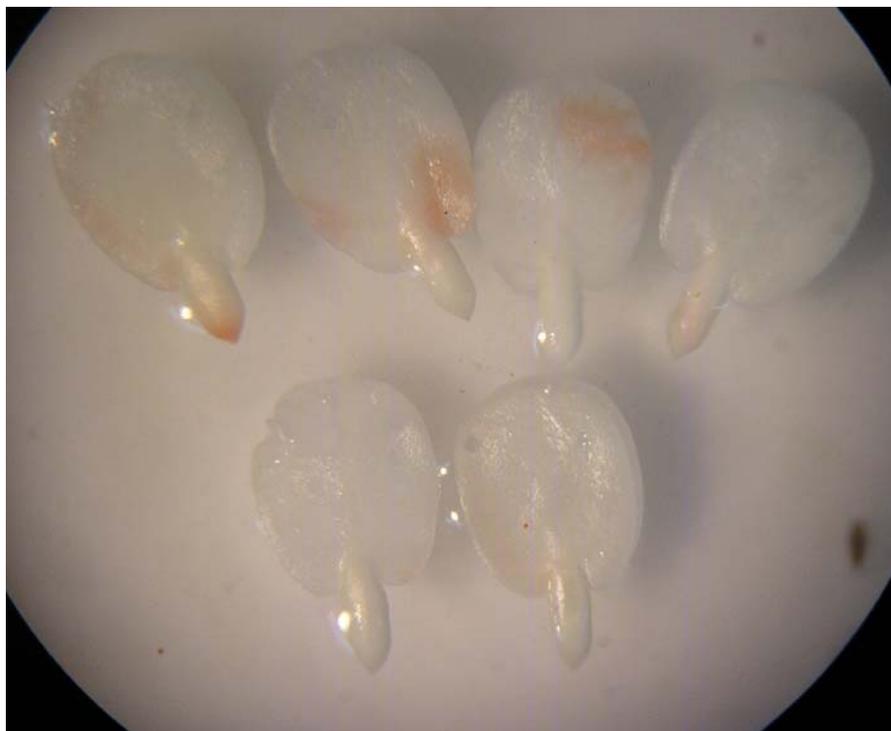


Foto: Daniel Villamil

**Figura 14.** Viabilidad de las semillas almacenadas en seco a temperatura ambiente a los 100 días después de la colecta.

Este resultado sugiere que la pérdida de viabilidad es acelerada en las semillas de gulupa y no se debe al efecto de los tratamientos en donde no hubo germinación.

### **7.5. Resultado de la Cromatografía.**

El resultado de la TLC confirmó la presencia de GA3 en la fracción giberélica. Se obtuvieron manchas fluorescentes como producto de la reacción del ácido giberélico con el  $H_2SO_4$  del revelador (Figura 15). El resultado del  $R_f=0.35$  concuerda con lo obtenido por Bautista & Gallardo (2000).



Foto: Daniel Villamil

**Figura 15.** Cromatografía: izquierda, mancha fluorescente de la fracción giberélica; derecha, mancha fluorescente del patrón GA3 (derecha).

## 8. DISCUSIÓN.

### 8.1. Variabilidad Intraespecífica & Germinación de *Passiflora*.

La teoría más aceptada dice que *P. edulis* fue introducida a Colombia procedente del sur de Brasil en los años 60s. Como producto de la polinización cruzada, la hibridación y la selección artificial, ahora es posible encontrar cultivariedades y formas locales como lo sugieren Ocampo *et al.* (2007) en su actualizada lista para la conservación de pasifloras, quienes reportan para Colombia varias cultivariedades y formas locales de *P. edulis* creciendo incluso de manera silvestre. Los mismos autores (2004) observaron con marcadores moleculares que la similaridad entre las formas morada (*P. edulis* var. *edulis*) y amarilla (*P. edulis* var. *flavicarpa*) del maracuyá es muy baja; y que la forma morada se parece más a *P. maliformis*, otra especie menos cultivada que se encuentra también de manera silvestre en Colombia.

Se ha comprobado que las especies de *Passiflora* pueden autofecundarse pero normalmente tienden a la polinización cruzada, como consecuencia de la organización floral y un mecanismo característico, que promueve este tipo de polinización gracias al movimiento alterno de las anteras y los estigmas (Ramírez 2006).

La evolución de características florales asociadas a polinizadores notablemente específicos tuvo un papel importante en la abundante especiación de *Passiflora* y muchas especies no desarrollaron mecanismos genéticos de aislamiento reproductivo, pudiéndose cruzar entre sí y producir híbridos con semillas viables, incluso cuando se cruzan cultivariedades con especies silvestres (Ramírez 2006).

Si se tiene en cuenta esta notable variabilidad, encontrar diferencias fisiológicas entre poblaciones de la misma especie de pasiflora no es sorprendente. De hecho, se ha señalado que cuando se propagan pasifloras por semilla esta diversidad genética puede resultar en una variabilidad indeseable para una plantación comercial (Isutsa 2003). Acorde con lo anterior, Romero (2000), Salazar (2000) y Ortega (2006) encontraron al trabajar con poblaciones diferentes, que el mayor efecto sobre la germinación de *Passiflora* lo tiene la procedencia de las semillas, seguido por el grado de madurez de los fruto.

En este estudio, se trabajó con un lote de semillas de madurez homogénea (Pinzón 2007) proveniente de la misma planta: una forma seleccionada de *Passiflora edulis* var. *edulis* bien adaptada a los 2600 msnm. De esta manera se intentó reducir el efecto de factores alineados como la diversidad intraespecífica sobre la variable respuesta (%G), obteniendo un resultado en la germinación de *Passiflora* superior al 80% con el mejor de los tratamientos del extracto de *C. corymbosa*, igual al obtenido con la mejor de las aplicaciones de GA3 de laboratorio, pero a un costo de tan solo el 0.003% del valor comercial del GA3. Adicionalmente, es importante resaltar que la imbibición de las semillas maduras en GA3 (1mg/ml) por 24 horas resulta muy eficaz para la germinación de Gulupa con un resultado superior al 90%.

## **8.2. Pérdida de la Viabilidad & Ensayo de Campo.**

Las semillas de *Passiflora* se han caracterizado por presentar una dormancia prolongada (Malavassi *et al.* 2002), pero en este estudio se demuestra que las semillas de *P. edulis* var. *edulis* pueden perder hasta el 80% de su viabilidad en tan solo 100 días, en términos del % de viabilidad de cada embrión según la tinción de sus partes, y en el número de embriones viables que perduran en un lote de semillas.

Con respecto a los resultados de germinación obtenidos en campo, sólo se puede mencionar que la dificultad inherente a la germinación de *Passiflora* resulta incrementada cuando no se tienen condiciones controladas como sucede en los ensayos en campo a diferencia de lo que ocurre con *in vitro*. Como sucede en muchas otras especies, la profundidad de siembra, la humedad del terreno y otras condiciones medioambientales pueden incidir en la dormancia de las semillas inhibiendo el efecto de los tratamientos pregerminativos.

## **9. CONCLUSIONES.**

### **9.1. El Conocimiento Tradicional.**

Los trabajos etnobotánicos han estudiado y demostrado científicamente la validez del uso tradicional de las plantas. Se ha sugerido que la observación cuidadosa del entorno, pudo desarrollar por medio de la experimentación empírica de muchas generaciones de pobladores nativos, un entendimiento minucioso de algunos fenómenos complejos que ocurren en la naturaleza, como la germinación. En Colombia los trabajos realizados durante el siglo XX por reconocidos investigadores (Schultes, Reichel-Dolmatoff, Cuatrecasas & García Barriga, entre

otros) probaron la importancia del conocimiento tradicional de las poblaciones rurales (Davis 2004, Ramírez 2005).

Los elaboradores artesanales de chicha descubrieron las propiedades germinativas de *C. corymbosa* y transmitieron el conocimiento, quizás cientos de años antes del descubrimiento de las giberelinas. Actualmente, la ruptura en la transmisión del conocimiento tradicional es un problema real, producto del proceso de aculturación progresiva de las comunidades rurales, que amenaza la supervivencia de este valioso conocimiento (Ramírez 2005).

## **9.2. Potencial del Extracto.**

El extracto acuoso de las hojas de *C. corymbosa* demuestra tener una aplicación importante en la agricultura, al presentar un efecto similar al del GA3 comercial. Su potencial para influir sobre la germinación de otras plantas, plasticidad, abundancia y adaptabilidad convierten a *C. corymbosa* en una planta ideal para integrar en un agroecosistema. Bien sea en una cerca viva, como nodriza de otra planta o como fuente de hojas para la elaboración del extracto, el “ondequiera” tiene un futuro promisorio, pues la elaboración de 2 litros de extracto, solo implica agua limpia y unos 120g de hojas secas. Su fácil elaboración lo convierte en una útil herramienta a disposición de cualquier agricultor en el campo colombiano.

## **9.3. Germinación en *Passiflora edulis* var. *edulis*.**

Tanto el extracto de *C. corymbosa* como la aplicación de GA3, pueden promover eficazmente la germinación de semillas maduras de *Passiflora edulis* var. *edulis*, pero la dormancia en pasifloras además de ser innata y morfofisiológica, puede verse altamente influenciada por el ambiente. Adicionalmente, gracias a las pruebas de tetrazolium realizadas, se puede concluir que las semillas maduras de

*P. edulis* var. *edulis* sembradas *in vitro* y almacenadas en seco a temperatura ambiente, pueden perder su viabilidad rápidamente (100 días después de cosechadas)

## **10. RECOMENDACIONES.**

La fácil producción del extracto de *C. corymbosa* abre la puerta a una nueva serie de investigaciones que deberían estar enfocadas en conocer: las otras giberelinas aprovechables en la planta, los estados fenológicos ideales para la obtención de giberelinas y que interacciones ecológicas se pueden dar por procesos de alelopatía en un cultivo tradicional con plantas nodrizas de *C. corymbosa*.

Es necesario realizar más trabajos en *Passiflora*, sobre todo a nivel de reproducción, pues en la enorme mayoría de las 167 especies de pasifloras reportadas para el país, no se tiene el conocimiento básico para su propagación. Se recomienda no sembrar semillas de *Passiflora* en campo antes de evidenciar la eclosión de la radícula pues las condiciones medioambientales pueden incidir en la dormancia.

## **11. REFERENCIAS.**

-Altieri, M. 1999. Bases científicas para una agricultura sustentable. Editorial Nordan–Comunidad 117p

-Almeida, S. P. 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC 464p.

-Azcon-Bieton, J & Talon M. 2000. Fundamentos de fisiología Vegetal. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. España 522p

- Bautista, L & Gallardo, R. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol-acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Trabajo de Grado (Microbiólogo), Facultad de Ciencias, departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana, facultad de Ciencias Básicas, carrera de Microbiología, Bogota, Colombia 120p
- Coombe, B. G. & D. Cohen. 1964. Laboratory instructions -- gibberellin bioassay using barley endosperm. University of Adelaide, Department of Plant Physiology 42:113-119
- Copeland, L & M. B MacDonald. 1995. Principles of seed science and technology. 3<sup>rd</sup> ed. Chapman Hall. New York 409p.
- Daivis, W. 2004. El Rio: Exploraciones y descubrimientos en la selva amazónica. El ancora editores. Fondo de Cultura Económica. Colombia 639p.
- Dey, P & Harborne, M. 1991. Methods in plant biochemistry. Vol 7. Terpenoids: 225p.
- Escobar, L.K. 1988. *Passifloraceae*. Flora de Colombia 10. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia 138p.
- Ferreira, G., Oliveira, A., Rodrigues, D., Bravo, G., Detoni, A., Tesser S & Antunes M. 2005. Efeito de arilo na germinação de sementes de *Passiflora alata* curtis em diferentes substratos e submetidas a tratamentos com giberelina. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal 27(2):277-280

- García-Barriga, H. 1975. Flora Medicinal de Colombia. Tomo II. 2da ed. Editorial Imprenta Nacional. Bogotá, Colombia 232p.
- Gibbons, S. & Gray A.I., Waterman P.G. 1996. Clerodane diterpenes from the bark of *Casearia Tremula*. *Phytochemistry* 41(2):565-570.
- González, M., Caicedo, C., Velásquez F., Flórez V. & Garzón, R. 2007. Efecto de la aplicación del ácido giberélico sobre el crecimiento de coliflor (*Brassica oleraceae* L.) var. *Botrytis* DC. *Agronomía Colombiana* 25(1): 54
- Groot, S. & C.M. Karssen. 1987. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta*. Vol 171(4): 525-531.
- International Seed Testing Association. 2006 International rules for seed testing +100p.
- Isutsa, D. 2003. Rapid micropropagation of pasiflora fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. *Scientia Horticulturae* 99: 395-400
- Jones, R. & J. E. Varner. 1967. The bioassay of gibberellins. *Planta Bcrl.* 72: 155-161.
- Kanokmedhakul, S. K., Kanokmedhakul, T., Kanarsa, T. & M Buayairaksa, M. 2005. New Bioactive Clerodane Diterpenoids from the Bark of *Casearia grewiifolia*. American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy. <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np049757k>. [Consulta: 5 en marzo de 2009].

- Killip, E.P. 1960. Supplemental notes to the American species of *Passiflora* with descriptions of new species. Contributions from the U.S. National Herbarium. 35(1):2
- Kurosawa, E. 1926. Experimental studies on the nature of the substance secreted by the "bakanae" fungus. Nat. Hist. Soc. Formosa.16: 213-227
- Layne-Garsaball, J. & Méndez-Natera J. 2006. Effects of foliage water extracts of purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) on seed germination and seedling growth of sesame (*Sesamum indicum* L.) cv. arapatol s-15. Idesia 24(2):61
- Malavasi, M., Fogaça, C. A., Fogaça L. A. & Ferreira, G. 2002. Preparo e coloração de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander) para a avaliação da viabilidade através do teste de tetrazólio. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal 23(1): 126-129.
- Melgarejo.L. 2003. BIOPROSPECCIÓN: Bioprospection: National Plan and Up to Date Situation in Colombia. Acta Biológica Colombiana 8(2):7-10
- Ocampo, J., Coppens, d'Eeckenbrugge., Cecile, T. Olano & Schnell, R.J. 2004. AFLP Analysis for the Study of Genetic Relationships Among Cultivated *Passiflora* Species of the Subgenera *Passiflora* and *Tacsonia*. Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort. 48:72-76.
- Ocampo, J., Pérez, G., Coppens d'Eeckenbrugge., Restrepo, M., Jarvis A., Salazar M & Caetano C. 2007. Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. Biota Colombiana 8 (1) 1 – 45.

- Ortega, A. 2006. Estudio en la fisiología de semillas de *Passiflora rubra* en dos épocas de colecta en el jardín botánico del Quindío. Trabajo de grado (Bióloga). Pontificia Universidad. Facultad de Ciencias Básicas. Carrera de biología, Bogotá 150p.
- Pinzón M., Fischer G & Corredor G. 2007. Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims). *Agronomía Colombiana* 25(1): 83-95.
- Purves, W., Sadova, A., Orians, G., & Heller, C. 2002. *Vida la ciencia de la Biología*. Sexta edición. Editorial Panamericana. New York. 1133p.
- Radly, M. 1958. The Distribution of Substances similar to Gibberellic Acid in Higher Plants. *Annals of Botany* 22:297-307
- Ramírez, Z. 2005. Conservación de la diversidad biológica y cultural en el piedemonte amazónico colombiano: La herencia del Dr. Schultes. *Ethnobotany Research & Applications* 3:167-177.
- Ramírez, W. 2006. Hibridación interespecífica en *Passiflora* (PASSIFLORACEAE), mediante polinización manual, y características florales para la polinización. *Lankesteriana* 6(3):123-131.
- Rangel, J. O. 1995. *Colombia Diversidad Biótica I*. editorial Universidad Nacional e INDERENA, Bogotá, Colombia.
- Romero, P. 2000. Evaluación del efecto de algunos factores físicos y químicos sobre la germinación de las semillas de tres especies de *Passiflora*, *P. edulis*, *P.*

mollissima, P. Lingularis. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias Basicas. Unidad de biotecnología Vegetal. Bogota Colombia. 204p.

-Rossetto, C., Celi, R., Coneglian, C., Nakagawa, J., Shimizu M & Marin, A. 2000. germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand) em função de tratamento pré-germinativo. Revista Brasileira de Sementes 22(1):247-252

-Ruddat, M., R., P. Pharis, H. Aoki & A. Crozier. 1968. Gibberellin-like Substances From Vegetative Tissue of a Conifer, Arizona Cypress. Plant Physiol. 43: 155

-Salazar, A. 2000. Evaluación de la procedencia y el grado de madurez de los frutos de dos especies de Passiflora: *Passiflora mollissima* y *Passiflora lingularis* sobre la germinación de sus semillas. Trabajo de grado (Biólogo). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias Básicas. Carrera de Biología. Unidad de biotecnología Vegetal. Bogotá Colombia 350p.

-Silva, S. L. C., da Silva, J., Figueiredo, P. & Yano, T. 2008. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. Acta Amazonica 38(1): 107-112

-Sponsel, V.M. y P. Hedden. 2004. Capítulo 2: Gibberellin biosíntesis and inactivation. pp. 63-94. En: Davies, P.J. (ed.). Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 750p.

- Srivastava, L.M. 2002. Plant growth and development. Hormones and environment. Academic Press, Amsterdam 772p.
- Tong-Bin, C. & Wieme,r D. 1991. Journal of Natural products 54(6):1612-1618.
- Toogood, A. 1999. Plant propagation. American Horticultutal Society. DK publishing inc. New York. 136p.
- Villamil, D., Robles, J & Chaparro, C. 2009. Efecto del Extracto Giberélico de *Casearia corymbosa* (FLACOURTIACEAE) sobre la germinación de semillas y la elongación de yemas laterales de papa cultivadas *In Vitro*. Memorias V Congreso colombiano de Botánica. San Juan de Pasto 105p.
- Zucareli, C., Castro, M., Oliveira, H., Brancalião, R., Rodrigues D., Ono O & Boaro C. 2003. Fitoreguladores e germinação de sementes de maracujá doce em condições de laboratório. Scientia Agraria 4(1-2): 9-14

## 12. ANEXOS

### Anexo 1. Formato para la toma de datos.

Fecha (dds)						
Tratamiento	r1	r2	r3	r4	r5	%G
f1						
f2						
f3						
f4						
f5						
f6						
s1						
s2						
s3						
s4						
s5						
s6						
G1						
G2						
G3						
H1						
H2						

**Anexo 2. Matriz de datos.**

F1	0	0	0	1	3
F1	0	0	0	1	0
F1	0	0	0	1	1
F1	0	0	0	0	0
F1	0	0	0	1	0
F2	0	4	4	4	4
F2	0	10	12	12	7
F2	0	7	8	8	10
F2	0	3	5	5	5
F2	0	0	0	1	10
F3	0	0	0	0	0
F3	0	0	0	3	3
F3	0	0	0	3	4
F3	0	0	0	0	0
F3	0	0	0	0	0
F4	0	8	8	8	8
F4	0	3	4	6	6
F4	0	5	7	11	12
F4	0	1	1	1	1
F4	0	0	0	8	8
F5	0	6	7	12	9
F5	0	0	0	8	11
F5	0	0	0	12	15
F5	0	0	0	11	12
F5	0	0	0	6	9
F6	0	0	0	7	8
F6	0	0	0	14	16
F6	0	0	0	11	14
F6	0	0	0	5	5
F6	0	0	0	13	18
S1	0	0	0	0	0
S1	0	0	0	0	3
S1	0	0	0	1	2
S1	0	0	0	4	0
S1	0	0	0	0	0
S2	0	0	5	7	16
S2	0	0	0	13	20
S2	0	0	0	19	15
S2	0	0	0	11	13
S2	0	0	0	4	17
S3	0	0	5	9	18

S3	0	0	0	18	10
S3	0	0	0	14	15
S3	0	0	0	7	8
S3	0	0	0	10	12
S4	0	0	0	0	0
S4	0	0	0	0	0
S4	0	0	0	0	0
S4	0	0	0	0	0
S4	0	0	0	0	0
S5	0	0	0	0	0
S5	0	0	0	4	0
S5	0	0	0	0	4
S5	0	0	0	2	5
S5	0	0	0	0	0
S6	0	1	1	4	1
S6	0	1	1	6	5
S6	0	0	0	2	8
S6	0	0	0	0	2
S6	0	0	0	0	1
G1	0	0	0	0	0
G1	0	0	0	0	1
G1	0	0	0	0	4
G1	0	0	0	4	0
G1	0	0	0	0	0
G2	0	0	0	0	0
G2	0	0	0	0	0
G2	0	0	0	0	0
G2	0	0	0	0	0
G2	0	0	0	0	0
G3	0	0	0	1	20
G3	0	0	0	18	19
G3	0	0	0	18	17
G3	0	0	0	18	19
G3	0	0	0	10	19
H1	0	0	0	8	0
H1	0	0	0	11	10
H1	0	0	0	10	14
H1	0	0	0	15	15
H1	0	0	0	0	15
H2	0	0	0	3	3
H2	0	0	0	7	10
H2	0	0	0	12	11
H2	0	0	0	10	5

H2	0	0	0	5	14
<b>Promedios replica</b>					
F1	0	0	0	0,8	0,8
F2	0	4,8	5,8	6	7,2
F3	0	0	0	1,2	1,4
F4	0	3,4	4	6,8	7
F5	0	1,2	1,4	9,8	11,2
F6	0	0	0	10	12,2
S1	0	0	0	1	1
S2	0	0	1	10,8	16,2
S3	0	0	1	11,6	12,6
S4	0	0	0	0	0
S5	0	0	0	1,2	1,8
S6	0	0,4	0,4	2,4	3,4
G1	0	0	0	0,8	1
G2	0	0	0	0	0
G3	0	0	0	13	18,8
H1	0	0	0	8,8	10,8
H2	0	0	0	7,4	8,6
DDS	30	40	50	60	70

### Anexo 3. Ultimo conteo

<b>Repeticiones</b>						
f1	3	0	1	0	0	4
f2	4	7	10	5	10	36
f3	0	3	4	0	0	7
f4	7	5	12	1	10	35
f5	9	11	15	12	9	56
f6	8	16	14	5	18	61
s1	0	3	2	0	0	5
s2	16	20	15	13	17	81
s3	18	10	15	8	12	63
s4	0	0	0	0	0	0
s5	0	0	4	5	0	9
s6	1	5	8	2	1	17
G1	0	1	4	0	0	5
G2	0	0	0	0	0	0
G3	20	19	17	19	19	94
H1	0	10	14	15	15	54
H2	3	10	11	5	14	43

