



Corpoica. Ciencia y Tecnología
Agropecuaria

ISSN: 0122-8706

revista_corpoica@corpoica.org.co

Corporación Colombiana de Investigación
Agropecuaria
Colombia

Benítez, Sandra Patricia; Lobo, Mario; Arturo Delgado, Oscar; Medina, Clara Inés
Estudios de germinación y remoción de latencia en semillas de papayuelas *Vasconcellea*
cundinamarcensis y *Vasconcellea goudotiana*
Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, vol. 14, núm. 2, junio-diciembre, 2013, pp.
187-197
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
Cundinamarca, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449944862002>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

FISIOLOGÍA DE SEMILLAS

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Estudios de germinación y remoción de latencia en semillas de papayuelas *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Vasconcellea goudotiana*

Highland papayas *Vasconcellea cundinamarcensis* and *Vasconcellea goudotiana* seed germination and dormancy release studies

Sandra Patricia Benítez¹, Mario Lobo², Oscar Arturo Delgado³, Clara Inés Medina⁴

¹ Ingeniera Agrónoma, Banacol, Apartadó, Antioquia, Colombia.

² PhD. Genética y Fisiología de semillas. C.I. La Selva, Corpoica, Rionegro, Antioquia y Universidad Nacional de Colombia, Medellín. mlobo@corpoica.org.co

³ Ingeniero Agrónomo y de Sistemas, MSc. Docente Universidad Católica de Oriente, Rionegro, Antioquia.

⁴ PhD. Ecofisiología C.I. La Selva, Corpoica, Rionegro, Antioquia. cmedina@corpoica.org.co

Fecha de recepción: 23/04/2013

Fecha de aceptación: 31/05/2013

ABSTRACT

Seed germination and dormancy of *Vasconcellea cundinamarcensis* and *V. goudotiana* were studied in order to develop procedures for seed embryo emergency. Characterization of viable dormant seeds was done with the tetrazolium test. Long periods of seed fermentation, for sarcotestal removal, affected the seed viability, mainly in *V. cundinamarcensis*. AG₃ and KNO₃ application promoted a significantly higher germination, in *V. goudotiana*, but not in *V. cundinamarcensis*, in relation to control seeds, fermented during 15 days. AG₃ and KNO₃ application promoted a significantly higher germination in *V. goudotiana*, but not in *V. cundinamarcensis*, in relation to control 15 days fermented seeds. Seed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* during 36 hours for sarcotestal removal, promoted a significant higher germination than that of the control, fermented without enzyme application, mainly in *V. goudotiana*. Seed fermentation with *S. cerevisiae* during 36 hours application, for sarcotestal removal, promoted a significant higher germination than that of the control, fermented without enzyme application, mainly in *V. goudotiana*. Seed germination, after *S. cerevisiae* fermentation and application of AG₃ and KNO₃ occurred in both species, being obtained the best germination in *V. goudotiana*, with application of 1000 ppm of GA₃ + 2.5% KNO₃, with statistical differences, related to the other germination applied treatments. The best germination results, without significant differences, in *V. cundinamarcensis* were obtained with the application of 600 ppm of GA₃ + 2.5% KNO₃ or 1000 ppm of GA₃ + 1.5% KNO₃ after the fermentation procedure with *S. cerevisiae*.

Key words: plant growth, embryo emergency, seed viability.

RESUMEN

Se estudió la germinación y latencia de las semillas de *Vasconcellea cundinamarcensis* y *V. goudotiana*, para desarrollar procedimientos promotores de emergencia de los embriones. La categorización de las semillas viables no germinables se realizó con el empleo del tetrazolio. La fermentación prolongada de las semillas, para remover la sarcotesta, afectó la viabilidad de éstas, en especial las de *V. cundinamarcensis*. Aplicaciones de KNO₃ y AG₃ promovieron una germinación significativamente mayor, en comparación con el testigo, en semillas fermentadas previamente durante 15 días de *V. goudotiana*, lo cual no ocurrió en las de *V. cundinamarcensis*. La aplicación de *Saccharomyces cerevisiae* durante 36 horas, para fermentación y liberación de la sarcotesta, indujo germinación en las dos especies, con una respuesta significativamente superior en *V. goudotiana*. La adición de AG₃ y KNO₃, luego del tratamiento anterior, promovió mayor emergencia en ambos taxa, en especial en *V. goudotiana*. La fermentación de las semillas con *Saccharomyces cerevisiae*, en combinación con AG₃ y KNO₃ produjo germinación en las dos especies, con énfasis en *V. goudotiana* al aplicar 1000 ppm de AG₃ + KNO₃ al 2,5% y en *V. cundinamarcensis*, al utilizar 600 ppm de AG₃ + AG₃ al 2,5%, sin diferencia significativa con la aplicación de 1000 ppm de AG₃ + KNO₃ al 1,5%; se logró mayor germinación en *V. goudotiana* en el tratamiento precitado, con el cual se obtuvo con confiabilidad estadística la máxima brotación de plántulas, en relación con el resto de tratamientos evaluados con la propia especie y en *V. cundinamarcensis*.

Palabras claves: brotación de plantas, categorización, emergencia de embriones, viabilidad de semillas.

INTRODUCCIÓN

Las llamadas papayuelas de altura, chamburo, papaya de tierra fría, chihualcán, siglalón, chichuacacón, titish, papaya de altura y bonete, entre otras (Badillo, 1971; Fouqué, 1973), género *Vasconcellea*, comprenden un conjunto de 21 especies potenciales (Kyndt *et al.*, 2005), relegadas y/o subutilizadas. Estas, según Cadavid *et al.* (2003), no han adquirido importancia como cultivo y se las encuentra como plantas individuales o en grupos pequeños en finca; sin embargo, en Chile, la especie *Vasconcellea cundinamarcensis* (*V. pubescens*), conocida como papayuelo o papayo de montaña, es un cultivo de exportación, con un área de siembra cercana a las 225 hectáreas, representadas principalmente por explotaciones comerciales establecidas en la zona norte, entre los 30° y 33° de latitud sur, cuya producción se aprovecha en la industria de conservas, jugos y mermeladas (Carrasco *et al.*, 2009). En dicho país, los agricultores obtienen sus plantas a partir de semillas, derivadas de los individuos con mejores atributos agronómicos (Ávila, 2007).

El taxón *Vasconcellea cundinamarcensis*, de acuerdo con Quintanilla (1995), se encuentra desde Colombia hasta Bolivia en forma espontánea; esto indica la necesidad de coleccionar los recursos de esta especie y taxa relacionados y, su preservación en colecciones de campo, con duplicados por la vía de semilla, la cual conduce a tener una representación mayor de la variabilidad poblacional y, de recombinantes entre los individuos de cada conglomerado de plantas. Al respecto, la Unión para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN) ha introducido cinco especies de *Vasconcellea* en la Lista Roja de taxa en peligro de extinción, las cuales corresponden a *V. horovitziana*, *V. omnilingua*, *V. palandensis*, *V. pulchra*, *V. sprucei* (IUCN, 2003). Incluso, se ha indicado que la lista de especies de este género en peligro podría ser más grande (Kyndt *et al.*, 2005) y, que la amenaza con mayor impacto es la destrucción de los hábitats donde éstas se encuentran, como secuela de la deforestación y reconversión de los bosques a tierras de cultivo o pastizales (IUCN, 2003).

Tomando como referente la potencialidad de la papayuela y especies relacionadas del género *Vasconcellea*, y el peligro de pérdida en condiciones *in situ*, se conformó a través de acciones de colecta una colección que cuenta actualmente con 80 accesiones de *Vasconcellea*, de los taxa: *V. cundinamarcensis* (*pubescens*), *V. goudotiana*, *V. cauliflora*, *V. sphaerocarpa*, *V. longiflora* y *V. sp.* (sin

identificación), con 40, 32, 4, 2, 1 y 1 poblaciones, respectivamente. Este conjunto poblacional se vinculó, al Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación Colombiana para la Alimentación y la Agricultura – SBUGNCAA-, y se conservan *ex situ*, en campo, con duplicados de semilla almacenados con 10% de humedad en ellas, dentro de bolsas de aluminio herméticamente selladas, en neveras a 12 °C.

El conjunto poblacional preservado, por la última vía, comprende semillas con y sin procesos de recombinación, con otras accesiones, por lo cual la colección de simientes no sólo sirve para reponer pérdidas de los materiales mantenidos en campo, sino también para la obtención de plantas derivadas de polinización abierta, con otras poblaciones. Lo mencionado puede alimentar procesos de selección de individuos élite, mediante clonación, destinados a evaluación y oferta posterior a los productores.

Todo lo anterior, señala la necesidad de categorizar la germinación y la latencia de las semillas, para resiembra de la colección de campo y monitorear la viabilidad de las unidades de propagación sexual conservadas de las diversas especies, para lo cual se precisa determinar la presencia de latencia en éstas y el desarrollo de protocolos para monitorear su viabilidad y aumentar los materiales conservados en condiciones de baja temperatura, antes de que lleguen a niveles reducidos de viabilidad, lo cual puede ocasionar erosión genética en el conjunto poblacional, en mantenimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización: el estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Semillas del Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación Colombiana para la Alimentación y la Agricultura –SBUGNCAA-, localizado en el centro de investigación La Selva, de Corpoica, Rionegro, Antioquia, Colombia.

Material biológico: en la investigación se incluyeron semillas de la especie cultivada *V. cundinamarcensis* (sinónimo: *V. pubescens*), al igual que del taxón promisorio *V. goudotiana*. Éstas se obtuvieron a partir de una mezcla aleatoria, balanceada, de 4 accesiones por especie, de la colección de campo establecida en el C.I. La Selva, Rionegro, Antioquia, a 2120 msnm, con una temperatura promedio de 17 °C, perteneciente a la formación ecológica bosque húmedo montano bajo.

Extracción de las semillas: se realizó mediante fermentación, durante tiempos variables, los cuales se indican para cada uno de los estudios; luego, se lavaron y se colocaron en desecadores herméticos, con sílica gel como desecante, con una relación de peso 1:1 entre éste y la semilla, hasta lograr 10% de humedad interna, cifra con la cual se almacenan los taxa con simientes intermedias, desde la óptica de tolerancia a la desecación, como es el caso de las papayuelas.

Pruebas de germinación: se emplearon germinadores Seedburo, con control de temperatura, a 28,5 °C, con colocación de las semillas sobre papel filtro humedecido con agua destilada. El número de semillas por unidad experimental se incluye en cada uno de los estudios. Las evaluaciones se llevaron a cabo durante 60 días, tiempo que permite detectar rompimientos iniciales de latencia.

Estudios realizados

Germinación de semillas extraídas a partir de frutos con diferente estado de madurez: las semillas se extrajeron a partir de frutos con diferente porcentaje de maduración, de acuerdo con el cambio de coloración de verde a completamente amarillo, en su epidermis: 25%, 50%, 75% y 100%. Dichas semillas se sometieron a fermentación, durante 15 días, para liberarlas de la sarcotesta. El estudio se hizo con un diseño factorial, completamente al azar, 2 X 4, los cuales corresponden a 2 especies y 4 estados de maduración; se emplearon unidades experimentales de 50 semillas y 5 repeticiones por tratamiento.

Estandarización del protocolo de tetrazolio para las semillas de papayuela: se desarrolló el procedimiento para semillas de papayuela, dado que no se encontró en la literatura. Para ello, se emplearon simientes recién extraídas y otras almacenadas en las n+veras, para semilla intermedia, del Banco de Germoplasma, las cuales se expusieron al tetrazolio durante 24, 48 y 72 horas; como métodos de aplicación se evaluaron tres procedimientos: incisión de la sarcotesta, con un bisturí, sin dañar el embrión; remoción manual de ésta; e inmersión de las semillas en la solución del tetrazolio, procedimiento recomendado, por la Sociedad Internacional de Analistas de Semillas, para detectar su viabilidad (ISTA, 2007). La prueba se basa en la actividad de las hidrogenasas, que catalizan las reacciones respiratorias en las mitocondrias, lo que permite correlacionar la viabilidad de las semillas con los cambios de color en los tejidos vivos

(Grzybowski *et al.*, 2012). Posteriormente, se hizo una evaluación visual del grado de tinción de los embriones, para seleccionar el protocolo que brindara un resultado confiable, mediante la tonalidad lograda en éstos, luego de la aplicación del tetrazolio; con indicación de Tunes *et al.* (2009), de que éste permite estimar rápidamente la viabilidad de las semillas, incluyendo las latentes.

Categorización de la viabilidad en semillas de *V. cundinamaricensis* y *V. goudotiana*, empleando tetrazolio, para la detección de simientes viables latentes: en el estudio se incluyeron semillas de las dos especies extraídas de: frutos podridos, sobrefermentados -método empleado por agricultores locales- y, frutos maduros, con fermentación de las simientes durante 15 días. La evaluación se llevó a cabo con un arreglo factorial 2X2, en el cual los factores correspondieron a los dos taxa y al tipo de fermentación al cual se sometió la semilla, con unidades experimentales de 100 simientes y 5 repeticiones. Éstas se pusieron a germinar, de acuerdo con el procedimiento descrito, para evaluar la emergencia de embriones. Los resultados se transformaron a valores de arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje, para su procesamiento estadístico y las diferencias entre tratamientos se procesaron a través de la prueba de Duncan, con una probabilidad de error de 0,05. Las simientes se clasificaron como: viables, las cuales corresponden a las germinadas y latentes sin emergencia de embriones, de acuerdo con la tinción con el tetrazolio; y, no viables, aquellas con embrión muerto, por falta de tinción con el indicador o sin presencia de la estructura. Para lo anterior, las semillas no germinadas se sometieron a tinción con tetrazolio, para determinar aquellas viables no germinables, de acuerdo con el protocolo obtenido, a partir de los resultados del acápite anterior. Éstas se sumergieron en la solución de tetrazolio, 0,1% en 100 ml de agua, durante 24 horas en condiciones de oscuridad, con separación posterior de los embriones, para evaluación de la coloración adquirida por éstos y, categorización de los viables, correspondientes a aquellos que exhibían color rojo brillante, en su superficie.

Efecto del ácido giberélico -AG₃ y nitrato de potasio -KNO₃ como promotores de germinación, en semillas provenientes de frutos fermentados y sobrefermentados de *V. cundinamaricensis* y *V. goudotiana*: dada la baja germinación, obtenida en la prueba anterior, se evaluó el efecto de los promotores de germinación giberelina AG₃ y nitrato de potasio KNO₃, en semillas provenientes de frutos sobremadurados, lo

cual produce fermentación excesiva, y otro conjunto extraídas de frutos maduros luego de fermentación, durante 15 días; con secado posterior de los dos tipos de simiente y su humedecimiento previo. Con las semillas se evaluaron tres tratamientos por especie: KNO_3 al 1,5%; AG_3 200 ppm; KNO_3 al 1,5% + AG_3 200 ppm y un testigo absoluto, en los dos taxa, sin aplicación de los promotores de germinación. La evaluación se llevó a cabo con un diseño factorial 2×4 , lo cual comprende la combinación de las dos especies, *V. cundinamarcensis*, *V. goudotiana* y los tratamientos relacionados. La germinación se llevó a cabo en germinadores, marca Seedburo, con control de temperatura, en condiciones controladas de 28 a 30 °C, con 50 semillas por unidad experimental y 5 repeticiones.

Efecto de la fermentación previa de las semillas de *V. cundinamarcensis* y *V. pubescens*, con la levadura *S. cerevisiae* para facilitar la eliminación de la sarcotesta y empleo posterior de los promotores de germinación, ácido giberélico - AG_3 - y nitrato de potasio - KNO_3 - para remoción de latencia: dado que la fermentación realizada por agricultores, por tiempos prolongados, para liberar la semilla de la sarcotesta causa pudriciones que pueden afectar la semilla por aspectos fisiológicos o patológicos, como alternativa se evaluó la fermentación previa con la levadura *S. cerevisiae* para facilitar la eliminación manual de la estructura mencionada. Para ello, se disolvieron 26 gramos de levadura y 105 de azúcar, en un litro de agua tibia, la cual se expuso al sol durante 30 minutos previo a la aplicación a las semillas, con adición del agente emulsificante monoestearato de sorbitán. Éstas se sumergieron en el preparado para su fermentación, a temperatura de 33 °C, por espacio de 36 horas. Posteriormente, se evaluó la germinación con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2×5 , correspondientes a las dos especies: *V. cundinamarcensis*, *V. pubescens* y a los tratamientos: con sarcotesta, fermentación con levadura; con sarcotesta, fermentación sin levadura; sin sarcotesta, fermentación con levadura; con sarcotesta, fermentación con levadura, aplicación de 200 ppm de AG_3 y KNO_3 al 1,5%; sin sarcotesta, fermentación con levadura, aplicación de 200 ppm de AG_3 y KNO_3 al 1,5%. Las unidades experimentales estuvieron integradas por 80 semillas con 5 repeticiones.

Germinación obtenida con semillas previamente fermentadas, con sarcotesta y sin sarcotesta, con la levadura *S. cerevisiae* y con aplicación de los promotores de emergencia de embriones, ácido giberélico, AG_3 y nitrato de potasio, KNO_3 , en diversas concentraciones:

el estudio buscó evaluar la germinación luego de la aplicación de la enzima *Sacharomyces cerevisiae*, con la cual se redujo el tiempo de fermentación y los daños causados por el proceso, con aplicación posterior de combinaciones de diferentes dosis de AG_3 y KNO_3 . La semilla provino de una mezcla balanceada de 4 accesiones de cada una de las especies, *V. cundinamarcensis* y *V. goudotiana*, extraídas a partir de frutos en completa maduración y sometidos a fermentación, con la sarcotesta, en presencia de la levadura mencionada, durante 36 horas. Posteriormente, las simientes fermentadas se secaron hasta un contenido de humedad de 10%, con silica gel como absorbente de humedad, en cámaras herméticas Fisher Scientific; luego, se rehidrataron para la aplicación de los tratamientos, con los promotores. El estudio se llevó a cabo con un diseño factorial 2×7 , con cinco repeticiones y unidades experimentales de 50 simientes. Los factores correspondieron a las dos especies y los tratamientos de aplicación de los promotores de germinación. En total se evaluaron 6 combinaciones de los estimuladores de la emergencia, más un testigo, correspondiente a semilla fermentada con la enzima.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación obtenida en semillas extraídas de frutos con diferente grado de maduración: no se obtuvo germinación en la semilla proveniente de frutos con diversos grados de maduración, referenciados por el desarrollo de pigmentos carotenoides en la cáscara, en las especies *V. cundinamarcensis* y *V. goudotiana*; la semilla se extrajo luego de fermentación durante 15 días, procedimiento empleado por algunos agricultores. Lo precedente puede señalar una latencia profunda de las simientes o, un efecto nocivo del proceso prolongado de fermentación al que se sometieron para la remoción de la sarcotesta. En contexto con lo anterior, Baskin y Baskin (2001) indicaron que las semillas de muchas especies exhiben latencia en el estado de madurez completa de los frutos y que no presentan germinación, en un conjunto amplio de condiciones ambientales. Igualmente, en el género *Vasconcellea*, se han reportado efectos nocivos de la fermentación, durante períodos largos, con recomendación de fermentación de la semilla durante 24 horas (CAF, 1992), para posterior remoción manual de la sarcotesta (Scheldeman, 2002).

Protocolo de tetrazolio estandarizado para las semillas de *V. cundinamarcensis* y *V. goudotiana*: se encontró que la mejor tinción de la semilla con tetrazolio se obtenía luego de 24 horas de inmersión en la solución, al 1%, con

buena penetración del producto, y que en las simientes con remoción manual de la sarcotesta se lograba una tinción nítida que permitía diferenciar claramente las viables. En contraste, en aquellas sometidas al indicador de viabilidad, sin remoción de la sarcotesta, no se produjo tinción alguna, con coloración leve en las que se realizaron incisiones con bisturí. Esto permitió seleccionar como procedimiento de evaluación de viabilidad, el tratamiento del colorante por 24 horas, a las unidades de propagación sexual, luego de remoción manual de la sarcotesta, lo cual brinda una tinción nítida y un indicador confiable de la viabilidad de las semillas. Con relación a la extracción de la sarcotesta, en forma previa a la aplicación del tetrazolio, Tokuhisa *et al.* (2006) indicaron que en la especie relacionada, *Carica papaya*, la sarcotesta -cubierta mucilaginoso que cubre externamente las semillas- podía ocasionar latencia física.

Viabilidad de las semillas de *V. cundinamarcensis* y *V. goudotiana*, validada a través de pruebas de germinación y del tetrazolio: los resultados porcentuales de germinación y latencia, obtenidos con semillas fermentadas y sobrefermentadas de las especies *V. cundinamarcensis* y *V. goudotiana*, con remoción de la sarcotesta, para la evaluación de la germinación y prueba posterior de viabilidad con tetrazolio se incluyen en la tabla 1. Como puede apreciarse, en el taxón *V. cundinamarcensis* no se obtuvo germinación alguna con las simientes extraídas mediante fermentación y sobrefermentación, en tanto que en *V. goudotiana* se obtuvo emergencia de embriones, 18,7%, con las semillas fermentadas, mas no en las sobrefermentadas. Lo precedente está en línea con las simientes no viables, las cuales superaron 70% en *V. cundinamarcensis*, sin

diferencias entre los dos procesos de fermentación, con porcentajes significativamente superiores de semillas muertas, correspondientes a embriones no viables y a las carentes de embrión, con relación al taxón *V. goudotiana*.

El mayor porcentaje de semillas viables, no emergidas, detectadas por el protocolo del tetrazolio y las germinadas, ocurrió en los lotes de simiente de *V. goudotiana*, provenientes de fermentación, con valores significativamente superiores a la sobrefermentada de la especie y aquellas de semilla fermentada y sobrefermentada de *V. cundinamarcensis*. En concordancia con lo anterior, el menor porcentaje de simientes no viables se obtuvo, con confiabilidad estadística, en aquellas de *V. goudotiana* fermentadas, en relación con las de la propia especie sobrefermentada y, a aquellas de *V. cundinamarcensis* fermentadas y sobrefermentadas (tabla 1), lo cual indica una pérdida de la viabilidad, derivado de los procesos de fermentación y sobrefermentación.

Los resultados obtenidos también indican que *V. cundinamarcensis* exhibió un porcentaje significativamente superior de inviabilidad en sus embriones, en comparación con *V. goudotiana*, lo cual no es atribuible a las simientes sin embrión, en las cuales no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos de fermentación y sobrefermentación, aplicados a las dos especies, con valores relativamente bajos que fluctuaron entre 1,0% y 6,2%. Por lo tanto, es presumible que los tratamientos previos de fermentación para la remoción de la sarcotesta hayan propiciado la pérdida de viabilidad de las simientes. Al respecto, aquellas con embrión no viable correspondieron, en alto grado, a pudrición causada por patógenos, con

Tabla 1. Categorización de la viabilidad de semillas de *Vasconcellea cundinamarcensis* y *V. goudotiana* (%) evaluada a través de pruebas de germinación y del procedimiento de tetrazolio

Clasificación de semillas	Germinación %			
	<i>V. cundinamarcensis</i>		<i>V. goudotiana</i>	
	Semilla fermentada	Semilla sobrefermentada	Semilla fermentada	Semilla sobrefermentada
Viables germinadas	0,0 dB	0,0 dB	18,7 bA	0,0 dB
Viables latentes	21,0 bB	22,7 bB	38,9 aA	30,4 bA
Viables totales	21,0 C	22,7 C	57,6 A	30,4 B
Embrión no viable	72,8 aA	74,8 aA	41,3 aC	66,1 aB
Sin embrión	6,2 cA	2,5 cA	1,0 cA	3,5 cA
No viables totales	70,0 A	77,3 A	42,3 B	69,6 A

* Entre promedios marcados con la misma letra minúscula en cada columna y con igual mayúscula en cada hilera no hay diferencias estadísticamente significativas (prueba de Duncan $p = 0,05$). Diferencias basadas en el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje.

p. 187-197

191

FISIOLOGÍA DE SEMILLAS

julio - diciembre / 2013

degradación de los tejidos, lo cual fue evidente en los dos taxa estudiados, durante la fermentación y sobrefermentación, para la remoción de la sarcotesta.

También se pudo inferir mayor afectación, derivada de los procesos de fermentación y sobrefermentación, en las simientes de *V. cundinamarcensis* que en aquellas de *V. goudotiana*, por la ausencia de germinación del primero en los dos procesos, lo cual sí ocurrió en la última especie, en la semilla sometida al tratamiento de menor duración. La ausencia de germinación de embriones viables, luego de los dos tiempos de fermentación para la eliminación de la sarcotesta, podría señalar inhibición de ésta por compuestos fenólicos presentes en la esclerotesta en mayor contenido que en la sarcotesta, considerados como inhibidores de la germinación por Tokuhisa *et al.* (2007) en *Carica papaya*; taxón con estrecha relación genética con las especies del género *Vasconcellea*, las cuales fueron incluidas, inicialmente, en forma conjunta con la papaya, en el género *Carica* (Badillo, 2000, 2001).

En contexto con lo anterior, Desai (2004) señaló que la emergencia de los embriones tiene dos componentes: uno genético y otro ambiental. Esto aplica a las unidades de propagación sexual de las papayuelas, ya que éstas provienen de polinización abierta, con presencia de flores unisexuales en diferentes plantas o en el mismo individuo; sobre lo cual, Scheldeman (2002) indicó que en el caso de *V. cundinamarcensis* existían plantas monoicas o dioicas, con presencia de flores macho, en ciertos períodos. Lo precedente, unido a la alogamia de la especie de *Vasconcellea*, señala constituciones genéticas diversas de las semillas de un mismo individuo e, incluso, de las plantas de cada accesión, lo que puede conducir a respuestas de germinación diferentes bajo condiciones similares de incubación. Adicionalmente, se ha reportado hibridación

entre especies de *Vasconcellea* (Van Droogenbroeck *et al.*, 2004), lo cual puntualiza, aún más, la variabilidad interna de las accesiones por posible introgresión espontánea interespecífica, en las poblaciones colectadas, en conservación; diversidad que debe estar relacionada con la latencia y la germinación obtenidas.

Aplicación de ácido giberélico y nitrato de potasio como promotores de germinación en semillas provenientes de frutos fermentados y sobrefermentados de *V. cundinamarcensis* y *V. goudotiana*

La germinación fue nula o casi nula en el taxón *V. cundinamarcensis*, tanto en las semillas fermentadas, 15 días en el proceso, como en las sobrefermentadas, obtenidas a partir de frutos podridos, con emergencia de embriones, en todos los tratamientos, en las unidades de propagación sexual en el caso de la especie *V. goudotiana* (tabla 2). En ésta última se apreció mayor germinación en semillas fermentadas con relación a las sobrefermentadas, en todos los tratamientos, lo cual incluyó el testigo, sin aplicación de promotores de brotación de plántulas. En el último taxón, la mayor germinación se obtuvo con los tratamientos de fermentación, con adición de 200 ppm del promotor ácido giberélico (AG_3) y, aquel en el cual se aplicó 200 ppm de AG_3 , complementados con nitrato de potasio (KNO_3), al 1,5%, con valores de 52,4% y 60,8% de emergencia, sin diferencias estadísticamente significativas entre éstos. Los resultados obtenidos apuntan a que el lote empleado de simientes de *V. cundinamarcensis* exhibía una latencia profunda o, su viabilidad fue afectada por los procesos de fermentación. Al respecto, Alarcón *et al.* (1997) informaron que las simientes de *V. cundinamarcensis* recién extraídas mostraban baja germinación. Igualmente, Varela *et al.*

Tabla 2. Germinación de semillas fermentadas y sobrefermentadas de *Vasconcellea cundinamarcensis* y *V. goudotiana* (%), con aplicación de los promotores de emergencia: ácido giberélico - AG_3 - y nitrato de potasio - KNO_3 -

	Germinación %			
	<i>V. cundinamarcensis</i>		<i>V. goudotiana</i>	
	Semilla fermentada	Semilla sobrefermentada	Semilla fermentada	Semilla sobrefermentada
Testigo	0,0aB	0,0aB	5,6cA	2,0aB
KNO_3 1,5%	0,0aB	0,4aB	52,4aA	1,6aB
AG_3 200 ppm	0,8aB	0,0aB	26,0bA	0,8aB
AG_3 200 ppm + KNO_3 1,5%	0,0aB	2,0aB	60,8aA	1,6aB

* Entre promedios marcados con la misma letra minúscula en cada columna y con igual mayúscula en cada hilera no hay diferencias estadísticamente significativas (prueba de Duncan $p = 0,05$). Diferencias basadas en el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje.

(2011) afirmaron que las semillas del taxón relacionado *Vasconcellea monoica* exhibían poca uniformidad en su germinación incluso en condiciones favorables para que esto ocurriera.

Con relación al efecto positivo de las giberelinas, AG₃, y del nitrato de potasio KNO₃, Gashi *et al.* (2012) señalaron que las primeras están más directamente implicadas en el control y promoción de la germinación que el otro compuesto. Esto se evidencia en el taxón *V. goudotiana*, en el cual no se encontraron diferencias significativas en la emergencia de plántulas entre los tratamientos derivados de la aplicación de AG₃ y las de éste compuesto adicionado con KNO₃. Al respecto, Finch-Savage y Leubner-Metzger (2006) informaron que el ácido giberélico estimula la germinación por la vía de síntesis de amilasas; y Gashi *et al.* (2012) señalaron que el KNO₃ es el compuesto químico más ampliamente utilizado para promover la germinación; a lo cual Alboresi *et al.* (2005) indican que los nitratos, tales como el KNO₃, claramente estimulan la germinación de semillas latentes.

Respuesta germinativa de semillas de *V. cundinamarcensis* y *V. goudotiana* en combinaciones de tratamientos con y sin fermentación a través de la levadura *S. cerevisiae*, con remoción y no remoción de la sarcotesta y dos tratamientos adicionales de aplicación de AG₃ 200 ppm y KNO₃ con y sin remoción de la sarcotesta: de acuerdo con los resultados, se detectó una respuesta germinativa superior en el taxón *V. goudotiana*, con relación a aquella de *V. cundinamarcensis*, con emergencia de embriones en

todos los tratamientos, lo cual no ocurrió en el segundo (tabla 3). La mayor respuesta germinativa de *V. goudotiana* también fue evidente en los dos estudios presentados previamente (tablas 1 y 2). Al respecto, como se anotó, Alarcón *et al.* (1997) indicaron que la germinación en las semillas de *V. cundinamarcensis* es reducida en semillas recién extraídas. Esto también ha sido reportado en otras especies hermanas, como es el caso de *V. monoica*, de la que Varela *et al.* (2011) indicaron que en el taxón *V. monoica*, la emergencia de las semillas exhibía uniformidad baja, aun sometida a condiciones favorables, para la emergencia de los embriones.

También pudo apreciarse un efecto positivo de la fermentación, con la aplicación de la levadura *S. cerevisiae*, la cual indujo alguna germinación en *V. cundinamarcensis* (8,8%), con valores significativamente superiores en *V. goudotiana* (66,6%), con una probabilidad de error de 0,05, en las semillas fermentadas con la sarcotesta (tabla 3). Los valores anteriores obtenidos con ambos taxa en las simientes fermentadas con levadura, fueron superados, con confiabilidad estadísticamente significativa de 0,95, en los tratamientos de fermentación con levadura en las semillas con sarcotesta, a las cuales se adicionó como promotores de germinación AG₃ 200 ppm y KNO₃ al 1,5%. Al respecto, en las simientes fermentadas sin sarcotesta, lo cual se tradujo en germinaciones nulas o bajas, se puede apreciar incidencia de daños por microorganismos, sobre lo cual Cherry (1983) afirmó que el deterioro de las simientes se incrementa con condiciones favorables para los patógenos, los cuales desarrollan mecanismos inhibitorios

Tabla 3. Germinación obtenida por semillas de papayuelas *Vasconcellea cundinamarcensis* y *V. goudotiana*, con y sin fermentación, con y sin sarcotesta, y con aplicación de ácido giberélico 200ppm y nitrato de potasio al 1,5%

Tratamiento	Germinación %	
	<i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	<i>Vasconcellea goudotiana</i>
Fermentación con levadura, con sarcotesta	8,8bB	66,6bA
Fermentación con levadura, sin sarcotesta	0,0cA	2,8cA
Fermentación sin levadura, con sarcotesta	0,0cA	3,8cA
Fermentación con levadura, con sarcotesta, AG ₃ 200 ppm + KNO ₃ 1,5%	39,4aB	88,4aA
Fermentación con levadura, sin sarcotesta, AG ₃ 200 ppm + KNO ₃ 1,5%	0,4cA	1,4cA

* Entre promedios marcados con la misma letra minúscula en cada columna y con igual mayúscula en cada hilera no hay diferencias estadísticamente significativas (prueba de Duncan $p = 0,05$). Diferencias basadas en el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje.

a la emergencia de los embriones y, aun toxinas durante el proceso de germinación. Al respecto El-Saidy y El-Hai (2011) informaron que la levadura *S. cerevisiae*, aplicada a semillas de *Arachis hypogaea*, en almacenamiento, tiene efectos positivos en la germinación y las protege del ataque de patógenos en almacenamiento; esto podría indicar que su aplicación, en el proceso de fermentación, utilizado para remover la sarcotesta, actúa como agente controlador de los microorganismos patogénicos causantes de pudriciones en los procesos de fermentación.

Germinación lograda con semillas de *V. cundinamarcensis* y *V. goudotiana*, extraídas a través de fermentación durante tres días, por acción de la enzima *S. cerevisiae*, con aplicación posterior de diferentes combinaciones de dosis de AG_3 y KNO_3

En el estudio se presentó germinación en los dos taxa, en todos los tratamientos aplicados, incluso en el testigo, sin diferencias significativas entre éstas, con la sola aplicación de la levadura *S. cerevisiae*, en las cuales se obtuvo emergencia de embriones del orden de 24,4 y 25,0%, con *V. cundinamarcensis* y *V. goudotiana*, respectivamente (tabla 4). Lo anterior es atribuible a la reducción en el tiempo de fermentación a 36 horas y el efecto antipatogénico de la levadura, reportado por El-Saidy y El-Hai (2011).

En los tratamientos aplicados luego de la fermentación con la levadura, se obtuvo la mayor germinación en el taxón *V. cundinamarcensis*, 51,2%, con la aplicación de 1000 ppm de AG_3 más KNO_3 al 1,5%, sin diferencias estadísticamente significativas con la obtenida al aplicar

600 ppm de AG_3 y KNO_3 al 2,5%, en los cuales se obtuvo una germinación de 51,20% y 48,0%, valores significativamente superiores a los obtenidos con los demás tratamientos evaluados con el taxón. Con la especie *V. goudotiana* se logró la máxima germinación, 83,6%, al tratar las simientes previamente fermentadas con *S. cerevisiae*, con 1000 ppm de AG_3 y KNO_3 al 2,5%, con diferencias estadísticamente significativas, con la respuesta obtenida con las demás combinaciones de los dos promotores de emergencia de embriones y, aun con todos los valores de germinación logrados con el taxón *V. cundinamarcensis*. Scheldeman (2002) señala que la aplicación previa de AG_3 estimula la germinación, en concentraciones altas, y recomendó la dosis de 1000 ppm como tratamiento para acelerarla y maximizarla; también postuló que el nitrato de potasio igualmente induce emergencia de los embriones, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos.

Dado que la germinación de las especies de *Vasconcellea* es a menudo irregular, lenta y errática a lo largo del tiempo (Scheldeman, 2002), los resultados obtenidos deben ser confirmados con evaluaciones en semillas cosechadas en varias épocas y en accesiones diversas, para tener mayor confiabilidad, ya que el mismo autor informó diferencias entre poblaciones de la misma especie. Igualmente, reportó la mayor germinación en *V. cundinamarcensis*, en un conjunto de taxa del género *Vasconcellea*, en el cual no se incluyó *V. goudotiana*, taxón con respuestas germinativas superiores a las de *V. cundinamarcensis*, en el estudio presente.

Con relación a las simientes de la colección almacenadas a baja temperatura, en los monitoreos periódicos se

Tabla 4. Porcentaje de germinación de semillas de papayuelas de altura *V. cundinamarcensis* y *V. goudotiana*, extraídas luego de 3 días en fermentación, con adición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y aplicación de combinaciones de AG_3 y KNO_3 como promotores de la germinación

Tratamiento	Germinación %	
	<i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> *	<i>Vasconcellea goudotiana</i> *
Testigo	24,4bA	25,0cdA
AG_3 200 ppm + KNO_3 1,5%	28,4bA	37,6cA
AG_3 200 ppm + KNO_3 2,5%	26,0bA	13,3dB
AG_3 600 ppm + KNO_3 1,5%	19,2bA	15,3dA
AG_3 600 ppm + KNO_3 2,5%	48,0aA	11,3dB
AG_3 1000 ppm + KNO_3 1,5%	51,2aA	64,4bA
AG_3 1000 ppm + KNO_3 2,5%	22,0bB	83,6aA

* Entre promedios marcados con la misma letra minúscula en cada columna y con igual mayúscula en cada hilera, no hay diferencias estadísticamente significativas (prueba de Duncan $p = 0,05$). Diferencias basadas en el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje.

requiere aplicar, aparte de la prueba de germinación, evaluaciones posteriores de viabilidad, con tetrazolio, para determinar la viabilidad real de cada una de ellas y así determinar la necesidad de coleccionar semillas a partir de la colección de campo en aquellas cuya germinación sea inferior al 80% de la inicial. Esto con el fin de mantener una representatividad adecuada de la variabilidad de los materiales sembrados, por la vía de simientes.

Igualmente, es recomendable la revalidación posterior de los resultados, con el fin de establecer protocolos confiables de remoción de la latencia, lo cual apoya la utilización del germoplasma con fines de investigación, así como desarrollo y posible entrega de cultivares superiores, seleccionados o procedentes de procesos de hibridación, para la implementación de posibles cultivos de papayuela. Ésta, con el Centro Primario de Diversidad en la Zona Andina, se siembra y exporta en Chile y, en el presente, está incluida, en Colombia, en el conjunto de especies relegadas, promisorias.

La colección de especies del género *Vasconcellea* puede servir para enriquecer la variabilidad genética de *Carica papaya* y la transferencia de atributos valiosos, a través de hibridación intergenérica de ésta, aspecto reportado por Vegas *et al.* (2003). Al respecto, Scheldeman (2002) informó que se han obtenido híbridos artificiales, intergenéricos, entre *Vasconcellea* y *Carica papaya*, para la transferencia de características como resistencia a enfermedades y tolerancia al frío. Estos exhiben barreras de incompatibilidad y aborto de las semillas (Magdalita *et al.*, 1997), las cuales pueden superarse a través de rescate de embriones (Drew *et al.*, 1998). Entre los atributos a transferir, a partir de los taxa de *Vasconcellea*; se han relacionado, entre otras, fragancias agradables, monoecia y cualidades ornamentales (Manshardt y Wenslaff, 1989), aparte de las anteriormente mencionadas.

CONCLUSIONES

No se obtuvo germinación alguna de semillas de las especies *V. cundinamarcensis* y *V. goudotiana* extraídas a partir de frutos en diferente grado de maduración, luego de fermentación, durante 15 días, para remoción de la sarcotesta. Esto puede indicar latencia profunda, por tratarse de taxa con un grado incipiente de domesticación y/o un efecto nocivo por la duración del proceso de fermentación.

El protocolo de tetrazolio, desarrollado y estandarizado para determinar latencia de las semillas de los taxa del

estudio, permitió diferenciar las no germinables viables de las no viables. Esto apoyó las etapas de investigación para la elucidación de simientes latentes en aquellas que no emergieron. Igualmente, será una ayuda importante para los procesos de monitoreo de semillas vivas, con fines de regeneración oportuna y así evitar erosión genética de las semillas, en almacenamiento, como duplicado de seguridad de la colección de campo.

El taxón *V. goudotiana* exhibió respuesta germinativa (18,7%), a través de las semillas fermentadas durante 15 días, para remoción de la sarcotesta, mas no de aquellas provenientes de frutos podridos, sobrefermentados, procedimiento empleado por cultivadores de la especie; en *V. cundinamarcensis* con los dos tipos de simiente no hubo respuesta germinativa. Lo precedente está en línea con la pérdida de viabilidad, monitoreada por el tetrazolio, en el taxón, la cual fue superior a la de *V. goudotiana*. Esto señala que *V. cundinamarcensis* es más susceptible a pérdida de la viabilidad al someterse a los procesos de fermentación y sobrefermentación, lo cual puede atribuirse a aspectos fisiológicos de éste o a una mayor susceptibilidad a patógenos de las semillas durante el proceso.

El comportamiento germinativo del taxón *V. cundinamarcensis* también fue nulo o muy pobre, como secuela de la fermentación y sobrefermentación, y aplicación posterior de los promotores de germinación AG₃ y AG₃ + KNO₃, con emergencia de embriones en todos los tratamientos de *V. goudotiana*, especialmente a partir de las simientes fermentadas. Esto reafirma el efecto negativo de los procedimientos de fermentación y sobrefermentación en el primer taxón, en el cual la germinación fue nula en los testigos, derivados de los dos procedimientos de fermentación y, casi nula al aplicar los promotores de emergencia de los embriones; lo que indica, en comparación con los resultados obtenidos con *V. goudotiana*, daño de las simientes por el proceso en sí y ataques de patógenos, lo cual se observó en el estudio.

De todas formas, es conveniente reevaluar lo anterior, en la especie *V. cundinamarcensis*, con semillas de diversas accesiones, colectadas en épocas distintas, ya que en esta entidad biológica se han detectado comportamientos erráticos de la semilla, con relación al tiempo de colecta y almacenamiento, al igual que respuestas diversas entre accesiones.

La aplicación de la levadura *S. cerevisiae* para la fermentación de la sarcotesta indujo germinación *per se* en los dos taxa, con una respuesta significativamente superior en *V. goudotiana*, con germinaciones significativamente

superiores al adicionar al proceso fermentativo del microorganismo, con la aplicación como promotores de emergencia de AG_3 , 200 ppm y KNO_3 al 1,5%; los cuales tuvieron un efecto mayor en *V. goudotiana*. Lo anterior se confirmó en un estudio posterior, con obtención de germinación de alrededor de 25%, con la sola aplicación de la levadura *S. cerevisiae*, en las dos especies, y un efecto positivo al aplicar posteriormente AG_3 y KNO_3 como promotores de emergencia; en concentraciones de 600 ppm y al 2,5% y de 1000 ppm y al 1,5%, en el caso del taxón *V. cundinamaricensis* y de 1000 ppm y KNO_3 al 2,5% en el de la especie *V. goudotiana*.

La combinación de la levadura para la fermentación de las semillas y los promotores de germinación AG_3 y KNO_3 en las concentraciones indicadas, para cada una de las dos especies, conforman un protocolo preliminar para la germinación, el cual es conveniente revalidar. De todas formas, como la latencia puede tener diferente profundidad, es recomendable, para el monitoreo de las semillas en conservación, realizar adicionalmente la prueba del tetrazolio para la determinación de la viabilidad real de las semillas, compuesta por la sumatoria del porcentaje de germinación y el de aquellas vivas latentes.

REFERENCIAS

- Alarcón L, Benavides L, Parodi G. 1997. Efecto de la temperatura y período de almacenamiento sobre la germinación de la semilla de papayuela (*Carica pubescens* Lenné et Koch). Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. 41:242-245.
- Alboresi A, Gestin C, Leydecker MT, Bedu M, Meyer C, Truong HN. 2005. Nitrate a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. Plant Cell. Environ. 28(4):500-512.
- Ávila P. 2007. Diversidad y estructura genética de *Vasconcellea pubescens* cultivada en Chile evaluada mediante marcadores ISSR. En: dspace. utalca. cil/bitstream/1950/6150/avila_figuroa.pdf
- Badillo VM. 1971. Monografía de la familia Caricaceae. Universidad Central de Venezuela Maracay, Venezuela 221 p.
- Badillo VM. 2000. *Carica* L. vs. *Vasconcellea* St Hill. (*Caricaceae*) con la rehabilitación de este último. Ernstia 10(2):74-79.
- Badillo VM. 2001. Nota correctiva *Vasconcellea* St Hill. (*Caricaceae*) y no *Vasconcellea* (*Caricaceae*). Ernstia 11:75-76.
- Baskin CC, Baskin JM. 2001. Seeds. Ecology biogeography and evolution of dormancy and germination. Academic Press. San Diego, California, USA. 627 p.
- Cadavid A, Villegas E, Medina CI, Lobo M, Reyes C. 2003. Caracterización morfológica de caricáceas de altura. En: Memorias IV Seminario Nacional de Frutales de Clima Frío Moderado. Medellín, Colombia CDTF UPB Corpoica. p. 55-60.
- CAF. 1992. Manual técnico del cultivo de chamburo. Centro Agrícola de Quito Corporación Andino de Fomento. Quito, Ecuador 36 p.
- Carrasco B, Ávila P, Pérez-Díaz J, Muñoz P, García R, Lavandero B, Zuita-Silva A, Retamales JB, Caligari PDS. 2009. Genetic Structure of highland papayas *Vasconcellea pubescens* (Lenné et C. Koch) Badillo) cultivated along a geographic gradient in Chile as revealed by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). Genetic Resources and Crop Evolution 56(3):331-337.
- Cherry JP. 1983. Protein degradation during seed deterioration. Phytopathology. 73(2):317-321.
- Desai B. 2004. Seeds Handbook. Biology production processing and storage. 2nd edition. (Marcel Dekker). 787 p.
- Drew RA, O'Brien CM, Magdalita PM. 1998. Development of *Carica* interspecific hybrids. Acta Horticulturae 461:285-291.
- El-Saidy AEA, El-Hai KMA. 2011. Alleviation of seed peanut deterioration during storage using biotic and abiotic agents. Research Journal of Seed Science 4(2):64-81.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist 171(3):501-523.
- Fouqué A. 1973. Espèces fruitières d'Amérique tropicale. Caricaceae. Fruits 28: 648-652.
- Gashi B, Kasamedin AK, Mata V, Kongjika E. 2012. Effect of gibberellic acid and potassium nitrate on seed germination of the resurrection plants *Ramonda serbica* and *Ramondana thaliae*. African Journal of Biotechnology 11(20):4537-4542.
- Grzybowski CR, de Castro O, Carvalho R, Panobianco M. 2012. Viability of barley seeds by the tetrazolio test. Revista Brasileira de Sementes 34(1):47-54.
- International Seed Testing Association -ISTA-. 2007. International rules for seed testing. 46 p.
- IUCN—The World Conservation Union. 2003. The IUCN Red List of Threatened Species. IUCN Species Survival Commission. IUCN Gland Switzerland and Cambridge UK. Available at website <http://www.iucnredlist.org/>.
- Kyndt T, Romein-Peters E, Van Droogenbroeck B, Romero-Motochi J, Gheyen G, Goetghebeur P. 2005. Species relationships in the genus *Vasconcellea* (*Caricaceae*) based on molecular and morphological evidence. American Journal of Botany 92:1033-1044.
- Magdalita PM, Drew RA, Adkins SW, Godwin ID. 1997. Morphological molecular and cytological analysis of *Carica papaya* × *C. cauliflora* interspecific hybrids. Theoretical and Applied Genetics 95:224-229.
- Manshardt RM, Wenslaff TF. 1989. Interspecific hybridization of papaya with other *Carica* species. Journal of the American Society for Horticultural Science 114(4):689-694.
- Quintanilla YD. 1995. Caracterización de la papaya (*Carica pubescens* Lenné et Koch) de Cobquecura para aptitud industrial. Memoria título Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía Universidad de Concepción. Chillán, Chile.

- Scheldeman X. 2002. Distribution and potential of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and highland papayas (*Vasconcellea* spp) en Ecuador. Thesis submitted in fulfillment of the requirement for the degree of Doctor (Ph. D.) University of Gent Belgium. 165 p.
- Tokuhisa D, Cunha D, Mantovani E, Hilst PC, Demuner AJ. 2007. Compostos fenólicos inibidores da germinação. Revista Brasileira de Sementes 29(3):180-188.
- Tokuhisa D, Diaz DC, Alvarenga EM, Diaz LA, Marín SL. 2006. Tratamientos para superacao da dormencia em sementes de mamao. Revista Brasileira de Sementes 29:131-139.
- Tunes LM, Bandinelli PG, Olivo F, Barros AC. 2009. Tratamento para superamento da dormencia em sementes de cevada. Scientia Agraria 10(1):15-21.
- Van Droogenbroeck B, Kyndt J, Maertens I, Romein-Peters E, Scheldeman X, Romero-Motochi JP, Van Damme P, Goethebeur P, Gheysen G. 2004. Phylogenetic analysis of the Highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (Caricaceae) using PCR-RFLP. Theoretical and Applied Genetics 108:1437-1486.
- Varela M, Abreu A, Galon K, Brekemkamp DM, Pereira J, Queiroz M, Martins G, Coelho RI. 2011. Influencia de períodos de imersão em agua na emergência de plântulas de mamão ornamental. XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica XI Encontro Latino Americano de Pos Graduação. Universidade Federal de Espirito Santo, Guararena, Brasil. p. 1-4.
- Vegas A, Trujillo G, Sandra Y, Mata J. 2003. Obtención, regeneración y evaluación de híbridos intergenéricos entre *Carica papaya* y *Vasconcellea cauliflora*. Interciencia 28(12):710-714.