

# **Efecto de la aplicación de bacterias y enzimas microbianas pectinolíticas sobre la respuesta germinativa de semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*)**

## **Effect of pectinolytic microbial enzymes and bacteria application on germination response of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) seeds**

Villamarin-Raad David <sup>1,2</sup>, Rodríguez Bocanegra María Ximena <sup>3</sup>, Rodríguez Pérez Loyla <sup>4</sup>

1. Estudiante de Biología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D. C., Colombia. E-mail: [villamarind@javeriana.edu.co](mailto:villamarind@javeriana.edu.co)
2. Estudiante de Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D. C., Colombia.
3. Profesora de Microbiología Industrial, Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D. C., Colombia. E-mail: [loyla.rodriguez@javeriana.edu.co](mailto:loyla.rodriguez@javeriana.edu.co)
4. Profesora de Biología, Biología de Plantas y Sistemas Productivos, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D. C., Colombia. E-mail: [mxrodriguez@javeriana.edu.co](mailto:mxrodriguez@javeriana.edu.co)

### **Resumen**

El maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) es un fruto apetecido por su sabor y valor nutricional, por lo que es cultivado en muchos países, como Colombia. La producción del fruto se realiza generalmente a partir de semillas, las cuales tienen dormancia mecánica por la cubierta seminal, lo que dificulta su germinación y desarrollo, afectando el rendimiento en los cultivos. Este trabajo evaluó la capacidad de microorganismos pectinolíticos procedentes de la Colección de la Pontificia Universidad Javeriana para degradar la cubierta seminal y facilitar la germinación de semillas de maracuyá. A partir de frutos de maracuyá del Huila, se extrajeron sus semillas y, por grupos, se lavaron con agua y Pectinex USPL. Posteriormente, las semillas lavadas se expusieron a inóculos y pectinasas de *B. cereus* y *B. subtilis* por 48 horas, y se evaluó por 45 días el número de semillas germinadas. Las semillas lavadas con Pectinex y expuestas a pectinasas de *B. subtilis* tuvieron mayor porcentaje (11%) y velocidad de germinación (1.91 semillas/día) con significancia estadística. El uso de pectinasas de *B. subtilis*, por lo tanto, podría ser considerado en protocolos de acondicionamiento de semillas de maracuyá en Colombia.

### **Palabras clave**

Maracuyá, germinación, dormancia, microorganismos pectinolíticos, pectinasas microbianas.

### **Abstract**

Yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) is a desired fruit for its taste and nutritional value, therefore is cultivated in many countries, as Colombia. The fruit production is usually made by seeds, which have mechanic dormancy due to their hard coat, which complicates their germination and development affecting the harvest yield. This study evaluated the ability of pectinolytic microorganisms

from Pontificia Universidad Javeriana Collection to degrade the seed hard core and to contribute to yellow passion fruit seeds germination. From yellow passion fruit from Huila, it was extracted their seeds and by groups they were washed with water and Pectinex USPL. Later, the seeds washed were exposed to inoculum and pectinases from *B. creus* and *B. subtilis* for 48 hours, and it was evaluated for 45 days the number of sprouted seeds. The seeds washed with Pectinex and exposed to *B. subtilis* pectinases showed highest germination percentage (11%) and rate (191 seed/day) with statistical significance. The use of *B. subtilis* pectinases, therefore, could be considered in conditioning protocols for yellow passion fruit seeds in Colombia

### **Key words**

Yellow passion fruit, germination, dormancy, pectinolytic microorganisms, microbial pectinases.

### **Introducción**

El maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) es una especie de la familia Passifloraceae de interés comercial, industrial y cosmético (dos Santos *et al.* 2019, Molina-Hernández *et al.* 2019) en Colombia y en otros países del mundo, al ser aprovechado su fruto como alimento por aportar vitaminas A y C, carbohidratos y carotenoides (Vaca-Vaca *et al.* 2016, de Luna Souto *et al.* 2017, DANE 2019, Molina-Hernández *et al.* 2019). Por sus cualidades para la alimentación, el fruto es producido en Australia, Sur África, India, Ecuador, Perú y Colombia, siendo Brasil el mayor productor del mundo (DANE 2019). En Colombia, en el 2017, se produjeron 138.590 toneladas de frutos (AGRONET 2017), siendo los departamentos de Antioquia, Santander y Valle del Cauca los mayores productores (DANE 2019).

Con el fin de obtener rendimiento óptimo, el cultivo de maracuyá requiere condiciones ambientales y biológicas adecuadas para la producción de frutos que cumplan con los estándares de calidad exigidos en el mercado (Rindermann y Gomez 1999, Jaramillo *et al.* 2009). Por ello, para el establecimiento de los cultivos se requieren semillas con adecuada calidad fisiológica, es decir, semillas cuyas propiedades conlleven a generar alta uniformidad en la germinación, proceso que inicia con la ruptura de la testa, y finaliza con la protrusión de la radícula (Adkins *et al.* 2002). Este proceso ocurre en tres etapas: entrada controlada de agua a la semilla (imbibición) por la diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio; reactivación del metabolismo del embrión en la que se presentan degradación y translocación de reservas energéticas, entre otras actividades metabólicas; y crecimiento del embrión por división celular y elongación de la radícula, que resulta en la ruptura de la testa por la radícula (Doria 2010, Escobar

2011, Villamizar 2012). La semilla es el órgano de propagación empleado en la reproducción sexual de *Passiflora* spp. (Doria 2010, Gil *et al.* 2015), la propagación más utilizada por los cultivadores por evitar la autoincompatibilidad que surge por la propagación asexual (esquejes) (Suassuna *et al.* 2003, Copete 2011, Colombo *et al.* 2019), e incrementar la variabilidad genética, generando individuos con alta calidad genética y fisiológica (germinación más rápida y sincrónica, mayor vigor de plántulas y tolerancia a plagas y enfermedades) (Copeta 2011, da Silva *et al.* 2020). Para el óptimo crecimiento y desarrollo de plantas de maracuyá, se requiere temperatura de 24 a 28°C, altitud de 1.300 m.s.n.m, humedad relativa de 60 a 70%, y luz solar promedio de 8 h diarias (DANE 2019); además de un adecuado suministro de agua durante todo el ciclo de vida, debido a que el estrés por sequía disminuye el crecimiento vegetativo en 50 a 75%, afectando la calidad del fruto, al reducir su contenido de pulpa (Mendes *et al.* 2019).

Respecto a las condiciones biológicas, los cultivos de maracuyá requieren semillas con una adecuada calidad fisiológica que favorezca la germinación; sin embargo, bajo condiciones naturales, la germinación de estas semillas es inhibida por dormancia (Mendiondo y Amela 2009, Shu *et al.* 2016, Colombo *et al.* 2019). La dormancia es un conjunto de mecanismos morfológicos, físicos y fisiológicos (Shu *et al.* 2016), que previenen la germinación cuando las condiciones no son favorables para el desarrollo del individuo (Kimura *et al.* 2015). La dormancia se cataloga como dormancia primaria si sus mecanismos son inducidos y regulados desde la formación de la semilla por la planta madre, el estado de maduración del fruto y características de la cubierta seminal, entre otras; y dormancia secundaria si es generada por condiciones ambientales (Escobar 2011, Naranjo de los Reyes *et al.* 2014, Scheler *et al.* 2015, Coughlan *et al.* 2017, Fischer *et al.* 2018, Song *et al.* 2019). La cubierta seminal es la estructura de protección que presentan las semillas de *Passiflora* spp., compuesta por dos capas: la más externa es la testa y la capa más interna es el tegmen (Cárdenas-Hernández *et al.* 2011, Naranjo de los Reyes *et al.* 2014). La testa es una cubierta gruesa que otorga a la semilla protección mecánica (Naranjo de los Reyes *et al.* 2014). La semilla de maracuyá presenta una estructura asociada, el arilo, una cubierta carnosa que rodea a la semilla, que contiene inhibidores de la germinación que están en contacto con la semilla (Colombo *et al.* 2019). La testa y el arilo protegen la semilla durante períodos de condiciones adversas, evitando que inicie la germinación en condiciones que podrían perjudicar el crecimiento y la viabilidad del individuo; sin embargo, también pueden retrasar o inhibir el proceso de germinación, aún bajo condiciones adecuadas (Shu *et al.* 2016). El proceso de germinación de semillas de *Passiflora* spp. es inhibido por dormancia exógena mecánica, debido a que la testa impide el desarrollo del embrión al restringir la protrusión de la radícula, y exógena química, debido a que la semilla está expuesta a inhibidores de la germinación procedentes del arilo (Delanoy *et al.* 2006, Colombo *et al.* 2019). Adicional

a esto, se propone que las semillas de maracuyá también presentan dormancia exógena física, atribuida a la testa, que limita la entrada de agua a la semilla durante la imbibición y evita la reactivación de los procesos de respiración metabólica, necesarios para dar inicio al desarrollo (Adkins *et al.* 2002, Villamizar 2012, Kimura *et al.* 2015). Además, se afirma que la semilla de maracuyá presenta dormancia endógena de tipo morfológico, debido a semillas viables con embriones inmaduros, y de tipo fisiológico, por la presencia de inhibidores de la germinación en contacto con el embrión (dos Santos *et al.* 2015).

Considerando lo anterior, para el establecimiento de cultivos de maracuyá se emplean semillas cuya germinación presentan baja uniformidad y alta asincronía o que no germinan por no tener adecuada calidad fisiológica, lo que afecta el crecimiento y desarrollo del cultivo, generando baja productividad (Ozarowski y Thiem 2013). Para romper la dormancia de las semillas se aplican técnicas o tratamientos pre-germinativos, como los acondicionamientos fisiológicos o “priming”, que someten a las semillas a procesos de hidratación y aireación controlada para reactivar el metabolismo y reducir el número de semillas dormantes y homogenizar la germinación (Escorbar 2011, Mahmood *et al.* 2016). Uno de los acondicionamientos fisiológicos más conocidos, es el “biopriming”, que somete a las semillas a un medio que contiene compuestos biológicos, como inóculos microbianos (Mahmood *et al.* 2016).

Los “biopriming” basan su técnica en exponer semillas en un medio que les proporcione compuestos necesarios para la germinación (Mahmood *et al.* 2016), por ejemplo: enzimas degradadoras de los polisacáridos constituyentes de la pared vegetal como lignina, celulosa y pectina (Yambe y Takeno 1992, Cárdenas-Hernández *et al.* 2011, Ahmadloo *et al.* 2014, Levesque-Tremblay *et al.* 2015, Scheler *et al.* 2015). La pectina vegetal es un componente presente en las capas más externas de la pared celular: pared primaria y lámina media, que otorga soporte, resistencia y unión estructural a las células y tejidos vegetales (Reignault *et al.* 2008). Este polisacárido está compuesto por cadenas del azúcar reductor, ácido D-galacturónico, unido por enlaces  $\alpha$  1-4, aunque también está presente, en menor cantidad, L-ramnosa y L-arabinosa (Hoondal *et al.* 2002, Reignault *et al.* 2008). La pectina es degradada por pectinasas producidas por microorganismos como bacterias y hongos fitopatógenos (Wojtasik *et al.* 2016, Romero-Perdomo *et al.* 2017) que emplean la acción de estas enzimas durante el proceso de colonización e infección, al degradar la pared vegetal de las células, disminuyendo la rigidez de los tejidos vegetales y facilitando su penetración por el patógeno (Valencia *et al.* 2011, Dees *et al.* 2017). A pesar de esto, las pectinasas han sido descritas como factores que podrían contribuir en el proceso de germinación (Yu *et al.* 2016, Roman-Ponce *et al.* 2017, Romero-Perdomo *et al.* 2017, Walitang *et al.* 2017). Así, el uso de microorganismos pectinolíticos podría ser una alternativa ambientalmente amigable que ayude al

agricultor a reducir el efecto que la dormancia genera en la germinación de semillas de maracuyá (Mabundza *et al.* 2010), al debilitar la cubierta seminal (Werker 1997), y promover la germinación, como lo reporta Yambe y Takeno (1992) en semillas de rosa (*Rosa multiflora*) expuestas a pectinasas, y Walitang *et al.* (2017) en semillas de arroz, al inocular las bacterias pectinolíticas *Xanthomonas* sp. y *Microbacterium* sp. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la exposición de bacterias y enzimas pectinolíticas como acondicionamiento fisiológico (“biopriming”) sobre la respuesta germinativa de semillas de maracuyá, lo que podría reducir el tiempo de germinación, incrementar el número de semillas germinadas, así como aumentar la uniformidad en el proceso de germinación y favorecer el establecimiento de plantas y posteriores etapas de desarrollo del cultivo, contribuyendo a la productividad en cultivos de maracuyá.

## **Materiales y metodología**

### **Población de estudio y muestra**

La población del estudio se obtuvo a partir de un lote de frutos de maracuyá procedentes de un cultivo de 1.5 años establecido en el Municipio de Timana, vereda Las Mercedes, departamento Huila.

Las bacterias, hongos filamentosos y levaduras evaluados hacen parte de la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (CMPUJ) reportados como pectinolíticos. La fase experimental se llevó a cabo en el laboratorio 131, edificio 50 (UNIDIA).

#### **- *Revisión de literatura de especies bacterianas y fúngicas pectinolíticas***

Se realizó una búsqueda de artículos científicos en el buscador integrado (Ebscohost) utilizando herramientas proporcionadas por la Biblioteca de la Pontificia Universidad Javeriana, en el período comprendido entre 2000-2019, usando palabras clave del tema anidadas con operadores booleanos para construir las cadenas de consulta; Pectin\* AND (“seed germination” or PGPR or “plant growth promoting rhizobacteria”) NOT (gen\* or genome or molecular), Pectinolytic\* AND (fungi or bacteria) AND (germination or dormancy). A partir de la información obtenida con respecto a microorganismos reportados en estudios realizados, se solicitó a la CMPUJ cepas de las especies reportadas disponibles.

#### **- *Evaluación semicuantitativa de actividad pectinolítica***

Para seleccionar entre las cepas entregadas por CMPUJ las bacterias y hongos con mayor actividad pectinolítica, se prepararon suspensiones bacterianas en solución salina ajustadas a 0.2 unidades de absorbancia a 540 nm (equivalente a  $10^8$  células/mL) en espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 20, y suspensiones fúngicas (filamentosos y levaduriformes) de  $10^7$  células/mL por conteo en cámara de Neubauer. Se sembraron 5 uL de cada suspensión en tres discos de papel filtro de 5 mm de diámetro colocados en una caja de Petri con medio pectina 1% - carragenina (pectina cítrica de baja metilación (10 g/L), sulfato de amonio (0.5 g/L), cloruro de calcio (0.5 g/L), fosfato monobásico de potasio (0.1 g/L), fosfato dibásico de potasio (0.1 g/L), triptosa (1 g/L) y carragenina (20 g/L), pH 7.3) por triplicado. Las cajas de Petri fueron incubadas a 25°C por 48 horas para bacterias y levaduras, y por 5 días para hongos filamentosos. Luego del tiempo de incubación, se reveló el halo de hidrólisis con lugol, y se midió el radio del halo (mm) a partir de la colonia. Las cepas que generaron los halos de hidrólisis de mayor tamaño fueron seleccionadas para la evaluación cuantitativa de actividad pectinolítica.

- ***Evaluación cuantitativa de actividad pectinolítica***

A partir de inóculos bacterianos y fúngicos preparados como se mencionó anteriormente, se sembraron 300 uL de cada una de las suspensiones por cuadruplicado en frascos compota estériles de 100 mL con 30 mL de caldo pectina 1% (pectina cítrica de baja metilación (10 g/L), sulfato de amonio (0.5 g/L), cloruro de calcio (0.5 g/L), fosfato monobásico de potasio (0.1 g/L), fosfato dibásico de potasio (0.1 g/L) y triptosa (1 g/L), pH 7.3) en agitación a 25°C a 120 r.p.m. por 5 días para bacterias y levaduras, y 7 días para hongos filamentosos. Para determinar el día de mayor producción de pectinasas, se realizó una curva de actividad pectinolítica para cada cepa evaluada cuantificando azúcares reductores liberados mediante la técnica de DNS (ácido-2,3-dinitrosalicílico). Cada 24 horas del período de cultivo, se extrajeron 1.2 mL de cada cultivo. Las muestras se centrifugaron a 10.000 r.p.m. por 20 minutos. A partir del sobrenadante, se tomaron tres alícuotas de 250 uL para la evaluación de la actividad pectinolítica, y otra alícuota del mismo volumen para cuantificar azúcares reductores en la muestra (blanco muestra). Las reacciones de actividad pectinolítica se llevaron a cabo mezclando 250 uL del extracto crudo de cada microorganismo (caldo de cultivo centrifugado) con 250 uL del sustrato (pectina cítrica de baja metilación 1% en buffer acetato de sodio 0.05 M pH 5), e incubándolas a condiciones de prueba: 40°C por 1 hora. Luego se centrifugó la mezcla a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos, y se cuantificaron con DNS los azúcares reductores liberados (ácido D-galacturónico) por la reacción enzimática a 540 nm (Miller 1959). La actividad enzimática fue definida como las micromoles de ácido D-galacturónico liberadas por minuto por litro (umol ácido D-galacturónico/min\*L) bajo las condiciones de prueba. Se empleó un

blanco absoluto (500 uL de buffer acetato de sodio 0.05 M pH 5), un blanco sustrato (250 uL de sustrato pectina 1% y 250 uL del buffer empleado), un blanco cultivo (500 uL de caldo pectina 1%) y un blanco muestra (250 uL del extracto crudo de cada proceso de fermentación, y 250 uL del buffer empleado). El blanco sustrato fue usado para ajustar la absorbancia durante la lectura del blanco muestra, del blanco cultivo y de las reacciones de actividad enzimática. Los blancos fueron evaluados bajo las mismas condiciones de prueba y de determinación de actividad enzimática. Se preparó una curva patrón con ácido D-galacturónico SIGMA G-2125 (0.1 a 3 g/L). A partir de los resultados se seleccionaron dos bacterias y dos hongos con mayor actividad pectinolítica para evaluar su efecto sobre la respuesta germinativa de semillas de maracuyá.

- ***Caracterización morfo-fisiológica de frutos de maracuyá***

Los frutos fueron caracterizados a partir de parámetros morfo-fisiológicos: como: diámetro polar y ecuatorial (mm), peso del fruto, de la pulpa y de la cáscara (g), grosor de la cáscara (mm), color del fruto y de la pulpa (escala Pantone), número de semillas y sólidos solubles totales de la pulpa (°Brix). Se midió con calibrador el diámetro polar, determinando la longitud del fruto desde el ápice hasta la base, el diámetro ecuatorial, midiendo la longitud transversal del fruto, y el grosor de la cascara abriendo el fruto. El peso del fruto, de la pulpa y de la cáscara se determinaron con balanza analítica. El color del fruto y de la pulpa se estableció comparando el color con la escala Pantone. Los sólidos solubles totales (°Brix) se determinaron colocando 1 mL de pulpa en refractómetro.

- ***Preparación de tratamientos de acondicionamiento fisiológico***

A partir de las cepas seleccionadas en la evaluación cuantitativa, se prepararon suspensiones en caldo pectina 1% ajustadas a  $10^8$  células/mL para bacterias y  $10^7$  células/mL para hongos (filamentosos y levaduriformes). Adicionalmente, se prepararon extractos enzimáticos, según el día de mayor producción de pectinasas de cada microorganismo. Se tomó agua destilada como control absoluto y caldo pectina 1% como control negativo. Con el fin de comparar la respuesta germinativa en semillas de maracuyá sometidas a las pectinasas microbianas respecto a un producto a base de pectinasas empleado para facilitar la remoción del arilo, Pectinex USPL, se preparó una suspensión del producto. La suspensión del producto y los extractos enzimáticos fueron diluídos a una misma concentración (31.07 UP) (Tabla 1).

- ***Aplicación de tipo de lavado y acondicionamientos fisiológicos (diseño experimental factorial)***

Las semillas con arilo procedentes de frutos con grados Brix entre 12 y 15 (Jaramillo *et al.* 2009) se mezclaron en un recipiente. La mezcla fue dividida en dos grupos dependiendo del método de lavado para remover el arilo: grupo LAVADO-A, semillas lavadas con agua destilada, y grupo LAVADO-P, semillas lavadas con Pectinex USPL (0.5 mL/L por 100 g de pulpa por 3 horas). Luego, las semillas se extendieron sobre una mesa recubierta con papel Kraft a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, hasta obtener un contenido de humedad de 8 a 10%. Posteriormente, las semillas fueron empacadas en bolsas de papel y mantenidas en un lugar fresco y oscuro. Cada tres días se registró el contenido de humedad de una muestra de 0.5 g de semillas en un medidor Ohaus (MB45) con protocolo de secado de 100°C por 30 minutos. Las semillas sin arilo fueron desinfectadas por inmersión en etanol 70% y colocadas en solución de hipoclorito de sodio 5% por 20 minutos (Flores *et al.* 2012); posterior a esto, las semillas fueron lavadas con agua destilada estéril hasta retirar el hipoclorito totalmente.

Los tratamientos corresponden a un diseño experimental factorial de dos factores: tipo de lavado de semillas y acondicionamiento fisiológico (Tabla 1). Cada tratamiento comprendió cuatro réplicas de 100 semillas (ISTA 2006). Para la aplicación de los tratamientos, se colocaron 400 semillas en tubos Falcon de 50 mL y se adicionaron 25 mL de la suspensión correspondiente al acondicionamiento. Los tubos se agitaron continuamente por 48 horas a 120 r.p.m. Posteriormente, las semillas fueron secadas sobre papel, en oscuridad a temperatura ambiente, registrando el contenido de humedad, con el protocolo de secado previamente descrito, hasta alcanzar un valor de contenido de humedad de 8 a 10%. Luego, en cabina de flujo laminar, se coloraron 100 semillas en cajas plásticas sobre papel absorbente familia® dispuesto en forma de acordeón. Las semillas se humedecieron con 17 mL de agua destilada estéril (Ogórek 2016). Las cajas plásticas fueron ubicadas en un cuarto a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, manteniendo la humedad dentro de las cajas para evitar la desecación de las semillas e inducir dormancia secundaria.

Tabla 1. Diseño experimental del ensayo de germinación de semillas *in vitro*.

Diseño experimental factorial		Factor 1: Tipo de lavado de semillas	
		Agua (LAVADO-A)	Pectinex USPL (0.5 g/L por 100 g de pulpa) (LAVADO-P)
Factor 2: Acondiciona mientos	Controles	Absoluto: agua destilada (AGUA)	
		Negativo: Caldo pectina 1% (CALDO)	
	Suspensión producto	Pectinex USPL (PECTINEX)	
	Tratamientos bacterianos	Suspensión en caldo pectina 1% (10 <sup>8</sup> células/mL) (BACTERIA)	



		Extracto enzimático (BACTERIA-E)
Tratamientos fúngicos (levaduras)		Suspensión en caldo pectina 1% (10 <sup>7</sup> células/mL) (HONGO)
		Extracto enzimático (HONGO-E)
Tratamientos fúngicos (filamentosos)		Extracto enzimático (HONGO-E)

- ***Evaluación in vitro de la respuesta germinativa de semillas de maracuyá por efecto de tipo de lavado y acondicionamiento fisiológico***

Cada tres días por un período de 45 días se registró el número de semillas germinadas por tratamiento, teniendo como criterio la protrusión de radícula de 5 a 10 mm de longitud. Con los resultados de número de semillas germinadas por día, se determinaron los siguientes parámetros e índices:

- Capacidad de germinación (CG): Porcentaje de semillas germinadas al final de la evaluación respecto al total de semillas empleadas en la prueba.
- Índice de tasa de germinación (GRI): Velocidad de germinación según el total de semillas germinadas (Gn) en un intervalo de tiempo en días (Tn).

$$GRI = G1/T1 + G2/T2 + G3/T3 + \dots Gn/Tn$$

- Valor pico (VP): Tasa de germinación, expresada como el máximo cociente de la división del número acumulado de semillas germinadas y el número de días.
- Germinación media diaria (MDG): El porcentaje acumulado de semillas germinadas al final del período de prueba, dividido por los días de prueba.
- Valor de germinación (VG): El producto entre el valor pico y el índice de tasa de germinación, un indicativo de velocidad germinativa.

$$VG = MDG * VP$$

- Tasa de germinación R<sub>50</sub>: Indicador de velocidad de germinación según el día en que germina el 50% de las semillas empleadas en la prueba.
- Tasa de germinación R<sub>50</sub>' : Indicador de velocidad de germinación según el día en que germina el 50% de las semillas respecto al total germinado al final de la prueba.

**Análisis de datos**

Por medio del software R Studio versión 3.6.1, se realizó una prueba de ANOVA (p≤0.05) y una prueba *post hoc* de Tukey (p≤0.05) para seleccionar las bacterias y hongos con actividad pectinolítica

significativamente mayor para ser empleadas para prueba de germinación, y para determinar la tendencia en los valores de grados Brix de los frutos del lote. Para analizar el efecto del lavado, los acondicionamientos fisiológicos y su interacción sobre la respuesta germinativa de semillas de maracuyá se usó una prueba de ANOVA de dos vías ( $p \leq 0.05$ ) y una prueba *post hoc* de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para reconocer diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

Por razones de la cuarentena y disposiciones del Gobierno Nacional, la Alcaldía de Bogotá y la PUJ, la prueba de germinación con pectinasas fúngicas y la evaluación de germinación hasta plántula intacta no se realizaron.

## Resultados

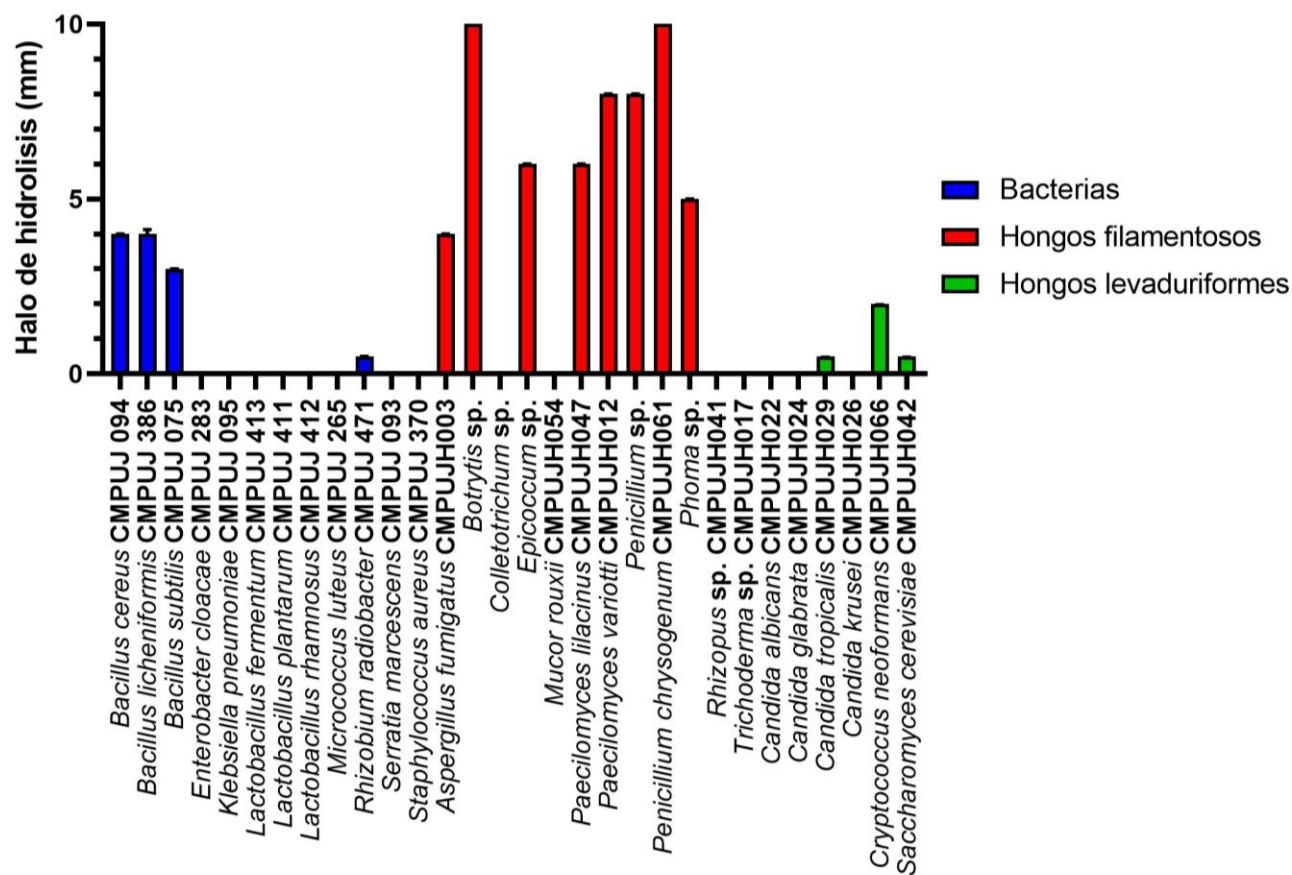
### - *Revisión de literatura de especies bacterianas y fúngicas pectinolíticas*

La búsqueda de literatura reportó especies de 47 géneros bacterianos, en los que se encontraban PGPR como *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Rhizobium* spp., y fitopatógenos como *Dickeya* spp. y *Pectobacterium* spp. Se encontraron reportes de 43 géneros de hongos pectinolíticos, 34 filamentosos, en los que destacaban fitopatógenos como *Botrytis* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp., y 9 levaduras, principalmente *Candida* spp., *Kluyveromyces* spp. y *Pichia* spp. (Material suplementario 1). Se solicitaron al CMPUJ 12 cepas bacterianas y 13 cepas fúngicas (7 filamentosas y 6 levaduriformes). Adicionalmente, se tomaron 5 cepas fúngicas (5 hongos filamentosos) del cepario de UNIDIA (Unidad de Investigaciones Agropecuarias) para la evaluación de actividad pectinolítica semicuantitativa (Material suplementario 2).

### - *Evaluación semicuantitativa de actividad pectinolítica*

Las bacterias que generaron un halo de hidrólisis de mayor tamaño fueron las especies de *Bacillus*: *Bacillus cereus* ( $4 \pm 0.008$  mm), *Bacillus licheniformis* ( $4 \pm 0.13$  mm) y *Bacillus subtilis* ( $3 \pm 0.007$  mm). Los hongos filamentosos que produjeron halos de mayor radio fueron *Botrytis* sp. ( $10 \pm 0.003$  mm), *Epicoccum* sp. ( $6 \pm 0.007$  mm), *Paecilomyces lilacinus* ( $6 \pm 0.004$  mm), *Paecilomyces variotti* ( $8 \pm 0.005$  mm), *Penicillium* sp. ( $8 \pm 0.005$  mm) y *Penicillium chrysogenum* ( $10 \pm 0.005$  mm). Respecto a las levaduras, *Cryptococcus neoformans* generó mayor halo ( $2 \pm 0.001$  mm) (Figura 1). Para el ensayo de cuantificación de actividad pectinolítica, se seleccionaron las cepas de *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Botrytis* sp., *Epicoccum* sp., *P. lilacinus*, *P. variotti*, *Penicillium* sp. y *P. chrysogenum* por presentar la mayor actividad enzimática entre las

cepas evaluadas. No se seleccionó ninguna levadura debido a que mostraron baja actividad pectinolítica respecto a los otros microorganismos.



**Microorganismos seleccionados para la evaluación enzimática**

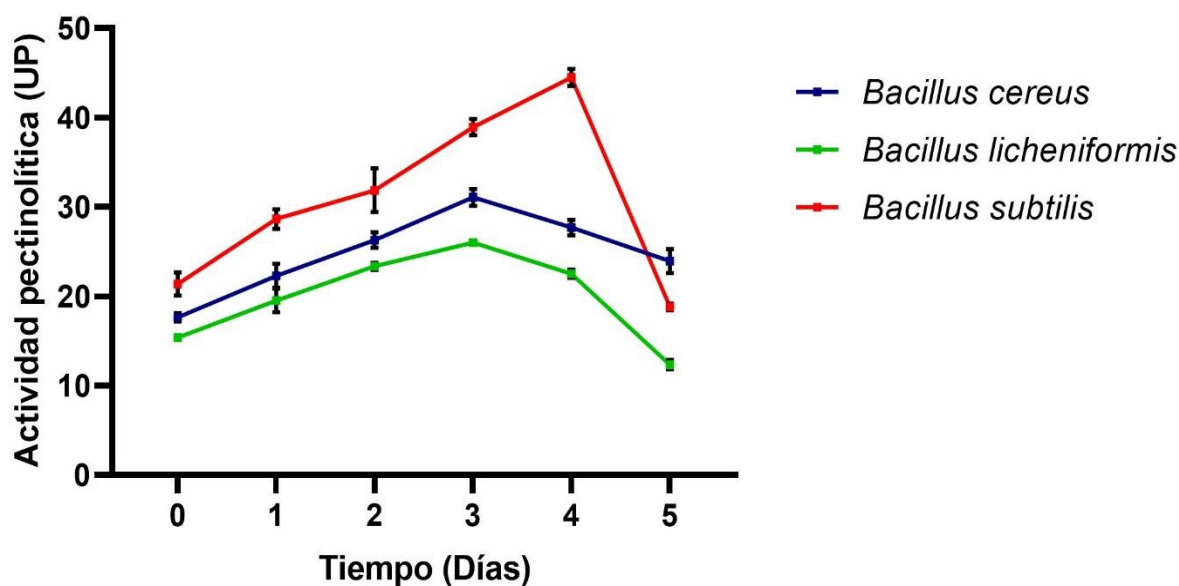
Figura 1. Evaluación semicuantitativa de actividad pectinolítica de cepas microbianas entregadas por el CMPUJ en medio pectina 1% - carragenina.

- **Evaluación cuantitativa de actividad pectinolítica**

En el ensayo de cuantificación de actividad pectinolítica bacteriana, la prueba de ANOVA mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en los valores de unidades pectinolíticas de bacterias y hongos (Material suplementario 3). Se observaron diferencias significativas en los valores iniciales de actividad pectinolítica del día 0, que podría atribuirse a inducción de producción de pectinasas previa a la inoculación. Al final del período de evaluación, según la prueba *post hoc* de Tukey, las bacterias que produjeron significativamente mayor cantidad de pectinasas fueron *B. cereus* en el día 3 ( $31.07 \pm 0.95$  UP) y *B. subtilis* el día 4 ( $44.48 \pm 0.97$  UP), mientras *B. licheniformis* obtuvo los menores valores ( $26.03 \pm 0.21$  UP). Respecto a las especies fúngicas, *Botrytis* sp. ( $464.05 \pm 4.55$  UP) y *P. variotti* ( $307.97 \pm 0.61$  UP) sintetizaron significativamente más pectinasas que los otros

hongos, alcanzando en el día 5 y el día 3, respectivamente, su máxima actividad pectinolítica, seguido por *Epicoccum* sp. ( $231.00 \pm 0.94$  UP) y *P. chrysogenum* ( $214.65 \pm 1.73$  UP), que no presentaron diferencias significativas en su producción enzimática máxima, conseguida el día 3, mientras, que *P. lilacinus* ( $192.50 \pm 0.20$  UP) y *Penicillium* sp. ( $158.16 \pm 0.67$  UP) produjeron la menor cantidad de pectinasas. *P. lilacinus* y *Penicillium* sp. alcanzaron su máxima producción el día 4 y el día 7 respectivamente (Figura 2 y Material suplementario 4). Por lo cual, se escogió a *B. cereus*, *B. subtilis*, *Botrytis* sp. y *P. variotti* como los microorganismos cuyas pectinasas serían evaluadas como posibles promotores de la germinación del maracuyá.

**A**



**B**

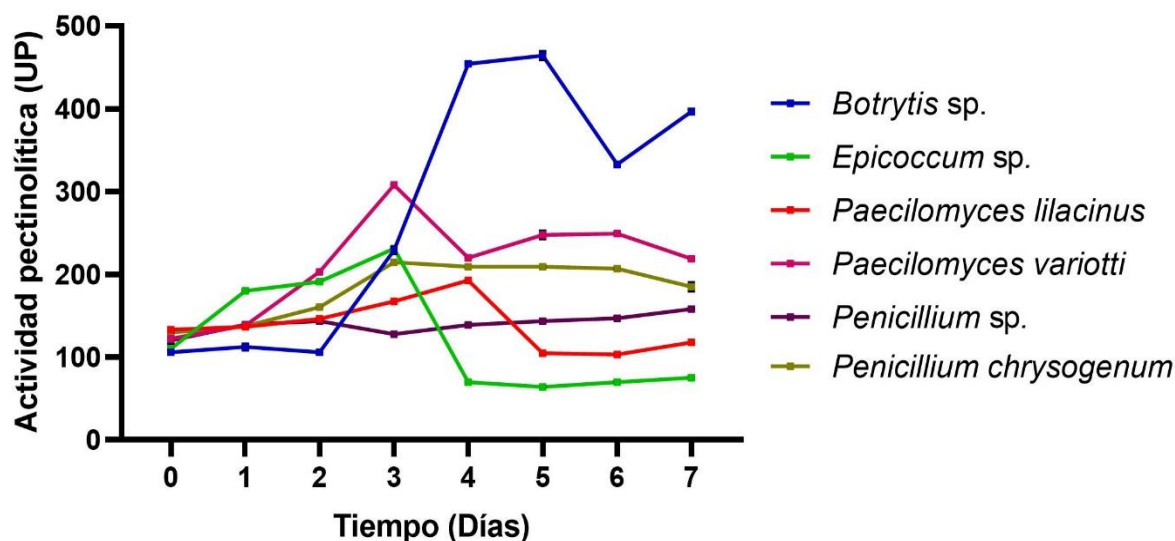


Figura 2. Actividad pectinolítica de los microorganismos seleccionados. Actividad pectinolítica bacteriana: *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis* (A). Actividad pectinolítica fúngica: *Botrytis* sp., *Epicoccum* sp., *P. lilacinus*, *P. variotti*, *Penicillium* sp. y *P. chrysogenum* (B).

- **Caracterización morfo-fisiológica de frutos de maracuyá**

Los resultados correspondientes a los parámetros morfo-fisiológicos se muestran en la Tabla 2. Los frutos de maracuyá presentaron diámetro polar promedio de 110.08±11.56 mm y diámetro ecuatorial promedio de 89.62±7.20 mm. El peso fresco promedio del fruto fue de 250.46±53.96 g, el peso promedio de la pulpa de 107.94±34.96 y el peso promedio de la cáscara de 143.82±34.82 g. El grosor de la cáscara fue de 8.44±2.18 mm en promedio. El color de los frutos varió desde verde (115 escala Pantone) hasta amarillo (121 escala Pantone), y el de la pulpa, desde amarillo (136 escala Pantone) hasta naranja (150-158 escala Pantone), siendo el amarillo y el naranja, respectivamente, los colores predominantes en los frutos (Material suplementario 5). En promedio cada fruto contenía 381±112.35 semillas. El promedio de grados Brix fue de 12.22±2.77°Brix. Para la prueba de germinación *in vitro*, se seleccionaron las semillas con contenido de humedad entre 8 a 10%, procedentes de los frutos con 12 a 15°Brix (Jaramillo *et al.* 2009)

Tabla 2. Parámetros morfo-fisiológicos de frutos de maracuyá.

	Diámetro polar (mm)	Diámetro ecuatorial (mm)	Peso fruto (g)	Color fruto (escala Pantone)	Grosor cáscara (mm)	Peso cáscara (g)	Peso pulpa (g)	Color pulpa (escala Pantone)	Número de semillas	Sólidos solubles totales (°Brix)
Promedio	110.08	89.62	250.5	-	8.44	143.82 (57%)	107.94 (43%)	-	381	12.22
Valor máximo	144.25	119.28	456.6	Amarillo (121) 24.8%	15.39	251.93 (55%)	221.79 (48%)	Naranja claro (150) 18.8%	584	15
Valor mínimo	80.6	71.79	146.5	Verde claro (379) 0.99%	4.78	74.19 (50%)	10.41 (7%)	Amarillo pálido (123) 0.99%	72	4

- **Respuesta germinativa de semillas de maracuyá por efecto de tipo de lavado y acondicionamiento fisiológico**

Se presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) por efecto de los factores evaluados: tipo de lavado, acondicionamiento fisiológico y la interacción tipo de lavado\*acondicionamiento fisiológico para CG, GRI, VP, MDG, VG, R<sub>50</sub>' (Tabla 3). La prueba de ANOVA indicó que el lavado fue el factor que tuvo mayor influencia en VG. El factor acondicionamiento tuvo más

influencia en  $R_{50}'$ , y la interacción tipo de lavado y acondicionamiento fisiológico fue la que más influyó en los índices CG, GRI, VP y MDG (Tabla 3). El efecto de los tratamientos sobre la germinación se debe principalmente a la interacción entre los factores (Tabla 3). Las semillas sometidas a LAVADO-P (con Pectinex USPL) presentaron los valores más altos en CG, GRI, VP, MDG, VG (Tabla 4). El acondicionamiento fisiológico P-CALDO influyó significativamente valores más altos de CG, GRI, VP, MDG y VG, mientras en  $R_{50}'$  los acondicionamientos que promovieron los valores más altos fueron BCEREUS y BCEREUS-E (Tabla 4). Por lo tanto, el tratamiento P-CALDO fue el que más favoreció la germinación de maracuyá, mostrando estadísticamente mayor número de semillas germinadas a mayor velocidad (Figura 3, Figura 4a y 4b). No hubo diferencias significativas en la  $R_{50}'$  por efecto de los lavados, y tampoco por los acondicionamientos, a excepción de P-PECTINEX y P-BSUBTILIS, que registraron valores estadísticamente más bajos, sin diferencias significativas entre ellos (Tabla 4). Ninguno de los tratamientos influyó CG de semillas de maracuyá mayor a 50%, por lo que la  $R_{50}$  no fue calculada.

Tabla 3. Resultados del error de media de cuadrados de la prueba de ANOVA para índices de respuesta germinativa de acuerdo con el tipo de lavado y al acondicionamiento fisiológico.

Fuente de variación	Grados de libertad	CG	GRI	VP	MDG	VG	$R_{50}'$
Tipo de lavado	1	546.88***	60.646***	0.499***	0.270 ***	0.787***	103.88**
Acondicionamiento fisiológico	6	520.79***	57.878***	0.568***	0.257***	0.697***	126.83***
Tipo de lavado*Acondicionamiento	13	560.17***	62.262***	0.644***	0.276 ***	0.715***	125.06***
Promedio	-	7.1964	2.3974	0.2573	0.1602	0.1357	13.09
CV	-	1.6108	1.6108	1.5210	1.6108	3.1394	0.4159

\*\*\* =  $p \leq 0.001$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \* =  $p \leq 0.05$ .

Tabla 4. Resultado de la prueba *post hoc* de Tukey entre los niveles de factor de tipo de lavado y acondicionamiento fisiológico.

Factor de diseño	Nivel de factor de diseño	CG	GRI	VP	MDG	VG	$R_{50}'$
Tipo de lavado	LAVADO-A	4.071 <sup>b</sup>	1.357 <sup>b</sup>	0.163 <sup>b</sup>	0.091 <sup>b</sup>	0.017 <sup>b</sup>	14.453 <sup>a</sup>
	LAVADO-P	10.321 <sup>a</sup>	3.438 <sup>a</sup>	0.352 <sup>a</sup>	0.229 <sup>a</sup>	0.254 <sup>a</sup>	11.729 <sup>a</sup>
Acondicionamiento fisiológico	AGUA	4.000 <sup>bc</sup>	1.333 <sup>bc</sup>	0.164 <sup>c</sup>	0.089 <sup>bc</sup>	0.020 <sup>b</sup>	14.100 <sup>ab</sup>
	PECTINEX	3.000 <sup>c</sup>	0.999 <sup>c</sup>	0.125 <sup>c</sup>	0.067 <sup>c</sup>	0.014 <sup>b</sup>	8.625 <sup>bc</sup>
	CALDO	24.875 <sup>a</sup>	8.291 <sup>a</sup>	0.814 <sup>a</sup>	0.553 <sup>a</sup>	0.803 <sup>a</sup>	14.831 <sup>ab</sup>

BCEREUS	4.750 <sup>bc</sup>	1.580 <sup>bc</sup>	0.144 <sup>c</sup>	0.105 <sup>bc</sup>	0.016 <sup>b</sup>	17.719 <sup>a</sup>
BCEREUS-E	4.875 <sup>bc</sup>	1.620 <sup>bc</sup>	0.125 <sup>c</sup>	0.110 <sup>bc</sup>	0.016 <sup>b</sup>	17.656 <sup>a</sup>
BSUBTILIS	1.000 <sup>c</sup>	0.334 <sup>c</sup>	0.046 <sup>c</sup>	0.023 <sup>c</sup>	0.003 <sup>b</sup>	5.344 <sup>c</sup>
BSUBTILIS-E	7.875 <sup>b</sup>	2.625 <sup>b</sup>	0.383 <sup>b</sup>	0.176 <sup>b</sup>	0.078 <sup>b</sup>	13.361 <sup>ab</sup>

Letras diferentes indican diferencia significativa.

La Figura 3 muestra que la CG de semillas de maracuyá en ninguno de los tratamientos de LAVADO-A superó el 10%, siendo A-PECTINEX el que mayor CG tuvo, 5.75%, sin mostrar diferencias significativas respecto a los otros tratamientos de LAVADO-A, mientras que en LAVADO-P, dos tratamientos mostraron germinación superior al 10%: P-CALDO (46.5%) y P-BSUBTILIS-E (11%), siendo P-CALDO significativamente mayor al resto de tratamientos. Sin embargo, P-BSUBTILIS-E a pesar de tener el segundo mayor porcentaje, no fue estadísticamente diferente a P-BCEREUS (6.25%), P-BCEREUS-E (4.75%), A-AGUA (4.5%), A-PECTINEX (5.75%), A-BCEREUS-E (5%) y A-BSUBTILIS-E (4.75%). P-CALDO inició su fase logarítmica 6 días después de siembra (DDS) y finalizó 21 DDS, 15 días después, alcanzando CG de 40%, y dando inicio a la fase estacionaria. Durante su fase estacionaria, P-CALDO alcanzó 39 DDS su máxima CG. Por otro lado, las semillas de P-BSUBTILIS-E comenzaron a germinar 9 DDS. Su fase logarítmica duró 12 días, terminado 21 DDS, donde alcanzó CG de 10%. En P-BSUBTILIS-E, 33 DDS, alcanzó su CG máxima durante su fase estacionaria. Ninguno de los tratamientos germinó después de 9 DDS. Los valores de CG más bajos, menores a 0.5%, correspondieron a P-PECTINEX y P-BSUBTILIS. En los dos lavados, la CG del inóculo de *B. cereus* superó la de *B. subtilis*, sin diferencias significativas. P-CALDO, en todos los índices, fue estadísticamente mayor a los otros tratamientos, con excepción del índice  $R_{50}'$ , en el que no se evidenció diferencias estadísticas entre los tratamientos, excepto por P-PECTINEX y P-BSUBTILIS que mostraron los menores valores (Figura 4a y 4b y Material suplementario 7).

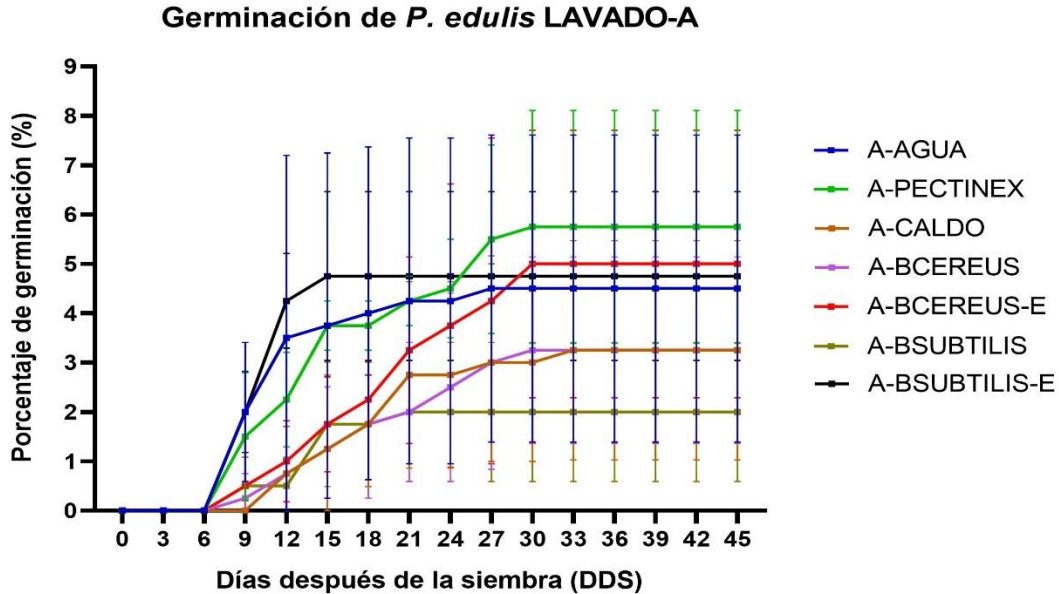
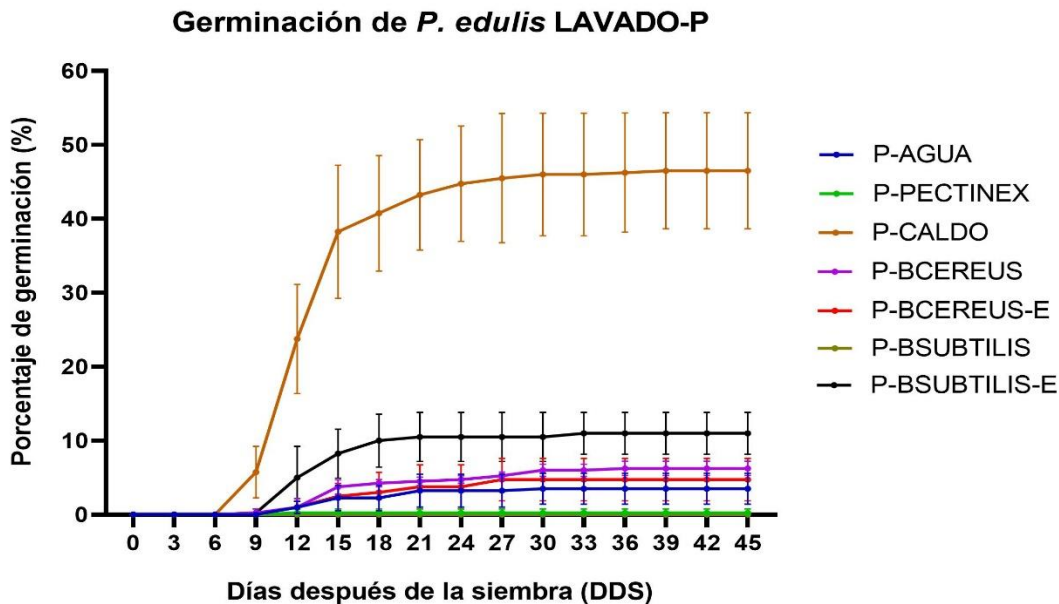
**A****B**

Figura 3. Curvas de germinación por efecto del tipo de lavado y de acondicionamientos fisiológicos sobre la capacidad de germinación de semillas de maracuyá. Porcentaje de semillas germinadas lavadas con agua (A) y con Pectinex USPL (B), bajo el efecto de los acondicionamientos fisiológicos con agua (-AGUA), Pectinex USPL (-PECTINEX), caldo pectina 1% (-CALDO), inóculo de *B. cereus* (-BCEREUS) y *B. subtilis* (-BSUBTILIS), enzima de *B. cereus* (-BCEREUS-E) y enzima de *B. subtilis* (-BSUBTILIS-E).

Se repitió la prueba estadística, excluyendo el tratamiento P-CALDO para determinar si había diferencias significativas en la respuesta germinativa por las bacterias y sus pectinasas en



ausencia de este tratamiento (Figura 4a y 4b). No se evidenciaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) por el factor tipo de lavado en la mayoría de índices, mientras que el factor acondicionamiento fisiológico y la interacción entre factores favorecieron significativamente CG, GRI, VP, MDG, VG,  $R_{50}'$ . El acondicionamiento fue el factor que tuvo mayor influencia en la CG, GRI, VP, MDG, VG,  $R_{50}'$ ; seguido por la interacción. El LAVADO-A tuvo mayor influencia en  $R_{50}'$ . El acondicionamiento P-BSUBTILIS-E favoreció mayor CG, GRI, VP, MDG, VG, mientras que el inóculo con *B. cereus* favoreció valores más altos de  $R_{50}'$ . La CG fue significativamente mayor en P-BSUBTILIS-E (11%) con respecto a otros tratamientos, excepto a P-BCEREUS (6.25%). Los resultados de GRI y MDG mostraron la misma tendencia que CG, lo indica que P-BSUBTILIS-E y P-BCEREUS incrementaron la velocidad de germinación de semillas por día. El VP indicó que P-BSUBTILIS-E y A-BSUBTILIS-E, generaron la mayor tasa de germinación de semillas sin mostrar diferencias significativas entre ellos, pero siendo P-BSUBTILIS-E significativamente mayor a los otros tratamientos. El VG mostró que P-BSUBTILIS-E generó germinación significativamente más rápida que los otros tratamientos. Con excepción de las semillas sometidas a los tratamientos P-PECTINEX y P-BSUBTILIS, que no mostraron respuesta germinativa de semillas, no hubo diferencias significativas en la  $R_{50}'$  de los tratamientos. La prueba fue repetida con los inóculos y las enzimas de ambas bacterias para comparar el efecto de las cepas de *Bacillus* sobre la respuesta germinativa de las semillas. El LAVADO-P y P-BSUBTILIS-E fueron el lavado y acondicionamiento respectivamente, que tuvieron mayor influencia en la germinación de semillas de maracuyá. Los resultados de CG, MDG y VP no variaron respecto a la prueba sin P-CALDO, por lo que las semillas sometidas al tratamiento P-BSUBTILIS-E mostró los valores más altos. La GRI y VG indicaron que P-BSUBTILIS-E aumenta significativamente la velocidad de germinación de las semillas. Las pectinasas bacterianas no generaron diferencias significativas en la  $R_{50}'$ . El inóculo con *B. subtilis* redujo significativamente la respuesta germinativa de las semillas de maracuyá. El efecto de *B. cereus* sobre la germinación de semillas correspondió principalmente a la interacción lavado-acondicionamiento, sin generar diferencias significativas entre las semillas bajo los tratamientos, mientras que los resultados de *B. subtilis* sobre la germinación en las semillas de maracuyá se debieron a la acción del acondicionamiento por parte del inóculo y del extracto enzimático, y no por el lavado o la interacción entre los factores (Figura 4a y 4b).

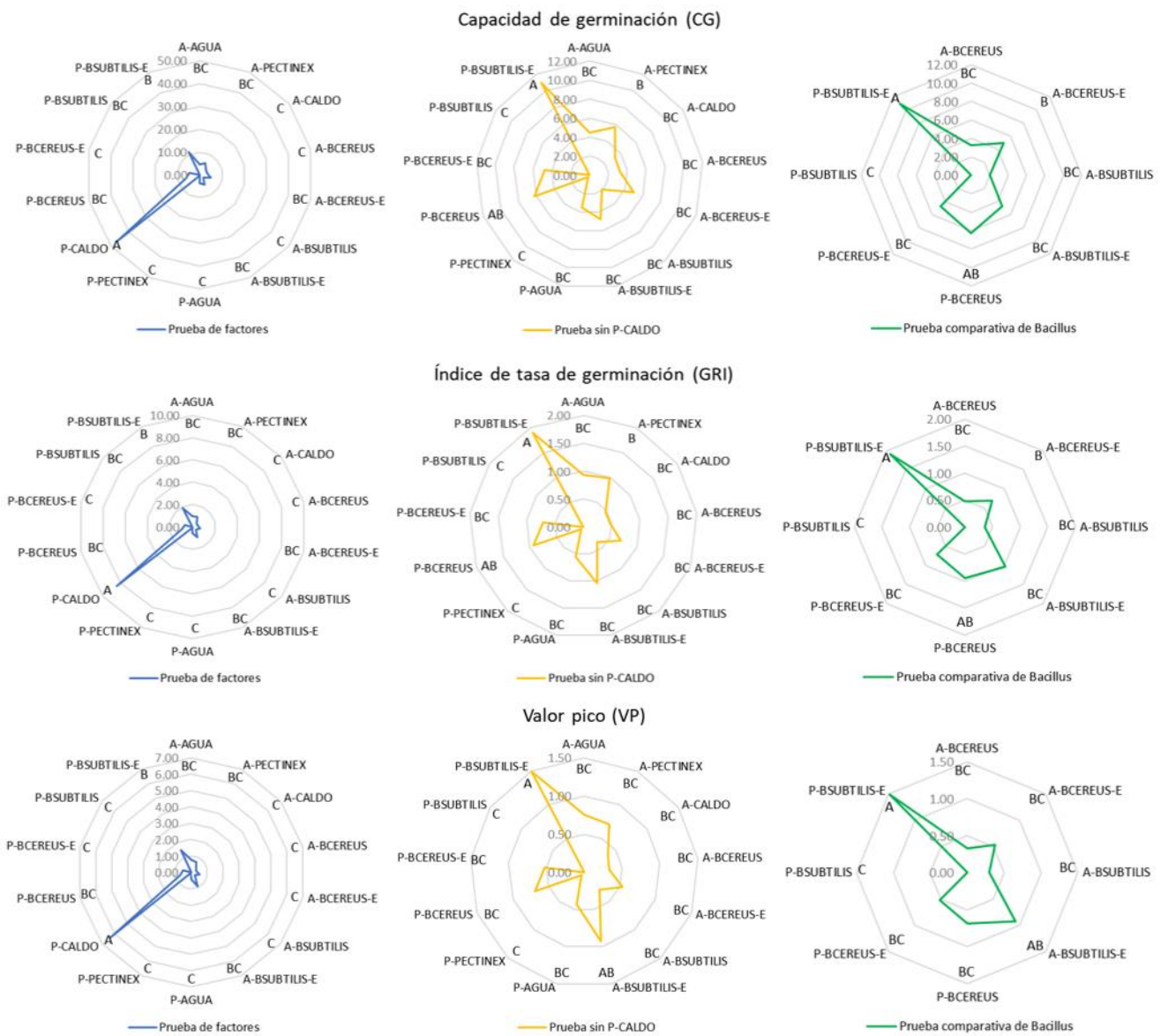


Figura 4a. Índices de respuesta germinativa: CG, GRI y VP de semillas de maracuyá por efecto de los tratamientos aplicados.

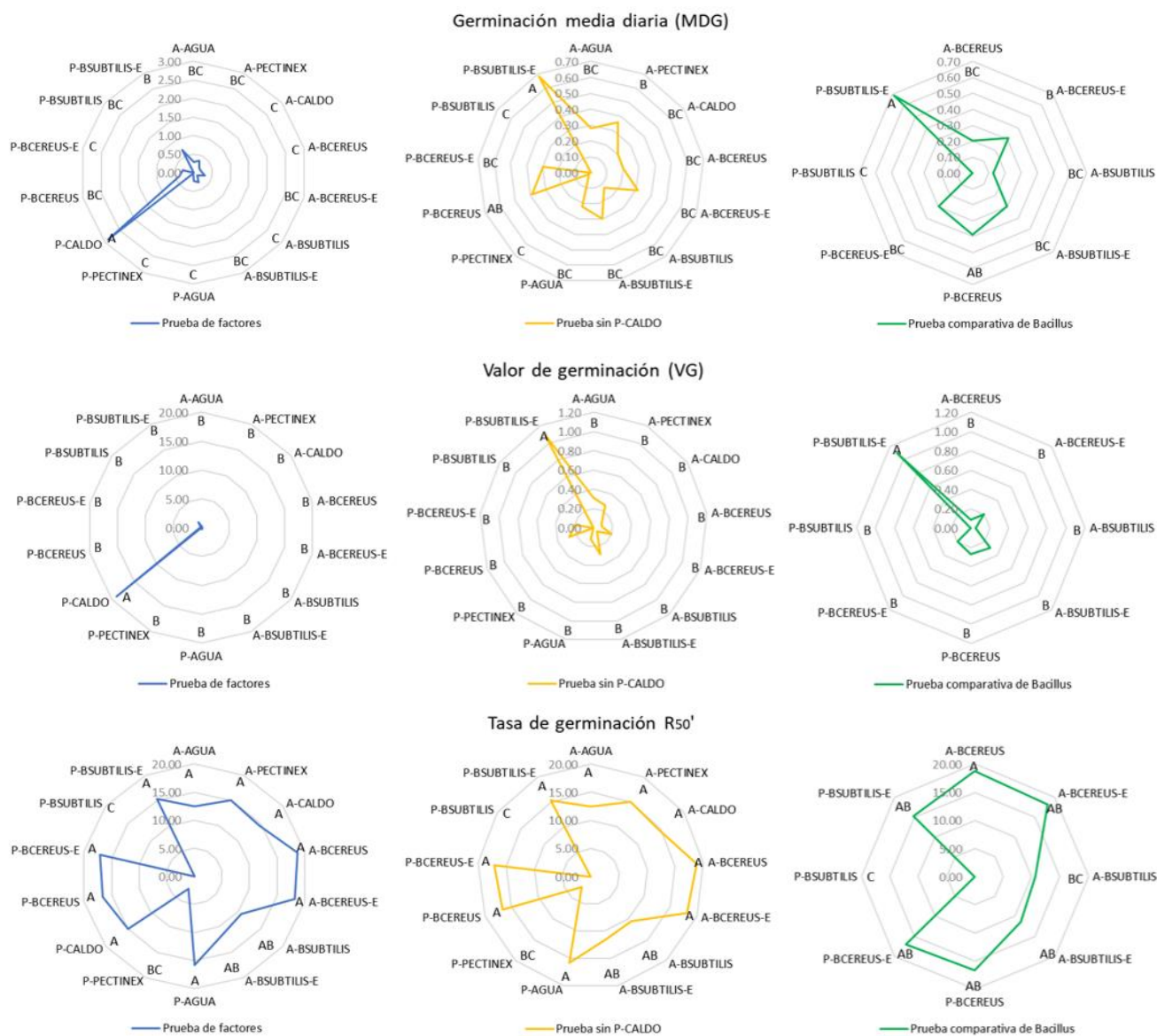


Figura 4b. Índices de respuesta germinativa: MDG, VG y  $R_{50}'$  de semillas de maracuyá por efecto de los tratamientos aplicados.

## Discusión

La baja actividad de las cepas empleadas en la evaluación de semicuantitativa de actividad pectinolítica pudo deberse a que las cepas entregadas por el CMPUJ, al provenir de un banco de conservación, pudieron haber perdido o tener atenuada su capacidad de producir pectinasas, a pesar de estar en un medio que indujera la producción de pectinasas, posiblemente por la aparición de mutaciones durante el proceso de transferencia seriada (pases celulares) en las que el microorganismo se adaptó a las condiciones de cultivo de conservación, lo que repercutió en que no hubo inducción de la actividad

pectinolítica (Henaó *et al.* 2006, Pinzón *et al.* 2009). Las tres especies de *Bacillus* están reportadas como microorganismos empleados en distintas industrias por su alta capacidad de producción de pectinasas (Venkatanagaraju y Divakar 2017), siendo *B. subtilis* el mayor productor de pectinasas en distintos trabajos de comparación de producción de enzimas pectinolíticas entre especies de *Bacillus* (Ouattara *et al.* 2011, Oumer y Abate 2018). *Bacillus* mostró mayor actividad comparado con *Rhizobium radiobacter*. Esta reportado que algunas especies de *Bacillus* tienen la capacidad para reproducirse con mayor velocidad en sustratos vegetales respecto a *Rhizobium* spp., como lo demuestra el trabajo de Sudto y colaboradores en 2008, donde, se evidencio que, en distintos desechos vegetales de origen agrícola, *B. subtilis* creció más rápido que *Rhizobium* sp., lo cual podría implicar, que para degradar el material vegetal y desarrollarse, *B. subtilis* produce pectinasas y otras enzimas hidrolíticas, en mayor concentración que *Rhizobium* sp.

Los reportes de *Botrytis* spp., *Paecilomyces* spp. y *Penicillium* spp. catalogan a estos hongos como fitopatógenos y *Epicoccum* spp. como patógeno secundario (Valdez *et al.* 2009, Benomari *et al.* 2018, Braga *et al.* 2018, Heidarian *et al.* 2018, Coutinho *et al.* 2020), que emplean pectinasas para invadir al hospedero. La alta actividad enzimática de *Botrytis* sp. podría deberse a su capacidad de sintetizar amplia variedad de enzimas degradadoras de los componentes de los tejidos vegetales: celulosa, hemicelulosa, pectina, etc; como celulasas y distintos tipos de pectinasas: poligalacturonasas, pectin liasas y pectin metil esterases, entre otras (Hwi-Geon *et al.* 2017, Hu *et al.* 2018, Kamaruzzaman *et al.* 2020), lo que lo ha posicionado como el segundo hongo fitopatógeno más perjudicial en diferentes cultivos en más de 200 especies vegetales (Shah *et al.* 2009, AbuQamar *et al.* 2017). *P. variotti* tuvo la mayor actividad pectinolítica, después de *Botrytis* sp., lo que es consistente con el trabajo de Patil *et al.* (2012), donde se aislaron microorganismos de desechos vegetales ricos en pectina, y *P. variotti* mostró mayor actividad pectinolítica respecto a aislamientos de los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus* y bacterias y levaduras.

Respecto a los frutos de maracuyá, según Fonseca y colaboradores en 2017 para Pasifloras: 50 a 150 mm de diámetro polar y 50 a 100 mm de diámetro ecuatorial; el tamaño de los frutos del lote se encuentra en el promedio, mientras, que Casaca *et al.* (2005) sugiere que el promedio del diámetro polar es 60 a 80 mm, y el del diámetro ecuatorial de 40 a 80 mm. Castro *et al.* (2009) proponen que el promedio del diámetro polar es 60 a 120 mm y del diámetro ecuatorial es 60 a 70 mm, por lo que los frutos del lote, en promedio, son grandes. Para Casaca *et al.* (2005) y Castro *et al.* (2009), un fruto de buena calidad comercial debe tener peso mayor a 130 g y contenido de pulpa mayor al 33% y de color amarillo, lo cual

es similar a los resultados de este trabajo. El número de semillas de los frutos del lote fue mayor al valor promedio reportado para maracuyá: 250-300 semillas (Casaca *et al.* 2005, Jaramillo *et al.* 2009), y según Castro *et al.* (2009) 350 semillas. Los frutos de maracuyá son comercialmente maduros cuando su contenido de sólidos solubles totales es de 13 a 18°Brix, y de acidez titulable total de 17 a 35 mg ácido ascórbico / 100 g de pulpa (Casaca *et al.* 2005, Castro *et al.* 2009). En contraste, Jaramillo *et al.* (2009) proponen que frutos con 12°Brix y 20 mg ácido ascórbico / 100 g son considerados comercialmente maduros y con calidad para emplearse en mercados. El valor de sólidos solubles totales (°Brix) y acidez titulable total (mg ácido ascórbico / 100 g pulpa) se consideran indicadores de maduración del fruto ya que la concentración de azúcares como sacarosa en el fruto (sólidos solubles) aumenta a medida que el fruto madura; así, concomitantemente, la concentración de ácidos orgánicos en el fruto disminuye al ser empleados como sustratos energéticos y convertidos a carbohidratos (Kishore *et al.* 2011, Moreno y Deaquiz 2016, Fischer *et al.* 2018). Por lo que los frutos del lote evaluado, al tener promedio de 12.22°Brix, cumplen con calidad comercial. Respecto a las semillas, según Kundu y colaboradores en 2020 en semillas ortodoxas, como las semillas de *Passiflora*, existe una correlación entre el grado de maduración y el contenido de humedad, en el que semillas maduras tienen menor contenido de humedad respecto a semillas inmaduras, por lo que el contenido de humedad alcanzado por las semillas durante el período de secado pudo haber contribuido al proceso de maduración de las semillas y a su capacidad para germinar (Mendiondo y Amela 2009, Newton *et al.* 2013, Li *et al.* 2018). Los parámetros evaluados en la caracterización morfo-fisiológica indican que, a pesar de provenir del mismo lote y tener la misma edad de cultivo, había diferencias entre los grados Brix de los frutos del lote (Material suplementario 6). Esto implica que los frutos o las plantas madre, en el cultivo, podrían haber estado expuestos a condiciones ambientales y biológicas que incidieron en la madurez del fruto, y en los valores de grados Brix (Zoecklein *et al.* 2010, Fischer *et al.* 2018, Ndukwe y Baiyer 2019), debido a que la planta madre regula genéticamente muchos mecanismos relacionados con el tiempo de maduración del fruto, y con dormancia, en el caso de las semillas (dos Santos *et al.* 2015, de Luna Souto *et al.* 2017), adicionalmente, en su trabajo, Chavarria-Perez *et al.* (2020) menciona que el genotipo en individuos del género *Passiflora*, como *Passiflora alata*, difiere según las condiciones ambientales, el lugar de cultivo y el tiempo de cosecha, generando variación en distintos atributos morfofisiológicos de los frutos de *Passiflora alata*, como: peso del fruto, longitud y diámetro del fruto, cantidad de pulpa y grados Brix, entre otros. Las diferencias en los valores de grados Brix de los frutos del lote también pudieron deberse a variaciones genéticas entre las plantas madre que incidieron en la maduración de los frutos, lo que a su vez repercute en la calidad genética de las semillas y su maduración, debido a que la maduración del fruto es un proceso

que influye en la maduración de las semillas (Pinzón *et al.* 2007, Escobar 2011). Por lo tanto, la calidad genética de la planta madre afecta la calidad genética de la semilla, incidiendo en el proceso de maduración de la semilla, a partir de la que se producirá la planta madre. La madurez de la semilla está determinada por su valor de peso seco y su contenido de humedad, la cual alcanza el máximo valor de peso seco cuando ha madurado, influyendo en la dormancia de la semilla y su capacidad para germinar y producir plantas de adecuada calidad que en la etapa de fructificación producirán frutos (dos Santos *et al.* 2015, Fischer *et al.* 2018, Kundu *et al.* 2020).

Los resultados de las pruebas de germinación indican que el factor lavado tuvo un efecto promotor en la CG por el lavado con Pectinex USPL. Este producto a base de pectinasas, según su ficha técnica y Cabrera y colaboradores en 1997, tiene actividad poligalacturonasa, una de las principales enzimas degradadoras de la pectina (Rajulapati *et al.* 2018). Por lo que, las poligalacturonasas junto con otras pectinasas, podrían haber degradado la pectina de la testa y reducir su rigidez estructural, facilitando la ruptura de la testa y, concomitantemente, la protrusión de la radícula, favoreciendo la germinación (Yambe y Takeno 1992, Wojtasik *et al.* 2016). La influencia en la CG por el acondicionamiento con caldo podría deberse a que el ácido D-galacturónico pudo actuar como una fuente de carbono adicional a la principal fuente energética otorgada por las reservas de carbohidratos que son usadas en el proceso de germinación (Doria 2010). Otros trabajos de germinación con *Passiflora edulis*, en los que evaluaban diferentes métodos de acondicionamiento fisiológico para promover la germinación, determinaron que tratamientos pre-germinativos de imbibición con glucosa 10%, suministraban a las semillas una fuente de energía suplementaria a la requerida para las reacciones metabólicas de germinación y desarrollo de la radícula (Mabundza *et al.* 2010, Ghosh *et al.* 2017), y favorecían la germinación respecto a otros tratamientos, como escarificación química con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a diferentes tiempos. Está reportado que las plantas podrían emplear el ácido D-galacturónico como fuente de carbono para producir energía para el crecimiento y desarrollo (Richard y Hilditch 2009), además pueden oxidar el ácido D-galacturónico a galactarato, que es metabolizado y convertido en ácido ascórbico (Gallie 2013, Venkatesh 2014). El ácido ascórbico, en plantas, es un metabolito precursor de reacciones del metabolismo primario y está encargado de la regulación de la división celular, por lo que ha mostrado actividad promotora del crecimiento vegetal. Por lo tanto, el ácido D-galacturónico del medio de cultivo, podría haber sido utilizado como fuente de carbono y/o metabolizado a ácido ascórbico, y empleado en la etapa de fosforilación oxidativa de la respiración aerobia para suplir el alto requerimiento energético para el crecimiento del embrión con el subsecuente desarrollo de la radícula durante la germinación.

El efecto de la interacción entre el lavado y el acondicionamiento fue el que más influenció la respuesta germinativa de semillas de maracuyá. Por lo que la aplicación conjunta del lavado con Pectinex USPL, al degradar la pectina de la cubierta seminal, y el acondicionamiento con ácido D-galacturónico y con pectinasas de *B. subtilis*, en P-CALDO y en P-BSUBTILIS-E, respectivamente, fueron los que promovieron la germinación de semillas de maracuyá. En contraste, la baja CG de las semillas de maracuyá en la mayoría de los tratamientos de la prueba *in vitro* podría deberse a que los tratamientos no conllevaron a reducir el efecto inhibitorio de la dormancia presente en semillas de *Passiflora* spp. sobre la CG (Carranza *et al.* 2016). Los valores más altos de CG de P-CALDO comparado con A-CALDO podría deberse a que las pectinasas del Pectinex USPL fueron más eficaces en la remoción del arilo y de compuestos inhibidores presentes en él, y de haber degradado la pectina que conforma la lámina media y la pared secundaria de la pared celular de la testa, haciéndola más delgada y disminuyendo su rigidez, lo que, al mismo tiempo, facilitaría la entrada de agua y del oxígeno a la semilla y la reactivación de los procesos metabólicos (Yambe y Takeno 1992, Adkins *et al.* 2002, Mendiondo y Amela 2009, Doria 2010, Walitang *et al.* 2017).

En las curvas de germinación, la fase logarítmica de P-CALDO indica que el efecto del lavado y el acondicionamiento no favorece un inicio temprano de la germinación, debido a que las semillas de maracuyá sometidas a otros tratamientos germinaron a partir de 6 DDS. Sin embargo, P-CALDO favorece valores altos de CG, que podrían deberse al aporte energético del caldo pectina hacia el desarrollo y elongación de la radícula, y al lavado que favorece la protrusión de la radícula al reducir la rigidez de la testa. Por lo tanto, el Pectinex USPL podría haber contribuido a reducir la restricción por dormancia química, mecánica y física, y el ácido D-galacturónico del medio de cultivo, podría haber sido usado como fuente de carbono y/o metabolizado a ácido ascórbico, empleado en la etapa de fosforilación oxidativa de la respiración aerobia para suplir el alto requerimiento energético que conlleva el desarrollo del embrión y protrusión de la radícula durante la germinación, e incrementando el número de semillas germinadas y su velocidad de germinación. Las semillas sometidas a P-SUBTILIS-E iniciaron la germinación 3 días después de P-CALDO. En este trabajo, las semillas iniciaron el proceso de germinación entre 6 y 9 DDS. Está reportado que las semillas de maracuyá según las condiciones ambientales y la influencia de la dormancia pueden tardar en germinar desde diez días hasta un mes, e incluso tres meses (Brugnara *et al.* 2018, Colombo *et al.* 2019). La similitud en los períodos de inicio del proceso de germinación podría deberse a factores moleculares implicados en la regulación del inicio de germinación (Cabin *et al.* 1997, Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006, Holdsworth *et al.* 2008, de Luna

Souto *et al.* 2017), y no por efecto de los tratamientos, al no evidenciarse heterogeneidad en el inicio de la fase logarítmica en las curvas de germinación.

En el caso de P-BSUBTILIS-E, su diferencia respecto a P-BCEREUS-E pudo ser por diferencias funcionales en el coctel enzimático específico de cada bacteria, y que pudieron haber degradado de forma diferente la pectina. Por ejemplo, en el trabajo de Ouattara y colaboradores en 2011, que buscaba entre seis especies de *Bacillus*, incluidas *B. subtilis* y *B. cereus*, las que produjeran mayor cantidad de un tipo de pectinasas, las pectato liasas, bajo un mismo sustrato (cocoa), seleccionó a *B. subtilis* como el segundo mayor productor de la enzima, mientras que *B. cereus* fue considerado como un productor pobre. Ambos *Bacillus* están reportados como productores de poligalacturonasas, una de las enzimas más empleadas por fitopatógenos para degradar la pectina de los tejidos del hospedero vegetal (Swain y Ray 2010, Kumar y Suneetha 2016, Kohli *et al.* 2017), además, el género *Bacillus*, ha mostrado la capacidad de producir pectin metilesterasas en sustratos vegetales, como cocoa (Ouattara *et al.* 2008). Las pectato liasas, las poligalacturonasas y las pectin metilesterasas son las principales depolimerizadoras de la pectina (Gophane *et al.* 2016 y Rajulapati *et al.* 2018), por lo que el efecto de P-BSUBTILIS-E en la germinación pudo deberse a una alta degradación de la pectina por el efecto conjunto del lavado con Pectinex USPL y de la exposición a las enzimas bacterianas, que facilitó la protrusión de la radícula al reducir el efecto de la dormancia mecánica sobre la germinación, adicionalmente, los resultados del valor pico podrían indicar que las pectinasas de *B. subtilis* pudieron contribuir a una germinación homogénea y sincronizada en P-BSUBTILIS-E y A-BSUBTILIS-E. Según los valores de  $R_{50}$ , estas pectinasas, no incrementan la velocidad a la que las semillas alcanzan el 50% de su germinación total, aunque aumentan el número de semillas que germinan, si son previamente lavadas con Pectinex USPL.

Las semillas sometidas al inóculo de *B. cereus* alcanzaron los mayores valores de germinación respecto a *B. subtilis*. Este resultado pudo deberse a la capacidad de estas cepas de *Bacillus* para producir auxinas, *B. cereus* y *B. subtilis* están reportados como productores de auxinas en medios con presencia y ausencia de triptófano (Khan *et al.* 2017, Wagi y Ahmed 2019, Tang *et al.* 2020). Las auxinas son moléculas reguladoras del crecimiento y desarrollo vegetal, que han mostrado la capacidad de promover el desarrollo vegetal y disminuir el tiempo requerido de germinación (Khalaf y Raizada 2016). *B. cereus* produce auxinas en mayor cantidad que *B. subtilis* (Wagi y Ahmed 2019), por lo tanto, el medio de cultivo al tener fuente de triptófano (triptosa) en su composición, pudo inducir la producción de auxinas, lo que generó mayor germinación y velocidad de germinación por parte de las semillas de maracuyá sometidas a inóculos de *B. cereus* comparado a las semillas sometidas a inóculos de *B. subtilis*. La



producción de auxinas varía según la fuente de carbono en el que la bacteria se desarrolle (Wagi y Ahmed 2019), por lo que la pectina del medio pudo haber reducido la producción de auxinas en *B. subtilis*, generando baja respuesta germinativa.

Los resultados demuestran la capacidad de pectinasas microbianas para aumentar la velocidad germinativa de semillas de *P. edulis*, al exponerlas a acondicionamiento fisiológico de tipo “biopriming” con enzimas que favorecen al proceso de germinación, como en el trabajo de Ahmadloo *et al.* (2015): En semillas de *Crataegus pseudoheterophylla* expuestas a concentraciones de pectinasas 2%, se evidenció un aumento en el porcentaje de semillas germinadas. Por el contrario, estas enzimas también son usadas por fitopatógenos como *Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp. y *Fusarium* spp. para colonizar los tejidos vegetales y generar enfermedades en el hospedero (Wojtasik *et al.* 2016, Dees *et al.* 2017, Ozturk *et al.* 2018), por lo que, en alta concentración, podrían generar un efecto inhibitor en la germinación, por ejemplo: Yambe y Takeno (1992) observaron que suspensiones al 2% de enzimas con actividad pectinolítica reducía el porcentaje de germinación de semillas de *Rosa multiflora* por daño al embrión al degradar la semilla, suprimiendo la germinación. En concordancia, la baja germinación obtenida en P-PECTINEX podría deberse a que las pectinasas del lavado y de los acondicionamientos degradaron la semilla, afectando su capacidad para germinar.

Este trabajo muestra que lavar las semillas de maracuyá con Pectinex USPL y exponerlas a ácido D-galacturónico aumenta el número de semillas que germinan y disminuye el tiempo de protrusión de la radícula; además, emplear pectinasas de *B. subtilis* contribuye a la germinación homogénea en semillas de maracuyá. La aplicación de ácido D-galacturónico en semillas de maracuyá a nivel de cultivo puede ser una práctica poco viable por los costos que el ácido D-galacturónico representa, por lo que emplear otras fuentes de carbono también podría contribuir al proceso de germinación (Mabundza *et al.* 2010, Ghosh *et al.* 2017). A pesar de los resultados, la aplicación de los tratamientos P-CALDO y P-BSUBTILIS-E, no alcanzaron el nivel comercial aceptado, 80% de germinación (Vieira *et al.* 2004, Escobar 2011). Por lo que, la remoción del arilo con Pectinex USPL, junto con la aplicación de otras fuentes de carbono y pectinasas de *B. subtilis* en semillas de maracuyá, pueden ser consideradas en el estudio de métodos de acondicionamiento fisiológico en programas de investigación interesados en promover la velocidad y uniformidad de germinación en cultivos de maracuyá en Colombia.

## Conclusiones

La germinación de semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) es favorecida por el lavado con Pectinex USPL por reducir el efecto de dormancia mecánica y física generada por la testa. El acondicionamiento con pectina contribuye al metabolismo del proceso germinativo de semillas de maracuyá.

El uso de pectinasas de *B. subtilis* como acondicionamiento fisiológico de tipo “bioprimer”, en semillas maduras de maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) lavadas con Pectinex USPL, favorece su germinación por reducir el grosor y rigidez de la testa de la cubierta seminal, adicionalmente, favorece la calidad fisiológica de las semillas al inducir germinación sincrónica y altos de porcentajes de germinación; Exponer semillas de maracuyá a pectinasas de *B. subtilis* incrementa el número de semillas que germinan y aumenta su velocidad de germinación. Así mismo, la actividad de pectinolítica de inóculos de *B. cereus* contribuye a aumentar el número de semillas que germinan. Por lo tanto, los métodos de acondicionamiento fisiológico empleados en este estudio son procedimientos a tener en cuenta en prácticas que busquen contribuir al proceso de producción en cultivos de maracuyá.

## Referencias

- AbuQamar S, Moustafa K, Tran LS (2017) Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Critical reviews in biotechnology* 37(2):262-274 doi:10.1080/07388551.2016.1271767
- Adkins SW, Bellairs SM, Loch DS (2002) Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. *Euphytica* 126(1):13-20
- Agronet MinAgricultura (2017) 21-MARACUYA\_201.pdf
- Ahmadloo F, Masoud T, Pejman A, Aidin H (2014) Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) and stratification on germination traits of *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. seeds. *Scientia Horticulturae* 172:61-67
- Ahmadloo F, Tabari M, Azadi P, Hamidi A, Beiramizadeh E (2015) Effects of pectinase, BAP and dry storage on dormancy breaking and emergence rate of *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark. *Kluwer Academic Publishers* doi:10.1007/s11056-014-9466-0
- Benomari FZ, Dib ME, Djabou N, Muselli A, Costa J, Andreu V et al. (2018) Essential oils from Algerian species of *Mentha* as new bio-control agents against phytopathogen strains. *Environmental Science and Pollution Research*.25(30):29889-29900

- Braga RM, Padilla G, Araújo WL (2018) The biotechnological potential of *epicoccum* spp.: Diversity of secondary metabolites. *Critical reviews in microbiology* 44(6):759-778 doi:10.1080/1040841X.2018.1514364
- Brugnara EC, Nesi CN, Höfs A, Ferreira LA (2018) Emergency and growth of passion fruit following different seeding dates and stimulant use, in subtropical autumn and winter. *Agrociencia Uruguay* 22(1):37-44
- Cabin RJ, Evans AS, Mitchell RJ (1997) Genetic effects of germination timing and environment: An experimental investigation. *Evolution* 51(5):1427 doi:10.2307/2411195
- Cabrera JC, Paz D y Gutiérrez A (1997) Estudio de preparados enzimáticos pectinolíticos industriales. I-Actividad poligalacturonasa del Pectinex Ultra SPL. *Cultivos Tropicales* 18(1):20-23
- Cárdenas-Hernández J, Miranda D, Magnitskiy S, Carranza C (2011) Análisis morfológicos y anatómicos de las capas de semillas de granadilla dulce (*Passiflora ligularis* Juss.). *Agronomía Colombiana* 29(3):377-385
- Carranza C, Castellanos G, Deaza D, Miranda D (2016) Efecto de la aplicación de reguladores de crecimiento sobre la germinación de semillas de badea (*Passiflora quadrangularis* L.) en condiciones de invernadero. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 10(2):284-91
- Casaca A, Sierra E, Cruz J, Arellano R, Jiménez M, Flores S et al. (2005) El Cultivo del Maracuyá (*Passiflora edulis*): Guías Tecnológicas de Frutas y Vegetales. Proyecto de modernización de los servicios de tecnología agrícola (PROMOSTA)
- Castro J, Paredes C, Muñoz D (2009) Cultivo del Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims f. *favicarpa* Deg.). *Gerencia Regional Agraria La Libertad* 30
- Chavarria-Perez LM, Giordani W, Días KO, Costa Z et al (2020) Improving yield and fruit quality traits in sweet passion fruit: Evidence for genotype by environment interaction and selection of promising genotypes. *PLOS ONE* 15(5):1-20 doi:10.1371/journal.pone.0232818
- Colombo RC, Costa DS, Carvalho DU, Cruz MA, Roberto SR (2019) Methods of aril removal and lightness conditions on seeds physiological quality of sour passion fruits. *Brazilian Journal Of Biology* 79(3):404-409
- Copeta A (2011) Efecto de acondicionamientos sobre la calidad fisiológica de semillas y plántulas de *passiflora edulis* [trabajo de grado]. Pontifica Universidad Javeriana, Carrera de Biología

- Coughlan JM, Saha A, Donohue K (2017) Effects of pre- and post-dispersal temperature on primary and secondary dormancy dynamics in contrasting genotypes of *A rabidopsis thaliana* (brassicaceae). *Plant Species Biology* 32(3):210-222
- Coutinho TC, de Oliveira AM, Oliveira EN, Ferreira MC, Rosa LH (2020) *Penicillium citrinum* and *penicillium mallochii*: New phytopathogens of orange fruit and their control using chitosan. *Carbohydrate Polymers* 234 doi:10.1016/j.carbpol.2020.115918
- Dees MW, Perminow JI, Brurberg MB, Lebecka R, Grupa A, Śliwka J et al. (2017) Characterization of *Dickeya* and *Pectobacterium* strains obtained from diseased potato plants in different climatic conditions of Norway and Poland. *European Journal of Plant Pathology* 148(4):839-851
- Delanoy M, Van Damme P, Scheldeman X, Beltran J (2006) Germination of *Passiflora mollissima* (kunth) L.H.bailey, *Passiflora tricuspidata* Mast. and *Passiflora nov sp.* seeds. *Scientia Horticulturae* 110(2):198-203 doi:10.1016/j.scienta.2006.07.007
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) (2019) Boletín Mensual Insumos y Factores Asociados a la Producción Agropecuaria El cultivo de la maracuyá, (*Passiflora edulis* L.) y un estudio de caso de los costos de producción en el municipio de Dabeiba (Antioquia)
- Doria J (2010) Generalidades sobre las semillas: Su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales* 31(1):74-85
- da Silva PR, dos Santos CE, Picanço MC, da Silva RS, da Silva ÉM, Lopes MC, da Silva Paes J (2020) Assessing the resistance of passion fruit genotypes as control method to *tetranychus mexicanus*. *Crop Protection* 128 doi:10.1016/j.cropro.2019.104990
- de Luna Souto A, Gava JP, Quintas M, de Azevedo F, Rodrigues M, dos Santos C (2017) Seed germination and vigor of passion fruit hybrids. *Comunicata Scientiae* 8(1):134-138
- dos Santos C, Morgado MA, Matias RG, Júnior AW, Bruckner CH (2015) Germination and emergence of passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds obtained by self- and open-pollination *Acta Scientiarum: Agronomy* 37(4):489-493 doi:10.4025/actasciagron.v37i4.19616
- dos Santos LC, Bitencourt RG, dos Santos P, de Tarso Vieira R, Martínez J (2019) Solubility of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) seed oil in supercritical CO<sub>2</sub>. *Fluid Phase Equilibria* 493:174-180 doi:10.1016/j.fluid.2019.04.002
- Escobar Y (2011) Evaluación del efecto de la procedencia y el grado de madurez de los frutos de dos especies de *Passiflora*: *Passiflora mollissima* (H.B.K) Bailey y *Passiflora ligularis* Juss sobre

la germinación de sus semillas [trabajo de grado]. Pontifica Universidad Javeriana, Carrera de Biología

- Fischer G, Melgarejo LM, Cutler J (2018) Pre-harvest factors that influence the quality of passion fruit: A review. *Agronomia Colombiana* 36(3):217
- Flores PS, dos Santos TM, Bruckner CH, Otoni WC, Dhingra OD, de Souza Diniz SP (2012) In vitro selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to fusarium vascular wilt. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108(1):37-45 doi:10.1007/s11240-011-0009-5
- Fonseca KG, Faleiro FG, Barth M, Feldberg N (2017) Morphoagronomic and molecular characterization of ornamental passion fruit cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 52(10):849-860
- Gallie D (2013) Increasing vitamin c content in plant foods to improve their nutritional value-successes and challenges. *Nutrients* 5(9) 3424-46. 10.3390/nu5093424
- Gil JG, Agudelo MM, Osorio JG, Bedoya LO, Osorio NW (2015) Germination and growth of purple passion fruit seedlings under pre-germination treatments and mycorrhizal inoculation. *Pesquisa Agropecuaria Tropical* 45(3):257-265 doi:10.1590/1983-40632015v4533273
- Ghosh A, Dey K, Bauri F, Dey A (2017) Effects of different pre-germination treatment methods on the germination and seedling growth of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6:630-636 doi:10.20546/ijcmas.2017.604.077
- Gophane SR, Khobragade CN, Jayebhaye SG (2016) Extracellular pectinase activity from bacillus cereus GC subgroup A: isolation, production, optimization and partial characterisation. *Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences* 6(2):767
- Heidarian R, Fotouhifar K, Debets AJ, Aanen DK (2018) Phylogeny of paecilomyces, the causal agent of pistachio and some other trees dieback disease in iran. *Public Library of Science* 13(7):1-14 doi:10.1371/journal.pone.0200794
- Henao I, Franco-Correa M, Marín G (2006) Evaluación de métodos de conservación para aspergillus niger con actividad enzimática amilolítica. *Universitas Scientiarum* 11(2):51-60
- Holdsworth M, Bentsink L, Soppe W (2008) Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* 179(1):33-54 doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02437.x
- Hoondal GS, Tiwari RP, Tewari R, Dahiya N, Beg QK (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59(4-5):409-418

- Hu Z, Shao S, Zheng C, Sun Z, Shi J, Yu J, Qi Z et al (2018) Induction of systemic resistance in tomato against botrytis cinerea by N-decanoyl-homoserine lactone via jasmonic acid signaling. *Planta* 247(5):1217-1227 doi:10.1007/s00425-018-2860-7
- Hwi-Geon Y, Dong-Jun K, Won-Seok G, Tae-Young S, Soo-Dong W (2017). Entomopathogenic fungi as dual control agents against both the pest myzus persicae and phytopathogen Botrytis cinerea. *Mycobiology* 45(3):192-198 doi:10.5941/MYCO.2017.45.3.192
- ISTA (International Seed Testing Association) (2006) International rules for seed testing. Rules. Switzerland
- Jaramillo J, Cardenas J, Orozco J (2009) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) Manual sobre el cultivo del maracuyá (*Passiflora edulis*) en Colombia
- Kamaruzzaman M, Lyu A, Zhang J, Wu M, Yang L, Li G, Chen W (2020) Competitive saprophytic ability of the hypovirulent isolate QT5-19 of botrytis cinerea and its importance in biocontrol of necrotrophic fungal pathogens. *Biological Control* 142 doi:10.1016/j.biocontrol.2019.104182
- Khalaf EM, Raizada MN (2016) Taxonomic and functional diversity of cultured seed associated microbes of the cucurbit family. *BioMed Central* doi:10.1186/s12866-016-0743-2
- Khan WU, Ahmad SR, Yasin NA, Ali A, Ahmad A (2017) Effect of pseudomonas fluorescens RB4 and bacillus subtilis 189 on the phytoremediation potential of catharanthus roseus (L.) in cu and pb-contaminated soils. *CRC Press* doi:10.1080/15226514.2016.1254154
- Kimura E, Fransen SC, Collins HP, Guy SO, Johnston WJ (2015) Breaking seed dormancy of switchgrass (*Panicum virgatum* L.): A review. *Biomass Bioenergy* 80:94-101
- Kishore K, Pathak KA, Shukla R, Bharali R (2011) Effect of storage temperature on physico-chemical and sensory attributes of purple passion fruit (*passiflora edulis* sims). *Journal of Food Science and Technology* 48(4):484-488 doi:10.1007/s13197-010-0189-8
- Kohli P, Sharma N, Gupta R (2017) Statistical optimization of production conditions of alkaline pectin lyase from bacillus cereus using response surface methodology. *Biocatalysis & Biotransformation* 35(6):417-426 doi:10.1080/10242422.2017.1360291
- Kumar GP, Suneetha V (2016) Characterization of pectin lyase and polygalacturonase from novel bacillus cereus GS-2 isolated from chittoor and vellore fruit industrial dump sites by SEM, 16SrRNA sequencing, ion-exchange, SDS and HPLC analysis. *Journal of Pure & Applied Microbiology* 10(1):741-749

- Kundu M, Tiwari S, Haldkar M (2020) Collection, germination and storage of seeds of *Saraca asoca* (roxb.) Willd. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 16 doi:10.1016/j.jarmap.2019.100231
- Finch-Savage W, Leubner-Metzger G (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171(3):501-523 doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x
- Levesque-Tremblay G, Pelloux J, Braybrook SA, Müller K (2015) Tuning of pectin methylesterification: Consequences for cell wall biomechanics and development. Springer Verlag 791-811 doi:10.1007/s00425-015-2358-5
- Li Z, Li F, Guo G, Gao Y, Pan R, Guan Y *et al.* (2018) Evaluation of seed quality based on changes of internal substances during tobacco seed (*Nicotiana tabacum* L.) development. *Plant Growth Regulation* 86(3):389-399 doi:10.1007/s10725-018-0437-x
- Mabundza RM, Wahome P, Masarirambi M (2010) Effects of different pre-germination treatment methods on the germination of passion (*Passiflora edulis*) seeds. *Journal of Agriculture and Social Sciences* 6:57-60
- Mahmood A, Turgay O, Farooq M, Hayat R (2016) Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: A review. *FEMS Microbiology Ecology* 92(8):1
- Mendes N, Araújo SE, de Souza L, Lemos T, Félix RL (2019) Organic cultivation of yellow passion fruit using tall seedlings with long root systems. *Comunicata Scientiae* 10(4):477-483 doi:10.14295/CS.v10i4.3147
- Mendiondo GM, Amela MT (2009) Germination of stored and scarified seeds of *Passiflora caerulea* L. (Passifloraceae). *Plant Biosystems* 143(2):369-376
- Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid-Reagent for Determinations of Reducing Sugars. *Analytical Chemistry* 31: 426-28
- Molina-Hernández JB, Martínez-Correa HA, Andrade-Mahecha M (2019) Potencial Agroindustrial del Epicarpio de Maracuyá como Ingrediente Alimenticio Activo. *Información Tecnológica* 30(2):245-256
- Moreno B, Deaquiz Y (2016) Caracterización de parámetros fisicoquímicos en frutos de mora (*Rubus alpinus* Macfad). *Acta Agronómica* 65(2):130-136 doi:10.15446/acag.v65n2.45587
- Naranjo de los Reyes G, Roselló R, Garrote J, Rodríguez LO (2014) Respuesta agronómica del cultivo del maracuyá (*Passiflora edulis* L.) a la aplicación del FitoMAS-E. *Revista Centro Agrícola* 41(3):79-84

- Ndukwe OO, Baiyer PK (2019) Fruit and juice metric characteristics of two yellow passion fruit (*passiflora edulis degener*) genotypes grown in southeastern nigeria. *Notulae Scientia Biologicae* 11(3):422-428 doi:10.15835/nsb11310410
- Newton RJ, Hay FR, Ellis RH (2013) Seed development and maturation in early spring-flowering *galanthus nivalis* and *narcissus pseudonarcissus* continues post-shedding with little evidence of maturation in planta. *Annals of Botany* 111(5):945 doi:10.1093/aob/mct051
- Patil NP, Patil KP, Chaudhari BL, Chincholkar SB (2012) Production, purification of exo-polygalacturonase from soil isolate *paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and its application. *Indian Journal of Microbiology* 52(2):240-246 doi:10.1007/s12088-011-0162-x
- Pinzón Y (2009) Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Revista Colombiana de Biotecnología* 11(2):8-18
- Ogórek R (2016) Enzymatic activity of potential fungal plant pathogens and the effect of their culture filtrates on seed germination and seedling growth of garden cress (*Lepidium sativum* L.). *European Journal of Plant Pathology* 145(2):469-481
- Oliveira DM, Mota TR, Salatta FV, Marchiosi R, Ferrarese-Filho O, dos Santos WD, McQueen-Mason S (2019) Designing xylan for improved sustainable biofuel production. *Plant Biotechnology Journal* 17(12):2225-2227 doi:10.1111/pbi.13150
- Ouattara HG, Karou GT, Niamke SL, Diopoh JK, Koffi BL, Sangare A (2008) Implication of *Bacillus* sp. In the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(9):1753-1760 doi:10.1007/s11274-008-9683-9
- Ouattara HG, Reverchon S, Niamke S, Nasser W (2011) Molecular identification and pectate lyase production by *bacillus* strains involved in cocoa fermentation. *Food Microbiology* 28(1):1-8 doi:10.1016/j.fm.2010.07.020
- Oumer OJ, Abate D (2018) Screening and Molecular Identification of Pectinase Producing Microbes from Coffee Pulp. *Biomed Research International* doi: 10.1155/2018/2961767
- Ozarowski M, Thiem B (2013) Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: A mini-review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23(6):937-947
- Ozturk M, Aksoy HM, Potrykus M, Lojkowska E (2018) Genotypic and phenotypic variability of *pectobacterium* strains causing blackleg and soft rot on potato in turkey. *European Journal of Plant Pathology* 152(1):143-155 doi:10.1007/s10658-018-1459-y
- Pinzón IM, Fischer G, Corredor G (2007) Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis* sims.). *Agronomía Colombiana* 25(1):1-18



- Rajulapati V, Sharma K, Dhillon A, Goyal A (2018) SAXS and homology modelling based structure characterization of pectin methylesterase a family 8 carbohydrate esterase from *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *Archives of Biochemistry and Biophysics* doi:10.1016/j.abb.2018.01.015
- Reignault, Valette-Collet O, Boccara M (2008) The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *European Journal of Plant Pathology* 120(1):1-11
- Richard P, Hilditch S (2009) D-galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. *Applied Microbiology & Biotechnology* 82(4):597
- Rindermann R, Gomez M (1999) Mercado mundial del Maracuyá. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM), Universidad Autónoma Chapingo 3
- Román-Ponce B, Reza-Vázquez DM, Gutiérrez-Paredes S, De Haro-Cruz M, Maldonado-Hernández J, Bahena-Osorio Y et al. (2017) Plant Growth-Promoting Traits in Rhizobacteria of Heavy Metal-Resistant Plants and Their Effects on *Brassica nigra* Seed Germination. *Pedosphere* 27(3):511-526
- Romero-Perdomo F, Abril J, Camelo M, Moreno-Galván A, Pastrana I, Rojas-Tapias D et al. (2017) *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología* 49(4):377-383
- Scheler C, Weitbrecht K, Simon P, Hampstead A, Büttner-Mainik A et al. (2015) Promotion of Testa Rupture during Garden Cress Germination Involves Seed Compartment-Specific Expression and Activity of Pectin Methylesterases. *Plant Physiology* 167(1):200
- Shah P, Gutierrez-Sanchez G, Orlando R, Bergmann C (2009) A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture. *Proteomics* 9(11), 3126-3135 doi:10.1002/pmic.200800933
- Shu K, Liu X, Xie Q, He Z (2016) Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Molecular Plant* 9(1):34-45
- Song Y, Zhu J, Yan Q (2019) Roles of abscisic acid and gibberellins in maintaining primary and secondary dormancy of Korean pine seeds. *Journal of Forestry Research* doi:10.1007/s11676-019-01026-4

- Suassuna T, Bruckner H, de Carvalho R, Borém A (2003) Self-incompatibility in passionfruit: Evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theoretical & Applied Genetics* 106(2):298
- Sudto A, Punyathiti Y, Pongsilp N (2008) The use of agricultural wastes as substrates for cell growth and carboxymethyl cellulase (CMCase) production by *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Rhizobium* sp. *KMITL Science and Technology Journal* 8(22)
- Swain MR, Ray RC (2010) Production, characterization and application of a thermostable exopolygalacturonase by *Bacillus subtilis* CM5. *Food Biotechnology* 24(1):37-50 doi:10.1080/08905430903320958
- Tang Y, Kang H, Qin Z, Zhang K, Zhong Y, Li H, Mo L (2020) Significance of manganese resistant *Bacillus cereus* strain WSE01 as a bioinoculant for promotion of plant growth and manganese accumulation in *Myriophyllum verticillatum*. *Science of the Total Environment* 707 doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135867
- Vaca-Vaca J, Carrasco-Lozano E, Rodríguez-Rodríguez M, Betancur-Perez J, López-López K (2016) Primer reporte de un begomovirus presente en maracuyá amarillo [*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Degener)] en Valle del Cauca, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 18(2):56-65
- Valdez JG, Makuch MA, Ordovini AF, Frisvad JC, Overy DP, Masuelli RW, Piccolo RJ (2009) Identification, pathogenicity and distribution of *Penicillium* spp. isolated from garlic in two regions in Argentina. *Plant Pathology* 58(2):352-361 doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01960.x
- Valencia MF, Quevedo BE, Franco-Correa M, Díez H, Parra CM, Rodríguez MX (2011) Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium* spp., aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. *Universitas Scientiarum* 16:147-159
- Venkatanagaraju E, Divakar G (2017) Purification Strategies for Microbial Pectinases. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy* 11(2):144-159
- Venkatesh J (2014) Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Botanical Studies* 55(38) doi:10.1186/1999-3110-55-38
- Vieira RD, Neto AS, de Bittencourt S, Panobianco M (2004) Electrical conductivity of the seed soaking solution and soybean seedling emergence. *Scientia Agricola* 61(2):164-168
- Villamizar L (2012) Evaluación del efecto de acondicionamientos fisiológicos sobre la respuesta germinativa de semillas y calidad fisiológica de plántulas de *Physalis peruviana* L sembradas en diferentes sustratos [trabajo de grado]. Pontificia Universidad Javeriana, Carrera de Biología

- Wagi S, Ahmed A (2019) *Bacillus* spp: Potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, 2019(7) doi:10.7717/peerj.7258
- Walitang DI, Kim K, Madhaiyan M, Young KK, Kang Y, Sa T (2017) Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC Microbiology* 17:1-13
- Werker E (1997) *Seed anatomy*. Gebrüder Borntraeger
- Wojtasik W, Kulma A, Dymińska L, Hanuza J, Czemplik M, Szopa J (2016) Evaluation of the significance of cell wall polymers in flax infected with a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *BMC Plant Biology* 16:1-16
- Yambe Y, Takeno K (1992) Improvement of Rose Achene Germination by Treatment with Macerating Enzymes. *HortScience* 27(9):1018-1020
- Yu Y, Zhen S, Wang S, Wang Y, Cao H, Yan Y et al. (2016) Comparative transcriptome analysis of wheat embryo and endosperm responses to ABA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stresses during seed germination. *BMC Genomics* 17(1):97
- Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH (2010) 4 - Practical methods of measuring grape quality, *Managing Wine Quality: Viticulture and Wine Quality*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition 107-133

## Anexos

- Material suplementario 1. Lista de microorganismos reportados como pectinolíticos.

Bacterias	Hongos filamentosos	Hongos levaduriformes
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Aureobasidium</i> sp.
<i>Aerobacter</i> sp.	<i>Annulohyphoxylon</i> sp.	<i>Candida</i> sp.
<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Cryptococcus</i> sp.
<i>Agrobacterium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Cystofilobasidium</i> sp.
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Debaryomyces</i> sp.
<i>Amycolata</i> sp.	<i>Cephalosporium</i> sp.	<i>Kluyveromyces</i> sp.
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Pichia</i> sp.
<i>Azospirillum</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Rhodotorula</i> sp.
<i>Azotobacter</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Saccharomyces</i> sp.
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Epicoccum</i> sp.	
<i>Bacteroides</i> sp.	<i>Eupenicillium</i> sp.	
<i>Beijerinckia</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	
<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Galactomyces</i> sp.	
<i>Caulobacter</i> sp.	<i>Geomyces</i> sp.	
<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Gibberella</i> sp.	
<i>Cladicellulosiruptor</i> sp.	<i>Gliocladium</i> sp.	
<i>Clostridium</i> sp.	<i>Humicola</i> sp.	
<i>Curtobacterium</i> sp.	<i>Lentinus</i> sp.	
<i>Dickeya</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	
<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Neosartorya</i> sp.	
<i>Erwinia</i> sp.	<i>Neurospora</i> sp.	
<i>Escherichia</i> sp.	<i>Oidiodendron</i> sp.	
<i>Exiguobacterium</i> sp.	<i>Paecilomyces</i> sp.	
<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	
<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Phoma</i> sp.	
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Polyporus</i> sp.	
<i>Leuconostoc</i> sp.	<i>Picnophorus</i> sp.	
<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	
<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	
<i>Moniliophthora</i> sp.	<i>Thelebolus</i> sp.	
<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Thermoascus</i> sp.	
<i>Pantoea</i> sp.	<i>Thermonospora</i> sp.	
<i>Pectobacterium</i> sp.	<i>Trametes</i> sp.	
<i>Pediococcus</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	
<i>Phyllobacterium</i> sp.		
<i>Pseudomonas</i> sp.		

Bacterias	Hongos filamentosos	Hongos levaduriformes
<i>Ralstonia</i> sp.		
<i>Rhizobacterium</i> sp.		
<i>Rhizobium</i> sp.		
<i>Serratia</i> sp.		
<i>Shinogobium</i> sp.		
<i>Staphylococcus</i> sp.		
<i>Stenotrophomonas</i> sp.		
<i>Streptomyces</i> sp.		
<i>Thermotoga</i> sp.		
<i>Xanthomonas</i> sp.		
<i>Yersinia</i> sp.		

- Material suplementario 2. Lista de microorganismos empleados en la evaluación de actividad pectinolítica.

CMPUJ	UNIDIA
<i>Bacillus cereus</i> CMPUJ 094	<i>Botrytis</i> sp.
<i>Bacillus licheniformis</i> CMPUJ 386	<i>Colletotrichum</i> sp.
<i>Bacillus subtilis</i> CMPUJ 075	<i>Epicoccum</i> sp.
<i>Enterobacter cloacae</i> CMPUJ 283	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CMPUJ 095	<i>Phoma</i> sp.
<i>Lactobacillus fermentum</i> CMPUJ 413	
<i>Lactobacillus plantarum</i> CMPUJ 411	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CMPUJ 412	
<i>Micrococcus luteus</i> CMPUJ 265	
<i>Rhizobium radiobacter</i> CMPUJ 471	
<i>Serratia marcescens</i> CMPUJ 093	
<i>Staphylococcus aureus</i> CMPUJ 370	
<i>Aspergillus fumigatus</i> CMPUJH003	
<i>Mucor rouxii</i> CMPUJH054	
<i>Paecilomyces lilacinus</i> CMPUJH047	
<i>Paecilomyces variotti</i> CMPUJH012	
<i>Penicillium chrysogenum</i> CMPUJH061	
<i>Rhizopus</i> sp. CMPUJH041	
<i>Trichoderma</i> sp. CMPUJH017	
<i>Candida albicans</i> CMPUJH022	
<i>Candida glabrata</i> CMPUJH024	
<i>Candida tropicalis</i> CMPUJH029	
<i>Candida krusei</i> CMPUJH026	
<i>Cryptococcus neoformans</i> CMPUJH066	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CMPUJH042	

- Material suplementario 3. Resultados del error de media de cuadrados de la prueba de ANOVA de la actividad pectinolítica de los microorganismos seleccionados.

Grupo microbiano	Grados de libertad	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Bacterias	2	36.67***	87.18***	74.59***	168.85 ***	526.30***	134.89***	-	-
Hongos	5	456.77***	1919.9***	4934.0***	15181***	67693***	82175***	38268***	50328***

\*\*\* =  $p \leq 0.001$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \* =  $p \leq 0.05$ .

- Material suplementario 4. Resultado de la prueba *post hoc* de Tukey de la actividad pectinolítica de los microorganismos seleccionados.

Grupo microbiano	Cepa microbiana	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Bacterias	<i>B. cereus</i>	17.6 <sup>b</sup>	22.3 <sup>b</sup>	26.2 <sup>b</sup>	31.0 <sup>b</sup>	27.6 <sup>b</sup>	23.9 <sup>a</sup>	-	-
	<i>B. licheniformis</i>	15.3 <sup>c</sup>	19.5 <sup>c</sup>	23.3 <sup>b</sup>	26.0 <sup>c</sup>	22.5 <sup>c</sup>	12.3 <sup>c</sup>	-	-
	<i>B. subtilis</i>	21.3 <sup>a</sup>	28.6 <sup>a</sup>	31.8 <sup>a</sup>	38.9 <sup>a</sup>	44.4 <sup>a</sup>	18.8 <sup>b</sup>	-	-
Hongos	<i>Botrytis</i> sp.	105.6 <sup>d</sup>	112.1 <sup>c</sup>	105.9 <sup>e</sup>	229.0 <sup>b</sup>	453.9 <sup>a</sup>	464.0 <sup>a</sup>	332.6 <sup>a</sup>	396.4 <sup>a</sup>
	<i>Epicoccum</i> sp.	109.9 <sup>c</sup>	180.0 <sup>a</sup>	190.8 <sup>b</sup>	230.9 <sup>b</sup>	69.5 <sup>f</sup>	63.8 <sup>f</sup>	69.8 <sup>f</sup>	75.1 <sup>f</sup>
	<i>P. lilacinus</i>	133.0 <sup>a</sup>	136.5 <sup>b</sup>	146.0 <sup>d</sup>	167.1 <sup>c</sup>	192.4 <sup>d</sup>	104.6 <sup>e</sup>	102.9 <sup>e</sup>	117.5 <sup>e</sup>
	<i>P. variotti</i>	122.2 <sup>b</sup>	138.1 <sup>b</sup>	202.9 <sup>a</sup>	307.9 <sup>a</sup>	220.9 <sup>b</sup>	247.4 <sup>b</sup>	249.1 <sup>b</sup>	218.7 <sup>b</sup>
	<i>Penicillium</i> sp.	120.0 <sup>b</sup>	139.0 <sup>b</sup>	143.5 <sup>d</sup>	127.7 <sup>d</sup>	138.7 <sup>e</sup>	143.3 <sup>d</sup>	146.9 <sup>d</sup>	158.1 <sup>d</sup>
	<i>P. chrysogenum</i>	129.4 <sup>a</sup>	137.3 <sup>b</sup>	160.4 <sup>c</sup>	214.6 <sup>b</sup>	209.2 <sup>c</sup>	209.1 <sup>c</sup>	206.8 <sup>c</sup>	184.8 <sup>c</sup>

Letras diferentes indican diferencia significativa.

- Material suplementario 5. Resultados de la caracterización morfo-fisiológica.

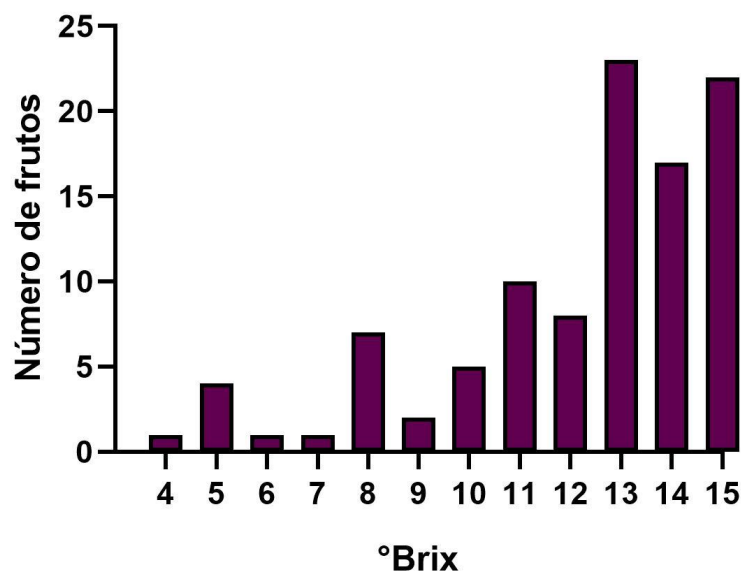
Fruto	Diámetro polar (mm)	Diámetro ecuatorial (mm)	Peso fruto (g)	Color fruto (escala Pantone)	Grosor cáscara (mm)	Peso cáscara (g)	Peso pulpa (g)	Color pulpa (escala Pantone)	Número de semillas	Sólidos solubles totales (°Brix)
1	134.25	119.28	309.31	115	8.15	148.94	160.37	1505	500	15
2	144.25	111.07	303.54	115	7.64	210.06	93.48	137	475	14
3	128.25	114.28	293.38	115	7.6	149.8	143.58	1505	555	15
4	95.14	90.05	205.74	115	6.23	118.61	87.13	N-21	323	13
5	116.46	94.92	309	115	8.22	156.67	152.33	1505	537	14
6	120.58	89.99	302.14	115	7.95	180.16	121.98	1505	378	8
7	106.35	88.78	245.23	116	8.32	140.74	104.49	137	422	13
8	123.45	96.29	342.85	108	14.82	206.41	136.44	158	490	15
9	113.64	92.47	247.74	121	6.96	158.11	89.63	N-21	345	15
10	112.28	96.16	276.06	115	6.35	133.71	142.35	N-21	543	15
11	141.85	92.4	323.22	113	7.26	137.95	185.27	158	557	14
12	117.45	94.05	321.99	109	9.32	161.37	160.62	123	495	13
13	100.64	90.14	271.5	109	6.9	128.73	142.77	129	584	14
14	103.54	96.86	295.94	114	15.39	170.07	125.87	137	361	13
15	114.27	83.78	226.76	109	9.05	113.24	113.52	158	412	12
16	115.32	90.07	302.9	114	7.56	182.96	119.94	1505	296	13
17	127.61	81.52	295.35	3955	13.1	214.09	81.26	150	275	5
18	103.54	92.52	229.57	115	8.76	117.18	112.39	151	220	11
19	113.27	84.83	197.1	108	9.61	135.92	61.18	150	287	5
20	109.12	93.5	253.92	109	7.32	143.92	110	158	231	15

Fruto	Diámetro polar (mm)	Diámetro ecuatorial (mm)	Peso fruto (g)	Color fruto (escala Pantone)	Grosor cáscara (mm)	Peso cáscara (g)	Peso pulpa (g)	Color pulpa (escala Pantone)	Número de semillas	Sólidos solubles totales (°Brix)
21	96.18	84.93	175.37	109	5.07	92.89	82.48	1575	406	15
22	116.09	92.75	283.87	114	10.52	176.37	107.5	158	386	15
23	117.84	88.6	267.33	106	9.78	155.11	112.22	137	393	14
24	114.09	99.25	222.51	115	10.32	153.66	68.85	1575	251	11
25	127.55	88.42	317.92	113	11.2	169.52	148.4	1505	460	12
26	95.75	84.32	157.04	114	8.74	91.8	65.24	1505	247	15
27	111.63	86.14	243.93	114	9.72	153.8	90.13	158	273	14
28	114.18	93.12	296.02	115	6.82	134.97	161.05	N-21	472	15
29	101.56	90.26	275.8	109	11.44	155.87	119.93	137	420	13
30	116.15	97.24	270.81	382	12.27	151.17	119.64	158	387	11
31	97.47	80.04	195.21	108	8.29	123.21	72	154	239	10
32	121.43	91.92	324.18	108	7.82	184.33	139.85	154	452	15
33	114.85	89.27	266.47	115	8.84	144.52	121.95	158	317	13
34	115.23	95.72	230.49	390	7.34	155.35	75.14	157	276	11
35	118.83	91.01	380.14	116	10.9	201.37	178.77	N-21	339	14
36	106.17	89.04	228.04	390	13.88	160.88	67.16	1575	196	8
37	133.46	84.35	287.49	108	9.21	149.43	138.06	150	325	13
38	100.32	92.83	210.12	121	10.29	107.7	102.42	157	323	11
39	112.42	92.32	249.52	121	9.48	186.24	63.28	150	207	15
40	111.05	79.45	197.63	108	11.49	95.74	101.89	157	484	8
41	120.03	84.33	183.2	106	5.91	106.18	77.02	1505	423	7
42	108.15	88.01	226.98	108	7.64	113.58	113.4	150	415	14
43	109.58	93.07	231.23	116	9.66	157.14	74.09	158	321	14
44	116.05	93.33	291.32	108	8.33	147.95	143.37	151	475	15
45	98.43	84.26	250.8	106	12.81	163.42	87.38	151	325	12
46	106.77	84.03	181.38	113	10.36	135.02	46.36	150	172	5
47	110.35	88.05	169.37	109	8.24	147.01	154.36	143	415	12
48	116.89	87.02	219.45	115	9.46	171.98	47.47	150	197	11
49	108.37	93.97	237.82	121	7.42	148.1	89.72	158	302	15
50	89.58	93.59	219.97	396	8.1	150.75	69.22	136	205	10
51	107.12	71.79	188.23	121	9.84	116.21	72.02	150	286	6
52	114.92	94.94	307.28	121	7.45	188.33	118.95	137	317	13
53	102.15	78.11	236.51	390	10.46	169.54	66.97	142	215	4
54	113.33	92.77	318.7	121	11.61	185.19	133.51	1505	376	8
55	122.95	91.25	297.65	121	6.61	173.32	124.33	137	345	12
56	105.89	84.56	280.85	129	9.23	159.64	121.21	150	419	13
57	98.6	80.01	217.42	115	7.56	131.56	85.86	150	205	10
58	100.21	88.35	257.96	121	7.56	130.39	127.57	150	372	13
59	101.52	82.94	190.97	397	10.31	111.92	79.05	150	241	11
60	108.32	83.07	220.47	399	8.92	123.3	97.17	136	365	11
61	105.57	84.43	210.7	395	6.2	111.92	98.78	150	374	10

Fruto	Diámetro polar (mm)	Diámetro ecuatorial (mm)	Peso fruto (g)	Color fruto (escala Pantone)	Grosor cáscara (mm)	Peso cáscara (g)	Peso pulpa (g)	Color pulpa (escala Pantone)	Número de semillas	Sólidos solubles totales (°Brix)
62	126.226	96.46	338.51	398	8.19	233.36	105.15	127	453	8
63	110.96	91.34	234.85	382	7.81	132.52	102.33	1505	529	9
64	94.07	83.85	149.9	121	8.63	104.86	45.04	150	186	13
65	80.6	79.22	162.44	121	5.94	84.75	77.69	142	281	15
66	100.64	74.91	157.26	121	5.37	97.15	60.11	150	295	13
67	120.94	92.63	243.16	394	6.84	124.32	118.84	158	440	14
68	92.69	90.43	263.56	131	8.22	126.44	137.12	1505	527	15
69	110.41	93.45	273.55	121	9.85	154.98	118.57	143	502	14
70	109.63	89.39	246.35	121	6	118.43	127.92	143	513	13
71	98.19	88.69	224.6	114	6.78	107.34	117.26	143	323	14
72	111.92	91.81	277.73	3965	6.85	166.04	111.69	151	482	13
73	112.35	92.85	308.72	120	10.19	154.41	154.31	137	539	15
74	101.59	84.39	223.2	120	6.81	131.24	91.96	136	291	13
75	107.3	83.57	198.3	120	8.76	144.24	54.06	136	247	15
76	113.45	89.12	249.05	1215	6.3	125.19	123.86	1505	397	14
77	90.09	88.75	245.91	121	4.78	103.41	142.5	1505	447	15
78	114.13	87.78	247.33	121	6.62	147.49	99.84	158	409	14
79	88.99	86.68	237.42	116	5.4	99.27	138.15	1585	413	9
80	109.85	88.5	262.34	1225	14.57	251.93	10.41	142	72	5
81	99.1	90.75	204.78	107	5.48	124.76	80.02	1585	437	13
82	114.18	89.23	245.95	121	7.64	154.64	91.31	136	468	11
83	105.94	83.31	228.34	121	6.71	115.06	113.28	150	505	13
84	85.17	79.27	149.27	121	6.76	74.19	75.08	136	387	15
85	114.16	93.14	268.6	120	6.12	150.13	118.47	1505	423	13
86	122.18	88.46	220	121	5.12	95.73	124.27	158	469	13
87	121.66	82.36	231.38	383	10.18	135.12	96.26	136	456	8
88	104.6	88.79	192.53	116	5.72	126.94	65.59	158	259	15
89	132.5	102.77	456.57	122	10.6	234.78	221.79	158	572	10
90	99.07	86.58	196.96	121	8.36	111.68	85.28	150	428	14
91	111.27	91.58	249.42	121	7.38	134.33	115.09	158	471	13
92	108.26	90.11	247.07	116	6.94	123.74	123.33	158	416	15
93	101.6	79.96	198.58	122	6.25	108.27	90.31	150	338	13
94	101.65	86.58	250.61	396	6.96	107.48	143.13	137	433	12
95	117.26	86.78	299.96	121	6.92	166.64	133.32	136	543	14
96	120.43	92.27	342.99	121	7.61	193.91	149.08	1575	584	12
97	93.35	85.35	216.16	121	7.36	93.55	122.61	1575	324	12
98	100.7	81.76	146.52	120	8.54	88.69	57.83	137	231	14
99	97.59	93.54	224.42	379	8.85	122.12	102.3	150	410	11
100	104.28	107.95	357.06	122	6.82	209.63	147.43	137	573	13
101	121.3	91.67	253.43	381	8.75	152.25	101.18	158	510	8



- Material suplementario 6. Grados Brix de frutos de maracuyá procedentes de la finca de Las Mercedes-Timana-Huila.



- Material suplementario 7. Índices de respuesta germinativa de semillas de maracuyá por los tratamientos aplicados.

Tratamiento	CG	GRI	VP	MDG	VG	R <sub>50'</sub>
A-AGUA	4.50±3.11	0.93±0.73	0.76±0.70	0.28±0.19	0.31±0.47	12.45±0.71
A-PECTINEX	5.75±2.36	0.99±0.25	0.71±0.10	0.36±0.15	0.26±0.14	15.00±4.24
A-CALDO	3.25±2.22	0.48±0.32	0.38±0.25	0.20±0.14	0.10±0.07	14.62±8.15
A-BCEREUS	3.25±1.89	0.48±0.36	0.33±0.19	0.20±0.12	0.08±0.10	18.75±2.87
A-BCEREUS-E	5.00±2.71	0.70±0.36	0.54±0.25	0.31±0.17	0.20±0.21	18.18±5.62
A-BSUBTILIS	2.00±1.41	0.36±0.25	0.30±0.21	0.12±0.09	0.05±0.04	10.68±5.20
A-BSUBTILIS-E	4.75±1.71	1.03±0.27	0.93±0.19	0.30±0.11	0.29±0.16	11.46±2.76
P-AGUA	3.50±2.08	0.56±0.36	0.43±0.26	0.22±0.13	0.12±0.12	15.75±1.5
P-PECTINEX	0.25±0.50	0.05±0.10	0.05±0.10	0.02±0.03	0.00±0.01	4.50±3.00
P-CALDO	46.50±7.85	8.45±1.65	6.37±1.50	2.91±0.49	19.04±7.98	15.03±0.95
P-BCEREUS	6.25±0.96	0.94±0.09	0.69±0.10	0.39±0.06	0.27±0.07	16.68±2.15
P-BCEREUS-E	4.75±2.87	0.71±0.47	0.52±0.32	0.30±0.18	0.20±0.24	17.12±1.98
P-BSUBTILIS	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
P-BSUBTILIS-E	11.00±2.83	1.91±0.62	1.49±0.53	0.69±0.18	1.09±0.57	15.25±2.51