

RECUPERATION OF THE HIGH GERMINABILITY CONDITION OF PAPAYA SEED THROUGH PRIMING TECHNOLOGY AND BIOREGULATORS

RECUPERACIÓN DE LA ALTA CAPACIDAD DE GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE PAPAYA MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE PREACONDICIONAMIENTO y BIORREGULADORES

Francisco Bautista-Calles, Guillermo Carrillo-Castañeda* y Ángel Villegas-Monter

Genética. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México.
(carrillo@colpos.mx)

ABSTRACT

Rapid loss of seed viability of *Carica papaya* L. (papaya) and its high commercial price impairs the availability of high quality seed to growers. Certified papaya seed cv. Maradol was utilized to define practical methodologies to restore the seed germination performance. Seed was submitted to: 1) hydropriming: 4 d of hydropriming rose seed germination up to 84%, 250% more than the untreated seeds; however, the seedlings generated from untreated seeds accumulated more biomass than the other treatments; 2) chemoprimer: seeds treated 4 d in a 10^{-5} M calcium chloride solution germinated 262% more than did the untreated seeds and in addition, the seedlings generated from treated seeds accumulated more biomass than the control seedlings. When seeds were treated either in the 10^{-4} M salicylic acid or in Agromil S® solution high germination was accomplished 81 and 73% higher than the untreated seed respectively. All treated seeds germinated faster than the untreated ones.

Keywords: *Carica papaya*, acetylsalicylic acid, agromil S®, calcium chloride, chemoprimer, hydropriming.

INTRODUCTION

Failure of seed germination and subsequent seedling growth is a major cause of yield decrease for papaya (*C. papaya*) due to a rapid decay of seed capacities. Papaya growers normally deposit six or up to twelve seeds per germination container, which increases production costs (Vargas, 1996). The fast reduction in seed germinability capacity observed in this seed has been correlated with the presence of inhibitors of germination in both the testa and sarcotesta (Paz and Vázquez, 1998). The activity of seed inhibitors has been reduced by soaking and washing the seed in water (Vargas, 1996) or by sun drying (Wood *et al.*, 2000). Papaya seed conditioned in the presence of gibberellic acid improved its germination, but, after drying, a decrease in seed vigor

RESUMEN

La pérdida rápida de la viabilidad de la semilla de *Carica papaya* L. (papaya) y su elevado precio comercial afectan la disponibilidad de semillas de alta calidad para los cultivadores. Se usó semilla certificada de papaya cv. Maradol para determinar las metodologías prácticas para recuperar la capacidad de germinación de las semillas. Las semillas se sometieron a: a) preacondicionamiento hídrico: tras 4 d de preacondicionamiento hídrico la germinación de semillas aumentó hasta 84%, 250% más que en aquellas que no se trataron; sin embargo, las plántulas generadas a partir de las semillas no tratadas acumularon más biomasa que las que sí se trataron; 2) preacondicionamiento químico: las semillas tratadas durante 4 d en una solución de cloruro de calcio 10^{-5} M germinaron 262% más que las no tratadas y, además, sus plántulas acumularon más biomasa que las plántulas testigo. Cuando las semillas se trataron ya sea en solución de ácido salicílico 10^{-4} o en la de Agromil S®, se obtuvo una germinación significativa, 81 y 73% más alta que en las no tratadas. Todas las semillas tratadas germinaron con mayor rapidez que las no tratadas.

Palabras clave: *Carica papaya*, ácido acetilsalicílico, Agromil S®, cloruro de calcio, preacondicionamiento químico, preacondicionamiento hídrico.

INTRODUCCIÓN

El fracaso de la germinación de la semilla y el posterior crecimiento de plántulas son causas principales de disminución en el rendimiento de la papaya (*C. papaya*), debido al rápido deterioro de la capacidad de germinación de las semillas. Los cultivadores de papaya generalmente depositan entre seis y doce semillas por contenedor de germinación, lo que incrementa los costos de producción (Vargas, 1996). La reducción acelerada de la capacidad de germinación observada en esta semilla se ha correlacionado con la presencia de inhibidores de germinación en la testa y sarcotesta (Paz y Vázquez, 1998). La actividad de los inhibidores se ha reducido mediante el remojo y el enjuague de la semilla en agua (Vargas, 1996) o por

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Enero, 2008. Aprobado: Junio, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 42: 817-826. 2008.

and germination was shown by the conditioned seed (Marcos and Maleus, 2008).

Methodologies have been developed to add quality to the seeds as well as to identify high quality seed (Artola *et al.*, 2003). The beneficial responses observed in the primed seed are: germination under a broad permissive temperature range, uniformity and hasten speed of germination, as well as improvement of seedling vigor (Welbaum *et al.*, 1998). Commercially available bioregulators are also used to stimulate seed germination; nevertheless, there are not defined criteria for their appropriate utilization in papaya germination. Therefore, the present study was conducted to develop methods, based on the priming technology to restore the germination capacity of papaya seed and to characterize under such conditions the early seedling development. The use of bioregulators was taken into consideration as well.

MATERIALS AND METHODS

Biological material and chemicals

Three seed lots of certified papaya cv. Maradol with slight differences in germination percentages were used in the present research. Chemical reagents, commercial germination enhancers: Agromil S[®], Biozyme pp[®], Germiboost[®], and the fungicide Captan[®] (50%) were used in this research. The fungicide Captan[®] (50%) contains N-trichloromethyl-thio-4ciclohexane, 2 dicarboximide and the bioregulators contain cytokinins, auxins, gibberellins, vitamins microelements. The chemical composition of Agromil S[®] in ppm is: cytokinins, 208; gibberellins, 31; auxins, 30.5 and in ppb, folic acid, 0.92; pantotenic acid, 12.5; riboflavin, 0.86; nicotinamid, 0.16; coline, niacin, 84.5; biotine, 100. Biozyme pp[®] contains: gibberellins, 31; indoleacetic acid, 30.2; Zeatin, 83.2 ppm; and the microelements Mn, Zn, Fe, B, and S (1.86%).

Conventional germination method

The method used by papaya growers consist in soaking a sample of 100 seeds in 0.5 L of tap water 72 h, changing the water every 12 h; after 60 h, 0.25 g of Captan[®] (50%) was added to the water. Then, a lot of 25 seeds was placed in a stripe of a flannel piece (15 × 20 cm) previously boiled and soaked with fresh tap water; each flannel piece was folded in two to cover the seeds, which were kept soaked at 29 ± 3 °C.

Hydropriming procedure

Seven lots of 80 seeds were primed at 1 d intervals (days 3 to 6) in 1 L of aerated distilled water (18-20 °C) (Artola *et al.*, 2003). The water was replaced every 24 h and 24 h before the seed completed its priming period, 0.5 g of Captan[®] (50%) was added to the water. After each priming period two seed lots were taken and only one of

secado al sol (Wood *et al.*, 2000). La capacidad de germinación de la semilla de papaya mejoró con la aplicación de ácido giberélico; sin embargo, una vez seca, su vigor y germinación disminuyeron (Marcos and Maleus, 2008).

Se han desarrollado metodologías para incrementar la calidad de las semillas, así como para identificar semillas de alta calidad (Artola *et al.*, 2003). Las respuestas favorables observadas en las semillas tratadas son: germinación bajo un rango de temperatura ampliamente permisivo, uniformidad y aceleración en la velocidad de germinación, así como mejoramiento del vigor de las plántulas (Welbaum *et al.*, 1998). Los bioreguladores disponibles comercialmente también se utilizan para estimular la germinación de semillas; sin embargo, no existe un criterio definido para su uso en la germinación de la papaya. Por ello, este estudio se realizó con el objetivo de desarrollar métodos con base en la tecnología de preacondicionamiento, para restablecer la capacidad de germinación de la semilla de papaya y determinar el desarrollo temprano de las plántulas en tales condiciones. También se consideró el uso de bioreguladores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos y material biológico

En esta investigación se usaron tres lotes de semilla de papaya cv. Maradol certificada con diferencias mínimas en los porcentajes de germinación. Además, se usaron reactivos químicos, potenciadores comerciales de la germinación: Agromil S[®], Biozyme pp[®], Germiboost[®], y el fungicida Captan[®] (50%). El fungicida Captan[®] (50%) contiene N-triclorometril-tio-4ciclohexano, 2dicarboximida y los bioreguladores contienen citoquininas, auxinas, giberelinas, microelementos vitamínicos. La composición química del Agromil S[®] en ppm es: citoquininas, 208; giberelinas, 31; auxinas, 30.5 y en ppb, ácido fólico 0.92%; ácido pantoténico, 12.5; riboflavina, 0.86%; nicotinamida, 0.16; colina, niacina, 84.5; biotina, 100. Biozyme pp[®] contiene: giberelinas, 31; ácido indolacético, 30.2; zaetina, 83.2 ppm; y los microelementos Mn, Zn, Fe, B y S (1.86%).

Método convencional de germinación

El método utilizado por los cultivadores de papaya consiste en remojar una muestra de 100 semillas en 0.5 L de agua corriente durante 72 h; tras 60 h, al agua se le añadió 0.25 g de Captan[®]; posteriormente, un lote de 25 semillas se colocó en un pedazo de franela (15 × 20) previamente hervido y remojado con agua corriente. Cada pieza de franela se dobló en dos para cubrir las semillas y éstas se mantuvieron en remojo a 29 ± 3 °C.

Preacondicionamiento hídrico

Se preacondicionaron siete lotes de 80 semillas en intervalos de 1 d (días 3 a 6) en 1 L de agua destilada (18-20 °C) (Artola *et al.*,

them was washed with distilled water. The seeds were then air-dried on the bench 30 min at $20 \pm 2^\circ\text{C}$. In each experiment two sets of 25 seeds per priming period were allowed to germinate (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2003).

Chemopriming procedure

Seed lots were subjected 4 d to the procedure described in the hydropriming section but instead of pure water there were used: solutions 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} M CaCl_2 ; solutions 10^{-5} M of gibberellic acid (GA_3), 6-benzylaminopurine (6-BAP), and abscisic acid (ABA); solutions 10^{-4} M acetylsalicylic acid (ASA), salicylic acid (SA), and sulfosalicylic acid (SSA); CaCl_2 10^{-3} M plus SA 10^{-4} M. Agromil S® 1.25 mL 0.5 kg^{-1} of seed, Biozyme pp® 10 g 0.5 kg^{-1} of seed and Germiboost® 5 g 0.45 kg^{-1} of seed. These solutions were adjusted to pH 5.9 ± 0.1 , and replaced every 24 h; in the last replacement, 0.5 g of Captán® (50%) was added. After the respective treatment, the seed without washing was air-dried as indicated. In each experiment three lots of 25 seeds per treatment were allowed to germinate. In addition, three lots of 25 untreated seeds were set to germinate (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2003).

Percentage of daily germination, final germination after 10 d, and days to 50% of germination (T_{50}), were determined. A seed was considered germinated when the radicle protrusion was ≥ 1 mm. The final germination was expressed as percentage of normal seedlings.

Determination of seedling development

The germinated seeds were placed 0.5 cm from the upper edge of a paper towel sheet moistened with 7 mL of distilled water and rolled up. The rolls were placed into plastic bags in a vertical position with the germinated seeds on top during 14 d at $29 \pm 3^\circ\text{C}$ under 16 h photoperiod. Seedling length, stem length, root length, biomass fresh and dry weight (oven-dried at 70°C for 72 h) of seedling, stem, and root were determined. Lots of 30 seedlings per treatment were used in these determinations. The determination of seedling development was repeated three times, one per week.

Experimental design

A completely randomized design was used with two and three repetitions for the priming and chemopriming experiments. For the conventional germination method averages were calculated. Data were tested by analysis of variance (ANOVA), and treatments mean were compared by Tukey test ($p \leq 0.05$). In any set of experiments, the comparisons were done among the different treatments and the control.

RESULTS AND DISCUSSION

Hydropriming

Seed hydroprimed 4 d and unwashed before drying exhibited the highest germination rate (84%), which

2003). El agua se reemplazó cada 24 h y se le añadieron 0.5 g de Captán® 24 h antes de que la semilla completara su periodo de preacondicionamiento. Después de cada periodo de preacondicionamiento se extrajeron dos lotes de semillas y uno de éstos se enjuagó con agua destilada. Posteriormente las semillas se secaron al aire durante 30 min a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ en un estante. En cada experimento se pusieron a germinar dos lotes de 25 semillas por periodo de preacondicionamiento (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2003).

Preacondicionamiento químico

Los lotes de semillas se sometieron durante 4 d al procedimiento descrito en el apartado relativo al preacondicionamiento hídrico; pero el agua pura se substituyó por las siguientes soluciones: 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M CaCl_2 ; soluciones 10^{-5} de ácido giberélico (GA_3), 6-benzilaminopurina (6-BAP), y ácido abscísico (ABA); 10^{-4} M ácido acetilsalicílico (ASA), ácido salicílico (SA), y ácido sulfosalicílico (SSA); CaCl_2 10^{-3} M más SA 10^{-4} M. Agromil S® 1.25 mL 0.5 kg^{-1} de semilla, Biozyme pp® 10 g 0.5 kg^{-1} de semilla y Germiboost® 5 g 0.45 kg^{-1} de semilla. Estas soluciones se ajustaron a pH 5.9 ± 0.1 y se reemplazaron cada 24 h; en el último reemplazo se añadieron 0.5 g de Captán® (50%). Después del tratamiento respectivo, las semillas sin lavar se secaron al aire como se indicó. En cada experimento se pusieron a germinar tres lotes de 25 semillas por tratamiento. Además, se pusieron a germinar tres lotes de 25 semillas no tratadas (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2003).

El porcentaje diario de germinación, la germinación final tras 10 d, y los días a 50% de germinación (T_{50}) fueron determinados. La semilla se consideró como germinada cuando la protrusión radicular fue ≥ 1 mm. La germinación final se expresó en porcentaje de plántulas normales.

Determinación del desarrollo de plántula

Las semillas germinadas se colocaron a 0.5 cm del borde de una toalla de papel humedecida con 7 mL de agua destilada y se enrollaron. Los rollos se colocaron dentro de bolsas de plástico en posición vertical con las semillas germinadas en el borde superior donde permanecieron 14 d a $29 \pm 3^\circ\text{C}$ en un fotoperiodo de 16 h. La longitud de la plántula, tallo y raíz, y el peso de la biomasa fresco y seco de la plántula (secado al horno durante 72 h a 70°C) fueron determinados. En estas determinaciones se usaron lotes de 30 plántulas por tratamiento. La determinación del desarrollo de plántulas se repitió tres veces, una por semana.

Diseño experimental

En los experimentos de preacondicionamiento y preacondicionamiento químico se usó un diseño completamente al azar con dos y tres repeticiones, respectivamente. Se calcularon los promedios del método convencional de germinación convencional. Los datos se evaluaron con análisis de varianza (ANOVA) y la media de los tratamientos se comparó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). En todas las series de experimentos se llevó a cabo la comparación de los diferentes tratamientos con su testigo.

was 2.5 times higher than that of the corresponding untreated seeds and higher speed of germination since T_{50} was reduced from 8 (untreated seed) to 4 d (Table 1). Seed from the same lot subjected to the conventional germination method germinated 35%. Thus, our procedure did promote two important functions of papaya seed, surpassing the results of the conventional germination method. The maximum beneficial effects were detected in the 4 d hydroprimed seeds, although exposing seeds to more days of priming or additional washing did not caused reduction of germination (treatments 3, 4, 7 and 8). These are the experimental conditions required for the appropriate removal of substances from seeds that inhibit their germination. Bhattacharya and Khuspe (2001) showed that testa free seeds germinated *in vitro* 95.5% compared to only 40.2% in intact papaya seeds.

Untreated seed generated seedlings that exhibited the best vigor condition, based on the accumulation of fresh (900 mg) and dry (72 mg) biomass in comparison to the 4 d hydroprimed seeds that accumulated less fresh (700 mg) and dry (40 mg) biomass. Priming allows advancement of germination during which seeds undergo the early physiological process (Heydecker and Coolbear, 1997) and the integration of interlocking metabolic systems (Leubner-Metzger, 2005) that occur before germination takes place. However, along the imbibition process lose of nutritional compounds (imbibitional leakage) takes place due to the lipid-phase transitions occurring in the plasma membrane as a result of dehydration and rehydration of seeds. Subedi and

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preacondicionamiento hídrico

Las semillas preacondicionadas 4 d y sin enjuagar antes del secado tuvieron la mayor tasa de germinación (84%), 2.5 veces mayor que la de las semillas correspondientes no tratadas; y mayor velocidad de germinación, dado que T_{50} se redujo de 8 (semilla no tratada) a 4 d (Cuadro 1). Las semillas del mismo lote sometidas al método convencional de germinación registraron 35% de germinación. Así, nuestro procedimiento promovió dos funciones importantes de la semilla de papaya, con lo que se superaron los resultados del método convencional de germinación. Los mayores efectos benéficos se detectaron en las semillas preacondicionadas 4 d con agua, aunque la exposición de las semillas a más días de preacondicionamiento o a enjuagues adicionales no disminuyó la germinación (tratamientos 3, 4, 7 y 8). Estas son las condiciones experimentales requeridas para la remoción adecuada de las sustancias de las semillas que inhiben su germinación. Bhattacharya y Khuspe (2001) mostraron que las semillas sin testa germinaron 95.5% *in vitro* en comparación con sólo 40.2% de las semillas de papaya no tratadas.

Estas últimas generaron plántulas que mostraron las mejores condiciones de vigor, a partir de la acumulación de biomasa fresca (900 mg) y seca (72 mg) en comparación con las semillas preacondicionadas 4 d en agua que acumularon menos biomasa fresca (700 mg) y

Table 1. Seed germination, seedling growth, and biomass accumulation obtained from papaya seed submitted to the treatments: 1) untreated seed; 2) seed primed during 3 d and washed; 3) seed primed during 3 d; 4) seed primed during 4 d and washed; 5) seed primed during 4 d; 6) seed primed during 5 d and washed; 7) seed primed during 5 d; 8) seed primed during 6 d and washed. (seedlings $n=30$, 14 d at 29 ± 3 °C under 16 h photoperiod).

Cuadro 1. Germinación de semillas, crecimiento de plántulas, y acumulación de biomasa obtenida a partir de semillas de papaya sometidas a los tratamientos: 1) semilla no tratada; 2) semilla preacondicionada durante 3 d y enjuagada; 3) semilla preacondicionada durante 3 d; 4) semilla preacondicionada durante 4 d y enjuagada; 5) semilla preacondicionada durante 4 d; 6) semilla preacondicionada durante 5 d y lavada; 7) semilla preacondicionada durante 5 d; 8) semilla preacondicionada durante 6 d y enjuagada (plántulas $n=30$, 14 d a 29 ± 3 °C bajo fotoperiodo de 16 h).

Treatment	Germination (%) ($n=25$)	Length (mm) Seedling	Biomass fresh weight (mg)			Biomass dry weight (mg)			T_{50} (d)
			Seedling	Stem	Root	Seedling	Stem	Root	
1	24 d	12.3 ns	900 a *	550 a *	300 a *	72 a *	43.5 a*	28.5 a*	8
2	58 bc	17.4 "	840 ab	580 a	200 ab	42 b	28.0 ab	14.0 ab	4
3	68 abc	12.1 "	600 abc	400 abc	170 ab	37 b	26.5 ab	10.5 b	4
4	70 abc	14.2 "	700 abc	400 abc	280 ab	43 ab	26.5 ab	16.5 ab	4
5	84 a	17.7 "	700 abc	520 ab	270 ab	40 b	25.0 b	15.0 ab	4
6	50 c	19.2 "	400 bc	270 bc	130 ab	45 ab	30.0 ab	15.0 ab	3
7	68 abc	17.1 "	340 c	250 bc	90 b	46 ab	32.0 ab	14.5 ab	3
8	76 ab	13.5 "	440 bc	230 c	210 ab	45 ab	28.5 ab	16.5 ab	2
MSD	22.23%	9.3	0.5	0.3	0.2	29.6	16.9	15.6	

Values followed by different letter in each column are significantly different ($p\leq 0.05$). ns=significantly. T_{50} =days needed to obtain 50% of seed germination ♦ Los valores seguidos por una letra distinta en cada columna son significativamente diferentes ($p\leq 0.05$). ns=significativamente. T_{50} =días necesarios para obtener 50% de germinación de semillas.

Ma (2005) showed that seed priming does not improve time to seedling emergence, seedling vigor, and growth. It seems that the imbibitional leakage did not affect seed functions involved in the speed of germination (T_{50}) since the results showed (Table 1) that to longer time of imbibition, correspond faster germination.

Despite the fact that all treatments removed inhibitory substances from seeds (2 to 8), exhibited excellent germination and speed of germination, as compared to control, the treatment 5 was selected because it assure both high and prompt germination. Thereafter, the seeds were always primed 4 d and never washed before setting them to dry.

Chemopriming

The highest germination (76%) was obtained in seeds exposed to the 10^{-5} M CaCl_2 solution (2.6 times higher than the untreated seeds) (Table 2). However, the seedlings, stems and roots generated from seeds that were germinated in the 10^{-3} M CaCl_2 solution, exhibited both the highest dry biomass accumulation and the fastest rate of germination (T_{50}). The embryo development can be distorted by poor nutrition, and poor root growth is usually the first sign of calcium deficiency (Burton *et al.*, 2000), which may influence the control of seed germination. A calcium-modulated, serine/threonine protein phosphatase, which may respond to the presence of abscisic acid, could play a role in signal transduction pathway, involving Ca^{2+} , protein kinases, and phosphatases (Trewavas and Malhó, 1997). It explains why calcium influences the control of seed germination. Besides, calcium is an essential plant nutriment required for the biosynthesis of membranes and the wall matrix, bridging pectin chains together into expanded, highly hydrated gel networks (White and Broadley, 2003). The seedlings generated from the seed that were germinated in the 10^{-3} M CaCl_2 solution exhibited both, the fastest rate of germination (T_{50}) and the best development (highest fresh and dry biomass accumulation).

seca (40 mg). El preacondicionamiento permite el progreso de la germinación, durante el cual las semillas experimentan el proceso fisiológico temprano (Heydecker y Coolbear, 1997) y la integración de mecanismos de encadenamiento metabólico (Leubner-Metzger, 2005) que tienen lugar antes de la germinación; sin embargo, junto con el proceso de inhibición hay una pérdida de compuestos nutricionales (pérdida de absorción) debido a las transiciones de la fase lipídica que ocurren en la membrana plasmática a consecuencia de la deshidratación y rehidratación de las semillas. Subedi y Ma (2005) mostraron que el preacondicionamiento de semillas no mejora el periodo de emergencia de plantula, vigor de plantula y crecimiento. Al parecer, la pérdida de absorción no afectó las funciones de las semillas involucradas en la velocidad de germinación (T_{50}), toda vez que los resultados muestran (Cuadro 1) que cuanto más largo es el periodo de preacondicionamiento, más rápida es la germinación.

Aun cuando todos los tratamientos eliminaron sustancias inhibitorias de las semillas (2 a 8) y mostraron una germinación y una velocidad de germinación excelentes, al compararse con el control, se optó por el tratamiento 5 debido a que éste aseguraba una capacidad de germinación alta y rápida. Por lo tanto, las semillas siempre se preacondicionaron 4 d y nunca se enjuagaron antes de ponerse a secar.

Preacondicionamiento químico

La germinación más elevada (76%) se obtuvo con las semillas expuestas a la solución 10^{-5} M CaCl_2 , 2.6 veces mayor que en aquellas que no se trataron (Cuadro 2); sin embargo, las plántulas, tallos y raíces producto de las semillas germinadas en la solución 10^{-3} M CaCl_2 mostraron tanto la mayor acumulación de biomasa seca como la tasa de germinación más rápida (T_{50}). El desarrollo del embrión puede alterarse a consecuencia de una mala nutrición y el poco crecimiento de la raíz es, generalmente, el primer indicador de deficiencia

Table 2. Seed germination, seedling growth, and biomass accumulation obtained from papaya seed previously chemoprimered in the CaCl_2 solution indicated. (seedlings $n=30$, 14 d at 29 ± 3 °C under 16 h photoperiod).

Cuadro 2. Germinación de semillas, crecimiento de plántulas, y acumulación de biomasa obtenida a partir de semillas de papaya previamente preacondicionadas en la solución de CaCl_2 indicada.

Treatment	Germination (%) ($n=25$)	Length (mm)		Biomass fresh weight (mg)			Biomass dry weight (mg)			T_{50} (d)
		Stem	Root	Seedling	Stem	Root	Seedling	Stem	Root	
Untreated	21 b	26 a	71 a	790 b	400 a	390 c	43.4 c	32.9 b	10.5 c	4
CaCl_2 10^{-3} M	70 a	21 b	72 a	1040 a	520 a	520 a	66.3 a	43.4 a	19.9 a	3
CaCl_2 10^{-4} M	75 a	21 b	81 ab	910 ab	460 a	430 bc	53.0 b	37.4 b	15.7 ab	4
CaCl_2 10^{-5} M	76 a	18 b	88 ab	930 ab	450 a	470 b	48.7 bc	34.3 b	14.8 bc	4
MSD	7.8261	0.3	2.0	0.2	0.1	0.06	9.5	5.8	4.6	

The highest germinability (87%) was exhibited by the seed exposed to the SA solution (81% more than the corresponding untreated seeds; Table 3); however, abnormal seedlings were generated (6.9%). To our knowledge, this is the first report for this species. Salicylic acid, a natural product member of the phenolic family which is biosynthesized in plants, interact both antagonistically (Mao and Zentgraf, 2007) and synergistically and with another plant growth regulators such as methyl jasmonate and jasmonic acid in regulatory processes (Takahashi *et al.*, 1993; Mur *et al.*, 2005; Beckers and Spoel, 2006), activating different components of signal transduction pathways (Chen *et al.*, 2002) and in the induction mechanisms of stress tolerance in plants. Compounds analogs to SA are ASA and SSA which also improve seed germination; in addition, these two compounds promoted seedling growth (Table 3). Salazar and Carrillo-Castañeda (2001) demonstrated that SSA induces *in vitro* the process of tuberization in *Solanum tuberosum* plants.

Speed and promotion of germination were observed when seeds were treated in solutions of either: SA, 10^{-4} M (58%); CaCl_2 , 10^{-5} M (54%); or calcium in conjunction with SA (54%) and additionally, accumulation of similar amounts of biomass by the seedlings was observed (Table 4). The interactive effect of calcium and SA allowed (statistically significantly, $p \leq 0.05$), 31% increase in stem length as compared to the seeds exposed to the SA solution. No abnormal seedlings were generated in the seeds treated in the solution of calcium in conjunction with SA.

In the earliest in signal transduction, high cellular concentration of SA cause superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium I tobacco cell suspension culture (Kawano *et al.*, 1998). Thus, involvement of Ca^{2+} influx and active oxygen species (partially reduced metabolites of oxygen) generation as components of SA signaling is suggested.

de calcio (Burton *et al.*, 2000), el cual puede influir en el control de la germinación de las semillas. Una serina/ treonina proteína fosfatasa modulada por calcio, capaz de responder a la presencia de ácido abscísico, puede intervenir en la cascada de transducción de la señal en la que están implicados Ca^{2+} , proteinquinasas, y fosfatasa (Trewavas y Malhó, 1997). Por otra parte, el calcio es un nutrimento esencial de las plantas necesario para la biosíntesis de las membranas y la matriz de la pared, que enlaza las cadenas de pectina para formar redes extensas de gel altamente hidratadas (White y Broadley, 2003). Las plántulas generadas a partir de las semillas que germinaron en la solución 10^{-3} M CaCl_2 mostraron tanto la tasa de germinación más rápida (T_{50}) como el mejor desarrollo (mayor acumulación de biomasa fresca y seca).

La mayor capacidad de germinación (87%) fue la registrada por las semillas expuestas a la solución de SA (81% más que las semillas correspondientes no tratadas) (Cuadro 3); sin embargo, se generaron plántulas anormales (6.9%). Hasta donde sabemos, este es el primer informe relativo a estas especies. El ácido salicílico, producto natural miembro de la familia fenólica que se biosintetiza en las plantas, interactúa de manera sinérgica y antagónica con otros compuestos en los procesos de regulación (Takayashi *et al.*, 1993; Mur *et al.*, 2005; Beckers y Spoel, 2006), mediante la activación de distintos componentes de las cascadas de transducción de la señal (Chen *et al.*, 2002) y la inducción de mecanismos de tolerancia al estrés en las plantas (Senaratna *et al.*, 2000). ASA y SSA, compuestos análogos de SA, también mejoraron la germinación; asimismo, promovieron el crecimiento de plántulas (Cuadro 3). Salazar y Carrillo-Castañeda (2001) demostraron que SSA induce *in vitro* el proceso de tuberización en *Solanum tuberosum*.

Se observó aceleración y estimulación de la germinación cuando las semillas se trataron en soluciones

Table 3. Seed germination, seedling growth, and biomass accumulation obtained from papaya seed previously chemoprimered in the solution indicated. (seedlings $n=30$, 14 d at 29 ± 3 °C under 16 h photoperiod).

Cuadro 3. Germinación de semillas, crecimiento de plántulas, y acumulación de biomasa obtenida a partir de semillas de papaya previamente precondicionadas con computos químicos en la solución indicada. (plántulas $n=30$, 14 d a 29 ± 3 °C bajo fotoperiodo de 16 h).

Treatment	Germination (%) ($n=25$)	Length (mm)		Biomass fresh weight (mg)			Biomass dry weight (mg)		
		Seedling	Root	Seedling	Stem	Root	Seedling	Stem	Root
Un-treated	48 c	105 b	86 b	890 a	420 a	460 a	68.9 a	47.8 a	21.1 a
SSA 10^{-4} M	81 b	113 a	95 a	890 a	410 a	470 a	60.1 ab	41.2 b	18.9 a
ASA 10^{-4} M	83 ab	112 a	94 a	1040 a	510 a	520 a	64.4 ab	42.4 b	22.0 a
SA 10^{-4} M	87 a	106 b	86 b	830 a	410 a	420 a	53.3 b	39.9 b	16.4 a
MSD	5.069%	0.5	0.4	0.2	0.1	0.1	9.6	5.2	7.2

SSA, Sulfosalicylic acid; ASA, Acetylsalicylic acid; SA, salicylic acid ♦ SSA, ácido sulfosalicílico; ASA, ácido acetilsalicílico; SA, ácido salicílico.

Seeds exposed to GA and 6-BAP exhibited poor positive effect on seed germination (25 and 17% more than control). Besides, the speed of germination (T_{50}) was improved by all solutions tested (Table 5). Bassel *et al.*, (2008) analyzed the transition from seed to seedling which is mediated by germination using a germination transcriptional program, considering that it is a complex process that starts with imbibitions and completes with radical emergence. Molecular mechanisms of gene regulation (Pinto *et al.*, 2007; Sreenivasulu *et al.*, 2008) determines the synthesis, transport, and signaling among hormones in which gibberellic acid, abscisic acid and complexes (the abscisic acid insensitive proteins, the gibberellin receptor GID1A, phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism (Sawada *et al.*, 2008) are involved. Ogawa *et al.* (2003) identified a number of transcripts, the abundance of which is modulated upon exposure to exogenous GA. Amaral da Silva *et al.* (2005) found that exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed

de: 10^{-4} M (58%); CaCl_2 , 10^{-5} M (54%); y de calcio en combinación con SA (54%); adicionalmente, las plántulas acumularon cantidades similares de biomasa (Cuadro 4). El efecto interactivo de calcio y SA produjo ($p \leq 0.05$, estadísticamente significativo) un incremento de 31% en la longitud del tallo al compararse con las semillas expuestas a la solución SA. No se generaron plántulas anormales en las semillas tratadas en la solución de calcio en combinación con SA.

En la transducción de la señal más temprana la alta concentración celular de SA causa generación de superóxidos, seguida de un incremento de calcio citosólico en el cultivo de células de tabaco en suspensión (Kawano *et al.*, 1998). Así, se sugiere la implicación del influjo de Ca^{2+} así como de la generación de especies activas del oxígeno (metabolitos de oxígeno parcialmente reducidos) como componentes de la ruta de señalización de SA.

Las semillas expuestas a GA y 6-BAP mostraron un ligero efecto positivo sobre la germinación de las semillas (25 y 17% más que el control); además, todas

Table 4. Seed germination, seedling growth, and biomass accumulation obtained from papaya seed previously chemoprimered in the solution indicated. (seedlings $n=30$, 14 d at $29 \pm 3^\circ\text{C}$ under 16 h photoperiod).

Cuadro 4. Germinación de semillas, crecimiento de plántulas, y acumulación de biomasa obtenida a partir de semillas de papaya previamente preacondicionada con compuestos químicos en la solución indicada. (plántulas $n=30$, 14 d a $29 \pm 3^\circ\text{C}$ bajo fotoperiodo de 16 h).

Treatment	Germination (%) ($n=25$)	Length (mm)			Biomass dry weight (mg)			T_{50} (d)
		Seedling	Stem	Root	Seedling	Stem	Root	
Un-treated	32 b	1030 a	630 a	400 a	68.7 a	24.1 a	47.3 a	5
SA 10^{-4} M	58 a	560 b	320 c	230 b	56.9 a	21.2 a	35.6 a	4
CaCl_2 10^{-5} M	55 a	600 b	350 bc	240 b	52.7 a	19.5 a	33.1 a	4
SA 10^{-4} M plus CaCl_2 10^{-5} M	54 a	760 b	420 b	340 ab	62.5 a	25.8 a	36.6 a	4
MSD	13.1	0.2	0.1	0.1	28.1	15.9	8.8	

SA, salicylic acid; CaCl_2 , calcium chloride ♦ SA, ácido salicílico; CaCl_2 ; cloruro de calcio.

Table 5. Seed germination, seedling growth, and biomass accumulation obtained from papaya seed previously chemoprimered in the solution indicated. (seedlings $n=30$, 14 d at $29 \pm 3^\circ\text{C}$ under 16 h photoperiod).

Cuadro 5. Germinación de semillas, crecimiento de plántulas, y acumulación de biomasa obtenida a partir de semillas de papaya previamente preacondicionadas con compuestos químicos en la solución indicada. (plántulas $n=30$, 14 d a $29 \pm 3^\circ\text{C}$ bajo fotoperiodo de 16 h).

Treatment	Germination (%) ($n=25$)	Fresh weight (mg)			Dry weight (mg)			T_{50} (d)
		Seedling	Stem	Root	Seedling	Stem	Root	
Un-treated	52.0 b	570 a	400 b	160 a	50.9 a	37.6 b	13.2 b	6
AG_3 10^{-5} M	65.3 a	680 a	430 b	240 a	58.7 a	39.8 ab	18.8 ab	4
6 BAP 10^{-5} M	60.9 a	850 a	650 a	200 a	60.8 a	50.9 a	13.2 b	4
ABA 10^{-5} M	47.5 b	580 a	320 b	250 a	57.1 a	39.5 b	17.5 a	4
DMS	7.0	0.3	0.2	0.1	13.3	11.1	4.2	

AG_3 , gibberellic acid; 6 BAP, 6-Bencylaminopurine, ABA, abscisic acid ♦ AG_3 , ácido giberélico; 6 BAP, 6-Bencylaminopurina; ABA, ácido abscísico.

germination, which is uncommon. In general, gibberellic acid increased the percentage and rate of seed germination in all cultivars and in the case of papaya, Bhattacharya and Khuspe (2001) demonstrated that gibberellic acid improved seed germination in all cultivars tested.

The potential performance of seeds during seed germination and development can be different among lots of seeds according to their physiological quality or deterioration condition, and their ability to withstand a wide variety of experimental conditions (Sung *et al.*, 2008).

Germination was promoted by all the commercial products tested; however, Agromil S® and Biozyme pp® promoted the maxima germination (73 and 70% more than the corresponding untreated seeds). All of them caused reduction by 48 h of T_{50} (Table 6); but, it is important to recall that the hydroprimed seed germinated 250% more than the corresponding untreated seeds (Table 1).

CONCLUSIONS

Applying our hydropriming technique, the papaya seed germination performance is significantly restored. Conceptually simple, it is based on essential variables involved in the seed functions. It is economical and technically practical. In addition, valuable information was considered concerning seed expressions that take place beyond the germination process, the early seedling development. How the seed expressions can be enhanced by inorganic and organic chemical compounds was shown. It is possible that our procedures could become techniques performed to satisfy the needs of both seed producers and farmers that demand the guaranty to acquire high quality papaya seed.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank La Semilla del Caribe seed dealers for the papaya seed donated for the development of this research.

las soluciones evaluadas generaron un incremento en la velocidad de germinación (T_{50}) (Cuadro 5). Bassel *et al.*, (2008) analizaron la transición de la semilla a la plántula, la cual es inducida por la germinación mediante el uso de un programa transcripcional de germinación, toda vez que se trata de un proceso complejo que se inicia con la imhibición y culmina con emergencia radicular. Los mecanismos moleculares de regulación génica (Pino *et al.*, 2007; Sreenivasulu *et al.*, 2008) determinan la síntesis, transporte y señalización entre hormonas en los que están implicados el ácido giberélico, el ácido abscísico y sus complejos (proteínas insensibles al ácido abscísico, receptor de giberelinas GID1 A, fitocromo- y la regulación del metabolismo del ácido abscísico medrada por giberilinals. Ogawa *et al.* (2003) identificaron varias transcripciones, de las cuales una gran cantidad se modifica al contacto con AG exógeno. Amaral da Silva *et al.* (2005) observaron que las giberelinas inhibieron la germinación de la semilla de café (*Coffea arabica* cv. *Rubi*), que es poco común. Generalmente, el ácido giberélico incrementó el porcentaje y la tasa de germinación en todos los cultivos y Bhattacharya and Khuspe (2001) demostraron que el ácido giberélico mejoró la capacidad de germinación de las semillas de todos los cultivos de papaya evaluados.

El desempeño potencial de las semillas durante su etapa de germinación y desarrollo puede variar entre los lotes de semillas en función de su calidad fisiológica o de su grado de deterioro, así como de su capacidad para soportar una gran variedad de condiciones experimentales (Sung *et al.*, 2008).

Todos los compuestos estimuladores comerciales de la germinación evaluados estimularon la germinación; sin embargo, la mayor se obtuvo con Agromil S® y Biozyme PP® (73 y 70% más que la obtenida en las semillas no tratadas). Todos causaron reducción alrededor de las 48 h de T_{50} (Cuadro 6); no obstante, cabe destacar que las semillas preacondicionadas con agua germinaron 250% más que aquellas que no se sometieron a tratamiento (Cuadro 1).

Table 6. Seed germination, seedling growth, and biomass accumulation obtained from papaya seed previously chemoprimered in the solution of commercial germination enhancer indicated. (seedlings n=30, 14 d at $29\pm3^{\circ}\text{C}$ under 16 h photoperiod).

Cuadro 6. Germinación de semillas, crecimiento de plántulas, y acumulación de biomasa obtenida a partir de semillas de papaya previamente preacondicionadas con compuestos químicos en la solución indicada del potenciador comercial de germinación.

Treatment	Germination (%) (n=25)	Length (mm)		Fresh weight (mg)			Dry weight (mg)			T_{50} (d)
		Stem	Root	Seedling	Stem	Root	Seedling	Stem	Root	
Un-treated	33 b	2.2 a	1.4 a	690 a	520 a	160 a	72.4 a	67.1 a	7.2 a	5
Agromil S	57 a	2.0 b	0.9 a	550 b	460 a	80 b	71.6 a	65.4 a	6.2 a	3
Biozyme PP	56 a	2.0 b	0.9 a	560 b	470 a	90 b	68.7 a	61.2 a	7.5 a	3
Germiboost	47 a	2.0 b	1.6 a	550 b	460 a	90 b	69.5 a	63.0 a	6.4 a	3
DMS	3.110%	0.2	1.2	0.1	0.1	0.1	9.8	6.7	3.5	

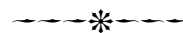
LITERATURE CITED

- Amaral da Silva, E. A., P. E. Toorop, J. Nijse, J. D. Bewley, and H. W. M. Hilhorst. 2005. Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in embryo. *J. Exp. Bot.* 56(413): 1029-1038.
- Artola, A., G. Carrillo-Castañeda, and G. García de los Santos. 2003. Hydropriming: a strategy to increase *Lotus corniculatus* L. seed vigor. *Seed Sci. Technol.* 31: 455-463.
- Bassel, G. W., P. Fung, T. F. Chow, J. A. Foong, N. J. Provart, and S. R. Cutler. 2008. Elucidating the germination transcriptional program using small molecules. *Plant Physiol.* 147:143-155.
- Bhattacharya, J., and S. S. Khuspe. 2001. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. *Sci. Horticul.* 91 (1-2): 39-49.
- Beckers, G. J. M., and S. H. Spoel. 2006. Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate. *Plant Biol.* 8 (1): 1-10.
- Burton, M. G., M. J. Lauer, and M. B. McDonald. 2000. Calcium effects on soybean seed production, elemental concentration, and seed quality. *Crop Sci.* 40: 476-482.
- Carrillo-Castañeda, G., J. M. Juárez, J. R. Peralta-Videa, E. Gomez, and J. L. Gardea-Torresdey. 2003. Plant growth-promotion bacteria promote copper and iron translocation from root to shoot in alfalfa seedlings. *J. Plant Nutr.* 26(9): 1801-1814.
- Chen, H. J., W. C. Hou, J. Kucap, and Y. H. Lin. 2002. Salicylic acid mediates alternative signal transduction pathways for pathogenesis-related acidic β -1,3-glucanase (protein N) induction in tobacco cell suspension culture. *J. Plant Physiol.* 159 (4): 331-337.
- Heydecker, W., and P. Coolbear. 1977. Seed treatments for improved performance-survey and attempted prognosis. *Seed Sci. Technol.* 5: 353-425.
- Kawano, T., N. Sahashi, K. Takahashi, N. Uozumi, and S. Muto. 1998. Salicylic acid induced intracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco cell suspension culture: The earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol.* 39: 721-730.
- Leubner-Metzger, G. 2005. β -1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *Plant J.* 41: 133-145.
- Manz, B., K. Müller, B. Kucera, F. Volke, and G. Leubner-Metzger. 2005. Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated *in vivo* by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiol.* 138: 1538-1551.
- Mao, Y., and U. Zentgraf. 2007. The antagonistic function of *Arabidopsis* WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium. *The Plant Cell* 19:819-830.
- Marcos, L. H., and S. C. Maleus. 2008. Efeitos da giberelina e da secagem no condicionamento osmótico sobre a viabilidade e o vigor de sementes de mamão (*Carica papaya* L.). *Rev. Brasileira Sementes* 30(1): 181-189.
- Mehra, V., J. Tripathi, and A. A. Powell. 2003. Aerated hydration treatments improve the response of *Brassica juncea* and *Brassica campestris* seeds to stress during germination. *Seed Sci. Technol.* 31 (1): 57-70.
- Morohashi, Y., and M. Shimokoriyama. 1972. Physiological studies on germination of *Phaseolus mungo* seeds. II. Glucose and organic-acid metabolisms in the early phases of germination. *J. Exp. Bot.* 23: 54-61.
- Mur, L. A. J., P. Kenton, R. Atzorn, O. Miersch, and C. Wasternack. 2005. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* 140: 249-262.

CONCLUSIONES

Al aplicar nuestra tecnología de precondicionamiento hídrico, la capacidad de germinación de la semilla de papaya se restablece significativamente. Sencilla conceptualmente, se basa en factores esenciales implicados en las funciones de la semilla. Es práctica tanto en su aspecto económico como en el técnico. Asimismo, se tomó en cuenta información valiosa relativa a las expresiones de las semillas, la cual ocurre fuera del proceso de germinación, como el desarrollo temprano de plántulas. Se mostró de qué manera los compuestos químicos orgánicos e inorgánicos pueden mejorar las expresiones de la semilla. Probablemente nuestros procedimientos lleguen a convertirse en tecnologías destinadas a satisfacer las necesidades de los productores de semilla y de los agricultores que buscan asegurar la adquisición de semillas de papaya de alta calidad.

—Fin de la versión en español—



- Ogawa, M., A. Hanada, Y. Yamauchi, A. Kuwahara, Y. Kamiya, and S. Yamaguchi. 2003. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Cell.* 15: 1591-1604.
- Paz, L., and Y. C. Vázquez. 1998. Comparative seed ecophysiology of wild and cultivated *Carica papaya* trees from a tropical rain forest region in Mexico. *Tree Physiol.* 18: 277-280.
- Pinto, L. V. A., E. A. A. Da Silva, A. C. Davide, V. A. Mendes De Jesus, P. E. Toorop, and H. W. M. Hilhorst. 2007. Mechanism and control of *Solanum lycocarpum* seed germination. *Ann. Bot.* 100(6):1175-1187.
- Reazeau, C., and G. Cavalié. 1997. Changes in RNA and protein metabolism associated with alterations in the germination efficiency in sunflowers seeds. *Ann. Bot.* 80: 131-137.
- Sawada, Y., M. Aoki, K. Nakaminami, W. Mitsuhashi, K. Tatamatsu, T. Kushi, T. Koshi, Y. Kamiya, Y. Inoue, E. Nambara, and T. Toyomasu. 2008. Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol.* 146: 1386-1396.
- Salazar, L. M. E., and G. Carrillo-Castañeda. 2001. Evaluación de los ácidos: salicílico, acetilsalicílico y sulfosalicílico en diferentes fenómenos biológicos en vitroplantas de (*Solanum tuberosum* L.). *Rev. Ciencias Agrícolas* 13: 22-25.
- Sreenivasulu, N., B. Usadel, A. Winter, V. Radchuk, U. Scholz, N. Stein, W. Weschke, M. Strickert, T. J. Close, M. Stitt, A. Graner, and U. Wobus. 2008. Barley grain maturation and germination: Metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiol.* 146:1738-1758.
- Subedi, K. D., and B. L. Ma. 2005. Seed Priming does not improve corn yield in a humid temperate environment. *Agron. J.* 97:211-218.
- Sung, Y., D. J. R. Cantliffe, T. Nagata, and W. M. Nascimento. 2008. Structural changes in lettuce seed during germination at high temperature altered by genotype, seed maturation temperature, and seed priming. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133: 167-311.

- Takahashi, Y., S. Ishida, and T. Nagata. 1993. Functions and modulations of auxin-regulated genes. *J. Plant Res.* 106: 357-367.
- Trewavas, A. J., and R. Mahló. 1997. Signal perception and transduction: The origin of the phenotype. *Plant Cell* 9: 1181-1197.
- Vargas, G. A. B. 1996. El Agroecosistema Papayo en la Parte Central de Veracruz: Limitantes y Perspectivas. Instituto de Recursos Naturales Campus Veracruz, Colegio de Postgraduados. Altamirano, Veracruz, Méx., pp: 120-124.
- Welbaum, E. G., Z. Shen, M. O. Olouch, and L. W. Jett. 1998. The evolution and effects of priming vegetable seeds. *Seed Technol.* 20 (2): 209-235.
- White, P. J., and M. R. Broadley. 2003. Calcium in plants. *Ann. Bot.* 92: 487-511.
- Wood, C. B., H. W. Pritchard, and D. Amritphale. 2000. Desiccation-induced dormancy in papaya (*Carica papaya* L.) is alleviated by heat shock. *Seed Sci. Res.* 10: 135-145.