

**UNIVERSIDAD MILITAR  
NUEVA GRANADA**



**EFECTO DE ÁCIDO GIBERÉLICO ( $AG_3$ ), NITRATO DE POTASIO ( $KNO_3$ ) Y  
RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPRs),  
SOBRE EL DESARROLLO TEMPRANO DE *Solanum sessiliflorum* (COCONA).**

**CATALINA MORENO CURTIDOR**

**Trabajo especial presentado como requisito parcial para optar al título de:  
Bióloga**

**Director:**

**Pedro Jiménez Morales, Ph.D.**

**Universidad Militar Nueva Granada.**

**Facultad de Ciencias Básicas**

**Programa de Biología Aplicada**

**Bogotá D.C., Colombia**

**2012.**

## CONTENIDO.

Tema	Página
<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. ABSTRACT</b>	2
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	3
3.1. Objetivo general	4
3.2. Objetivos específicos	4
<b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	5
4.1. <i>Solanum sessiliflorum</i> <b>Dunal</b>	5
4.2. Ácido giberélico (AG <sub>3</sub> )	7
4.3. Nitrato de potasio (KNO <sub>3</sub> )	8
4.4. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs).	9
4.5. Escala fenológica BBCH.	10
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	12
5.1. Área de estudio	12
5.2. Recolección y almacenamiento de semillas	12
5.3. Determinación del porcentaje de germinación y fotoblastismo	12
5.4. Evaluación de la viabilidad	13
5.5. Evaluación del efecto de AG <sub>3</sub> y KNO <sub>3</sub> sobre la germinación	13
5.6. Evaluación del efecto de PGPRs sobre la germinación	14
5.7. Evaluación del efecto de AG <sub>3</sub> y KNO <sub>3</sub> sobre el desarrollo	15
5.8. Elaboración de la escala fenológica BBCH	15
5.9. Análisis estadístico	16
<b>I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	16
6.1. Porcentaje de germinación y fotoblastismo	16
6.2. Porcentaje de viabilidad	18
6.3. Efecto de AG <sub>3</sub> y KNO <sub>3</sub> sobre la germinación	19
6.4. Efecto de las PGPRs sobre la germinación	22
6.5. Efecto de AG <sub>3</sub> y KNO <sub>3</sub> sobre el desarrollo temprano	23

6.6. Escala BBCH extendida para <i>Solanum sessiliflorum</i> .	27
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	33
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	34

## I. RESUMEN.

En este trabajo se realizaron pruebas de germinación a semillas de *Solanum sessiliflorum* para conocer los requerimientos generales que presenta esta especie para llevar a cabo este proceso y producir plantas viables en etapas tempranas de crecimiento bajo condiciones diferentes a las de su área de distribución habitual. En las pruebas se determinaron porcentajes de viabilidad, porcentajes de germinación, tiempos de germinación y respuesta al estímulo de la luz. Por otro lado, se evaluó el efecto de diferentes tratamientos pre-siembra con los promotores de crecimiento AG<sub>3</sub> (ácido giberélico), KNO<sub>3</sub> (nitrato de potasio) y PGPRs (rizobacterias promotoras de crecimiento) de los géneros *Bacillus sp* y *Pseudomonas sp*, sobre el desarrollo de *S. sessiliflorum*. Adicionalmente se obtuvo una descripción de los estadios de desarrollo de la especie. El estudio se realizó en la Universidad Militar Nueva Granada, Cajicá, Colombia, a una temperatura media de 18°C y 2558 m.s.n.m, con semillas tomadas de frutos maduros de *S. sessiliflorum* provenientes de Caquetá, Colombia (temperatura media anual de 27°C y 242 m.s.n.m). Se determinó que las PGPRs no tuvieron efecto positivo sobre el desarrollo de ésta especie, mientras que los tratamientos con AG<sub>3</sub> y KNO<sub>3</sub> tanto en presencia como en ausencia de luz, presentaron disminución de tiempos de germinación e incremento en los porcentajes de germinación. El tratamiento más eficiente resultó del efecto sinérgico de AG<sub>3</sub> a 500ppm y KNO<sub>3</sub> a 0,25M, donde de acuerdo con las pruebas estadísticas, el porcentaje de germinación se incrementó significativamente por encima del control y de los demás tratamientos. Sin embargo, sobre las variables: altura y número de hojas, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Finalmente, la descripción de los estadios de desarrollo obtenida permitió elaborar una escala fenológica (BBCH) extendida para *S. sessiliflorum*.

Palabras clave: *Solanum sessiliflorum*, AG<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, rizobacterias promotoras de crecimiento, escala fenológica BBCH.

## I. ABSTRACT

This study tested *Solanum sessiliflorum* for seed germination in order to know the general requirements for this species to carry out this process and to produce viable plants under different conditions from its customary distribution area. In tests, we determined viability percentages, germination percentages, germination times and response to the stimulus of light. Furthermore, we evaluated the effect of pre-sowing treatments with growth promoters GA<sub>3</sub> (gibberellic acid), KNO<sub>3</sub> (potassium nitrate) and PGPRs (growth promoting rhizobacteria) from the genera *Bacillus sp* and *Pseudomonas sp*, over *S. sessiliflorum* development at early growth stages. Additionally, we obtained a description of phenological stages for the species. The study was conducted at Nueva Granada Military University, Cajicá, Colombia, with an average temperature of 18°C and 2558 m.a.s.l, with seeds from ripe fruits of *S. sessiliflorum* native from Caquetá, Colombia (average annual temperature of 27°C and 242 m.a.s.l). We found PGPRs provided no positive effect on this species development, while treatments with GA<sub>3</sub> and KNO<sub>3</sub> in presence and absence of light, had decreased time germination and increased germination percentages significantly, according with statistic test. The most efficient treatment for germination was the synergistic effect from GA<sub>3</sub> 500ppm and KNO<sub>3</sub> 0.25M treatment, where the germination percentage was increased significantly over control and other treatments. However, growth variables as height and number of leaves were not statistically different. Finally, the description of developmental stages obtained allowed us to develop an extended (BBCH) scale for phenological stages in *S. sessiliflorum*.

Keywords: *Solanum sessiliflorum*, AG<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, plant growth promoting rhizobacteria, phenological scale BBCH.

### III. INTRODUCCIÓN

En Colombia, el frutal amazónico *Solanum sessiliflorum* (cocona) es poco conocido a nivel nacional y no ha logrado posicionarse en el mercado a pesar de su potencial agroindustrial (Cardona, 2011). Sin embargo, en otros países de la región, Perú y Brasil, esta especie es conocida y sus productos derivados se comercializan activamente (Marx *et al*, 1998; Carvajal y Balcázar, 2000). Existe una larga trayectoria de investigación sobre la especie y abundantes publicaciones sobre cocona, pero la mayoría de estas se enfocan en el aprovechamiento agroindustrial y pocas en el conocimiento de su biología básica (Pereira *et al*, 2011). Pese a la gran utilidad de los frutos de cocona, y el creciente interés en su investigación e implementación en sistemas productivos, aspectos como condiciones de germinación, ruptura de dormancia o uso de promotores de crecimiento en busca de la optimización del proceso germinativo y el desarrollo temprano en la especie, entre otros, parecen dejarse de lado o no han sido debidamente documentados en la literatura actualmente disponible para la especie.

*S. sessiliflorum* (cocona), es nativa de la Amazonía, semileñosa, perenne y pertenece a la familia Solanaceae. Sus frutos comestibles tienen gran aceptación y por ser una planta rústica, fácil de cultivar, considerablemente resistente a enfermedades y sin requerimientos nutricionales muy exigentes, posee gran potencial para la agroindustria moderna (Oliveira, 2006). Estas cualidades permiten su comercialización por buenos precios, no solo como fruto fresco, sino también sus productos derivados como jaleas, dulces, salsas, yogurt, jugos y algunos medicamentos (Carvajal y Balcázar, 2000; Cardenas, 2004; Silva Filho *et al*, 2005).

Actualmente, la cocona está distribuida en el Amazonas brasileño, peruano, ecuatoriano, colombiano y venezolano, como también en los Andes del Ecuador y Colombia hasta 1000 m.s.n.m (Silva Filho, 1998). Se ha reportado que en Brasil y Perú, la cocona se comercializa activamente y ha sido objeto de investigación para ejecutar proyectos agrícolas con el fin de fomentar el desarrollo y asistir a los cultivadores (Marx *et al*, 1998; Silva Filho, 1998; Cardona, 2011), mientras en Colombia, su cultivo solo se destaca en el Departamento del Guaviare, donde es un alimento tradicional de ésta zona, reconocido por su refrescante sabor, y por las propiedades medicinales que le son atribuidas (Cardona, 2011).

En Colombia, durante casi una década se han adelantado proyectos sobre manejo y transformación de especies frutales de la región amazónica, dirigidos hacia el conocimiento y aprovechamiento de sus cualidades agroindustriales (Hernández *et al*, 2004). Estos estudios han sido llevados a cabo, principalmente, por el Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas (SINCHI), la Corporación

Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) además de otras instituciones gubernamentales y académicas que también han participado del esfuerzo, como la Universidad de la Amazonía, la Universidad Nacional de Colombia, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, la Asociación de productores para el cambio Económico del Guaviare (ASOPROCEGUA) y algunas otras asociaciones pertenecientes a la corporación Red Colombia Verde (Barrera *et al*, 2011).

Aún así, la información respecto a la biología de la especie resulta escasa y la investigación referente a procesos como la germinación y el desarrollo temprano, no resulta clara y disponible: Evidentemente conocer cómo funcionan estos procesos es una necesidad para los interesados en implementar sistemas productivos de *S. sessiliflorum*, dadas sus implicaciones para el establecimiento y producción de la especie (Díaz y Martins, 2010; Pereira *et al*, 2011).

Con el estudio de la germinación de la especie, su fenología y la evaluación de cómo responden las semillas de cocona a la aplicación de diferentes promotores de crecimiento durante la germinación y el desarrollo temprano, este trabajo pretende aportar información sobre la biología básica de la especie y explorar metodologías que pueden favorecer el crecimiento de cocona bajo condiciones diferentes a las de su área de distribución natural para promover la expansión de su uso.

### 3.1. *Objetivo general*

Estudiar el desarrollo de *Solanum sessiliflorum* bajo condiciones ambientales diferentes a las de su área de distribución habitual.

### 3.2. *Objetivos específicos*

- Evaluar la germinación de *Solanum sessiliflorum* bajo condiciones de la Sabana de Bogotá.
- Evaluar el efecto de tratamientos con  $AG_3$  y  $KNO_3$  sobre la germinación de *Solanum sessiliflorum*.
- Evaluar el efecto de cuatro cepas de rizobacterias sobre la germinación de *Solanum sessiliflorum*.
- Elaborar una escala fenológica (BBCH) extendida para *Solanum sessiliflorum*.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. *Solanum sessiliflorum* Dunal.

Esta planta pertenece a la familia Solanaceae, sección Lasiocarpa, género *Solanum* y se conoce comúnmente como cocona, túpiro, tomate indio, Orinoco apple o peach tomato. Es semileñosa, nativa de la Amazonía y ha sido domesticada por las poblaciones indígenas de la zona. (Volpato *et al*, 2004; Silva Filho, 2005).

Todos los tipos de cocona que han sido recolectados por institutos oficiales en las distintas regiones del Amazonas brasileño, peruano y colombiano provienen de los campos y parcelas de los habitantes de la región, o de mercados locales donde son comercializados, por lo cual es posible encontrarse con numerosas etnovariedades que van desde el tipo silvestre hasta la más avanzada en el proceso de domesticación, que se distinguen principalmente según el tamaño y forma de los frutos (Silva Filho, 1998).

Las etnovariedades de cocona han sido también mejoradas *ex situ* y muchos materiales promisorios han sido seleccionados por calidad del fruto y productividad, así como en términos de resistencia a plagas y enfermedades, entre las que se han encontrado materiales resistentes a *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* y *Sclerotium rolfsii*, patógenos considerados de importancia económica en las Solanáceas que producen frutos comestibles en el Amazonas (Noda *et al*, 1997 citado en Silva Filho, 1998). Estos materiales fueron mejorados *ex situ* y actualmente han sido devueltos al agricultor de zona rural como un recurso genético de mejor calidad (Silva Filho, 1998).

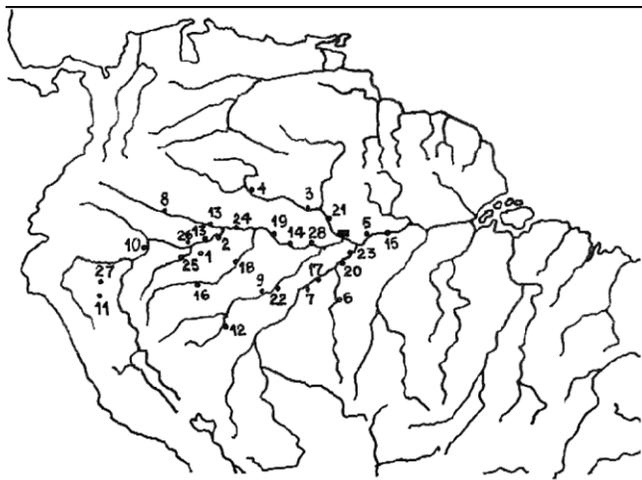
Estudios efectuados en el Perú indican la existencia de más de 25 ecotipos, de los cuales se han seleccionado 11 promisorios, pero estos no han sido mantenidos en ninguna colección de germoplasma, dificultando así su disponibilidad (Silva Filho, 1998). En la Amazonía colombiana pueden distinguirse 6 ecotipos de *S. sessiliflorum*, que se diferencian por caracteres como tipo de crecimiento, variables de la hoja, color del epicarpio y color de la pulpa, peso y tamaño del fruto. (Hernández *et al*, 2004; Hernández y Barrera, 2004).

Durante la siembra, el espaciamiento entre plantas de cocona puede variar de acuerdo con la intensidad del cultivo, de la etnovariiedad y el tipo de suelo. Generalmente ocurren etnovariedades que crecen poco y pueden ser cultivadas en cualquier tipo de suelo en un espaciamiento

de 1,0 x 1,0 m. Las etnovariedades que crecen más de 1,50 m de alto, en suelos con baja fertilidad natural deben ser cultivadas en un espaciamiento mínimo de 1,00 x 1,50 m, dado que una plantación muy densa hace que la cosecha de los frutos sea incómoda para las personas que ejecutan esta tarea (Silva Filho, 1998).

Esta especie tiene un ciclo vegetativo corto y la producción comienza aproximadamente 7 meses después de la emergencia (Marx *et al*, 1998). Es muy productiva y dependiendo de las condiciones del suelo, el clima y el genotipo sembrado, pueden durar cerca de 3 años y la cosecha por planta puede llegar a 14kg por año pudiendo dar 100 toneladas por hectárea de frutos (Carvajal y Balcázar, 2000).

Las plantas de *S. sessiliflorum* crecen rápidamente y pueden alcanzar una altura aproximada de 2m. La especie se cultiva en altitudes que varían desde el nivel del mar hasta 1.500 m sobre el nivel del mar, sin embargo sobre los 1.000 m su producción disminuye, y a los 1.500 m no produce nada económicamente (Silva Filho, 1998). La especie está bien adaptada a regiones de clima cálido con humedad relativa superior al 80%, donde la temperatura promedio llega a 24°C y con precipitación anual de 2000 y 8000mm (Figura 1) (Carvajal y Balcázar, 2000; Silva Filho *et al*, 2005).



**Figura 1.** *Solanum sessiliflorum*. Origen y localización geográfica de 28 etnovariedades de cocona. Tomado de Silva Filho *et al*, (2005).

La planta presenta potencial para la agroindustria moderna dada su rusticidad y alta producción. El principal interés sobre esta especie radica en sus frutos, que son de tamaño variable sub-globosos a ovoides de color verde cuando están inmaduros y naranja cuando maduran, de pulpa ácida con numerosas semillas pequeñas y achatadas (Marx *et al*, 1998).

La pulpa del fruto es amarga pero agradable, su sabor es similar al de algunos cítricos y puede ser consumido en: compotas, dulces, ensaladas, jaleas, jugo, pasteles, junto con pescado y carnes. Adicionalmente, puede usarse para elaborar cosméticos y medicamentos con acción hipocolesterolémica e hipoglucémica y, aunque el fruto de cocona no alcanza a cubrir las necesidades nutricionales minerales de un hombre adulto, constituye una excelente opción para complementar la dieta, particularmente para individuos con restricciones de sodio (Rincón *et al*, 2011; Silva Filho *et al*, 2005).

En los frutos de *S. sessiliflorum*, los minerales, carbohidratos y ácidos orgánicos son representativos en el total de su valor nutricional. El alto contenido de agua (aproximadamente 90%) se ve reflejado en su consistencia jugosa, mientras que su sabor agradable puede atribuirse a su contenido de ácido cítrico y su considerable contenido de azúcar. Es importante enfatizar que tienen un valor calórico bajo, son promisorios como productos para dieta y por su alta concentración de fibra son óptimos para la digestión (Marx *et al*, 1998; Pizzinato *et al*, 2008).

El principal medio de propagación de ésta especie es el uso de semillas obtenidas de frutos maduros, provenientes de plantas que son seleccionadas por presentar características agronómicamente favorables como buena producción, ausencia de enfermedades y vigor (Carvajal y Balcázar, 2000). Se ha reportado que la germinación de las semillas bajo condiciones ambientales ideales puede ocurrir entre un período de 18 a 90 días después de la siembra en campo y 30 días en cultivos *in vitro* (Oliveira, 2006). Sin embargo el proceso germinativo de *S. sessiliflorum* ha sido poco estudiado y se desconocen trabajos orientados a la obtención de porcentajes de germinación elevados y uniformes (Pereira *et al*, 2010).

#### 4.2. Ácido giberélico.

Diversos autores han reportado la efectividad del ácido giberélico aplicado exógenamente en el control y promoción de la germinación de semillas dada su habilidad de interrumpir estados de latencia y reemplazar estímulos ambientales como la luz o la temperatura dando como resultado incrementos en los porcentajes de germinación y disminución de tiempo de germinación en especies como *Carica papaya* L. (Bhattacharya y Khuspe, 2001), *Onopordum nervosum* (Fernández *et al*, 2002) *Minthostachys mollis* (Suárez *et al*, 2011), en *Arabidopsis thaliana* y en algunas plantas de importancia comercial de la familia Solanaceae como *Nicotiana tabacum* y *Solanum lycopersicum* (Peng y Harberd, 2002).

El ácido giberélico se descubrió en la década de los 30s, cuando en Japón identificaron plantas de arroz enfermas que crecían muy altas y que no producían semillas. Científicos japoneses investigaron la

enfermedad, y encontraron que dicha altura era inducida por un químico secretado por el hongo *Gibberella fujikuroi* que había infectado a las plantas altas. El químico fue aislado y lo llamaron *giberelina*. Los científicos japoneses tuvieron éxito en obtener cristales impuros de dos componentes activos de crecimiento del hongo, que llamaron giberelina A y giberelina B (Taiz y Zeiger, 2010).

Solo hasta mediados de 1950 como resultado de un descubrimiento simultáneo, se reveló la estructura del componente químico que inducía el incremento en la elongación de las plantas: un grupo en Gran Bretaña y otro en Estados Unidos, tuvieron éxito en resolver la estructura de un material que habían purificado a partir de filtrados de cultivo del hongo, y que llamaron *ácido giberélico*. Casi al mismo tiempo, científicos de la Universidad de Tokio aislaron tres giberelinas a partir de su giberelina A original (giberelinas A1, A2 y A3 respectivamente). La estructura de la giberelina A3 de los científicos de Tokio y la del ácido giberélico de los científicos de Gran Bretaña y Estados Unidos, resultaron ser idénticas (Taiz y Zeiger, 2010).

La característica estructural que todas las giberelinas tienen en común y que las define como una familia de moléculas es que son diterpenos cíclicos derivados del ent-kaureno y son sintetizadas a partir de unidades de acetato del acetyl CoA en la ruta del ácido mevalónico (Azcón-Bieto y Talón, 2000). Después de su descubrimiento, el ácido giberélico rápidamente comenzó a estar al alcance de los fisiólogos quienes comenzaron a probarlo en una gran variedad de plantas y obtuvieron efectos impresionantes sobre el crecimiento y desarrollo (Taiz y Zeiger, 2010).

Además de controlar la elongación del tallo, el ácido giberélico es una hormona vegetal involucrada en una gran variedad de procesos del desarrollo (González *et al*, 2007). En el desarrollo reproductivo puede afectar la transición del estado juvenil al estado maduro y en la germinación de las semillas, puede controlar aspectos como la pérdida de dormancia y la movilización de las reservas del endospermo (Saldivar *et al*, 2010; Taiz y Zeiger, 2010; Peng y Harberd, 2002).

#### 4.3. Nitrato de Potasio

El nitrato de potasio ( $KNO_3$ ) es un compuesto comúnmente usado para romper la dormancia y promover la germinación de semillas (Siadat *et al*, 2011). La AOSA (Association of Official Seeds Analysts) y la ISTA (International Seed Testing Association) recomiendan el uso de soluciones con diferentes concentraciones de éste compuesto en pruebas de rutina de germinación para semillas de diversas especies (Copeland y McDonald, 2001).

A pesar de que el efecto promotor en la germinación de semillas por parte de los compuestos nitrogenados fue reconocido hace mucho tiempo y a pesar de que diversos autores han evidenciado su habilidad para incrementar la sensibilidad a la luz y reducir el requerimiento de luz en semillas de muchas especies, su mecanismo de acción aún no es claro (Giba *et al*, 2006; Siadat *et al*, 2011). Para esclarecer este fenómeno, diferentes autores han usado modelos experimentales como *Sisymbrium officinale*, cuyas semillas requieren la presencia simultánea de nitrato y de la forma “rojo-lejano absorbente” (Prf) del fitocromo para poder germinar (Hilhorst, 1990), *Spirodela polyrhiza* cuya germinación es dependiente de fitocromo y la germinación de esporas de helechos, entre otros (Giba *et al*, 2006).

Entre tanto, lo que se sabe es que los nitratos han sido reportados como cofactores en la acción del fitocromo y han sido asociados con el incremento del número de receptores Pfr en especies fotoblásticas positivas (Alboresi *et al*, 2005; Kenanoglu *et al*, 2007). Por otra parte, autores como Nonogaki *et al*, (2010), afirman que los nitratos también podrían estimular la germinación a través de otras vías, como las implicadas en el metabolismo de hormonas o después de ser reducidos a nitrito, podrían acelerar el flujo metabólico a través de la vía pentosa fosfato (PPP) al aumentar indirectamente la oxidación de NADPH, actuando así como un importante componente de transducción de señales.

Sin embargo, aunque la información disponible es una gran avance hacia la comprensión del papel de los compuestos nitrogenados en el proceso germinativo, algunas hipótesis aún no se han podido corroborar experimentalmente y hacen falta investigaciones que permitan dilucidar el mecanismo molecular y fisiológico por el cual la aplicación exógena del mismo, resulta efectiva para romper la dormancia de semillas e inducir su germinación (Sheng Tang *et al*, 2008; Siadat *et al*, 2011).

#### 4.4. *Rizobacterias Promotoras de crecimiento PGPRs.*

Las bacterias que colonizan las raíces son conocidas como rizobacterias. La mayoría de estas permanecen confinadas en su superficie o en el rizoplano (microambiente inmediato que rodea la raíz) (Taiz y Zeiger, 2010), pero otras ingresan a las raíces y permanecen allí como endófitas (Van y Bakker, 2003). En el rizoplano ocurren diversas interacciones que pueden ser benéficas, neutras o nocivas para las plantas. Los efectos perjudiciales incluyen actividades fitotóxicas y patogénicas por parte de las bacterias y por el contrario, el efecto benéfico incluye actividades que incrementan la disponibilidad de agua y nutrientes minerales, además de establecer relaciones simbióticas como la formación de nódulos radicales en el caso de las leguminosas (Van y Bakker, 2003).

En la mayoría de los casos, las cepas bacterianas aisladas de las raíces tienen poca especificidad, pero la liberación de ciertos exudados por parte de las raíces favorece la colonización selectiva para algunas de ellas (Van y Bakker, 2003). Entre las rizobacterias, existe un grupo llamado PGPRs (plant growth promoting rizobacteria) que presentan habilidad para promover el crecimiento de las plantas (Van y Bakker, 2003). A este grupo pertenecen bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Ahmad *et al*, 2008).

Las PGPR pueden afectar el crecimiento de las plantas de manera directa cuando la bacteria le provee a la planta algún regulador de crecimiento sintetizado por ella, como auxinas, citoquininas y giberelinas y/o facilitando la toma de algunos nutrientes del ambiente como nitrógeno fijado, fósforo y hierro del suelo, y de manera indirecta, cuando estas ejercen antagonismo contra microorganismos fitopatógenos, por ejemplo, mediante la secreción de moléculas de bajo peso molecular conocidas como sideróforos y/o antibióticos (Glick y Bashan, 1997).

Para el caso particular de cepas bacterianas de los géneros *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp*, existen numerosas publicaciones que las reportan como potenciales estimuladoras del crecimiento vegetal al ser inoculadas en las semillas y como exitosas competidoras que pueden llegar a dominar la población en la rizósfera y colonizar extensamente la endorrizosfera (Bathia *et al*, 2008).

Estos microorganismos aplicados en las semillas, tienen el potencial de establecerse en la rizosfera y de transferirse a las raíces a medida que éstas emergen de las semillas (Bennett y Whipps, 2008). La ventaja de esto radica en que pese a que en los sistemas agrícolas convencionales la intervención de los suelos puede modificar la estructura poblacional natural, alterando la comunidad microbiana y llevando a la pérdida de microorganismos benéficos, la incorporación de PGPRs en los sistemas productivos, permitiría cambiar el balance de las comunidades microbianas hacia una estructura poblacional orientada a incrementar la sanidad y productividad de las plantas (Avis *et al*, 2008).

#### 4.5. Escala Fenológica BBCH.

La escala BBCH (**B**iologische **B**undesanstalt, **B**undessortenamt und **C**hemische Industrie) es un sistema para la codificación uniforme de estadios de crecimiento fenológicamente similares, para todas las especies de plantas mono y dicotiledóneas (Meier *et al* 2009). La ventaja de la escala es su simplicidad, y su facilidad de ser usada en plantas anuales y perennes, y tanto para los estados del desarrollo vegetativo como reproductivo. Desde que el uso de la escala BBCH ha sido aceptado para cereales, papa, colza,

remolacha, girasol y haba, muchos investigadores hicieron escalas basadas en la BBCH para frutales, vid, varias verduras, granada, cítricos, níspero y mango (Rajan *et al*, 2011).

Como todas las ramas de la ciencia, las ciencias agrícolas están cada vez más integradas en redes internacionales y el intercambio de los nuevos hallazgos requiere un entendimiento común de los términos en uso. Es por esto que también es necesaria una comprensión común de la terminología para la descripción de las etapas de crecimiento de las plantas (Meier *et al*, 2009). El esquema BBCH es una buena base para satisfacer esta demanda científica, ya que además de una terminología uniforme, su sistema de codificación y descripción de las etapas de desarrollo de las plantas estandarizada facilita el procesamiento de datos en distintas herramientas de software para agricultores, que son muy usados actualmente (Meier *et al*, 2009).

El uso de la escala BBCH no se restringe solo para los agricultores, sino que también puede ser útil para profesionales en áreas como entomología o fitopatología, con el propósito de precisar correlaciones por ejemplo, sobre el estado fenológico en el cual una especie es más susceptible al ataque de plagas o enfermedades (Attibayéba *et al*, 2010; Hormaza *et al*, 2012).

El código decimal de la BBCH se divide entre estadios de crecimiento principales y secundarios y está basado en el código desarrollado para cereales y arroz por Zadoks *et al*, (1974), citado en Meier *et al*, (2009). Los autores de la escala afirman que para una codificación uniforme que cubra el máximo número de especies de plantas, es necesario utilizar criterios principalmente fenológicos. Por ejemplo, la germinación de semillas verdaderas y el brote de las yemas se clasifican en una sola etapa de crecimiento principal, la etapa 0 (Finn *et al*, 2007).

Aunque la escala BBCH es de fácil acceso y se encuentra disponible en inglés, alemán, español y francés, esta es solo una base general y no contiene una descripción lo suficientemente exacta que represente por ejemplo, a todos los frutales, y por tanto, los investigadores pueden tener dificultades al interpretar escalas que generalizan demasiado y pierden información relevante (Hess *et al*, 1997). Sin embargo, actualmente pueden encontrarse y elaborarse escalas más específicas para familias, géneros y especies que facilitan la construcción e interpretación de la información para las respectivas especies de interés y que están basadas en la codificación BBCH (Hess *et al*, 1997; Finn *et al*, 2007).

Algunos de los principios generales para la elaboración de la escala BBCH son presentados a continuación:

- La descripción de un estadio de crecimiento está basada en las características principales de una planta individual. Si la escala es usada para describir un estadio de desarrollo de una población de plantas, la descripción debe por lo menos describir el 50% de la población de plantas
- El ciclo completo del desarrollo de las plantas se subdivide en diez etapas principales claramente distinguibles. Estos estadios principales de crecimiento, son descritos usando números del 0 al 9 en orden ascendente. Debido a la diversidad de especies de plantas, pueden presentarse cambios durante el proceso de desarrollo, o incluso algunas etapas pueden no ocurrir. Los estadios principales de crecimiento no necesariamente ocurren siempre en el estricto orden ascendente de los números, y pueden, ocasionalmente, también desarrollarse en forma paralela.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Área de estudio.

El estudio se realizó en la Universidad Militar Nueva Granada, ubicada en Cajicá, Colombia, a una temperatura media de 18°C y 2558 m.s.n.m, en el 2011.

### 5.2. Recolección y almacenamiento de semillas.

Frutos maduros de *S. sessiliflorum* provenientes de Caquetá, Colombia fueron la fuente de semillas. Éstas fueron retiradas del fruto, junto con el arilo, y fueron dejadas en un frasco con tapa a temperatura ambiente durante 48 horas para permitir su fermentación, activando así los mecanismos de post-maduración. Después de fermentarse, las semillas fueron lavadas y secadas a temperatura ambiente, Una vez secas, fueron almacenadas en oscuridad a 4°C.

### 5.3. Determinación del porcentaje germinación y fotoblastismo

Las semillas fueron imbibidas en agua destilada estéril durante 24 horas en agitación orbital (120 rpm). Posteriormente fueron ubicadas en recipientes plásticos de 11cm de largo, 6cm de alto y 9cm de profundidad, con el fondo recubierto de papel de filtro saturado con agua destilada. Se evaluó un total de 400 semillas para la germinación con iluminación natural y 400 para la germinación en oscuridad, distribuidas en cuatro repeticiones.

Se realizaron observaciones cada cuatro días para determinar si había ocurrido germinación, teniendo como criterio la presencia de radícula con 4 mm de longitud.

#### *5.4. Evaluación de la viabilidad.*

Un total de 100 semillas fue colocado en agua destilada estéril, y dejado en agitación (120 r.p.m) durante 24 horas. Posteriormente se realizó una disección a la testa de cada semilla, antes de ubicarlas en cajas plásticas de 11cm de largo, 6cm de alto y 9cm de profundidad, con el fondo recubierto de papel de filtro saturado con la solución de cloruro de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-tripfenil-2H-tetrazolio (TTC) a pH 6.5-7.5 cloruro de tetrazolio al 1.0%). Este montaje se incubó por 72 horas, al cabo de las cuales los embriones fueron observados y se registró si estaban teñidos de color rojo o no. El experimento se repitió 4 veces.

#### *5.5. Evaluación del efecto de $AG_3$ y $KNO_3$ sobre la germinación*

A pesar de tener diversos tratamientos se realizó un protocolo común inicial. En él, las semillas fueron esterilizadas superficialmente con una solución de alcohol al 70%, por dos minutos, y lavadas tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, fueron sumergidas en agua destilada y dejadas en agitación a 120 rpm, durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se retiró el agua y se sustituyó por diluciones correspondientes a cada promotor de crecimiento, como se muestra en la Tabla 1.

Posteriormente, se retiraron los promotores y las semillas fueron colocadas en cajas cúbicas de plástico de 11cm de largo, 6cm de alto y 9cm de profundidad, recubiertas con láminas de papel absorbente saturado con 7 ml de agua destilada estéril, con luz natural y a temperatura ambiente (18 °C).

Los montajes se realizaron simultáneamente en presencia y ausencia de luz para los tratamientos 1 al 8 y para los tratamientos del 9 al 12, solo en presencia de luz (Tabla 1). Se evaluaron un total de 100 semillas por cada tratamiento, y se repitió el experimento cuatro veces. Cada cuatro días se determinó el número de semillas germinadas, utilizando como criterio que la radícula midiera al menos 4mm de longitud. Se humedeció el papel absorbente cada vez que se requirió.

- 
1. Control (Agitación durante 24 horas en agua destilada estéril).
  2. Agitación durante 24 horas en  $\text{KNO}_3$  0.5M
  3. Agitación durante 24 horas en  $\text{KNO}_3$  0.25M
  4. Agitación durante 24 horas en  $\text{KNO}_3$  0.1M
- 
5. Control (Agitación durante 24 horas en agua destilada estéril).
  6. Agitación durante 24 horas en  $\text{AG}_3$  500ppm.
  7. Agitación durante 24 horas en  $\text{AG}_3$  300ppm.
  8. Agitación durante 24 horas en  $\text{AG}_3$  150ppm.
- 
9. Control (Agitación durante 24 horas en agua destilada estéril).
  10. Control (Agitación durante 24 horas en  $\text{AG}_3$  500ppm)
  11. Control (Agitación durante 24 horas en  $\text{KNO}_3$  0.25M)
  12. Agitación durante 24 horas en  $\text{AG}_3$  (500ppm) +  $\text{KNO}_3$  (0.25M)
- 

**Tabla 1.** Tratamientos usados en las pruebas de germinación.

#### 5.6. Evaluación del efecto de las PGPRs sobre la germinación

Se emplearon cepas bacterianas pertenecientes a la colección de aislados de rizoplano de uchuva de los géneros *Pseudomonas sp* (PC20 y P19) y *Bacillus sp* (B14 y B34), del laboratorio de fitopatología de la Universidad Militar Nueva Granada. Las bacterias fueron reactivadas haciendo siembra masiva de un inóculo sobre agar nutritivo, se incubaron a 25°C durante 24 horas.

Con el propósito de desprender las bacterias del medio, sobre los cultivos de bacterias se aplicó agua destilada estéril y con una punta de micropipeta estéril se raspó suavemente la superficie del agar. Una vez obtenida una mezcla homogénea, se suspendió en 50ml de agua destilada estéril y se agitó vigorosamente. Posteriormente, se tomó una muestra de dicha suspensión y se determinó su densidad óptica a 540nm, utilizando un espectrofotómetro (Spectronic 20).

Se ajustó la suspensión hasta una lectura de densidad óptica (DO) entre 0,1 y 0,2 la cual corresponde a una concentración de  $10^8$  ufc/ml. Esta medida se determinó utilizando una curva de crecimiento establecida previamente.

Las semillas se esterilizaron superficialmente con una solución de alcohol al 70% por dos minutos, y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Luego fueron sumergidas en agua destilada y dejadas en

agitación a 120 rpm, durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se retiró el agua y se sustituyó por las suspensiones correspondientes a cada cepa respectivamente. Estas semillas se mantuvieron durante 48 horas en agitación a 120 rpm.

Completada la incubación con bacterias, las semillas fueron colocadas en cajas de plástico transparentes de 11cm de largo, 6cm de alto y 9cm de profundidad. El fondo de estas cajas estaba recubierto por cuatro láminas de papel absorbente saturadas de agua destilada estéril. La incubación de estos montajes se hizo en luz natural y temperatura ambiente (18°C). Cada cuatro días se revisó el número de semillas germinadas, teniendo como criterio que la radícula midiera al menos 4mm de longitud. Se humedeció el papel absorbente cuando era requerido. Se utilizaron 100 semillas por cada cepa, y establecieron cuatro repeticiones.

#### *5.7. Evaluación del efecto de $AG_3$ y $KNO_3$ sobre el desarrollo*

Las plántulas obtenidas de cada tratamiento (Tabla 1) fueron retiradas del papel absorbente y trasplantadas a bandejas plásticas de 72 alvéolos. Posteriormente fueron transferidas a bolsas plásticas de 3 Kg, bajo invernadero con luz natural y a temperatura ambiente (18 °C). Sobre éstas plantas se evaluaron las variables de crecimiento altura y número de hojas finales.

#### *5.8. Elaboración de la escala fenológica*

Se hizo seguimiento de cada etapa de desarrollo aplicando los principios básicos establecidos en la escala fenológica general BBCH (Hess *et al*, 1997; Finn *et al*, 2007; Meier *et al*, 2009) a 80 plantas, obtenidas desde la germinación de las semillas hasta la siembra en campo donde se completó el desarrollo. Se tomaron fotografías de los órganos más representativos, que fueron incluidas para ilustrar algunos de los estadios fenológicos principales y secundarios, los cuales fueron descritos utilizando características externas claramente reconocibles.

La codificación fue completada siguiendo los principios de la escala general, donde se establece el uso de los estadios secundarios para describir fases cortas del desarrollo que ocurren durante un determinado estadio de desarrollo principal, dando origen al código de dos dígitos al combinar los números correspondientes al estadio principal y secundario. En los casos donde fue necesaria una subdivisión más detallada respecto a un estadio de crecimiento principal, que iba más allá de las posibilidades del uso de los estadios secundarios del 0 al 9, se presentó una escala de tres dígitos al lado de la escala de dos

dígitos, lo cual hace referencia a la inclusión de mesoestadios entre el principal y el secundario (Hess *et al*, 1997; Finn *et al*, 2007; Meier *et al*, 2009).

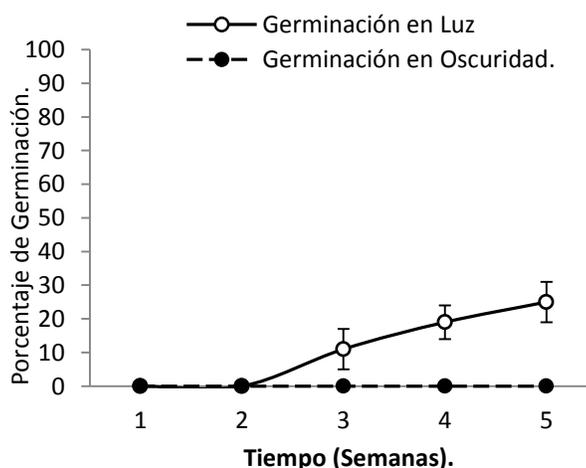
### 5.9. Análisis estadístico

Los datos de germinación se graficaron en curvas de porcentaje de germinación vs tiempo con Excel (Microsoft<sup>tm</sup>). Posteriormente se realizó una prueba de normalidad (Shapiro), análisis de varianza (ANOVA), y test de Tukey usando el paquete estadístico R, para determinar diferencias entre tratamientos, para las variables porcentaje de germinación, altura de las plantas y número de hojas.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1. Porcentajes de germinación y fotoblastismo.

En presencia de luz se obtuvo 25% de germinación *in vitro*, mientras en oscuridad, las semillas de *S. sessiliflorum* no germinaron. (Figura 2). Con base en la sensibilidad que las semillas presentan al estímulo de la luz, éstas son clasificadas en tres categorías: Fotoblásticas positivas, que presentan germinación promovida por la luz blanca, y no germinan en oscuridad, fotoblásticas negativas cuya germinación es inhibida por la luz blanca y las semillas fotoblásticas neutras que son indiferentes al estímulo de la luz (Benvenuti y Macchia, 1997). Así, nuestros resultados indican que *in vitro*, con iluminación natural y temperatura media de 18° C, las semillas de *S. sessiliflorum* presentan respuesta fotoblástica positiva al estímulo de la luz.



**Figura 2.** Porcentajes de germinación de semillas de *S. sessiliflorum* en presencia y ausencia de luz. Las barras representan la desviación estándar  $\pm$  SD.

Para *S. sessiliflorum*, autores como Santos *et al* (2000), reportan que en cámaras de germinación y a temperatura constante de 30°C obtuvieron 60% de germinación en presencia de luz y 42% en oscuridad, mientras bajo temperaturas alternantes entre 20°C y 35°C, en oscuridad, obtuvieron 68,5% de semillas germinadas. Por otra parte, Stefanello *et al* (2008) reportan porcentajes de germinación superiores al 80% tanto en presencia como ausencia de luz, en cámaras de germinación a 24°C, y concluyen que las semillas de esta especie son fotoblásticas neutras.

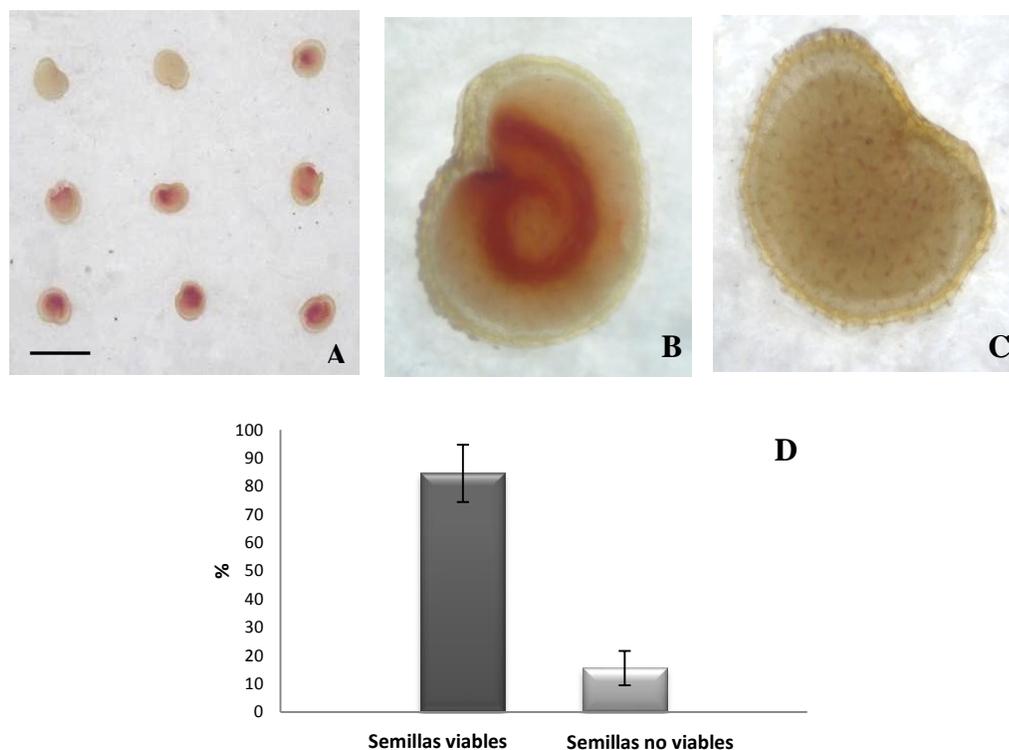
Adicionalmente, Kambizi *et al*, (2006) reportan que para *S. sessiliflorum*, la interacción de la luz con la temperatura es importante para regular el proceso germinativo, y así, el requerimiento de luz que presente la especie puede variar con la temperatura, siendo este último el factor que más afecta directamente la germinación en la especie. Además, Santos *et al* (2000), afirman que pequeñas diferencias en la temperatura pueden causar grandes modificaciones en la respuesta germinativa de *S. sessiliflorum* y Pereira *et al*. (2010), reportan que la temperatura tiene una marcada influencia en el proceso germinativo, no solo respecto a los porcentajes de germinación sino también sobre la velocidad de germinación para ésta especie.

Sin embargo, nuestros resultados muestran que la germinación en cocona es altamente dependiente de las condiciones de luz. El requerimiento de luz para germinar, es un comportamiento que ha sido reportado para semillas de *Solanum quitoense* (lulo) y *Solanum betaceum* (tomate de árbol), asociada a la presencia de la fotodormancia característica de la forma silvestre de especies en un temprano proceso de domesticación (Cardenas *et al*, 2004), lo cual es consecuente con la situación de la especie en Colombia, donde aún se encuentra sembrada espontáneamente en campos y parcelas, principalmente en su forma silvestre y cultivada a pequeña escala (Barrera *et al*, 2011).

## 6.2. Prueba de viabilidad

La prueba con cloruro de tetrazolio para comprobar la viabilidad de las semillas de *S. sessiliflorum* dio como resultado una coloración roja en los embriones de las semillas viables y ausencia de coloración en las semillas no viables (Figura 3: a, b y c), como era de esperarse, ya que una vez la solución de tetrazolio es embebida por la semilla, en las células vivas se lleva a cabo una reacción química de óxido reducción en la cual participan las enzimas deshidrogenasas presentes en tejidos vivos. En esta reacción, se reduce la sal de tetrazolio a formazan. El formazan es un compuesto estable, no difusible, de coloración rojiza

que permite distinguir las partes vivas de las semillas (coloreadas) de las muertas (no coloreadas) (Wei *et al*, 2009).



**Figura 3.** (A) Prueba de viabilidad de semillas de *S. sessiliflorum*, utilizando cloruro de tetrazolio al 1%, escala 5mm. (B) Semilla viable (nótese la coloración del embrión), (C) Semilla no viable, (D) Porcentajes de viabilidad. Las barras representan la desviación estándar  $\pm$  SD.

El porcentaje de viabilidad obtenido fue 84,5% (Figura 3, d) mientras el porcentaje de germinación fue (25%) (Figura 2). Estos resultados sugieren que la germinación pudo verse inhibida por dormancia, ya que aún cuando las semillas eran viables, no germinaron (Delanoy *et al*, 2006).

Es sabido que en las semillas, los embriones experimentan un detenimiento en el desarrollo en espera de condiciones ambientales adecuadas para continuar su ciclo de vida. La transición de latencia a germinación es controlada por las señales externas del medio ambiente (calidad y cantidad de la luz, temperatura, humedad y exposición transitoria al frío) y por reguladores de crecimiento interno (Bewley, 1997). Dada la alta susceptibilidad a los cambios de temperatura que se reporta para *S. sessiliflorum*, es posible que la temperatura promedio registrada para la sede experimental de Cajicá (18°C), haya favorecido la inducción de dormancia.

Sin embargo, diversos autores han reportado la relevancia de optimizar el proceso germinativo de semillas bajo condiciones de temperatura inferiores a los rangos óptimos para una especie, con el propósito de hacer más eficiente su aprovechamiento comercial (Kenanoglu *et al*, 2007) y de promover la expansión del uso de las mismas para hacer una explotación rentable de un recurso alimenticio en áreas diferentes a las de su distribución habitual (Rascio *et al* 2002). Para esto, las metodologías asociadas al rompimiento de la dormancia inducida por la luz o la temperatura y la utilización de promotores de crecimiento como  $KNO_3$  y  $AG_3$  son muy comunes (Kambizi *et al*, 2006).

### 6.3. Efecto de $AG_3$ y $KNO_3$ sobre la germinación

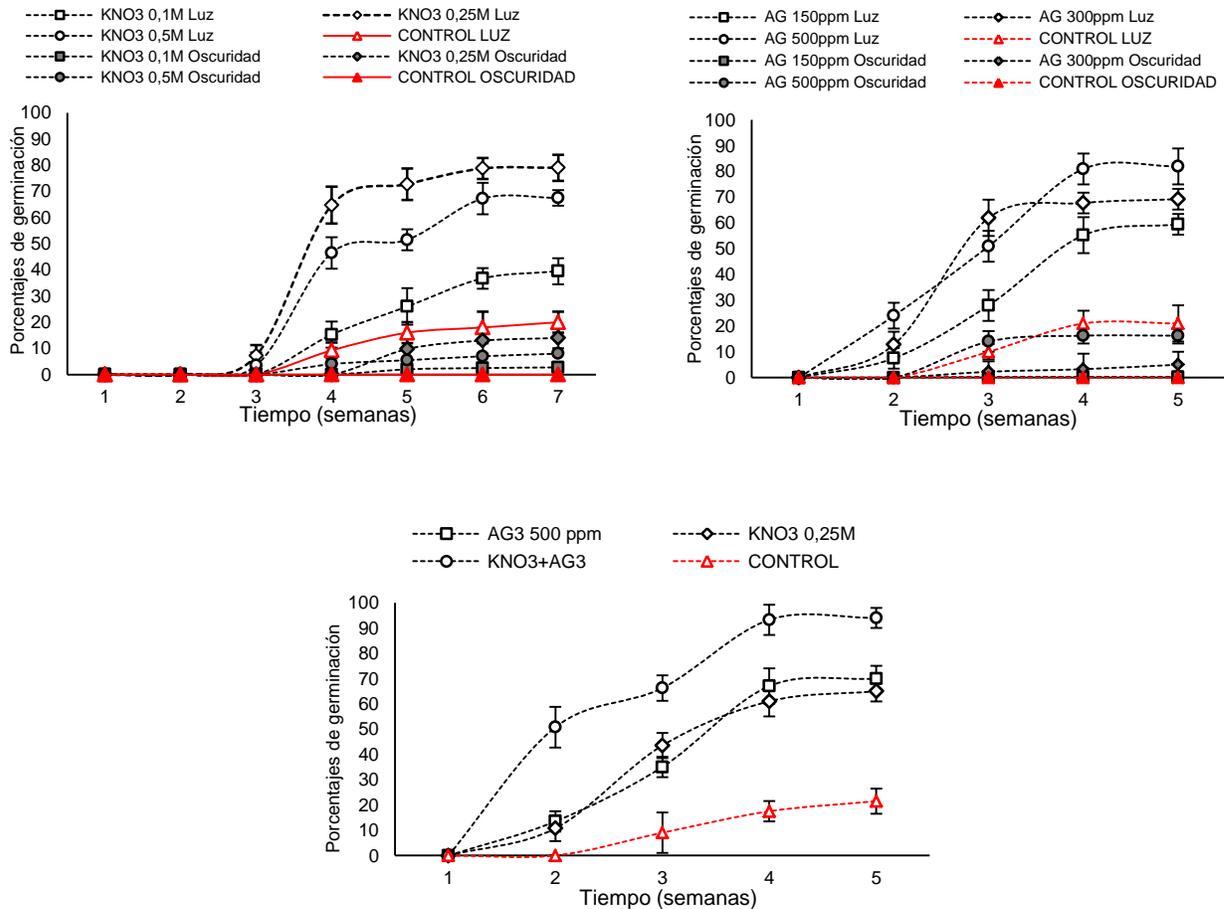
Los tratamientos en presencia de luz con  $AG_3$  y  $KNO_3$  mostraron porcentajes de germinación significativamente superiores al control ( $P < 0,05$ ) para todas las concentraciones evaluadas, siendo 0,25M la concentración más efectiva de  $KNO_3$  (79%) y 500ppm para  $AG_3$  (82%), frente al control (25%) (Tabla 2 y Figura 4).

El efecto benéfico del nitrato de potasio para romper la dormancia, incrementar porcentajes de germinación y disminuir tiempos de germinación, ha sido reportado para especies como *Paulownia tomentosa* (Grubisic y Konjevic, 1990), *Crithmum maritimum* (Atia *et al*, 2009), *Chenopodium album* (Sheng *et al*, 2008), *Echinacea purpurea* (Karimian *et al*, 2011), *Descurainia sophia* y *Plantago ovata* (Ali *et al*, 2010) y semillas de papayo (Andrade *et al*, 2008), entre otras.

La aplicación exógena de  $AG_3$  también ha dado como resultado la ruptura de dormancia y un incremento en porcentajes de germinación y disminución en tiempos de germinación para especies como *Jaltomata procumbens* (Saldivar *et al*, 2010), en especies forrajeras como *G. ulmifolia*, *L. leucocephala*, (Hermosillo *et al*, 2008), *Annona cherimola* L y *Annona muricata* L (Lobo *et al*, 2007), *Brassica oleraceae* L. (González *et al*, 2007), *Carica papaya* L. (Bhattacharya y Khuspe, 2001), *Onopordum nervosum* (Fernández *et al*, 2002) *Minthostachys mollis* (Suárez *et al*, 2011), en *Arabidopsis thaliana* y en algunas plantas de importancia comercial de la familia Solanaceae como *Nicotiana tabacum* y *Solanum lycopersicum* (Peng y Harberd, 2002).

Adicionalmente, los autores anteriores indicaron que a mayores concentraciones de  $AG_3$  se obtienen mayores porcentajes de germinación en menos tiempo, lo cual también se comprobó en éste trabajo, pues para *S. sessiliflorum*, en los tratamientos con  $AG_3$  la semillas germinaron en 5 semanas, mientras las

semillas del control germinaron en 7 semanas y los porcentajes de germinación fueron superiores en los tratamientos con mayores concentraciones de  $AG_3$  (Tabla 2 y Figura 4).



**Figura 4.** Porcentajes de germinación de semillas de *Solanum sessiliflorum* bajo el efecto de ácido giberélico ( $AG_3$ ) y nitrato de potasio ( $KNO_3$ ), en presencia y ausencia de luz. Las barras representan la desviación estándar  $\pm$  SD.

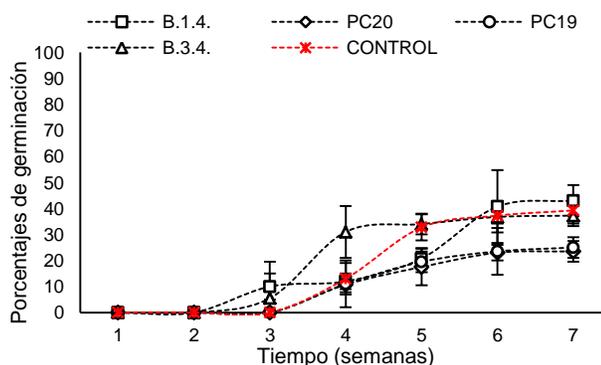
La utilización simultánea de ácido giberélico y nitrato de potasio, resultó en un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) sobre los porcentajes de germinación (94%) de *S. sessiliflorum* en presencia de luz. Estos valores resultan ser superiores al control (25%), y a todos los demás tratamientos y concentraciones de promotores evaluadas previamente (Tabla 2 y Figura 4), mostrando un comportamiento que permite suponer un posible efecto sinérgico entre éstos dos compuestos.

Para las pruebas de germinación en oscuridad con  $\text{KNO}_3$  y  $\text{AG}_3$ , no se presentó germinación en ninguno de los tratamientos control, pero sí en los tratamientos con los promotores de crecimiento. Los mayores porcentajes obtenidos en oscuridad fueron 14% para  $\text{KNO}_3$  y 16,25% para  $\text{AG}_3$ , (Figura 4 y Tabla 2). Estos resultados debidos a la presencia de los promotores, coinciden con el efecto reportado en trabajos enfocados a la iniciación, control y promoción de la germinación de semillas, mediados por  $\text{KNO}_3$  y  $\text{AG}_3$ , donde se ha evidenciado la capacidad de romper la latencia y reemplazar estímulos ambientales como la luz y la temperatura que poseen estos promotores (Saldivar *et al*, 2010).

Ya que *S. sessiliflorum* está bien adaptada en zonas donde la temperatura promedio llega a los 24°C y autores como Pereira *et al*, (2010) reportan que la temperatura óptima para la germinación de semillas de ésta especie se encuentra en el rango de 30°C a 35°C (90% de semillas germinadas), es posible afirmar que la temperatura promedio en la cual se desarrolló éste trabajo (18°C), inferior a los rangos óptimos para la especie, pudo inducir la latencia. Sin embargo, el incremento significativo en los porcentajes de germinación obtenidos bajo el efecto de los promotores indica que su aplicación resulta eficiente para mejorar el proceso en condiciones ambientales diferentes a las de su área de distribución natural.

#### 6.4. Efecto de las PGPRs sobre la germinación

Los tratamientos con *Bacillus sp* y *Pseudomonas sp*, no presentaron porcentajes de germinación significativamente diferentes entre cepas ni respecto al control ( $P > 0,05$ ) y para los tratamientos con *Pseudomonas sp* los porcentajes de germinación fueron inferiores al control y a los demás tratamientos. Por tanto, ninguna de las cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento evaluadas en este trabajo tuvo un efecto positivo sobre la germinación de *S. sessiliflorum* (Figura 5 y Tabla 2).



**Figura 5.** Efecto de dos cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento del género *Bacillus sp* (B3.4 y B1.4.) y dos del género *Pseudomonas sp* (PC 19 y PC20) en presencia de luz, sobre los porcentajes de germinación de semillas de *Solanum sessiliflorum*. Las barras representan la desviación estándar  $\pm$  SD.

Ha sido reportado un efecto positivo de las inoculaciones con cepas de rizobacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp* sobre la germinación de semillas de sorgo, mijo, trigo y en girasol, dado que las cepas de estos géneros se destacan de forma integral por producir metabolitos de tipo AIA, sideróforos, ácido salicílico y citoquininas (Banchio *et al*, 2008). La producción de estas sustancias por parte de las rizobacterias desencadena la actividad de enzimas como la amilasa, trayendo consigo un incremento en la disponibilidad de almidón y promoviendo así la germinación temprana (Glick y Bashan, 1997).

A pesar de que las PGPRs evaluadas en éste trabajo han mostrado efectos positivos sobre la germinación de semillas de curuba, pitaya, lulo, tomate y uchuva (datos no mostrados), no se presentó dicho efecto sobre la germinación de semillas de cocona. Teniendo en cuenta que nuestros resultados indicaron que la germinación pudo verse inhibida por dormancia, ésta podría ser la causa de los bajos porcentajes de germinación obtenidos en los tratamientos con PGPRs, pues no se ha comprobado, al menos para las cepas evaluadas, que éstas tengan la capacidad de romper la dormancia y reemplazar estímulos ambientales como la luz o la temperatura como parte de sus habilidades promotoras de crecimiento.

Tratamientos	Porcentajes de Germinación Luz	Porcentajes de Germinación Oscuridad.	Tiempo (semanas)
<i>Bacillus sp</i> 1	43 ± 2,4 de		7
<i>Bacillus sp</i> 2	37,25 ± 5,5 e		7
<i>Pseudomonas sp</i> 1	23,5 ± 2,5 ef	-	7
<i>Pseudomonas sp</i> 2	25 ± 4,3 ef		7
AG3 500ppm	82 ± 4,8 ab	16,25 ± 1,7 fgh	5
AG3 300ppm	69,25 ± 2,0 bc	5 ± 1,2 gh	5
AG3 150PPM	59,5 ± 4,1 cd	0,25 ± 0,2 h	5
KNO3 0,50 M	67,5 ± 4,5 bc	8 ± 0,9 fgh	7
KNO3 0,25 M	79 ± 7,2 ab	14 ± 4,0 fgh	7
KNO3 0,1 M	39,5 ± 5,5 e	2,75 ± 1,1 h	7
KNO3 0,25M	75,2 ± 6,7 abc		5
AG3 500ppm	75 ± 1,9 abc	-	5
AG3 500PPM + KNO3 0,25M	94 ± 1,9 A		5
Control	25 ± 1,4 Ef	0 h	7

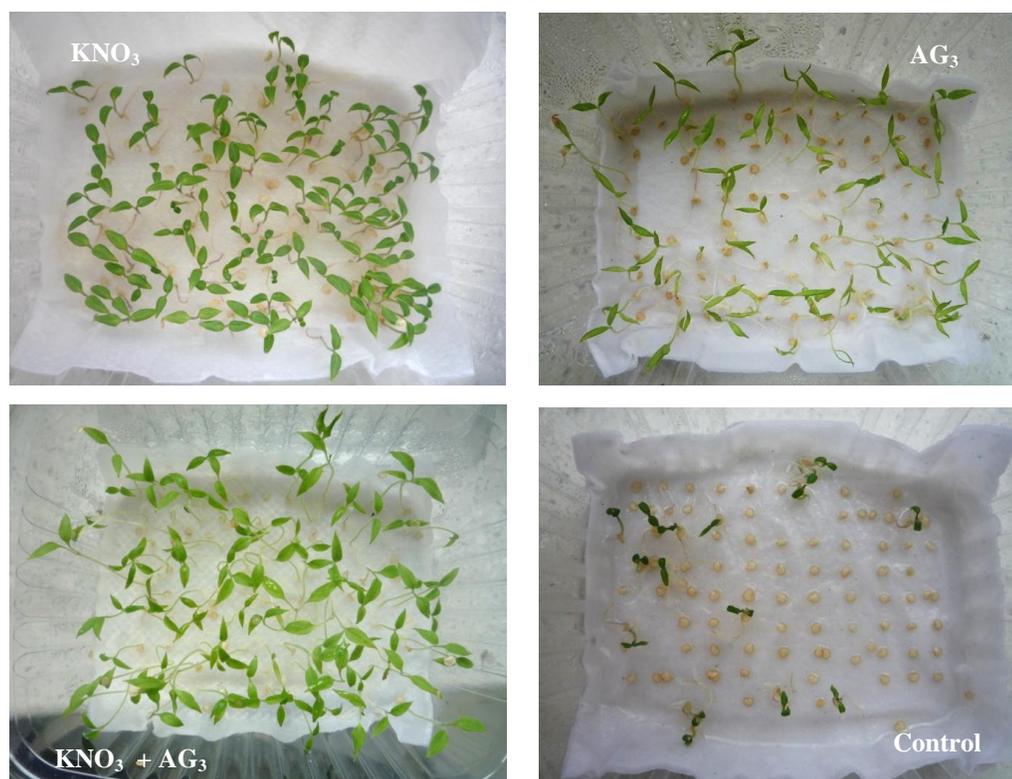
**Tabla 2.** Efecto de tratamientos pre-siembra con AG<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub> y cepas de PGPRs de los géneros *Bacillus sp* y *Pseudomonas sp* sobre la germinación de semillas de *Solanum sessiliflorum*. Porcentajes con la

misma letra al lado derecho no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P > 0,05$ ).

### 6.5. Efecto de $AG_3$ y $KNO_3$ sobre el desarrollo temprano

El material vegetal obtenido de los tratamientos en germinación con  $AG_3$  y  $KNO_3$  en presencia de luz fue conservado porque obtuvimos una gran cantidad de plántulas saludables que presentaban características que indicaban diferencias entre tratamientos.

Las observaciones se registraron para 100 plántulas de cada tratamiento. A simple vista, en las plántulas de los tratamientos con  $AG_3$  se percibía mayor altura, hipocotilos delgados y una lámina foliar más pequeña, respecto a los tratamientos con  $KNO_3$ , mientras las plántulas de los tratamientos con  $KNO_3$  aparentemente tenían hipocotilos más gruesos, una lámina foliar más grande y menos altura respecto a las plántulas de los tratamientos con  $AG_3$  (Figura 6).



**Figura 6.** Plántulas de *Solanum sessiliflorum* obtenidas de los tratamientos de germinación con nitrato de potasio ( $KNO_3$ ), ácido giberélico ( $AG_3$ ) y el control.

La diferencia en la apariencia de las plántulas se hizo evidente a lo largo del desarrollo. A simple vista, para el tratamiento con ácido giberélico las plántulas parecían tener peciolo elongados y delgados mientras los de las plantas del tratamiento con nitrato de potasio eran gruesos y cortos. Las plántulas del tratamiento control parecían tener tallos más cortos que las de los demás tratamientos (Figura 7).

Consideramos importante reportar estas diferencias encontradas en las plántulas provenientes de los tratamientos pre-siembra con nitrato de potasio ( $KNO_3$ ) y ácido giberélico ( $AG_3$ ) como un precedente para futuras investigaciones orientadas hacia el entendimiento de las posibles implicaciones de estos resultados. Esto es importante por ser el efecto de la aplicación de los promotores que favorecieron las condiciones para la germinación, y esto sumado a buenas cualidades físicas, fisiológicas, sanitarias y genéticas de una semilla para producir una planta normal (hipocótilo, cotiledones o epicótilo) y una raíz (primaria y secundaria), le da a los agricultores mayores perspectivas de producir un cultivo saludable con rendimientos mejorados (FAO, 2011).



**Figura 7.** Plantas de *Solanum sessiliflorum* provenientes de los tratamientos con ácido giberélico, nitrato de potasio y del control, durante el transplante a semilleros y a bolsas plásticas.

El seguimiento sobre el desarrollo temprano se hizo hasta que las plántulas alcanzaron entre 15cm y 25cm de altura. En este punto se registraron valores de altura y número de hojas finales. Las pruebas estadísticas indicaron que no hubo diferencias significativas respecto al control en las plántulas provenientes de los tratamientos con los promotores de crecimiento AG<sub>3</sub> y KNO<sub>3</sub>, excepto para las plantas del tratamiento con KNO<sub>3</sub> a 0,25M, que presentaron una altura significativamente superior (Tabla 3) (Figura 8).

Tratamientos	Altura (cm)	Número de hojas.
Control	18,2 ± 0,20 b	4 ± 0,12 A
AG3 500ppm	19,2 ± 0,21 b	3 ± 0,13 A
AG3 300ppm	19 ± 0,24 b	3 ± 0,13 A
AG3 150PPM	18,8 ± 0,25 b	3 ± 0,13 A
Control	17,9 ± 0,25 b	3 ± 0,10 A
KNO3 0,50 M	18,8 ± 0,25 b	4 ± 0,11 A
KNO3 0,25 M	29,1 ± 0,31 a	4 ± 0,09 A
KNO2 0,1 M	18,1 ± 0,25 b	4 ± 0,09 A

**Tabla 3.** Altura y número de hojas de plantas de *Solanum sessiliflorum* de tratamientos bajo el efecto de AG<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>. Los valores con la misma letra al lado derecho no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí, de acuerdo con la prueba de Tukey (P > 0,05).



**Figura 8.** Plantas de *Solanum sessiliflorum* obtenidas de los tratamientos con ácido giberélico y nitrato de potasio, y control al concluir del experimento.

## 6.6. Escala BBCH extendida para *Solanum sessiliflorum*.

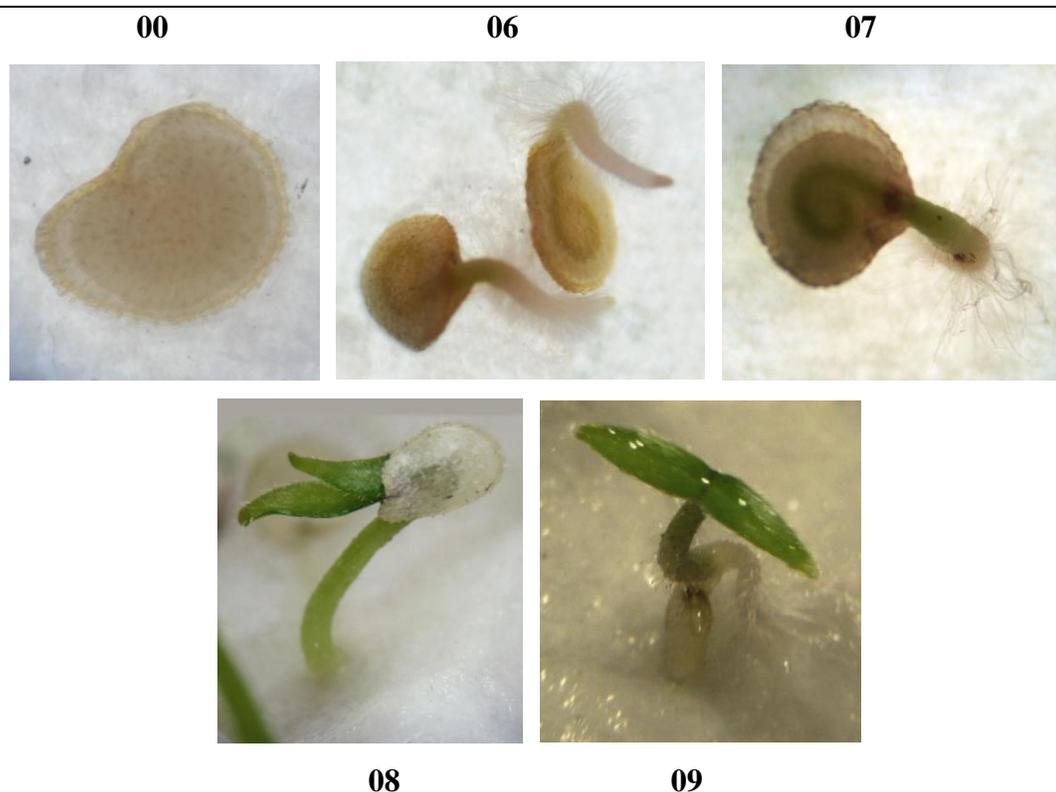
---

### Estadío principal de desarrollo 0. Germinación.

---

Cada fruto contiene de 500 a 2.000 semillas pequeñas, ovaladas y achatadas de color amarillo y de un diámetro de 3,2 mm a 4,0 mm, testa lisa, endospermo duro, cotiledones ovoides, enteros y penninervios. Éstas se encuentran agrupadas y envueltas en un mucilago transparente, la germinación es epigea y fanerocotidelar (Carvajal y Balcázar 2000; Díaz M y Martins S 2010). Desde el inicio de la imbibición hasta la emergencia de la radícula transcurre un periodo de aproximadamente 30 días, a partir del cual ocurre elongación de la radícula, se hace visible el hipocótilo, seguido de la aparición de raíces secundarias y pelos radicales. Posteriormente, el hipocótilo forma un gancho, elevándose de la superficie con las hojas cotiledonares aún enrolladas. Luego se puede observar el hipocótilo saliendo totalmente de la testa y posteriormente la expansión parcial de las hojas cotiledonares.

---



---

#### Código:

- 00 Semilla seca.
  - 05 Emergencia de la radícula.
  - 06 Elongación de la radícula, formación de pelos radiculares y/o raíces laterales.
  - 07 Elongación del hipocótilo.
  - 08 El hipocótilo forma un gancho, elevándose de la superficie con las hojas cotiledonares aún enrolladas
  - 09 Las hojas cotiledonares se expanden y continúa la elongación del hipocótilo hacia la superficie.
-

---

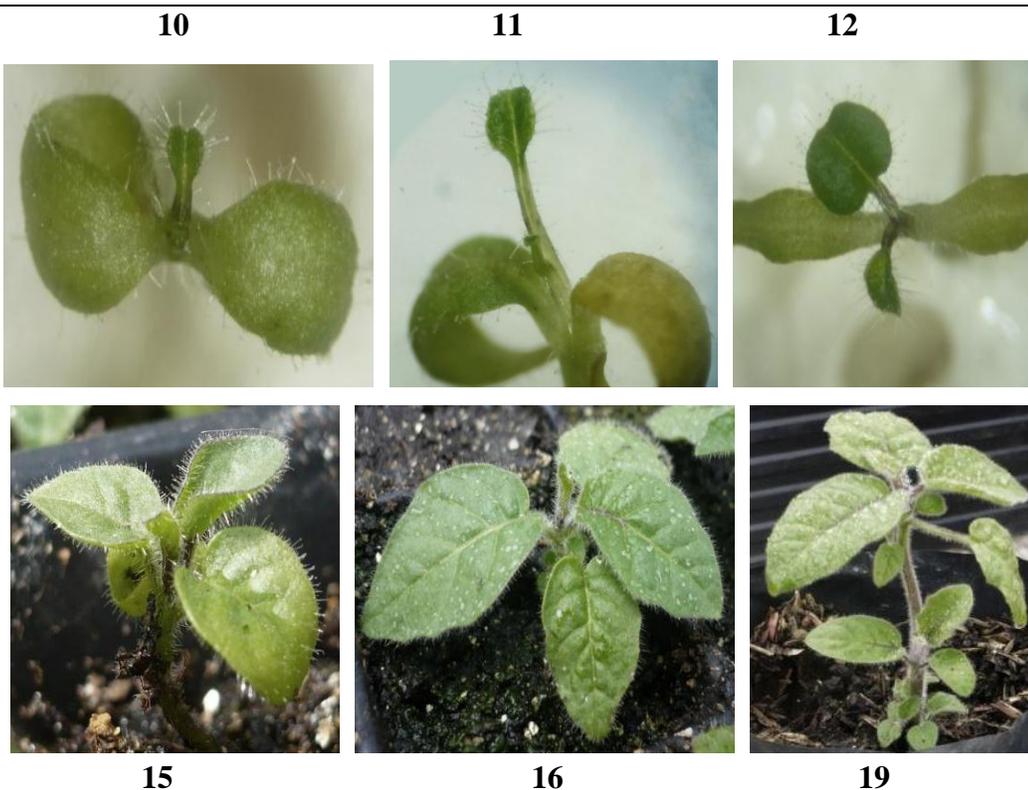
**Estadio principal de desarrollo 1. Desarrollo de las hojas (Tallo principal).**

---

Inicialmente pueden observarse las hojas cotiledonares completamente expandidas y luego la formación de la primera hoja verdadera. Antes de que la primera hoja verdadera esté totalmente desarrollada, se observa la formación de la segunda hoja verdadera, seguido de un rápido marchitamiento de las hojas cotiledonares (Rascio *et al* 2002). Posteriormente caen las hojas cotiledonares, el primer par de hojas verdaderas se expande completamente y continúa la aparición sucesiva de hojas verdaderas.

Las hojas de cocona son grandes, ovaladas, pubescentes, de color verde oscuro por el haz y verde claro por el envés. Son simples, alternas, de bordes lobulados triangulares y sinuados, pecioladas, de ápice agudo y base asimétrica (Carvajal y Balcazar 2000; Rascio *et al* 2002; Volpato *et al*, 2004).

---



---

**Código:**

- |           |   |
|-----------|---|
| <b>10</b> | Aparición de la primera hoja verdadera  |
| <b>11</b> | Desarrollo de la primera hoja verdadera.  |
| <b>12</b> | Desarrollo de la segunda hoja verdadera.  |
| <b>13</b> | <b>139</b> Desarrollo de la tercera hoja verdadera. Caída de las hojas cotiledonares. |
| <b>19</b> | Desarrollo de nueve o más hojas verdaderas.   |
-

---

## Estadio principal de desarrollo 2. Formación de brotes laterales.

---

La planta de cocona se ramifica desde la base del tallo principal, cerca del suelo. Las ramificaciones tienen una distribución irregular y abundante y crecen arqueadas con tallos gruesos, cilíndricos, semileñosos y pubescentes (Carvajal y Balcázar 2000; Rascio *et al* 2002).

---

21



23



25



27

---

### Código:

- 21 Primer brote lateral visible.
  - 23 Tercer brote lateral visible.
  - 25 Quinto brote lateral visible.
  - 27 Séptimo brote lateral visible.
  - 29 Nueve o más brotes laterales visibles.
-

---

### **Estadio principal de desarrollo 3. Elongación del tallo, desarrollo del brote (Tallo principal).**

---

La cocona alcanza una altura máxima de 1,50m, aproximadamente, siete ramas primarias y nueve secundarias, de tallos gruesos, cilíndricos, semileñosos y pubescentes (Rascio *et al* 2002). Durante la primera fase el tallo crece recto y produce hojas de vida corta que se caen rápidamente dejándolo desnudo. El crecimiento de yemas axilares es significativamente inhibido debido a la expresión de una fuerte dominancia apical. El tallo ortrópico crece continuamente hasta la producción de ocho nodos, después, ocurre un cambio drástico con el desarrollo de una yema axilar que pasa a ser yema apical y el tallo se bifurca en ramas divaricadas plagiotrópicas. Este evento involucra la pérdida de la dominancia apical (Rascio *et al* 2002; Barrera *et al*, 2011).

---

**31**



**34**



**39**

---

#### **Código:**

- 31** El tallo ha alcanzado el 10% de su longitud o grosor final.
  - 34** El tallo ha alcanzado el 40% de su longitud o grosor final.
  - 36** El tallo ha alcanzado el 60% de su longitud o grosor final.
  - 39** El tallo ha alcanzado el máximo de su longitud o grosor final.
-

---

**Estadio principal de desarrollo 5. Aparición del órgano floral.**

---

Las flores de cocona son completas y perfectas, con inflorescencias de tipo cimosa de pedúnculo corto con cinco a nueve flores o botones (Carvajal y Balcázar 2000; Rascio *et al* 2002; Barrera *et al*, 2011).

---

**55****59**

---

**Código:**

- 51** Botones florales visibles.
  - 55** Primeros capullos visibles sin abrirse.
  - 59** Primeros pétalos visibles.
-

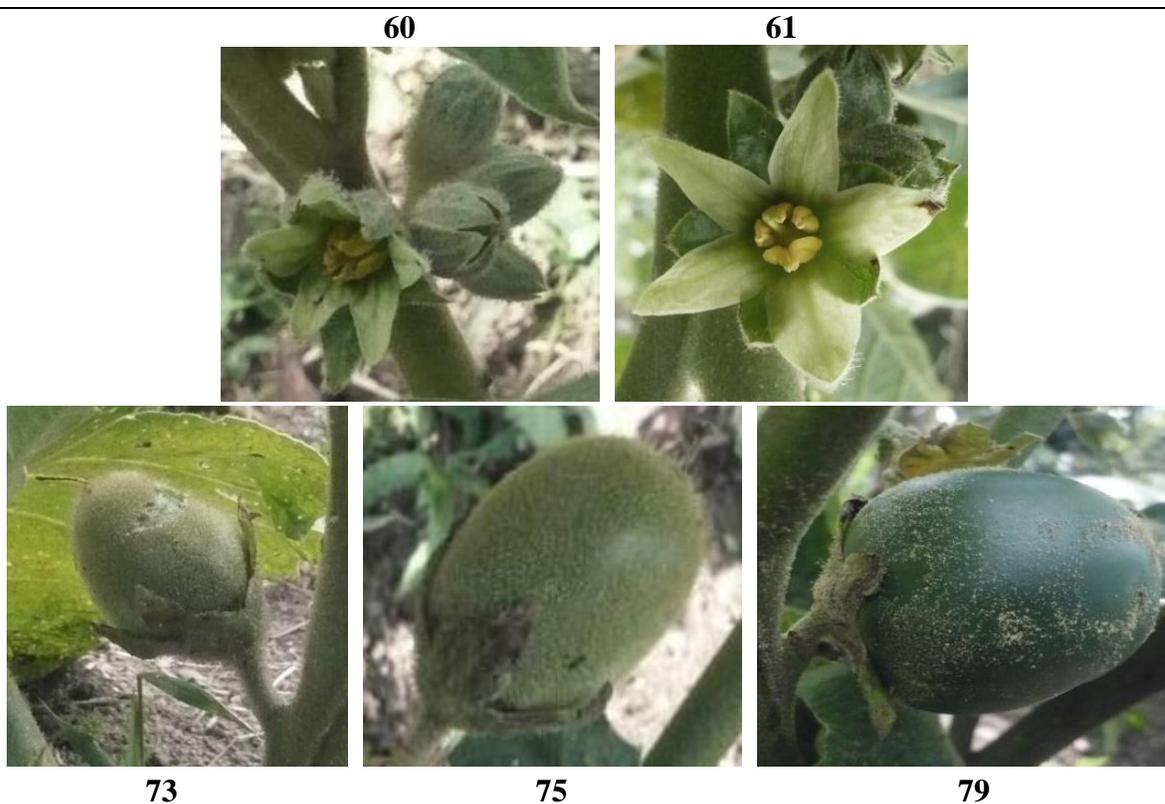
---

### Estadio principal de desarrollo 6 y 7. Floración y Formación del fruto.

---

En una misma inflorescencia se encuentran flores hermafroditas y estaminadas. Las flores estaminadas poseen estilete reducido y ovario rudimentario. Las flores hermafroditas poseen un estigma húmedo, estilete glabro y su ovario es piloso y con forma de globo (Silva Filho, 1998). Las flores miden entre 4 y 5 cm de diámetro y están dispuestas en racimos axilares. El cáliz posee 5 sépalos duros, triangulares y pubescentes en el lado externo y glabro en el interno y la corola exhibe 5 pétalos de color blancuzco, ligeramente amarillo o verdoso (Rascio *et al* 2002). Después de la bifurcación del tallo, aparecen las flores en ambas ramas, en donde luego se muestra la presencia de frutos justo encima de esta bifurcación (Rascio *et al* 2002). Los frutos son bayas, de forma ovalada y su tamaño y peso varía de acuerdo al ecotipo. Los frutos maduros son amarillos o naranja-rojizos y de pulpa acuosa (Carvajal y Balcázar 2000; Volpato *et al*, 2004). El desarrollo de las flores no es simultáneo, pero las flores abiertas coexisten con flores cerradas de diferentes tamaños y con frutos en diferentes estados de maduración. Después de la apertura floral se presenta el crecimiento longitudinal del ovario, hecho que marca el inicio del crecimiento del fruto. En este momento el fruto cuajado exhibe una longitud de 0.9 cm y una tonalidad verde oscura, y está cubierto por pubescencias blancas (Hernández *et al*, 2004; Barrera *et al*, 2011).

---



---

#### Código:

- 60 Primeras flores abiertas.
  - 61 Comienzo de la floración: 10% de plantas en floración.
  - 63/71 30% de plantas en floración. Cuajado de fruto visible.
  - 65/75 50% de plantas en floración. Pétalos se caen o se secan. El fruto alcanza 50% de su tamaño final.
  - 79 El fruto alcanza su tamaño final.
-

---

**Estadio principal de desarrollo 8. Maduración de frutos y semillas.**

---

El fruto presenta un crecimiento de tipo sigmoidal doble. El período de desarrollo desde el estado de fruto cuajado hasta el estado de fruto maduro (color naranja marrón) es de 71 días. El fruto varía desde casi esférico u ovoide hasta ovalado, con 4 a 12 cm de ancho, 3 a 6 cm de largo y 24 a 250 g de peso. El color de la baya puede ser desde amarillo hasta rojizo; los frutos de color amarillo normalmente están cubiertos de pubescencia blancuzca, fina y suelta. La cáscara es suave y rodea la pulpa o mesocarpio grueso, amarillo y acuoso. Las cuatro celdas que lo componen están llenas de semillas envueltas en mucílago claro, similares a las del tomate (Hernández *et al*, 2004; Barrera *et al*, 2011).

---

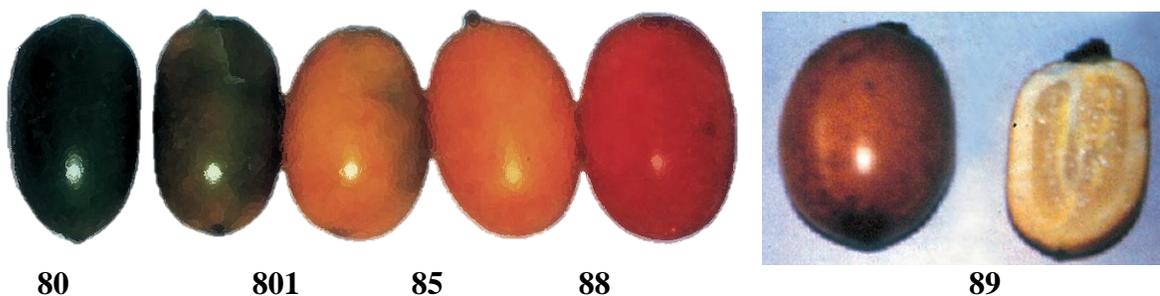


Imagen tomada y modificada de Hernández *et al*, 2004

---

**Código:**

<b>81</b>	<b>801</b>	Comienzo de coloración del fruto. Cambio de color del fruto de verde a rojo o naranja.
<b>85</b>		
<b>89</b>	<b>809</b>	Continuación del cambio de color. Aumenta la intensidad del color del fruto. Maduración completa. Fin de la coloración típica de la especie. Cáscara sin pubescencias, pulpa amarilla y acuosa, abundantes semillas envueltas en mucílago claro.

---

**VII.CONCLUSIONES.**

- A pesar de que otros trabajos reportan que la germinación en *S. sessiliflorum* presenta una respuesta fotoblástica neutra al estímulo de la luz, nuestros resultados discrepan al reportar que la germinación de la especie es dependiente de luz. Tal comportamiento puede atribuirse al temprano proceso de domesticación en el que aún se encuentra la especie en algunas regiones del país.
- Las condiciones de temperatura, inferiores a los rangos óptimos para la especie pudieron haber inducido la latencia, pero a pesar de que la temperatura pudo haber afectado el desarrollo de la especie de una manera más trascendente de lo que podemos demostrar con estos experimentos, el incremento en los porcentajes de germinación obtenidos bajo el efecto de los promotores indica que

su aplicación resulta eficiente para mejorar el proceso en condiciones ambientales diferentes a las de su área de distribución natural.

- Las plántulas de cocona presentaron diferencias interesantes en su patrón de desarrollo como resultado del efecto de los promotores. Aunque su evaluación no estaba contemplada dentro los objetivos de este trabajo, se reportan como un precedente para futuras investigaciones.
- La escala BBCH extendida para *S. sessiliflorum* se presenta como una base para homogenizar la terminología de los estudios fenológicos para la especie y para ser usada en las diferentes áreas de investigación donde se requiera incluir los estados de desarrollo de la misma. Está abierta a cambios que puedan sugerir otros investigadores con el propósito de enriquecer la información disponible y obtener una escala cada vez más específica para la especie.

### **XIII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Ahmad F, Ahmad I, Khan M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *India Microbiological Research*. 163:173-181.
2. Alboresi A, Gestin C, Leydecker M, Bedu M, Meyer C, Truong H. 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environment*. 28: 500-512.
3. Ali T, Hossein P, Asghar F, Salman Z, Chahooki Z, Ali M. 2010. The effect of different treatments on improving seed germination characteristics in medicinal species of *Descurainia sophia* and *Plantago ovata*. *African Journal of Biotechnology*. 9(39): 6588-6593.
4. Andrade M, Ayala J, Alia I, Rodríguez H, Acosta C. M, López V. 2008. Efecto de promotores de la germinación y sustratos en el desarrollo de plántulas de papayo. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 25: 617-635.
5. Atia A, Debez A, Barhoumi Z, Smaoui A, Abdely C. 2009. ABA, GA<sub>3</sub>, and nitrate may control seed germination of *Crithmum maritimum* (Apiaceae) under saline conditions. *Comptes Rendus Biologies*. 332(8): 704-710.
6. Attibayéba, Mikoko E, Kounkou J. S, Cerely J. G, Mandoukou F. 2010. Description of different growth stages of *Sesamum indicum* L. using the extended BBCH scale. *Pakistan Journal of Nutrition*. 9(3): 235-239.
7. Avis T. J, Gravel V, Antoun H, Tweddell R.J. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 1733–1740.

8. Azcón-Bieto J, Talón M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. Capítulo 20 Giberelinas. McGraw-Hill Interamericana, Barcelona.
9. Banchio E, Bogino P. C, Zigadlo J, Giordano W. 2008. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochemical Systematics and Ecology*. (36): 766–771.
10. Bathia S, Maheshwari D. K, Dubey R. C, Arora D. S, Bajpai V. K, Kang S. C. 2008. Beneficial Effects of Fluorescent Pseudomonads on Seed Germination, Growth Promotion, and Suppression of Charcoal Rot in Groundnut (*Arachis hypogea* L). *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18(9): 1578–1583.
11. Barrera J A, Hernández M S, Melgarejo M L (Compiladores). 2011. Estudios ecofisiológicos en la Amazonia colombiana. Cocona. Instituto Amazónico de Investigaciones científicas SINCHI, Bogotá, Colombia.
12. Bennett A. J., Whipps J.M. 2008. Beneficial microorganism survival on seed, roots and in rhizosphere soil following application to seed during drum priming. *Biological Control*. 44: 349-361.
13. Benvenuti S, Macchia M. 1997. Light environment, phytochrome and germination of *Datura stramonium* L seeds. *Environmental and experimental Botany*. 38: 61-71.
14. Bhattacharya J, Khuspe S. 2001. In vitro and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L) seeds. *Scientia Horticulturae*. 91: 39-49.
15. Bewley J. D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell*. 9:1055-1066.
16. Cardenas W, Zuluaga M L, Lobo M. 2004. The effect of seed dormancy on germplasm conservation and viability monitoring in lulo (*Solanum quitoense* Lam) and tree tomato (*Cyphomandra betacea* (*Solanum betaceum*) Cav Sendt). *Plant Genetic Resources Newsletter*. 139: 31-41. Accedida en Agosto de 2012 en: <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2008%2FQJ%2FQJ0801.xml%3BQJ2005000105>
17. Cardona J. E. 2011. Estudio de metabolitos fijos y volátiles en tres morfotipos de cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal) procedentes del departamento del Guaviare. Universidad Nacional de Colombia, Tesis para título: Master en Ciencias- Química. 4-20. Accedida en Agosto de 2012 en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/5302/1/julianaerikacristinacardonajaramillo.2011.pdf>
18. Carvajal C, Balcázar L. 2000. Cultivo de cocona. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. IIAP. Iquitos, Perú. 4-52.
19. Copeland L. O, McDonald M. B. 2001. Principles of seed science and technology. Kluwer Academic Publishers. 4 Edición. 104-110.

20. Delanoy M, Van Damme P, Scheldeman X, Beltran J. 2006. Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey, *Passiflora tricuspidis* Mast. and *Passiflora nov sp.* seeds. *Scientia Horticulturae*. (110):198–203.
21. Diaz M, Martins S. 2010. Envelhecimento acelerado em sementes de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 40(3): 251-256.
22. FAO. 2011. Semillas en emergencias, Manual Técnico. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. 57-62. Accedida Agosto de 2012 en: <http://www.fao.org/docrep/015/i1816s/i1816s00.pdf>
23. Fernández H, Pérez C, Revilla M. A, Pérez F. 2002. The levels of GA<sub>3</sub> and GA<sub>20</sub> may be associated with dormancy release in *Onopordum nervosum* seeds. *Plant Growth Regulation*. 38: 141- 143.
24. Finn G. A, Straszewski A. E, Peterson V. 2007. A general growth stage key for describing trees and woody plants. *Annals of Applied Biology*. 151(1): 127-131.
25. Giba Z, Grubisic D, Konjevic R. 2006. Seeking the Role of NO in Breaking Seed Dormancy. *Plant Cell Monographs*. (6): 91-110.
26. Glick B. R, Bashan Y. 1997. Genetic manipulation of plant growth promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances*. 15(2):353-378.
27. Gonzáles L. M, Caycedo C, Velásquez M. F, Flores V, Garzón M. R. 2007. Efecto de la aplicación del ácido giberélico sobre el crecimiento de coliflor (*Brassica oleraceae* L.) var. Botrytis DC. *Agronomía Colombiana*. 25(1): 54-61.
28. Grubisic D, Konjevic R. 1990. Light and nitrate interaction in phytochrome-controlled germination of *Paulownia tomentosa* seeds. *Planta*. 181: 239-243.
29. Hernández M. S, Barrera J. A. 2004. Bases técnicas para el aprovechamiento agroindustrial de especies nativas de la Amazonía. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Universidad de la Amazonía. Bogotá, Colombia: 25-40.
30. Hernández M. S, Barrera J. A, Páez B, Oviedo E, Romero H. 2004. Aspectos Biológicos y conservación de frutas promisorias de la Amazonía Colombiana. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Universidad de la Amazonía. Bogotá, Colombia: 129-150.
31. Hermosillo Y, Aguirre J, Rodríguez R. A, Ortega C, Gómez A, Magaña R. 2008. Métodos inductivos para maximizar la germinación de semilla de germoplasma nativo en vivero para sistemas silvopastoriles en Nayarit, México. *Zootecnia Tropical*. 26(3): 355-358.

32. Hess M, Barralis G, Bleiholder H, Buhr L, Eggers T, Hack H, Stauss R. 1997. Use of the extended BBCH scale-general for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Research*. 37: 433- 441.
33. Hilhorst H. 1990. Dose-response analysis of factors involved in germination and secondary dormancy of seeds of *Sisymbrium officinale*. *Plant Physiology*.94: 1096-1102.
34. Hormaza P, Mesa E, Romero H. M. 2012. Phenology of the oil palm interspecific hybrid *Elaeis oleifera* × *Elaeis guineensis*. *Scientia Agricola*. 69 (4): 275-280.
35. Kambizi L, Adebola P O, Afolayan A J. 2006. Effects of temperature, pre-chilling and light on seed germination of *Withania somnifera*; a high value medicinal plant. *South African Journal of Botany*. 72: 11-14.
36. Karimian Z, Azizi M, Noori S. 2011. Seed Germination and Dormancy Breaking Techniques for *Echinacea purpurea* L. *Journal of Biological and Environmental Sciences*. 5(13): 7-10.
37. Kenanoglu B. B, Demir I, Mavi K, Yetisir H, Keles D. 2007. Effect of priming of germination of *Lagenaria siceraria* genotypes at low temperatures. *Tarim Bilimleri Dergisi*. 12(3): 169- 175.
38. Lobo M, Delgado O, Cartagena J. R, Fernandez E, Medina C. I. 2007. Categorización de la germinación y la latencia en semillas de chirimoya (*Annona cherimola* L) y guanabana (*Annona muricata* L), como apoyo a programas de conservación de germoplasma. *Agronomía Colombiana*. 25(2): 231-244.
39. Marx F, Eloisa H. A, Andrade J. G. 1998. Chemical composition of the fruit of *Solanum sessiliflorum*. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung*. 206: 364-366.
40. Meier U, Bleiholder H, Buhr L, Feller C, Hack H, Heß M, Lancashire P, Schnock U, Stauß R, Boom T, Weber E, Zwinger P. 2009. The BBCH system to coding the Phenological growth stages of plants - history and publications. *Journal für Kulturpflanzen*. 61(2): 41–52.
41. Nonogaki H, Bassel GW, Bewley D. 2010. Germination-Still a mystery. *Plant Science*. 179: 574-581.
42. Oliveira E. 2006. Germinação de sementes, enraizamento de estacas caulinares e cultivo *in vitro* de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal.). Tesis de doctorado para Titulo- Doctor en Agronomía (Horticultura), Universidad Estadual Paulista. 25-42. Accedida en: [http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bla/33004064014P0/2006/pinto\\_eos\\_dr\\_botfca.pdf](http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bla/33004064014P0/2006/pinto_eos_dr_botfca.pdf)
43. Peng J, Harberd N. P. 2002. The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Plant Biology*. 5: 376–381.

44. Pereira M. D, dos Santos C. E, Filho S. M. 2011. Germinação de sementes de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). Revista Brasileira de Ciências Agrárias. (6)1: 79-84.
45. Pizzinato J. R, Schueltert A. R, Amaral A. T, Souza A. C, Manzatti J, Volkweis C. R, Freitas M. B, Schwantes F. R, Schwantes D. O. 2008. Crossing and diagnostic methods of cubiu hybrid plants based on genetic markers. Crop Breeding and Applied Biotechnology. 8: 283-290.
46. Rascio N, Camani A, Sacchetti L, Moro I, Cassina G, Torres F, Cappelletti E. M, Paoletti M. G. 2002. Acclimatization trials of some *Solanum* species from Amazonas Venezuela at the Botanical Garden of Padova. Economic Botany. 56(4): 306-314.
47. Rajan S, Tiwari D, Singh V. K, Saxena P, Singh S, Reddy Y, Upreti K, Burondkar M, Bhagwan A, Kennedy R. 2011. Application of extended BBCH scale for phenological studies in mango (*Mangifera indica* L.). Journal of Applied Horticulture. 13(2): 108-114.
48. Rincón A. M, Gonzáles D, Rached L. B, Emaldi U, Padilla F. 2011. Actividad antioxidante y contenido de polifenoles en frutos de túpiro (*Solanum sessiliflorum* Dunal) provenientes del Amazonas venezolano. Revista Facultad de Farmacia. 74(1): 41-45.
49. Santos L. A, Bueno C. R, Clement C. R. 2000. Influência da temperatura na germinação de sementes de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) no escuro. Acta Amazonica. 30(4): 671-675.
50. Saldívar P, Laguna A, Gutierrez F, Dominguez M. 2010. Ácido giberélico en la germinación de semillas de *Jaltomata procumbens* (Cav.) J. L. Gentry. Agronomía Mesoamericana. 21(2):327-331.
51. Sheng Tang D, Hamayum M, Moon Ko Y, Ping Zhang Y, Mo Kang S, Jung Lee I. 2008. Role of red light, temperature, stratification and nitrogen in breaking seed dormancy of *Chenopodium album*. Journal of Crop Science and Biotechnology. 11(3): 199- 204.
52. Siadat S. A, Moosavi S. A, Zadeh M. S, Fotouhi F, Zirezadeh M. 2011. Effects of halo and phytohormone seed priming on germination and seedling growth of maize under different duration of accelerated ageing treatment. African Journal of Agricultural Research. 6(31): 6453-6462.
53. Silva Filho D. F. 1998. Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal): Cultivo y Utilización. Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaria PRO-TEMPORE. Caracas, Venezuela: 37- 43.
54. Silva Filho D. F, Kiyoko L, Yuyama O, Aguiar J. P, Oliveira M. C, Pinheiro L. C. 2005. Caracterização e avaliação do potencial agrônômico e nutricional de etnoviedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Amazônia. Acta Amazônica. 35(4): 399 – 406.
55. Stefanello S, Christoffoli P, Frantz G, Rocha A. C, Silva J. M, Stefanello R, Schuelter A. R. 2008. Germinação de sementes armazenadas de cubiu sob diferentes condições de luz. Scientia Agraria. 9(3): 363-367.

56. Suárez D, Fernández J. L, Melgarejo L. M. 2011. Efecto de la luz y el ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) en la germinación de *Minthostachys mollis* Kunth. Griseb (Labiatae). Acta Biológica Colombiana. 16(2): 149-154.
57. Taiz, L. y Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
58. Van L C., Bakker P. A. 2003. Signalling in rhizobacteria, Plant Interactions. Ecological studies. (168): 297-330.
59. Volpato G, Marcucci R, Tornadore N, Paoletti M.G. 2004. Domestication process of two *Solanum* section Lasiocarpa species among Amerindians in the upper Orinoco, Venezuela, with special focus on Piaroa Indians. Economic Botany. 58(2): 184-194.
60. Wei S, Hu Y, Srivastava M, Zhou Q, Niu R, Li Y, Wu Z, Sun T. 2009. Seed germination of a newly discovered hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. affected by illumination and seed soaking-reagent. Journal of Hazardous materials. 170: 1256-1259.