

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



“PRUEBA DE TETRAZOLIO EN SEMILLAS DE ESPÁRRAGO  
(*Asparagus officinalis* L.)”

Presentado por:

CINTHIA BELINDA VALDIVIA TRUJILLO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
**INGENIERO AGRÓNOMO**

**Lima – Perú**

**2015**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**“PRUEBA DE TETRAZOLIO EN SEMILLAS DE ESPÁRRAGO  
(*Asparagus officinalis* L.)”**

Presentado por:

**CINTHIA BELINDA VALDIVIA TRUJILLO**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

.....  
Ing. Mg. Sc. Luis Beingolea Peña  
**PRESIDENTE**

.....  
Ing. Mg. Sc. Cecilia Figueroa Serrudo  
**PATROCINADORA**

.....  
Ing. José Palacios Vallejo  
**MIEMBRO**

.....  
Ing. Saray Siura Céspedes  
**MIEMBRO**

A mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación  
siendo mi apoyo en todo momento. Es por ellos que soy lo que soy ahora.  
Los amo con todo mi corazón.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mis padres Jorge Valdivia Córdova y Magnolia Trujillo García, pilares fundamentales en mi vida, quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, creyeron en mí en todo momento y no dudaron de mis habilidades.

A mi patrocinadora, Ing. Cecilia Figueroa Serrudo, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación fue de gran ayuda para realizar el presente trabajo de tesis.

A mi co- patrocinadora, Mg. Sc. Mercedes Flores Pimentel, que dedico su tiempo a ayudarme y compartir sus conocimientos durante el desarrollo de esta investigación.

Al Ing. M. S. Andrés Casas Días por haberme donado las semillas de manera desinteresada y quién siempre estuvo disponible para cualquier consulta.

A mis hermanos, Héctor y Brenda, por ser mi compañía, mi apoyo y mi fuerza para seguir adelante.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones. Para ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.

## INDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	Objetivos	1
1.1.1	Objetivo general	1
1.1.2	Objetivos específicos	1
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
2.1	Taxonomía	2
2.1.1	Clasificación taxonómica	3
2.2	Distribución del género <i>Asparagus</i>	3
2.3	Familia <i>Asparagaceae</i>	4
2.4	Descripción morfológica de la semilla de espárrago	5
2.5	Latencia	6
2.6	Viabilidad	7
2.6.1	Prueba con tetrazolio	8
2.7	Germinación	9
2.7.1	Factores que intervienen en la germinación	9
2.7.1.1	Factores externos	9
2.7.1.2	Factores internos	13
2.7.2	Tipos de germinación	17
2.7.3	Estructuras esenciales de las plántulas	19
2.7.4	Desarrollo de las plántulas del género <i>Asparagus</i>	21
2.7.4.1	Ensayo de germinación en el laboratorio	21
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1	Lugares de ejecución de los ensayos	25
3.2	Materiales	25
3.3	Equipos	26

3.4	Metodología	26
3.4.1	Muestra de trabajo	26
3.4.2	Estudio morfológico	26
3.4.3	Ensayo de germinación	28
3.4.4	Ensayo de viabilidad	29
3.5	Diseño experimental	31
3.5.1	Ensayo de viabilidad	31
3.6	Parámetros evaluados	32
3.6.1	Ensayo de germinación	32
3.6.2	Ensayo de viabilidad	32
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
4.1	Características morfológicas	33
4.2	Proceso de germinación de las semillas	36
4.3	Ensayo de germinación	38
4.4	Ensayo de viabilidad	44
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>53</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>59</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Porcentaje de plántulas y semillas por repetición y total	40
Tabla2: Porcentaje de semillas viables	46
Tabla 3: Porcentaje de semillas no viables	46
Tabla 4: Análisis ANVA para semillas viables	47
Tabla 5: Análisis ANVA para semillas no viables	47
Tabla 6: Prueba Tukey para el factor H de semillas viables	48
Tabla 7: Prueba Tukey para el factor T de semillas viables	49
Tabla 8: Prueba Tukey para el factor I de semillas viables	50

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Proceso de fecundación en la formación de semillas	2
Figura 2: Semilla de espárrago	6
Figura 3: Curva del proceso de absorción de agua	11
Figura 4: Niveles relativos de ABA y contenido hídrico durante el desarrollo de la semilla	16
Figura 5: Germinación hipogea	18
Figura 6: Germinación epigea	19
Figura 7: Estructuras esenciales de una plántula de dicotiledónea	20
Figura 8: Estructuras esenciales de una plántula de monocotiledónea	20
Figura 9: Esquema del corte longitudinal para semillas de espárrago	27
Figura 10: Cámara de germinación	28
Figura 11: Cámara de germinación con luz artificial	29
Figura 12: Estufa	30
Figura 13: a) SP: Sobre papel, b) EP: Entre papel, c) A: Agua	31
Figura 14: a) Óvulo anátropo, b) Semilla de <i>Asparagus officinalis</i> , con vista en posición de un óvulo anátropo	34
Figura 15: Vista del funículo en las semillas de <i>Asparagus officinalis</i>	34
Figura 16: a) Semilla de forma achatada, b) Semilla de forma redonda	35
Figura 17: a) Semilla entera con testa y sin lugol que muestra el corte longitudinal, b) Semilla entera sin testa y con lugol que muestra el corte longitudinal, c) Semilla sin lugol y cortada longitudinalmente, d) Semilla con lugol y cortada longitudinalmente	35
Figura 18: Proceso de germinación de <i>Asparagus officinalis</i>	36
Figura 19: Partes de la plántula de <i>Asparagus officinalis</i>	38
Figura 20: Porcentaje de plántulas y semillas por repetición	39
Figura 21: Porcentaje total de plántulas y semillas	39
Figura 22: Plántula normal totalmente sana de <i>Asparagus officinalis</i>	41
Figura 23: Plántula normal con ligera zona necrótica de <i>Asparagus officinalis</i>	41
Figura 24: Plántulas anormales	42

Figura 25: Diferencia de tamaño entre una semilla dura y fresca	43
Figura 26: Semillas muertas	44
Figura 27: Semillas viables	45
Figura 28: Semillas no viables	45
Figura 29: Media de los niveles del factor H de semillas viables en la prueba Tukey	48
Figura 30: Media de los niveles del factor T de semillas viables en la prueba Tukey	49
Figura 31: Media de los niveles del factor I de semillas viables en la prueba Tukey	50

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Medidas de las semillas y del embrión de <i>Asparagus officinalis</i>	59
Anexo 2: Procedimiento ANVA de la prueba de tetrazolio en semillas de <i>Asparagus officinalis</i>	60
Anexo 3: Variable dependiente: Viable	60
Anexo 4: Variable dependiente: No viable	61
Anexo 5: Prueba Tukey para semillas viables	62
Anexo 6: Factor H	62
Anexo 7: Factor T	62
Anexo 8: Factor I	63
Anexo 9: Prueba Tukey para semillas no viables	63
Anexo 10: Factor H	63
Anexo 11: Factor T	64
Anexo 12: Factor I	64

## RESUMEN

La producción de espárrago en el Perú se realiza durante todo el año, es por eso que se ha convertido en uno de los principales productos de exportación en nuestro país, siendo el primero al nivel mundial. En este sentido, la gran demanda de semilla de calidad por parte de las empresas exportadoras de espárrago exige trabajar una propuesta para reducir el tiempo del análisis. Por este motivo, el objetivo del presente estudio fue determinar la metodología estandarizada para realizar la prueba de tetrazolio en semillas de espárrago, así como también la descripción morfológica y la prueba de germinación como estudios complementarios para conocer más a fondo las semillas de *Asparagus officinalis*.

Se analizaron 140 semillas para la descripción morfológica, estructura interna y descripción del proceso de germinación, 400 semillas para el ensayo de germinación, usándose como sustrato papel toalla, con temperaturas alternas de 20°C durante 18 horas y 30°C durante 6 horas, se mantuvo húmedo durante los 28 días que duró el ensayo. Para el ensayo de viabilidad se utilizaron 1200 semillas analizados en un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3x2x2, con el respectivo análisis de varianza (ANVA) y para la comparación de medias se empleó la prueba de Tukey al 0.05. Los factores fueron tres: forma de la humidificación (H), tiempo de humidificación (T) y tiempo de inmersión en tetrazolio (I), cada uno con su respectivo nivel.

La semilla de *Asparagus officinalis* es completa, tienen dos tipos de forma, achatada y redonda y su tamaño promedio es de 3.8 mm de largo, 3.2 mm de ancho y 2.6 mm de espesor, el endospermo es córneo y en la parte central se encuentra el embrión que mide en promedio 3.5 mm. Tiene una germinación hipogea, iniciándose la germinación en promedio al séptimo día. En el ensayo de viabilidad estadísticamente los factores principales H (forma de humidificación) y T (tiempo de humidificación) son altamente significativos, siendo los mejores niveles A (remojo en agua) y 48 (horas de humidificación), respectivamente, y para el factor I (tiempo de inmersión en tetrazolio) por cuestiones prácticas se recomienda utilizar el nivel 24 horas.

**Palabras clave:** *Asparagus officinalis*, viabilidad, cloruro de tetrazolio, germinación, morfología.

## **I. INTRODUCCIÓN**

El Perú es el primer exportador mundial de espárragos, con una participación que bordea el 20% del mercado mundial. El sector agroexportador genera al país más de US\$ 1000 millones anuales, del cual le corresponde al espárrago el 21%, por eso viene a ser uno de los principales productos de exportación en nuestro país. El área total cultivada de espárrago en el Perú es de 27,000 Ha (IICA, 2010). La producción nacional del espárrago en enero del 2013 alcanzó 28.5 miles de TM. Las ventas externas, en ese mes, en todas sus presentaciones (fresco, congelado y preparado) alcanzó US\$ 34,0 millones, evidenciando un incremento de 14,9%, respecto a enero 2012, siendo los principales países de mayor demanda Estados Unidos de América, Reino Unido y España (INEI, 2013).

La gran demanda de semilla de calidad por parte de las empresas exportadoras de espárrago exige trabajar una propuesta para reducir el tiempo del análisis, si lo comparamos con la prueba de germinación para la misma especie. Por este motivo, en el ámbito del análisis de calidad de la semilla no existe una metodología estandarizada para la prueba de tetrazolio, esto es, el pre tratamiento y la tinción del espárrago; prueba que resulta más rápida para conocer la viabilidad de la semilla.

### **1.2 OBJETIVOS**

#### **1.2.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la metodología estandarizada para realizar la prueba de tetrazolio en semillas de espárrago.

#### **1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Describir la morfología de la semilla de espárrago.
- Determinar el tipo de pre tratamiento de la semilla previo a la tinción.
- Comparar el porcentaje de viabilidad de la semilla con el porcentaje de germinación.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

## 2.1 TAXONOMÍA

El espárrago, *Asparagus officinalis* L. es una Angiosperma monocotiledónea que pertenece a la familia Asparagaceae y al género *Asparagus*. Por ser una angiosperma, los óvulos se encuentran encerrados dentro del ovario, tienen flores como elementos reproductivos y presentan doble fecundación, una que dará origen al embrión y otra al endosperma; las semillas permanecen dentro del fruto hasta estar completamente maduras. Por ser monocotiledónea, estas plantas se caracterizan por tener un solo cotiledón y endosperma muy desarrollado, donde se encuentran acumuladas las sustancias de reserva que servirán para el desarrollo inicial del embrión (Delgado de la Flor et al., 1994).

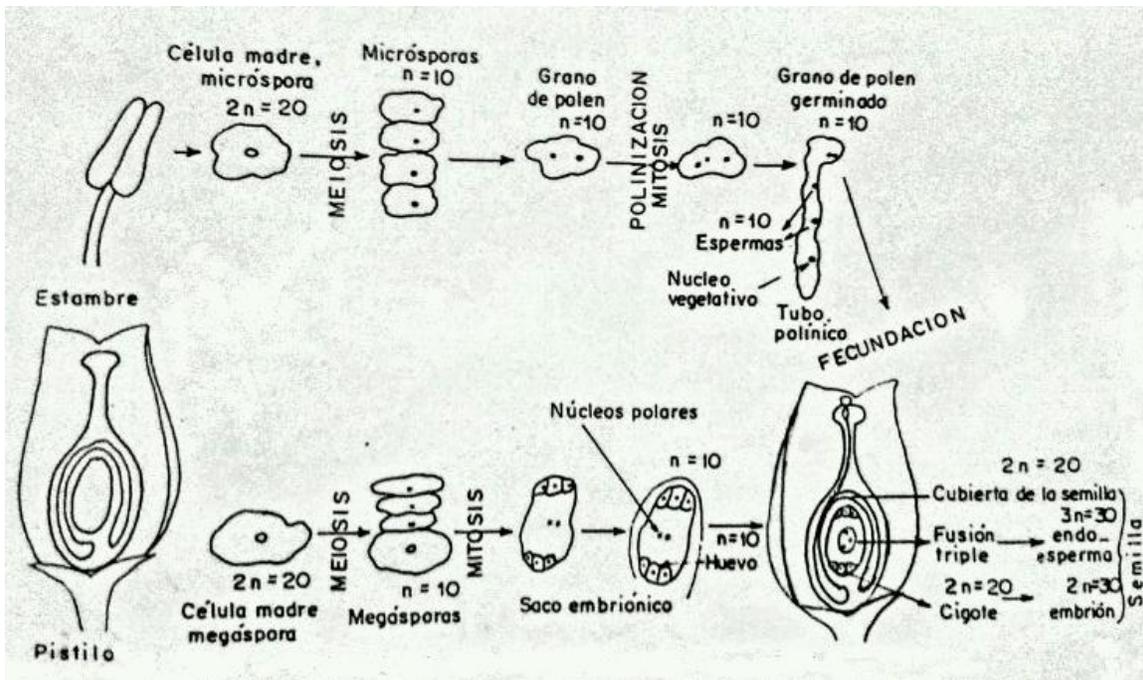


Figura 1: Proceso de fecundación en la formación de semillas (Delgado de la Flor et al., 1994).

### 2.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según Stevens (2001):

Reino	: Plantae
Clado	: Angiospermas
Clado	: Monocotiledoneas
Orden	: Asparagales
Familia	: Asparagaceae
Subfamilia	: Asparagoideae
Género	: <i>Asparagus</i>
Especie	: <i>Asparagus officinalis</i>

## **2.2 DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO ASPARAGUS**

El género *Asparagus* es una planta originaria de la cuenca del Mediterráneo habiéndose desarrollado en márgenes de ríos y playas costeras (Rivera y Rodríguez, 1999).

Los griegos, de cuya lengua deriva el nombre *Asparagus*, cultivaban esta especie como una hortaliza de lujo, al menos 200 años AC. Hasta el día de hoy, los países mediterráneos como España, Francia e Italia, son importantes productores y desde ahí el cultivo se ha extendido, principalmente, a otros países de climas templados o cálidos, aunque en todos ellos la superficie cultivada es más bien baja. Los principales centros de creación de cultivares se han concentrado en Europa (Alemania, España, Francia e Italia) y América (Canadá y Estados Unidos) con objetivos iniciales un tanto distintos: Europa enfocada a la obtención de espárragos blancos y América a espárragos verdes. Hoy día esto es menos marcado, existiendo una tendencia general a espárragos verdes y, además, surgen nuevos centros de mejoramiento como Nueva Zelandia y Taiwan. Los principales productores en la actualidad son Estados Unidos, España y Perú (Pontificia Universidad Católica de Chile, s.f.).

## **2.8 FAMILIA ASPARAGACEAE**

Las Asparagaceas tienen un solo género (aunque algunos lo dividen en tres), y alrededor de 370 especies repartidas por las zonas subtropicales y templadas (López, 2007). Son plantas perennes, rizomatosas, leñosas, a veces trepadoras, más raramente herbáceas, generalmente espinosas, lampiñas o casi. Tienen un rizoma horizontal, con hacecillos de fibras engrosadas, blanquecinas. Los tallos son muy ramosos, generalmente erguidos; cuando trepan, se enroscan en dirección contraria a las agujas del reloj. Las hojas son simples, sin estípulas, y están reducidas a escamas alternas, escariosas, más o menos envainadoras, que se prolongan a menudo en la base por un espolón espinoso, de cuya axila nacen falsas hojas (en realidad son ramillas acortadas que se denominan cladodios o filóclados), solitarias o agrupadas en hacecillos, lineares, raramente ovado-lanceoladas, herbáceas o correosas, caducas o persistentes, a veces espinescentes. Las flores son hermafroditas o más frecuentemente unisexuales, regulares (de simetría radial), a menudo cabizbajas, generalmente menuditas, blancas, verdosas o amarillentas; tienen un pedúnculo fino, articulado, generalmente provistos de bracteíllas en la base; pueden ir solitarias, geminadas o en ramilletes (cimas), que a menudo semejan umbelas o racimos, generalmente en la axila de las hojas. El perianto es acampanado o casi estrellado, caduco, formado por dos verticilos de 3 piezas libres o unidas en la base, sepaloideas o petaloideas, casi iguales, generalmente elípticas o lanceoladas, a veces algo mayores en las flores masculinas. Las flores masculinas tienen 6 estambres libres, en dos verticilos de a 3, de filamentos relativamente cortos, insertos en la base de las piezas del perianto y generalmente más corto que ellas. Las flores femeninas van generalmente en distinto pie de planta, y tienen un pistilo formado por 3 hojas carpelares soldadas, un ovario súpero, con 3 cavidades, cada una de ellas con dos o varios rudimentos seminales; el estilo es terminal, fino, y remata en un estigma con tres lóbulos; llevan a veces estambres funcionalmente estériles (estaminodios), y segregan néctar mediante glándulas (nectarios) que tienen en los tabiques del ovario. Las flores hermafroditas (por ejemplo, en *Asparagus albus*) son similares a las otras, pero con estambres y pistilo fértiles. El fruto es carnoso (en baya), del tamaño de un guisante, globoso, negro (a veces con una cubierta blanco-azulada) o rojo. Las semillas, trígonas o redondeadas, 1-2 por cavidad del fruto (hasta 6 en total) (López, 2007).

## 2.9 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA SEMILLA DE ESPÁRRAGO

En la familia Asparagaceae, sub familia Asparagoideae, la semilla surge de óvulos anátropos, normalmente de dos óvulos siendo soportados en cada uno de los tres lóculos del ovario (Robbins y Borthwick, 1925). Un óvulo anátropo es cuando el cuerpo del óvulo se incurva 180°, de modo que el funículo se alarga, se suelda sobre un lado de la nucela constituyendo la rafe, y la cálaza queda en posición opuesta al hilo y al micrópilo. Son los óvulos más frecuentes en las angiospermas (Guimarães, 1981). Su testa es multiplicable, colapsando, exotesta masiva, tegmen inconspicuo (Stevens, 2001); su color es negro, finamente rugosa, y un tanto frágil (Robbins y Borthwick, 1925), mide de 3 a 4 mm de diámetro (Cantos, 2003). Las células del endospermo son de paredes gruesas, porosas, n= 56, cromosomas de 1 a 3 micrómetros de longitud (Stevens, 2001).

El embrión es la parte más pequeña de la semilla, de estructura simple o algo curvada (Montes, 1977); es una estructura esbelta, filiforme completamente incrustada en el disco, endospermo córneo (Robbins y Borthwick, 1925). En un extremo presenta la zona radicular la cual muestra como una ligera depresión, en la base de la cual se encuentra el punto de crecimiento. El resto del embrión, y desde luego la mayor parte, viene a constituir el cotiledón, el cual permanece en contacto con el endospermo durante los estados tempranos de la germinación absorbiendo alimento del endospermo, abasteciendo el embrión en las zonas de crecimiento. El embrión está completamente rodeado por el endospermo (Fig. 2). Existen dos clases principales de alimento almacenado en el endospermo. Estos son hemicelulosa que se almacena en las paredes de la célula mientras que la grasa se localiza en las cavidades celulares (Montes, 1977).

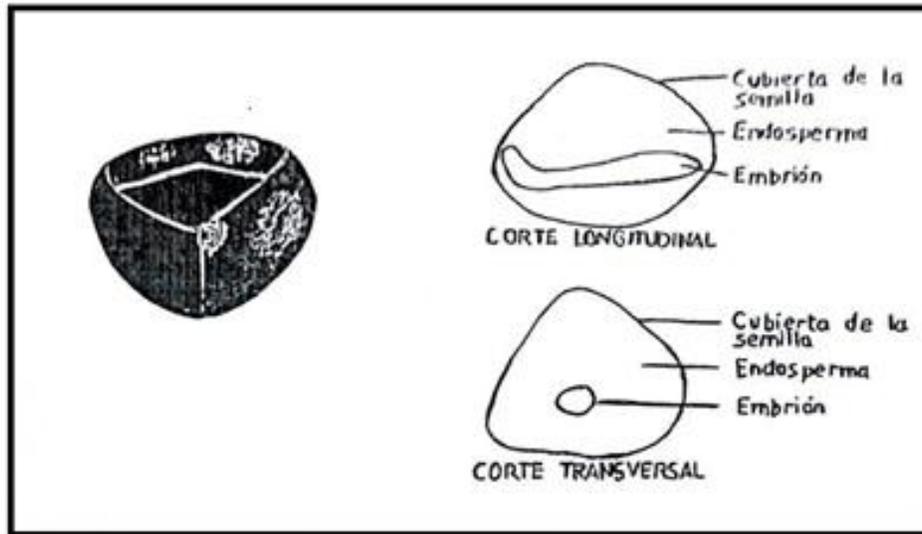


Figura 2: Semilla de espárrago (Regalado, 1992).

Existen 2 formas de semillas. Si dos óvulos desarrollan en una sola cavidad de la baya las superficies que entran en contacto llegarán a achatarse debido a la presión mutua. Sin embargo, si un óvulo individual desarrolla en la cavidad, su forma será completamente redondeada. No existe razón para creer que cualquiera de estos 2 tipos sea superior al otro (Montes, 1977).

## 2.10 LATENCIA

El estado de *dormición, latencia o letargo* es definido como la incapacidad de una semilla intacta y viable, de germinar bajo condiciones de temperatura, humedad y concentración de gases que serían adecuadas para la germinación (Varela y Arana, 2011). En estas semillas se manifiesta una baja capacidad y/o velocidad germinativa, en amplios intervalos de un entorno positivo para el crecimiento vegetal (Camacho, 2011). En particular, en el sector forestal se utiliza la palabra *latencia*, la cual proviene del latín “latensis” y significa oculto, escondido o aparentemente inactivo para referirse a esta incapacidad de la semilla a germinar, la cual puede constituir un problema por ejemplo para los programas de producción de plántulas en vivero. La latencia se establece durante la formación de la semilla, y posee una importante función que consiste en restringir la germinación en la planta madre antes de su dispersión en el campo. Además, se considera que la latencia es una adaptación

que contribuye a la supervivencia del individuo, ya que restringe la germinación cuando los factores ambientales son desfavorables para el desarrollo de la plántula. Es importante destacar que existe un amplio rango de intensidades de latencia, que va desde la latencia absoluta, en la cual la germinación no se produce bajo ninguna condición, pasando por intensidades intermedias, donde las semillas pueden germinar en un rango de condiciones ambientales estrecho (por ejemplo cuando se incuban a cierta temperatura), hasta el extremo donde no hay latencia, y las semillas pueden germinar en un amplio rango de condiciones ambientales. Es necesario tener en cuenta que la latencia es un proceso dinámico (Varela y Arana, 2011).

Se cree que la latencia del embrión es debida a la presencia de inhibidores, especialmente *ácido abscísico* (ABA), así como a la ausencia de promotores de crecimiento, como ácido giberélico (GA). La pérdida de la latencia del embrión suele estar asociada al brusco descenso de la relación entre ABA y GA (Taiz y Zeiger, 2006).

## 2.11 VIABILIDAD

La viabilidad de las semillas es el período de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar. Es un período variable y depende del tipo de semillas y de las condiciones de almacenamiento. Atendiendo a la longevidad de las semillas, es decir, el tiempo que las semillas permanecen viables, pueden haber semillas que germinan, todavía, después de decenas o centenas de años; se da en semillas con una cubierta seminal dura como las leguminosas. El caso más extremo de retención de viabilidad es el de las semillas de *Nelumbo nucifera* encontradas en Manchuria con una antigüedad de unos 250 a 400 años. En el extremo opuesto tenemos las que no sobreviven más que algunos días o meses, como es el caso de las semillas de arce (*Acer*), sauces (*Salix*) y chopos (*Populus*) que pierden su viabilidad en unas semanas; o los olmos (*Ulmus*) que permanecen viables 6 meses (García et al., 2006).

### 2.11.1 PRUEBA CON TETRAZOLIO

Peretti (1994) menciona que la prueba de tetrazolio es un análisis bioquímico que permite determinar en forma rápida la viabilidad de las semillas y da una referencia de su poder germinativo. Es particularmente útil en simientes dormidas o lentas en germinar. El cloruro o bromuro de tetrazolio es usado como un indicador de las reacciones de óxido-reducción que tienen lugar en las células que respiran, poniendo de manifiesto la actividad metabólica propia de las células vivas. Esta sal, soluble en agua e incolora, es absorbida por las semillas; al penetrar en las células reaccionan con las enzimas de la respiración y se transforman en un compuesto rojo (formazán) insoluble en agua, estable y no difusible, que permanece en las células donde se formó. Por lo tanto el uso de este reactivo permite distinguir las células vivas del embrión que se colorean de rojo, de las células muertas que permanecen incoloras y de las células que respiran débilmente o enfermas, que se colorean de rosado.

La viabilidad de cada semilla se determina por comparación de su coloración con un patrón de tinción, considerando los siguientes aspectos:

- Tamaño de la región coloreada.
- Intensidad de la coloración.
- Presencia o ausencia de manchas irregularmente distribuidas.

Peretti (1994) también menciona que la intensidad de la coloración depende de cuán activa es la solución preparada y de la tasa de liberación de iones hidrógeno por las enzimas deshidrogenasas que intervienen en la respiración de las células

## 2.12 GERMINACIÓN

La germinación de la semilla es un fenómeno biológico, que puede interpretarse como la continuación del crecimiento del embrión, el cual ha sido temporalmente interrumpido durante la formación de la semilla. Durante el desarrollo de la germinación intervienen eventos genéticos, metabólicos, anatómicos y bioquímicos. Básicamente supone la activación metabólica de la semilla hasta que se da origen a una plántula normal. Durante la formación de la semilla se producen y almacenan reservas en el endospermo (monocotiledóneas) o cotiledones (dicotiledóneas) (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza [CATIE], 1996).

### **2.12.1 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA GERMINACIÓN**

La germinación es una secuencia de eventos, influenciada directamente por varios factores internos y externos que interactúan permanentemente.

Dentro de los factores externos, se encuentran principalmente la humedad, temperatura, luz, oxígeno y CO<sub>2</sub>, sustrato (ph, nivel de salinidad, medio). Los internos que intervienen son los promotores e inhibidores de la germinación, la activación metabólica en general y la regulación genética particular (CATIE, 1996).

#### **2.7.1.1 FACTORES EXTERNOS**

##### **Humedad**

La absorción de agua es el primer paso, y el más importante, que tiene lugar durante la germinación; porque para que la semilla recupere su metabolismo es necesaria la rehidratación de sus tejidos. La entrada de agua en el interior de la semilla se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio que le rodea. En condiciones normales, este potencial hídrico es menor en las semillas secas que en el medio exterior. Por ello, hasta que emerge la radícula, el agua llega al embrión a través de las paredes celulares de la cubierta seminal; siempre a favor de un gradiente de potencial hídrico. Aunque es necesaria el agua para la rehidratación de las semillas, un exceso de la

misma actuaría desfavorablemente para la germinación, pues dificultaría la llegada de oxígeno al embrión (García et al., 2006).

Herrera et al. (2006) señala que en el proceso de absorción de agua podemos distinguir tres fases:

### **I. Fase I: Imbibición**

Consiste en la absorción del agua necesaria para la rehidratación de proteínas y organelas celulares, así como para el transporte y para que ocurran las reacciones hidrolíticas.

### **II. Fase II: Activación de procesos metabólicos o germinación *sensu stricto***

En esta fase ocurre la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. También se incrementan las actividades enzimáticas, así como la degradación inicial de las reservas. A diferencia de la anterior, esta fase se caracteriza por un cese en la absorción de agua y una actividad metabólica más reducida.

### **III. Fase III: Emergencia de la radícula**

Es la última fase de la germinación y tiene lugar la radícula (crecimiento visible), concluyendo el proceso germinativo, ya que el crecimiento subsecuente se considera un proceso separado.

La duración de cada una de estas fases depende de ciertas propiedades de las semillas, como su contenido en compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno. Estas fases también están afectadas por las condiciones del medio, como el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, etc. Otro aspecto interesante es la relación de estas fases con el metabolismo de la semilla. La primera fase se produce tanto en semillas vivas y muertas y, por tanto, es independiente de la actividad

metabólica de la semilla. Sin embargo, en las semillas viables, su metabolismo se activa por la hidratación. La segunda fase constituye un período de metabolismo activo previo a la germinación en las semillas viables o de inicio en las semillas muertas. La tercera fase se produce sólo en las semillas que germinan y obviamente se asocia a una fuerte actividad metabólica que comprende el inicio del crecimiento de la plántula y la movilización de las reservas. Por tanto los factores externos que activan el metabolismo, como la temperatura, tienen un efecto estimulante en la última fase. En las dos primeras fases de la germinación los procesos son reversibles, a partir de la fase de crecimiento se entra en una situación fisiológica irreversible. La semilla que haya superado la fase de germinación tendrá que pasar a la fase de crecimiento y originar una plántula, o por el contrario morir (García et al., 2006).

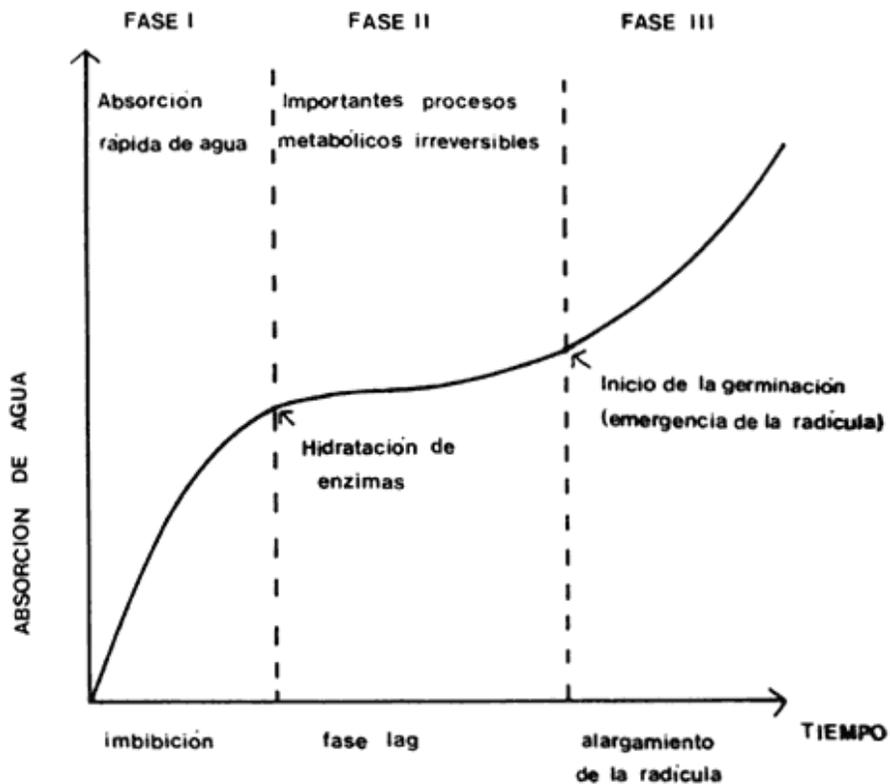


Figura 3: Curva del proceso de absorción de agua (Vázquez et al., 1997)

## Temperatura

La temperatura es un factor decisivo en el proceso de la germinación, ya que influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla después de la rehidratación. La actividad de cada enzima tiene lugar entre un máximo y un mínimo de temperatura, existiendo un óptimo intermedio. Del mismo modo, en el proceso de germinación pueden establecerse unos límites similares. Por ello, las semillas sólo germinan dentro de un cierto margen de temperatura. Si la temperatura es muy alta o muy baja, la germinación no tiene lugar aunque las demás condiciones sean favorables. La temperatura mínima sería aquella por debajo de la cual la germinación no se produce, y la máxima aquella por encima de la cual se anula igualmente el proceso. La temperatura óptima, intermedia entre ambas, puede definirse como la más adecuada para conseguir el mayor porcentaje de germinación en el menor tiempo posible (García et al., 2006). Los requerimientos de temperatura son especialmente importantes para la ruptura de los procesos de latencia; las semillas de climas templados, requieren de temperaturas frías por períodos prolongados para iniciar la germinación; mientras que en el caso de las semillas tropicales es común la necesidad de altas temperaturas para interrumpir el reposo (Herrera et al., 2006).

## **Oxígeno**

El oxígeno es necesario como sustrato en las reacciones metabólicas importantes de la semilla, especialmente la respiración. Aunque en los primeros estadios de la germinación los procesos, tales como cuando la radícula rompe el tegumento, las reacciones son de carácter anaeróbico, posteriormente la germinación se hace totalmente dependiente del oxígeno. La disponibilidad de oxígeno también se afecta por otros factores como la temperatura, el grado de humedad, concentración de CO<sub>2</sub>, dormancia y algunos hongos y bacterias (CATIE, 1996).

## **Luz**

La sensibilidad de las semillas a la luz es bastante variable de acuerdo a la especie. Algunas semillas se estimulan positivamente por la luz y otras negativamente. La respuesta de las semillas a la luz, está ligada a una cromoproteína denominada “fitocromo”, pigmento responsable de atraparla. Básicamente el fitocromo es un sensor de señales del medio ambiente y fotorregulador, ya que capta, traduce y amplifica señales para la germinación. Actúa solo en semillas hidratadas, aunque está presente en semillas secas, el agua induce a cambios conformacionales, hidrata la parte proteica del fitocromo y estimula la síntesis misma del fitocromo (CATIE, 1996). La importancia de la luz es notoria después de que la radícula ha salido, pues se necesita una intensidad lumínica relativamente alta para producir plántulas fuertes y vigorosas (Sierra, 2005).

### **2.7.1.2 FACTORES INTERNOS**

La latencia o dormancia, así como las hormonas y sustancias inhibitoras no hormonales son controladores internos que regulan la germinación de semillas y se ajustan a las condiciones medioambientales y metabólicas de la semilla (CATIE, 1996).

#### **Promotores de la germinación**

Los principales promotores de la germinación son la giberelina (AG), ácido indolacético (AIA) y citoquininas, compuestos que están presentes en pequeñas cantidades en la semilla y su síntesis responde a sus características genéticas y respuestas específicas al medioambiente (por ejemplo fitocromo 660 nm, promueve la formación de giberelina y ésta a su vez desencadena la germinación) (CATIE, 1996). En algunas semillas que requieren tanto periodos fríos como de luz para germinar, los niveles hormonales aumentan después de aplicar tratamientos adecuados de estos compuestos (García et al., 2006).

- Giberelina:

La giberelina estimula la germinación, su velocidad y a la vez que estimula el crecimiento de la plántula. La respuesta de esta hormona puede variar con cada especie (CATIE, 1996). Las giberelinas superan la latencia en semillas, actuando como sustituto de bajas temperaturas, días largos o luz roja. En las semillas, uno de los efectos de las giberelinas es estimular la elongación celular, de manera que la radícula pueda empujar a través del endospermo, la cubierta seminal que restringe su crecimiento (Salisbury y Ross, 1994).

### **Inhibidores de la germinación**

Los inhibidores de la germinación de semillas son sustancias químicas y pueden ser producidas o trasladadas a la semilla para bloquear el crecimiento del embrión (Courtis, 2013).

Son inhibidores:

- Acido abscísico (ABA):

El desarrollo embrionario es dependiente del ABA. Este proceso se puede dividir en tres etapas: 1) mitosis y diferenciación celular; 2) expansión celular y acumulación de reservas (proteínas, grasas, almidón), y 3) maduración, proceso en el que las semillas se secan y pasan a un estado de dormición.

El ABA inhibe la germinación precoz y el viviparismo, es decir, por qué no germinan o pueden no germinar precozmente en frutos húmedos en la planta madre. Aunque en las semillas existen varios mecanismos de latencia, hay diversos datos que indican que el ABA desempeña un papel importante en este proceso: 1) correlación entre las concentraciones bajas de ABA y la germinación precoz en cultivos de embriones; 2) el ABA exógeno impide la germinación de los embriones inmaduros de varias especies cuando se cultivan *in vitro*; 3) cuanto más altos son los niveles de ABA endógeno, mayor es la sensibilidad al ABA y 4) mutantes deficientes en ABA presentan una fase de latencia más corta o germinan, incluso, cuando se encuentran en el fruto. Además, la aplicación de un inhibidor de la biosíntesis del

ABA (floridona) a semillas en desarrollo previene la latencia del embrión. Por lo tanto, el aumento de los niveles endógenos de ABA al final de la embriogénesis está claramente relacionado con el inicio de la maduración y con la inhibición de la germinación precoz (Fig N°4). El ABA también reprime la expresión de numerosos genes específicos de la germinación y puede originar o acelerar la formación de grupos especiales de proteínas de reserva de la semilla en cultivos de embriones. Este hecho indica que el incremento normal de los niveles de ABA al principio y durante la etapa media del desarrollo de la semilla controla la acumulación de dichas proteínas de reserva. El efecto osmótico es también un factor importante en la latencia y el depósito de reservas en la semilla, aunque no está directamente mediado por el aumento de ABA (Azcon- BietoyTalon, 2008).

- Sustancias derivadas del metabolismo secundario de la planta:

- Compuestos orgánicos aromáticos (fenólicos, benzoicos, cofactores de AIA oxidasa, difenólicos);
- Compuestos derivados de las lactonas (cumarina, escopoletina, juglona).

- Inhibidor  $\beta$ : Acido abscísico + inhibidor

En especies tropicales y subtropicales, los inhibidores se encuentran en el pericarpio e inhiben la germinación en las estaciones secas. La eliminación manual del pericarpio o la lixiviación de los frutos es suficiente para que se inicie la germinación de las semillas. En condiciones naturales, esto ocurre en las estaciones lluviosas. El efecto inhibitorio en la germinación se consigue también con la aplicación de reguladores del crecimiento, como el *ácido abscísico* o el *etileno* (Courtis, 2013).

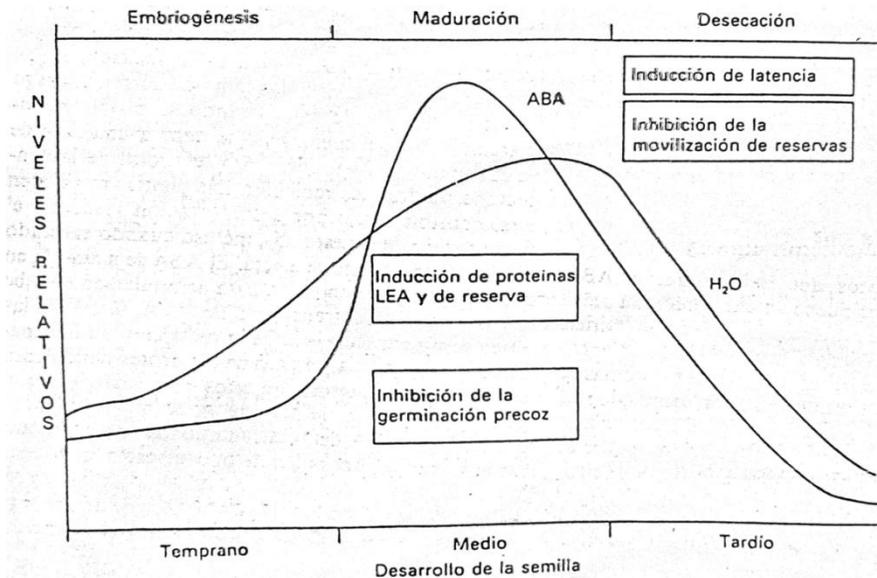


Figura 4: Niveles relativos de ABA y contenido hídrico durante el desarrollo de la semilla (Azcon-Bieto y Talon, 2008)

### Embrión fisiológicamente inmaduro

Este tipo de latencia o dormancia se debe, fundamentalmente, a una disminución en la actividad enzimática de los embriones. En los cereales este tipo de latencia es frecuente, impidiendo que las semillas germinen luego de cosechadas, aunque el embrión este perfectamente formado y durante el almacenaje en sitio seco van perdiendo esta dormición, lo que convierte a esta latencia en un carácter fitotécnico deseable. El período de duración de latencia puede variar desde algunas semanas hasta varios meses, de ahí que existen cultivares que germinan en planta (vivíparos) y otros permanecen inalterables aún en condiciones adecuadas para la germinación. Existen métodos artificiales para romper esta latencia, por ejemplo métodos térmicos, químicos (Courtis, 2013).

### Presencia de tegumentos duros

Muchas plantas producen semillas cuyo tegumento externo es duro impermeable al agua o a los gases, e incluso el micrópilo está provisto de una barrera que impide la penetración de agua al embrión (Vázquez et al., 1997).

Courtis (2013) señala que los tegumentos pueden ser duros por:

- Impermeabilidad al agua por presencia de cutinas, ligninas, quinonas, sustancias pécticas insolubles (Leguminosas);
- Impermeabilidad al oxígeno por presencia de fenoles sustancias ávidas de  $O_2$  que lo atrapan y no permiten que llegue al embrión (*Xanthium*);
- Resistencia mecánica a la expansión del embrión por contener un estrato de esclereidas con paredes secundarias muy lignificadas (*Brassicas*);
- Impedir la difusión de los inhibidores fuera de la semilla (Guayule).

En tales casos, para romper el letargo de las semillas debido a los tegumentos duros, se puede recurrir a diferentes métodos ya sean mecánicos o químicos. En la naturaleza esto se produce por la abrasión de las partículas de arena, la acción de insectos y/o microorganismos, las alternancias térmicas marcadas o el pasaje por el aparato digestivo de animales y aves que presentan sustancias ácidas (Courtis, 2013).

## **2.7.2 TIPOS DE GERMINACIÓN**

Los cambios fisiológicos y metabólicos que se producen en las semillas, no latentes, después de la imbibición de agua, tienen como finalidad el desarrollo de la plántula. Este proceso comienza por la radícula, que es el primer órgano que emerge a través de las cubiertas. Sin embargo, en otras semillas el crecimiento comienza por el hipocótilo. Las semillas, atendiendo a la posición de los cotiledones respecto a la superficie del sustrato, pueden diferenciarse en la forma de germinar (García, 2003).

Jara (1996) nos dice que podemos distinguir dos tipos de germinación: hipogea y epigea.

## Germinación hipogea

En la mayoría de las especies, los cotiledones permanecen sobre o bajo el suelo. El punto de crecimiento (epicotilo) que está sobre los cotiledones comienza a crecer rápidamente formando un brote que termina en hojas rudimentarias (plúmula). La plúmula se dobla hacia atrás mientras que el brote sale del suelo, pero eventualmente se vuelve hacia la luz, y forma las primeras hojas de la plántula. Durante este período, los nutrientes de los cotiledones son absorbidos hasta secarse. Luego la plántula se nutre por si sola mediante la raíz y las hojas verdes con capacidad de fotosíntesis.

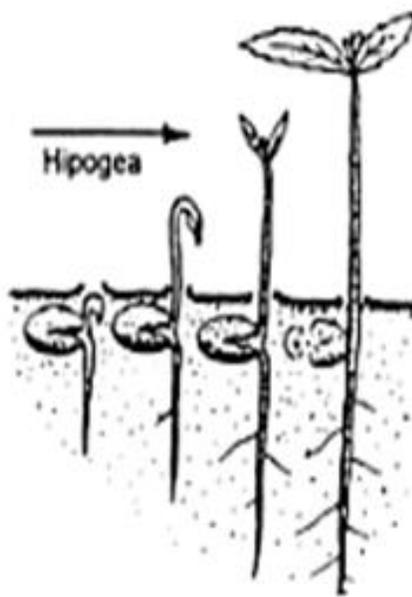


Figura 5: Germinación hipogea

## Germinación epigea

En otras especies, el hipocotilo comienza a crecer rápidamente una vez que la radícula está suficientemente desarrollada. Esto generalmente hace que brote un arco fuera del suelo. El hipocotilo se hace más fuerte y los cotiledones se expanden, se vuelven verdes y comienzan a funcionar como hojas. Durante este tiempo la cubierta de la semilla se cae. Poco

después el epicotilo comienza a crecer y la plúmula se desarrollará para producir las primeras hojas verdaderas. Si la semilla tiene un endosperma, este es absorbido por los cotiledones durante el crecimiento inicial.

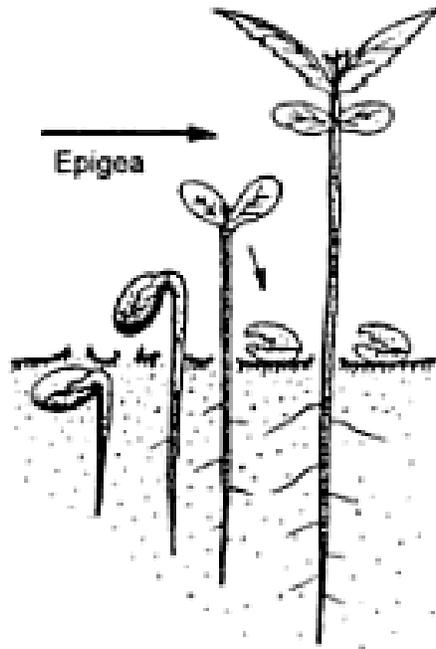


Figura 6: Germinación epigea

### 2.7.5 ESTRUCTURAS ESENCIALES DE LAS PLÁNTULAS

Una plántula, dependiendo de la especie ensayada, consta de una combinación específica de alguna de las siguientes estructuras esenciales para su desarrollo posterior (SENASA, 2007):

- Sistema radicular (raíces primarias; en ciertos casos raíces seminales).
- Eje del brote (hipocotilo; epicotilo; en ciertos casos Poaceae [Gramineae] mesocotilo; yema terminal).
- Cotiledones (uno o varios).
- Coleoptilo (en todas las Poaceae [Gramineae]).

## Dicotiledóneas

- 8 Cotiledones.
- 16 Epicotilo.
- 20 Hipocotilo.
- 37 Pecíolo.
- 42 Hojas primarias.
- 43 Raíz primaria.
- 47 Hojuelas.
- 50 Raíces secundarias.
- 57 Yema terminal.

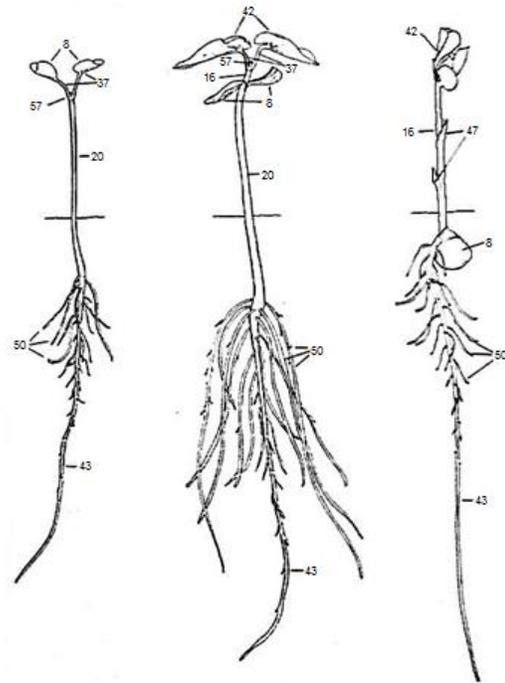


Figura 7: Estructuras esenciales de una plántula de dicotiledónea (Bekendam y Grob, 1980)

## Monocotiledóneas

- 1 Raíces adventicias.
- 5 Coleóptilo.
- 8 Cotiledón.
- 24 Raíces laterales.
- 29 Mesocotilo.
- 42 Hoja primaria.
- 43 Raíz primaria.
- 50 Raíz secundaria.
- 52 Raíces seminales.

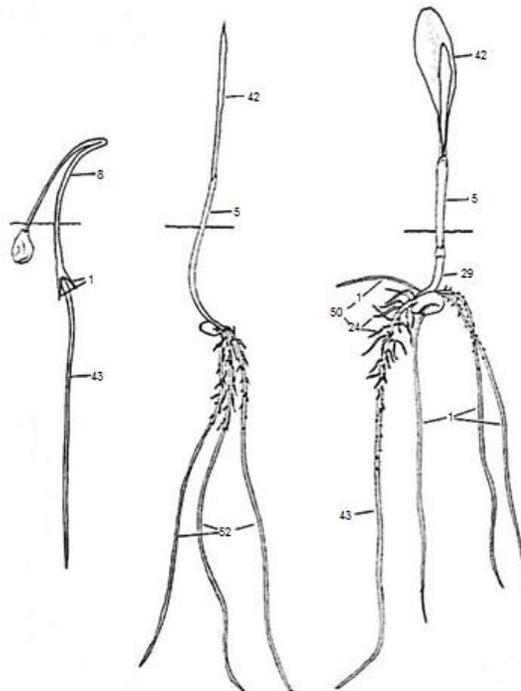


Figura 8: Estructuras esenciales de una plántula de monocotiledónea (Bekendamy Grob, 1980)

## **2.7.6 DESARROLLO DE LAS PLÁNTULAS DEL GÉNERO ASPARAGUS**

Las plántulas del género *Asparagus* son monocotiledóneas con germinación hipogea. En la germinación la raíz primaria emerge de la semilla seguida por un corto hipocotilo y la parte basal del cotiledón. La parte superior del cotiledón permanece en la semilla para absorber alimentos de reserva. Después de que la raíz primaria aparece pueden desarrollarse algunas raíces secundarias. El epicotilo alargado sostiene pequeñas hojuelas, formando las superiores la yema terminal. El embrión cilíndrico en la semilla madura se encuentra incrustado en un endospermo duro, semitransparente y no amiláceo (BekendamyGrob, 1980).

### **2.7.6.1 ENSAYO DE GERMINACIÓN EN EL LABORATORIO**

#### **Plántulas normales:**

Las plántulas normales son aquellas que muestran potencial para su desarrollo en plantas normales, cuando crecen en los suelos de buena calidad y bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y luz (SENASA, 2007).

De acuerdo a Bekendamy Grob (1980) las plántulas, del género *Asparagus*, se consideran normales según los siguientes criterios:

- Sistema radicular: raíz primaria intacta o sólo con leves defectos:
  - p. ej. - decoloración o manchas necróticas.
  - grietas o hendiduras cicatrizadas.
  - grietas o hendiduras de profundidad limitada.
  
- Sistema apical: hipocotilo y parte basal del cotiledón intactos, epicotilo intacto o con sólo leves defectos:

- p. ej. - decoloración o manchas necróticas.
- yema terminal intacta.

- Plántula: todas las estructuras esenciales normales, como se han detallado.

### **Plántulas anormales:**

Las plántulas anormales son todas aquellas que no se pueden clasificar como normales por tener alguna deficiencia en el desarrollo de sus estructuras esenciales, que les impide su desarrollo normal cuando crecen en suelo preparado y bajo condiciones favorables de humedad, luz y temperatura (Moreno, 1984).

De acuerdo a Bekendamy Grob (1980) las plántulas, del género *Asparagus*, se consideran anormales según los siguientes criterios:

- Sistema radicular: raíz primaria defectuosa:

- p. ej. - raquítica o mazuda.
- atrofiada o ausente.
- rota.
- hendida desde el extremo.
- con constricción.
- curvada.
- ahilada.
- con geotropismo negativo.
- vítrea.
- podrida como resultado de una infección primaria.

- Sistema apical: hipocotilo o parte basal del cotiledón defectuoso:

- p. ej. - deformado.

- podrido como resultado de una infección primaria.

- epicotilo defectuoso:

p. ej. - corto y grueso.

- profundamente agrietado o roto.

- ausente.

- ahilado.

- vítreo.

- podrido como resultado de una infección primaria.

- yema terminal defectuosa:

p. ej. - deformada.

- ausente.

- podrida como resultado de una infección primaria.

- Plántula: una o más de las estructuras esenciales anormales como se han detallado anteriormente o bien con el desarrollo normal impedido debido a que la plántula, considerada como un todo, es defectuosa:

p. ej. - deformada.

- fracturada (p. ej. semilla desprendida).

- dos fusionadas.

- amarilla o blanca.

- ahilada.

- vítrea.

- podrida como resultado de una infección primaria.

### **Semillas no germinadas:**

Las semillas que no han germinado al final del ensayo cuando han sido ensayadas bajo las condiciones dadas en los métodos específicos para cada especie, se clasifican como:

- a. Semillas duras: Semillas que permanecen duras al final del periodo de ensayo, porque no han absorbido agua, debido a la impermeabilidad de la cubierta. La dureza es una forma de latencia.
- b. Semillas frescas o latentes: Semillas, distintas de semillas duras, que no han germinado bajo las condiciones del ensayo de germinación, pero que permanecen sanas y firmes y tienen el potencial para desarrollarse en una plántula normal. Las semillas frescas pueden embeberse de agua cuando se las proporciona las condiciones establecidas, pero el proceso de germinación está bloqueado.
- c. Semillas muertas: Semillas que al final del periodo del ensayo no están ni dura ni frescas ni han producido ninguna estructura de la plántula. Las semillas muertas normalmente están blandas, decoloradas, frecuentemente enmohecidas.
- d. Otras categorías: En algunas circunstancias o para determinados grupos de especies, semillas vacías y no germinadas podrían clasificarse en otras categorías, como son:
  - d.1 Semillas vacías: Semillas que están completamente vacías o contienen solamente tejido residual.
  - d.2 Semillas sin embrión: Semillas que contienen endospermo fresco o tejido gametofítico en el cuál no hay, aparentemente, cavidad embrional ni embrión.
  - d.3 Semillas dañadas por insectos: Semillas que contienen larvas, restos o excrementos de insectos, o bien, presenta otras evidencias de ataques que afectan la capacidad de las semillas para germinar.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS:**

### **3.7 LUGARES DE EJECUCIÓN DE LOS ENSAYOS:**

Los ensayos se realizaron en la Universidad Nacional Agraria la Molina, ubicado en el distrito de La Molina, provincia de Lima, Perú, a 240 m.s.n.m. aproximadamente.

El estudio comprendió dos etapas, la primera se realizó en el Laboratorio de Taxonomía y Anatomía Vegetal del Departamento Académico de Biología de la Facultad de Ciencias, en esta se hicieron los estudios de morfología de la semilla y estructura interna. La segunda etapa se realizó en el Laboratorio de Semillas del Departamento Académico de Fitotecnia de la Facultad de Agronomía y aquí se realizaron los ensayos de viabilidad y germinación.

### **3.8 MATERIALES:**

- Agua destilada
- Beakers
- Cloruro 2, 3, 5 trifeniltetrazolio
- Envases de plástico
- Estilete
- Etiquetas
- Hoja de afeitar
- Lugol
- Navajas
- Papel milimetrado
- Papel toalla
- Picetas
- Placas petri
- Semillas de espárrago

### **3.9 EQUIPOS:**

- Cabina de germinación
- Estereoscopio (Leica zoom 2000)
- Estufa
- Cámara digital

### **3.10METODOLOGÍA:**

#### **3.10.1 MUESTRA DE TRABAJO**

Se utilizaron semillas de *Asparagus officinalis* del cv UC-157 F1 cosechadas el año 2008, compradas de una empresa dedicada a la venta de semillas y fueron conservadas en refrigeradora, para desacelerar el proceso de deshidratación.

Se separaron las semillas en cinco grupos:

Se tomaron 140 semillas para la primera etapa del estudio morfológico y se dividieron en tres grupos: 20 para el estudio de la estructura interna, 20 para la etapa de descripción morfológica y 100 para la descripción del proceso de germinación. Luego se tomo un cuarto grupo de 400 semillas para el ensayo de germinación y finalmente un quinto grupo de 1200 semillas para el ensayo de viabilidad.

#### **3.10.2 ESTUDIO MORFOLÓGICO**

En esta etapa se realizó la descripción morfológica, estructura interna y descripción del proceso de germinación, para la cual se tomaron 140 semillas y se separaron en tres grupos:

Para realizar el estudio de la estructura interna, se tomo un grupo de 20 semillas, las cuales fueron remojadas por 24 horas, y después se las puso a hervir por veinte minutos, para la dureza de la semilla y de la testa. Se realizaron varios cortes longitudinales y transversales de la semilla, para ubicar la posición del embrión, su forma y partes, así como también observar al endospermo y la estructura externa de las semillas, todo esto con ayuda de un

estereoscopio y de una navaja. Una vez conocida la configuración interna de la semilla de espárrago (*Asparagus officinalis*), se observó que con un corte longitudinal centrado se podía exponer al embrión entero (Figura 9) y esto también nos permitió realizar el ensayo de viabilidad.

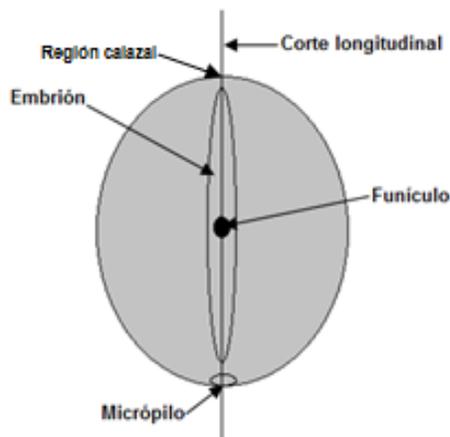


Figura 9: Esquema del corte longitudinal para semillas de espárrago

Como tanto el endospermo como el embrión son de color blanco, se utilizó lugol para poder observar mejor las partes de la semilla.

Otro segundo grupo de 20 semillas se utilizaron para la caracterización morfológica, con el fin de determinar el tamaño. Las semillas fueron medidas con papel milimetrado, tomándose el largo, ancho y espesor. El largo de las semillas fue medido desde la región calazal hasta la micropilar; el ancho fue medido en la región media respecto al funículo y el espesor volteando la semilla lateralmente. Después las semillas fueron cortadas longitudinalmente para extraer el embrión y medir su largo. Todas estas medidas fueron expresadas en milímetros.

Finalmente el tercer grupo de 100 semillas se pusieron a germinar. A partir del día 7 se empezó a extraer cada 2 días la semilla más representativa y así se realizó la descripción del proceso de germinación.

### 3.10.3 ENSAYO DE GERMINACIÓN

Los requerimientos para los ensayos de germinación de *Asparagus officinalis* fueron tomados de las normas ISTA (2004).

- ❖ Se procedió a tomar un cuarto grupo de 400 semillas al azar.
- ❖ Luego se dividieron en grupos de 4 para así obtener 4 repeticiones de 100 semillas cada uno.
- ❖ Cada repetición se colocó con una adecuada separación sobre papel toalla totalmente húmeda.
- ❖ Finalmente se procedió a enrollar cada papel toalla húmedo con las semillas y los cuatro rollos se colocaron en un envase de plástico con tapa, y ésta a su vez se pusieron dentro de la cámara de germinación (Figura 10).



Figura 10: Cámara de germinación

El sustrato de papel toalla se mantuvo húmedo durante los 28 días que duró el ensayo. La temperatura dentro de la cabina fue alterna (20°C durante 18 horas y 30°C durante 6 horas), así como también se reguló automáticamente la iluminación artificial dentro de la cabina las 24 horas (Figura 11), ya que dicha luz produce un mejor desarrollo de las plántulas, que facilitan la evaluación

Se realizó una primera evaluación a los 10 días para permitir la detección de plántulas normales, tal como lo establece ISTA (2004). Al finalizar la prueba se llevó a cabo la segunda

evaluación donde se encontraron plántulas normales, anormales, semillas frescas, semillas duras y muertas.



Figura 11: Cámara de germinación con luz artificial

#### 3.10.4 ENSAYO DE VIABILIDAD

Hasta donde sabemos, no existe información específica acerca de la prueba de viabilidad para *Asparagus officinalis*. Pero se realizaron tanto la preparación de la semilla, así como la evaluación y la cuantificación de resultados en base a las normas generales de ISTA (2004).

Se empezó humidificando la semilla de tres maneras diferentes, luego esto se procedió a hacer cortes longitudinales a la semilla para que facilite la penetración del tetrazolio al embrión.

Los 3 factores para evaluar la viabilidad de las semillas de *Asparagus officinalis* fueron:

- ❖ Factor H: Forma de la humidificación. En este factor se consideraron 3 de niveles (Figura 13):
  - SP: Sobre papel

- EP: Entre papel
- A: Agua
- ❖ Factor T: Tiempo de humidificación. En este factor se consideraron 2 niveles: 24 y 48 horas.
- ❖ Factor I: Tiempo de inmersión en tetrazolio. Después de haber cumplido con el tiempo de remojo asignado por tratamiento, se prosiguió con la inmersión de las semillas en el cloruro de tetrazolio al 0.5%. En este factor se consideraron 2 niveles: 12 y 24 horas.

Para dicho ensayo se tomó un quinto grupo de 1200 semillas al azar, de las cuales por cada interacción entre niveles se utilizaron 100 semillas, y de éstas se formaron grupos de 25, para así poder obtener 4 repeticiones por cada interacción de niveles.

Para la evaluación y cuantificación de resultados, se tomó en cuenta la uniformidad de color en el embrión.

En todo momento, tanto en el tiempo de la humidificación como en el tiempo que estuvo inmersa la semilla en el tetrazolio, estuvieron en una estufa a 20°C (Figura 12).



Figura 12: Estufa

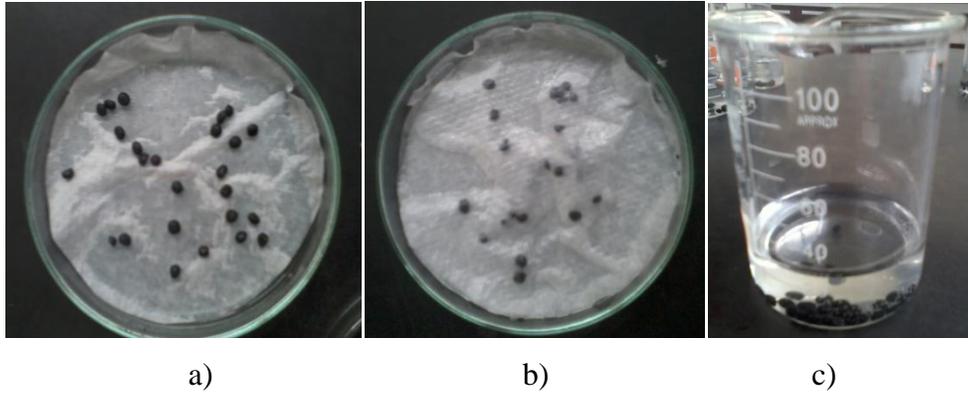


Figura 13: a) SP: Sobre papel, b) EP: Entre papel, c) A: Agua

### 3.11 DISEÑO EXPERIMENTAL:

#### 3.11.1 ENSAYO DE VIABILIDAD

Los datos fueron analizados en un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3x2x2, con el respectivo análisis de varianza (ANVA) y para la comparación de medias se empleó la prueba de Tukey al 0.05. La prueba estadística se hizo tanto para semillas viables como no viables. Los factores fueron tres: forma de la humidificación, tiempo de humidificación y tiempo de inmersión en tetrazolio, cada uno con su respectivo nivel y las réplicas fueron cuatro (25 semillas para cada una), considerándose una semilla como la unidad experimental. Los datos fueron procesados con el programa estadístico SAS.

El modelo estadístico para este diseño es:

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + T_j + I_k + (HT)_{ij} + (HI)_{ik} + (TI)_{jk} + (HTI)_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

donde:

- $Y_{ij}$ : Parámetros estudiados.
- $\mu$ : Media general del ensayo.
- $H_i, T_j$  e  $I_k$ : Efecto debido a los factores principales H, T e I.

- $(HT)_{ij}$  ,  $(HI)_{ik}$  ,  $(TI)_{jk}$  y  $(HTI)_{ijk}$ : Efecto debido a la interacción los factores.
- $\varepsilon_{ij}$ : Error experimental.

### **3.12 PARÁMETROS EVALUADOS**

**3.6.1 ENSAYO DE GERMINACIÓN**, se evaluaron los porcentajes de plántulas normales y anormales, semillas muertas, frescas y duras.

**3.6.2 ENSAYO DE VIABILIDAD**, se determinó el porcentaje de semillas viables y no viables, proponiéndose así un patrón de tinción para facilitar su evaluación, considerándose así semillas viables a aquellas con el embrión totalmente teñido o con mínimas zonas sin teñir, y semillas no viables a aquellas con zonas intactas, con mínimas zonas teñidas o aquellas en donde se observe el punto de inserción entre el cotiledón y la plúmula sin teñir.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

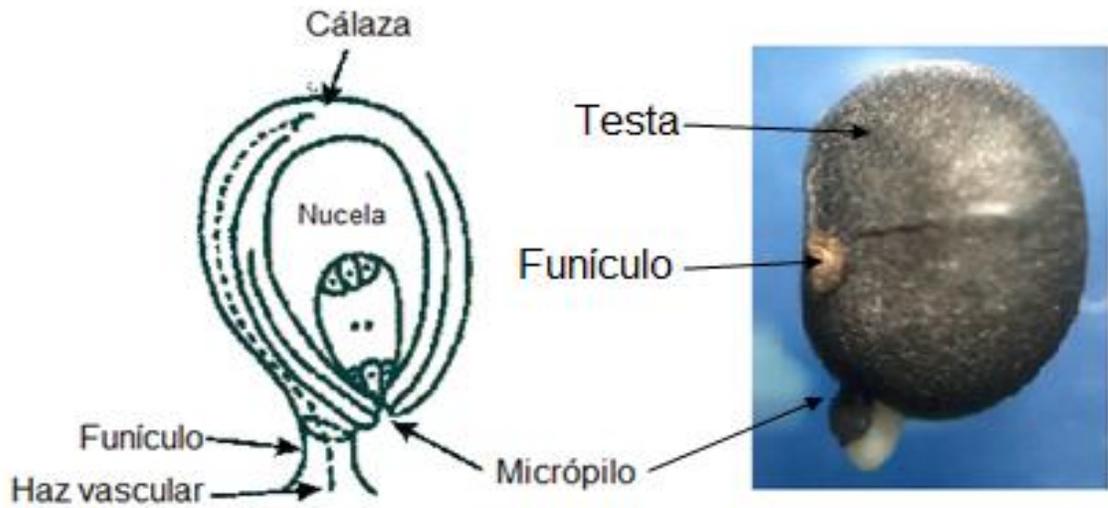
#### 4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

La semilla de *Asparagus officinalis* es completa, pues posee testa, endospermo y embrión, tal como lo indica Regalado (1992) en la Figura 2. La testa y el endospermo son de consistencia dura. Robbins y Borthwick, (1925) nos dice que el origen de las semillas de esta especie sonen óvulos anátropos (Figura 14).

En la observación de la superficie externa de la semilla, se observa el funículo como una cicatriz y el micrópilo se puede ver, con la ayuda de un estereoscopio, como una pequeña depresión en la testa (Figura 14b y 15). La testa es de color negro, finamente rugosa y vista al estereoscopio es porosa (Figura 14.b).

Las semilla tienen dos tipos de forma, achatada y redonda (Figura 16), estos tipos de forma coincide con la descripción de Montes (1992) quien afirma que si dos óvulos desarrollan en una sola cavidad de la baya las superficies que entran en contacto llegarán a achatarse debido a la presión mutua. Sin embargo, si un óvulo individual desarrolla en la cavidad, su forma será completamente redondeada. El tamaño promedio de las semillas es de 3.8 mm de largo, 3.2 mm de ancho y 2.6 mm de espesor.

En secciones longitudinales de la semilla se observa la testa, el endospermo y el embrión. La testa es de carácter lignificado, el endospermo es corneo, tal como lo afirma Robbins y Borthwick, (1925) para la especie *Asparagus officinalis*, y el embrión se ubica en la parte central del endospermo, es lineal, paralelo al eje de la semilla respecto al funículo y micrópilo (Figura 17 a y b), es de color blanco, de estructura esbelta, filiforme, mide en promedio 3.5mm (su tamaño varia respecto al tamaño de la semilla, entre más grande es la semilla más grande será el embrión) y está constituido por tres partes, cotiledón, plúmula y radícula (Figura 17 c y d). En la figura 17 se observa que la radícula se ubica hacia el micrópilo y el cotiledón se orienta hacia la zona calazal y este es de ápice obtuso.



a)

b)

Figura 14: a) Óvulo anátropo b) Semilla de *Asparagus officinalis*, con vista en posición de un óvulo anátropo

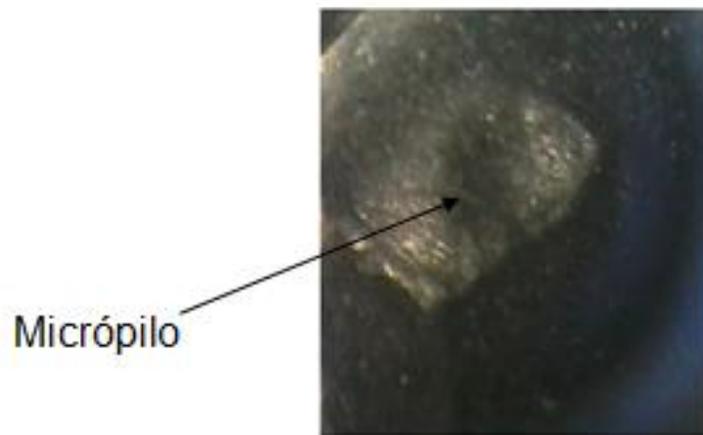


Figura 15: Vista del micrópilo en las semillas de *Asparagus officinalis*



a)

b)

Figura 16: a) Semilla de forma achatada, b) Semilla de forma redonda

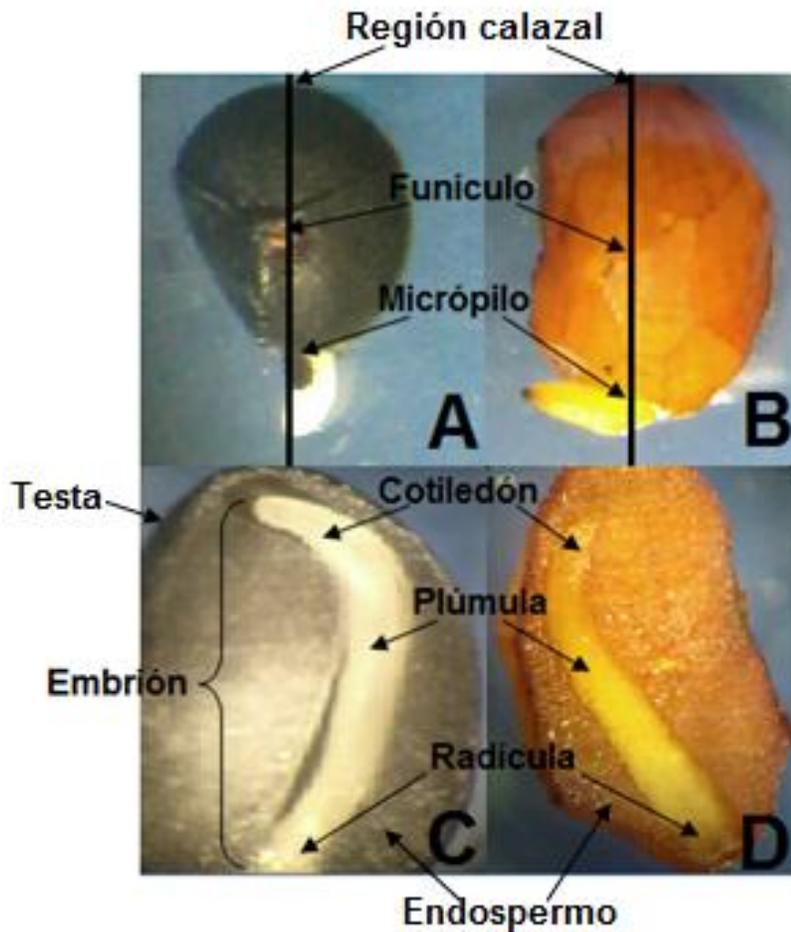


Figura 17: a) Semilla entera con testa y sin lugol que muestra el corte longitudinal, b) Semilla entera sin testa y con lugol que muestra el corte longitudinal, c) Semilla sin lugol y cortada longitudinalmente, d) Semilla con lugol y cortada longitudinalmente.

## 4.2 PROCESO DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

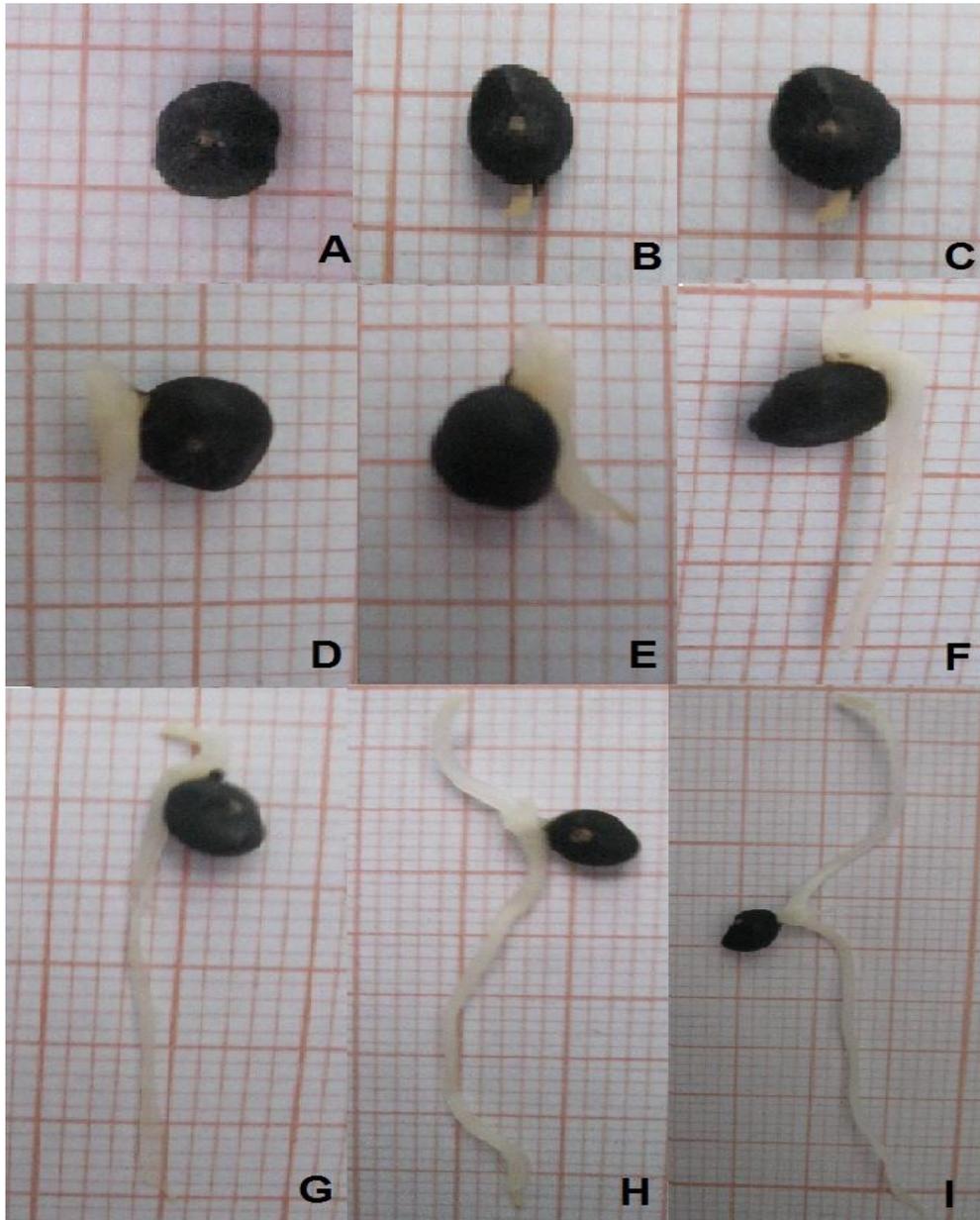


Figura 18: Proceso de germinación de *Asparagus officinalis*

- a) La semilla empieza a absorber agua y se hincha.
- b) Día 7, emergencia de la radícula (1 mm).
- c) Día 9, crecimiento radicular (3 mm) y se inicia el crecimiento de los pelos absorbentes.

- d) Día 11, mayor crecimiento radicular (4.5 mm) e inicio de la elongación del epicotilo que empuja a la plúmula (1.5 mm).
- e) Día 13, mayor crecimiento radicular (5 mm) y mayor elongación de la plúmula (2 mm).
- f) Día 15, el crecimiento de la radicular es aun más pronunciado (20 mm) y mayor elongación de la plúmula (4 mm).
- g) Día 17, el crecimiento de la radicular es aún mayor (26 mm) y ligero crecimiento de la plúmula, respecto al anterior (5 mm).
- h) Día 19, el crecimiento de la radicular es aun más pronunciado, (30 mm) y la plúmula creció aún mas (12 mm).
- i) Día 21, la radícula creció con una mayor velocidad (42 mm) y mayor elongación de la plúmula (23 mm).

En el proceso de absorción de agua para *Asparagus officinalis* podemos distinguir tres fases:

- I. **Fase de imbibición:** Esta fase ocurre entre los 0 y 6 días, y en este tiempo los tejidos de la semilla absorben una intensa cantidad de agua. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria (García et al., 2006).
- II. **Fase de activación de procesos metabólicos o germinación *sensu stricto*:** En esta fase se da el inicio de la actividad enzimática y del metabolismo respiratorio, translocación y asimilación de las reservas alimentarias en las regiones en crecimiento del embrión (Vázquez et al., 1997).
- III. **Fase de emergencia de la radícula:** En esta última fase se inicia la emergencia de la radícula en el día 7. Del día 7 al 10, se observa el crecimiento solo de la radícula, el día 11, el epicotilo empieza a elongarse y empuja a la plúmula hacia al exterior. En los días posteriores tanto la radícula como la plúmula se elongan, pero la radícula lo hace con mayor velocidad que la plúmula.

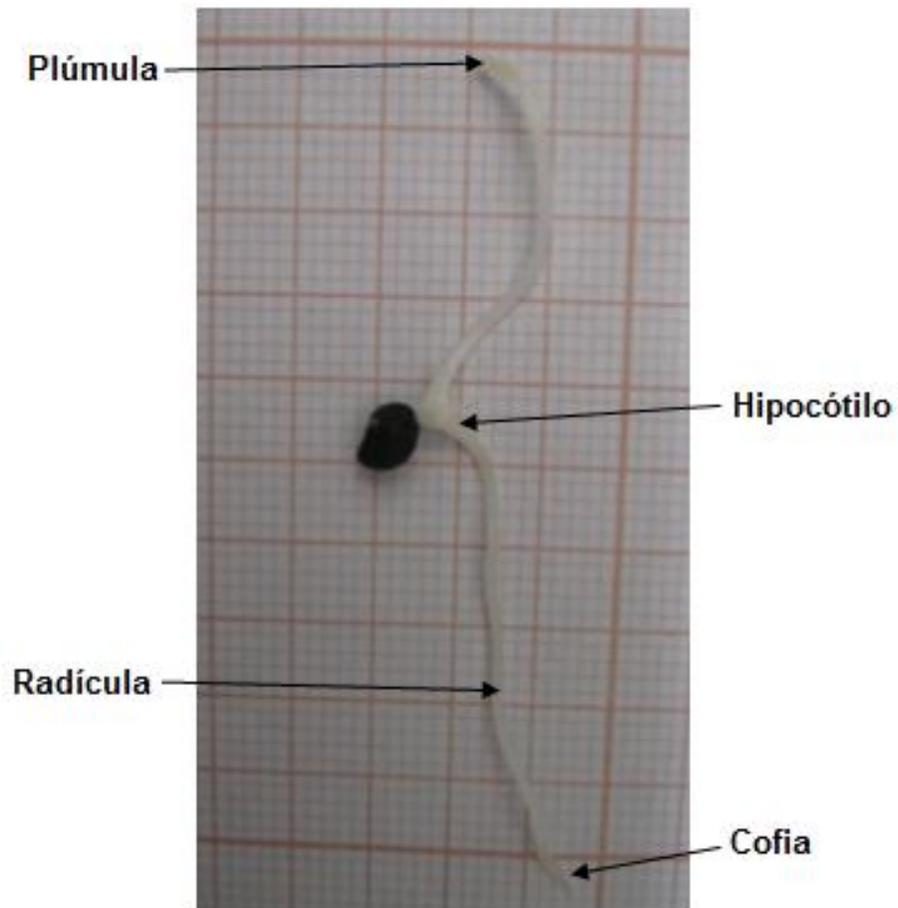


Figura 19: Partes de la plántula de *Asparagus officinalis*

### 4.3 ENSAYO DE GERMINACIÓN

En el ensayo de germinación, se observaron para las cuatro repeticiones un número similar de plántulas normales y anormales, semillas muertas y frescas (Figura 20).

La evaluación del mencionado ensayo, fueron en base a los criterios del **Manual para evaluación de plántulas en análisis de germinación** (Bekendam y Grob, 1980).

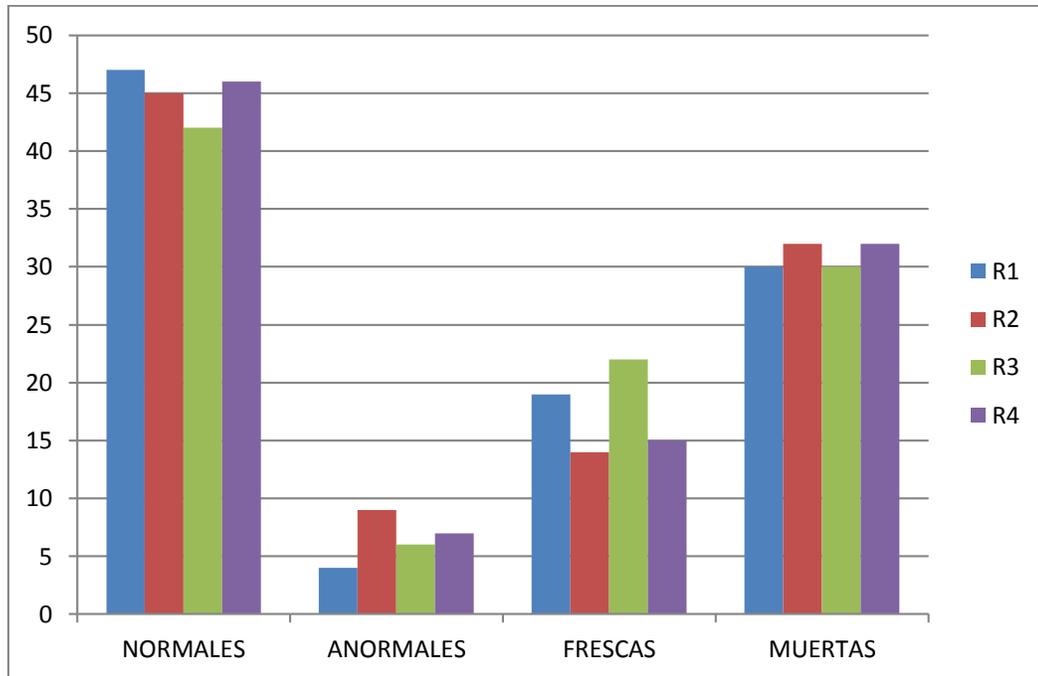


Figura 20: Porcentaje de plántulas y semillas por repetición

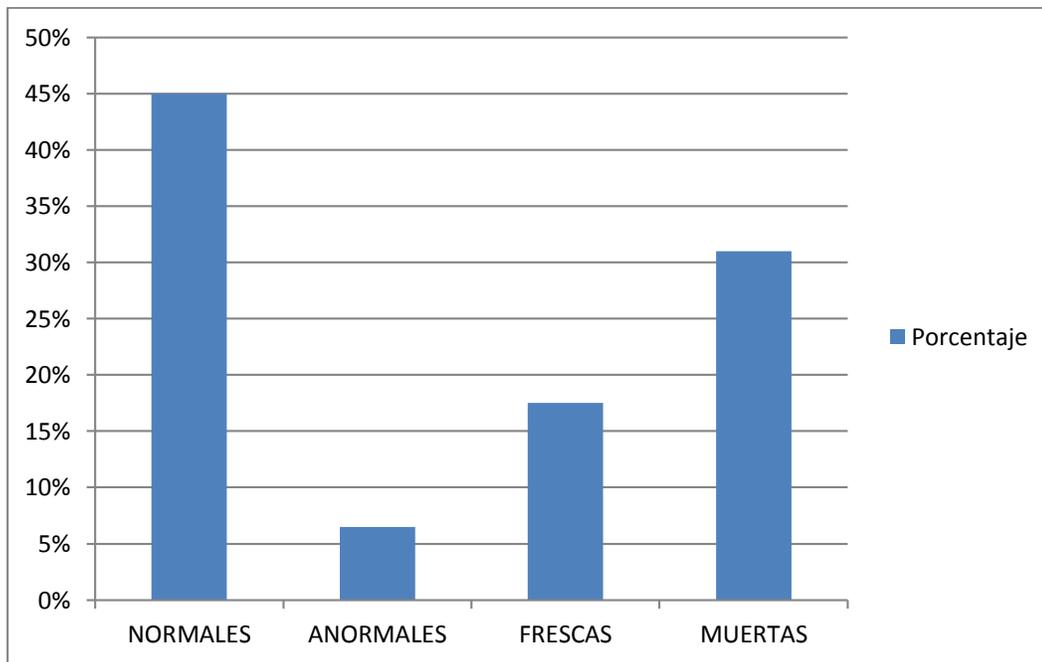


Figura 21: Porcentaje total de plántulas y semillas

Tabla 1: Porcentaje de plántulas y semillas por repetición y total

REPETICIONES	PLÁNTULAS GERMINADAS		SEMILLAS	
	NORMALES	ANORMALES	FRESCAS	MUERTAS
<b>R1</b>	47	4	19	30
<b>R2</b>	45	9	14	32
<b>R3</b>	42	6	22	30
<b>R4</b>	46	7	15	32
<b>TOTAL</b>	180	26	70	124
<b>PROMEDIO</b>	45	6.5	17.5	31
<b>PORCENTAJE</b>	<b>45%</b>	<b>7%</b>	<b>17%</b>	<b>31%</b>

#### Plántulas normales:

Fueron en su mayoría intactas, es decir con todas sus estructuras esenciales completas y bien desarrolladas (Figura 22). Algunas plántulas presentaron ligera presencia de zonas necróticas en la zona radicular (Figura 23), pero estas no afectaron su desarrollo. Como se puede observar en la Tabla N°1, por cada repetición se obtuvo un similar número de plántulas normales y éstas obtuvieron un porcentaje de germinación de 45% con temperaturas alternas de 20 – 30°C.

Pill, Frett y Morneau (1991), en la Universidad de Delaware, Estados Unidos, realizaron pruebas de germinación en la variedad Mary Washington (*Asparagus officinalis* L.) y a temperaturas constantes de 10, 20 y 30°C se obtuvieron porcentajes de germinación de 6%, 90% y 91%, respectivamente. Se tiene que tomar en cuenta que las condiciones de temperatura y la variedad son diferentes.



Figura 22: Plántula normal totalmente sana de *Asparagus officinalis*



Figura 23: Plántula normal con ligera zona necrótica de *Asparagus officinalis*

### **Plántulas anormales:**

Las plántulas anormales que se observaron en las cuatro repeticiones fueron en su mayoría plántulas deformes que presentaron raíz primaria atrofiada y podrida, mazuda y geotropismo negativo (Figura 24). Según Camacho (1994), compuestos fenólicos y otros compuestos volátiles que se encuentran en la cubierta de las semillas inhiben la germinación, pero en caso de haber germinación se producen radículas cortas, deformes y necrosadas de la punta.

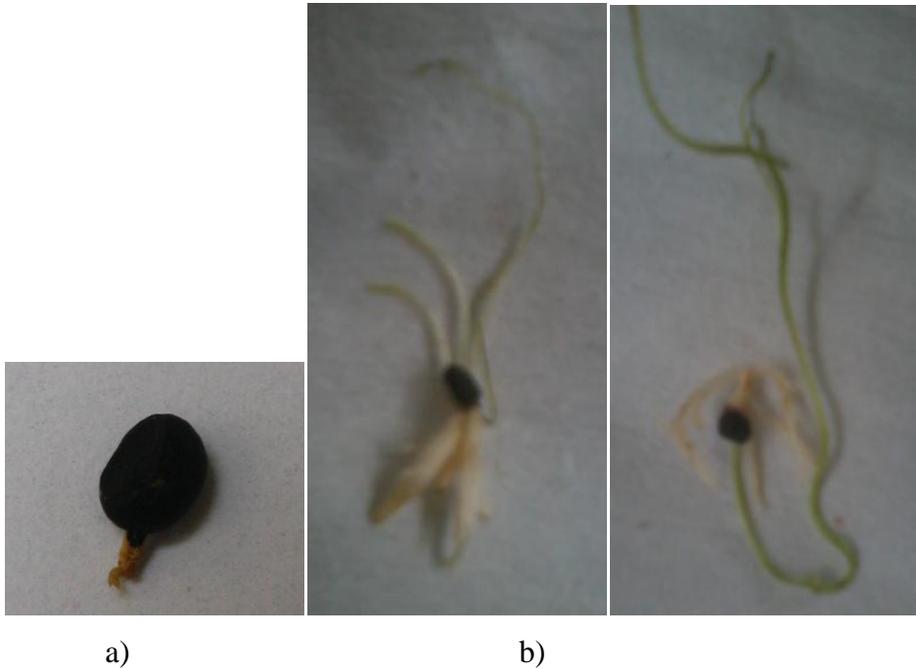


Figura 24: Plántulas anormales

- a) Plántula anormal con raíz primaria atrofiada y podrida de *Asparagus officinalis*.
- b) Plántula anormal con raíz primaria mazuda y yema terminal podrida de *Asparagus officinalis*.
- c) Plántula anormal con geotropismo negativo de *Asparagus officinalis*.

### Semillas frescas:

Con respecto a las semillas no germinadas, se observaron que todas estaban hinchadas por la absorción de agua. Es por eso que a todas las semillas no germinadas e imbibidas se las consideraron como semillas frescas. Estas semillas no germinan, porque se encuentran en estado de latencia, posiblemente debido a la presencia de sustancias químicas inhibidoras, fotosensibilidad (Salisbury & Ross, 1994) o factores no adecuados que bloquean el proceso de germinación. La latencia de las semillas, probablemente está vinculada con la respuesta a las condiciones ambientales favorables como la temperatura y las insolaciones bajas, propias del invierno en el desierto costero, este mecanismo impide la germinación de las semillas por debajo de un umbral de precipitación, que estaría relacionado a la presencia de ciertas sustancias inhibidoras en la testa de la semilla, las cuales deben ser lavadas para que logren germinar (Sotomayor & Jiménez, 2008). En muchos casos para romper esta latencia se puede

hacer una escarificación y aplicación de sustancias promotoras de la germinación (Moreno, 1984).

Como señala Arostegui yDiaz (1992), cualquier condición de latencia que pueda inhibir la germinación debe superarse con la aplicación de tratamientos de pre-germinación que sean necesarios.

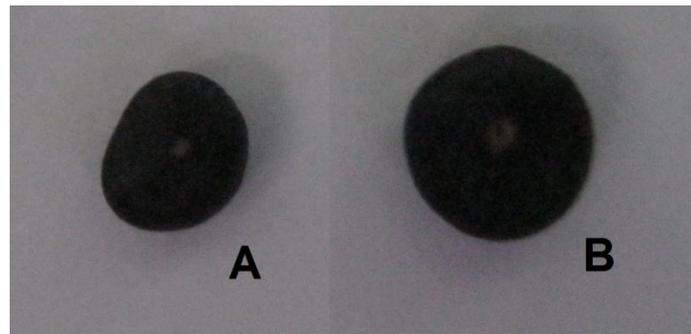
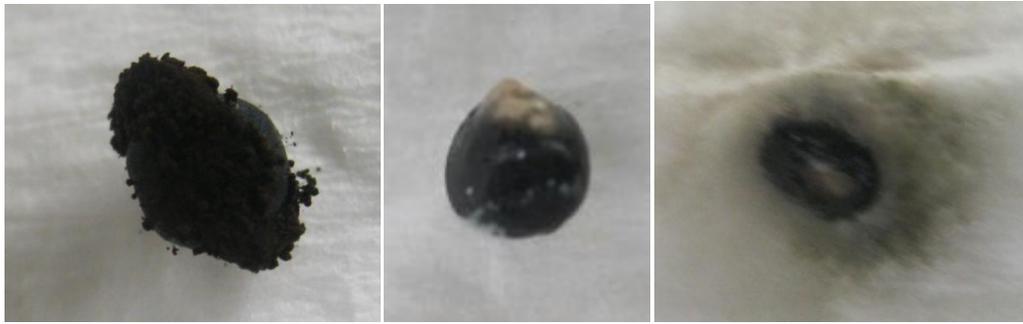


Figura 25: Diferencia de tamaño entre una semilla dura y fresca

- a) Semilla dura
- b) Semilla fresca

### **Semillas muertas:**

Las semillas muertas que se obtuvieron se deshacían inmediatamente presionándolas con la uña contra una superficie y se notaron que interiormente estaban podridas, debido a la consistencia blanda que presentaba el endospermo, y éstas tenían en su superficie moho o sustancias mucilaginosas (Figura 26 a y b), que impidieron la germinación de las semillas. Así como también se observó la presencia de un halo negro alrededor de la semilla en todas las repeticiones (Figura 26 c).



a)

b)

c)

Figura 26: Semillas muertas

- a) Semilla enmohecida
- b) Semilla con sustancia mucilaginosa
- c) Halo negro alrededor de la semilla

#### 4.4 ENSAYO DE VIABILIDAD:

En el ensayo de viabilidad de *Asparagus officinalis*, los resultados se basaron en el número de semillas teñidas de color rojizo, debido a la reacción del tetrazolio con el tejido vivo de la semilla, considerándose así, como semillas viables a aquellas que presentaron el embrión totalmente teñido o con mínimas zonas sin teñir (Figura 27), y semillas no viables a aquellas que no reaccionaron con el tetrazolio y por lo tanto se mantuvieron intactas, con mínimas zonas teñidas a lo largo del embrión o aquellas en donde se observó el punto de inserción entre el cotiledón y la plúmula sin teñir (Figura 28).

En las semillas se observó una tinción a nivel del endospermo debido probablemente al excesivo remojo en tetrazolio.



Figura 27: Semillas viables



Figura 28: Semillas no viables

Tabla2: Porcentaje de semillas viables

<b>H</b>	<b>SP</b>				<b>EP</b>				<b>A</b>			
<b>T</b>	<b>24 h</b>		<b>48 h</b>		<b>24 h</b>		<b>48 h</b>		<b>24 h</b>		<b>48 h</b>	
<b>I</b>	<b>12 h</b>	<b>24 h</b>										
1	7	4	9	11	13	12	14	11	11	16	15	17
2	8	8	12	10	15	13	11	12	16	13	14	18
3	8	7	11	13	11	11	15	13	20	15	16	14
4	9	9	12	12	14	15	14	14	14	11	17	16
<b>Promedio</b>	8	7	11	11.5	13	13	14	13	15	14	16	16
<b>Porcentaje</b>	32%	28%	44%	48%	52%	52%	56%	52%	60%	56%	64%	64%

Factor H: Forma de la humidificación.

SP: Sobre papel.

Factor T: Tiempo de humidificación.

EP: Entre papel.

Factor I: Tiempo de inmersión en tetrazolio.

A: Agua.

Tabla3: Porcentaje de semillas no viables

<b>H</b>	<b>SP</b>				<b>EP</b>				<b>A</b>			
<b>T</b>	<b>24 h</b>		<b>48 h</b>		<b>24 h</b>		<b>48 h</b>		<b>24 h</b>		<b>48 h</b>	
<b>I</b>	<b>12 h</b>	<b>24 h</b>										
1	18	21	16	14	12	13	11	14	14	9	10	8
2	17	17	13	15	10	12	14	13	9	12	11	7
3	17	18	14	12	14	14	10	12	5	10	9	11
4	16	16	13	13	11	10	11	11	11	14	8	9
<b>Promedio</b>	17	18	14	13	12	12	11	12	10	11	9	9
<b>Porcentaje</b>	68%	72%	56%	52%	48%	48%	44%	48%	40%	44%	36%	36%

Factor H: Forma de la humidificación.

SP: Sobre papel.

Factor T: Tiempo de humidificación.

EP: Entre papel

Factor I: Tiempo de inmersión en tetrazolio.

A: Agua.

Con respecto al análisis de varianza (ANVA), para semillas viables (Tabla 4), nos indica que los factores principales H (forma de humidificación) y T (tiempo de humidificación) son altamente significativos, siendo el factor principal I (tiempo de inmersión en tetrazolio) no significativo. También resulto significativo la interacción H\*T, mientras que las interacciones H\* I, T\* I y la triple interacción resultaron no significativas, con un coeficiente de variabilidad de 15.16%.

Tabla 4: Análisis ANVA para semillas viables

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
H	2	275.7916667	137.8958333	38.26	<.0001 **
T	1	35.0208333	35.0208333	9.72	0.0036 **
I	1	2.5208333	2.5208333	0.70	0.4085 ns
H*T	2	28.7916667	14.3958333	3.99	0.0271 *
H*I	2	0.5416667	0.2708333	0.08	0.9278 ns
T*I	1	3.5208333	3.5208333	0.98	0.3296 ns
H*T*I	2	4.0416667	2.0208333	0.56	0.5757 ns

ns diferencia no significativa

\* diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ )

\*\* diferencia altamente significativa ( $p \leq 0,001$ )

Después para la comparación de medias con la prueba de Tukey al 0.05, para semillas viables, en la Tabla 5 y en la Figura 29, podemos observar que con respecto al factor H (forma de la humidificación ), existen diferencias significativas entre las medias de los tres niveles(A= agua, EP = entre papel y SP = sobre papel), siendo el mejor, para semillas viables, el nivel A, por tener la mayor media, obteniéndose así en este nivel el mayor porcentaje de semillas viables, tal como se observa en la Tabla 2. Así como también se observa que el nivel SP es el que menor media tiene, esto quiere decir que con dicho tratamiento se obtiene el menor porcentaje de semillas viables.

Tabla5: Prueba Tukey para el factor H de semillas viables

FACTOR H	NIVELES		
	A	EP	SP
MEDIA	15.1875 <sup>a</sup>	13.0000 <sup>b</sup>	9.3750 <sup>c</sup>

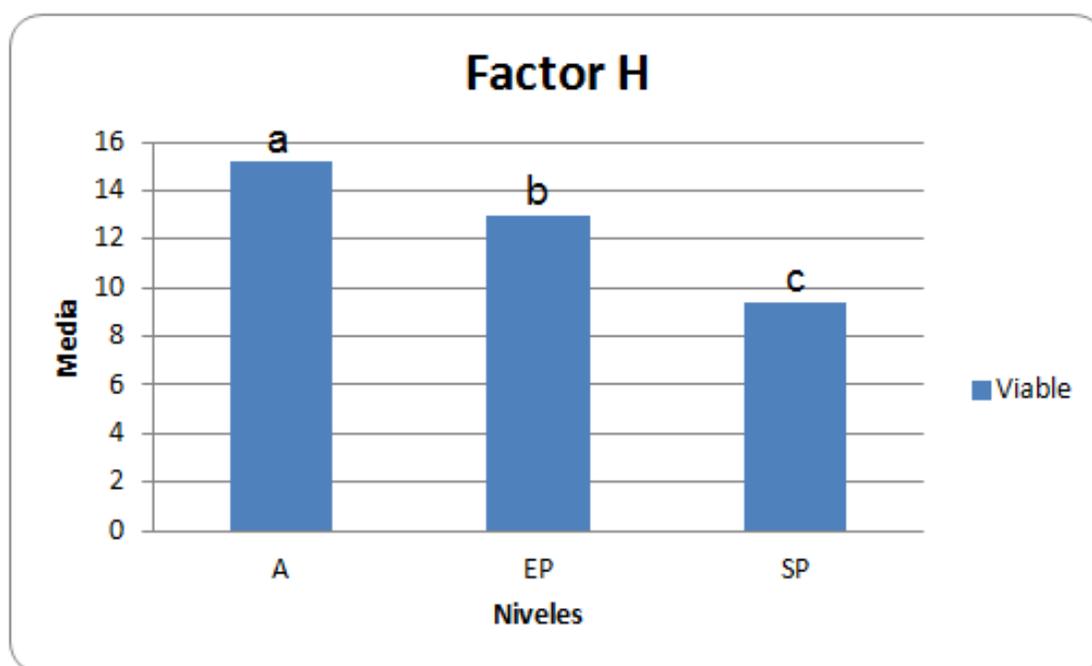


Figura 29: Media de los niveles del factor H de semillas viables en la prueba Tukey

Para el factor T(tiempo de humidificación), en la Tabla 6 y en la Figura 30, se observa que existen diferencias significativas entre las medias de los dos niveles 24 y 48 horas, siendo el mejor, para semillas viables, el nivel 48, por tener la mayor media, obteniéndose así en este nivel el mayor porcentaje de semillas viables, tal como se observa en la Tabla 2. Así como también se observa que el nivel 24 es el que menor media tiene, esto quiere decir que con dicho tratamiento se obtiene el menor porcentaje de semillas viables.

Tabla6: Prueba Tukey para el factor T de semillas viables

FACTOR T	NIVELES	
	48	24
MEDIA	13.3750 <sup>a</sup>	11.6667 <sup>b</sup>

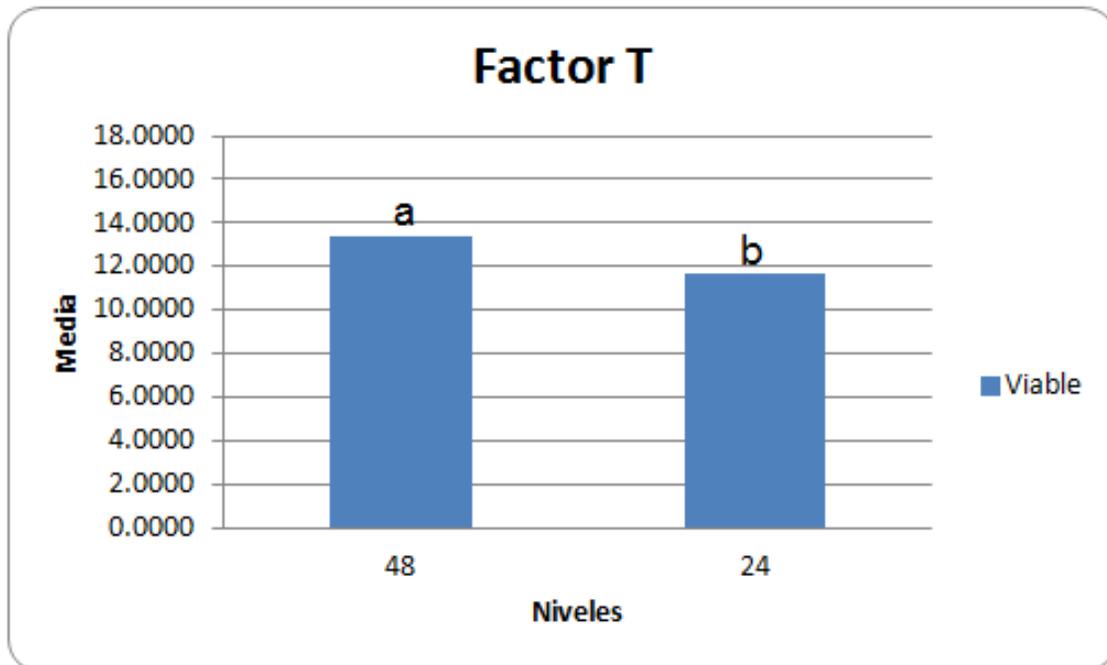


Figura 30: Media de los niveles del factor T de semillas viables en la prueba Tukey

Para el factor I(tiempo de inmersión en tetrazolio),tanto en laTabla7 y Figura 31, de semillas viables, se observa que los niveles 12 y 24 horas, no hay diferencias significativas entre las medias de ambos, esto quiere que si realizo mi prueba con cualquiera de los dos niveles, los resultados van a salir muy semejantes para ambos.

Tabla7: Prueba Tukey para el factor I de semillas viables

FACTOR I	NIVELES	
	12	24
MEDIA	12.7500 <sup>a</sup>	12.2917 <sup>a</sup>

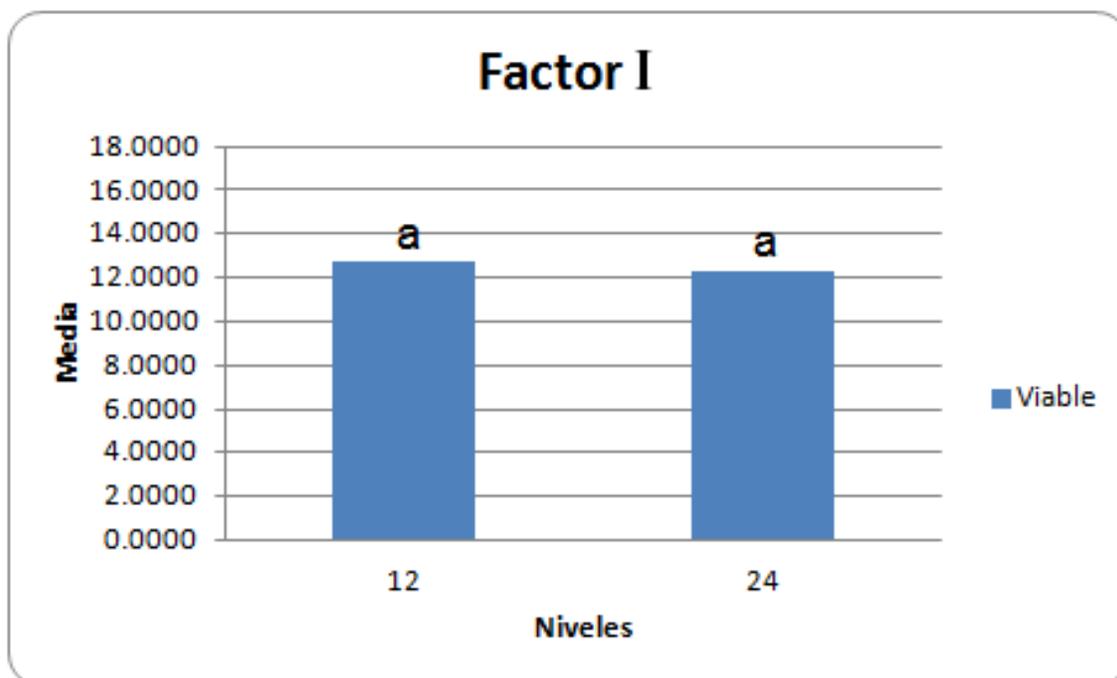


Figura31: Media de los niveles del factor I de semillas viables en la prueba Tukey

## V. CONCLUSIONES

1. La semilla de *Asparagus officinalis* es completa, pues posee testa, endospermo y embrión. En la observación de la superficie externa de la semilla, se observa el funículo como una cicatriz y el micrópilo como una pequeña depresión en la testa. Las semilla tienen dos tipos de forma, achatada y redonda y su tamaño promedio es de 3.8 mm de largo, 3.2 mm de ancho y 2.6 mm de espesor. La testa es de carácter lignificado, de color negro, finamente rugosa y porosa, el endospermo es córneo y en la parte central se encuentra el embrión, este es lineal, paralelo al eje de la semilla respecto al funículo y micrópilo, es de color blanco, de estructura esbelta, filiforme, mide en promedio 3.5 mm y está constituido por tres partes, cotiledón, plúmula y radícula. La radícula se ubica hacia el micrópilo y el cotiledón se orienta hacia la zona calazal y este es de ápice obtuso.
2. Las semillas de *Asparagus officinalis*, tienen una germinación hipogea, iniciándose la germinación en promedio al séptimo día.
3. Estadísticamente los factores principales H(forma de humidificación) y T (tiempo de humidificación) son altamente significativos, siendo los mejores niveles A (remojo en agua) y 48 (horas de humidificación), respectivamente, para obtener eficientemente un mayor porcentaje de semillas viables, y como el factor I (tiempo de inmersión en tetrazolio) resultó no significativo, por cuestiones prácticas se recomienda utilizar el nivel 24 horas, ya que para un laboratorista o analista sería más fácil dejar la muestra en remojo en el tetrazolio y regresar al día siguiente a evaluar.
4. El patrón de tinción recomendado para las semillas de *Asparagus officinalis* es aquel en donde las semillas con el embrión totalmente teñido o con mínimas zonas sin teñir

son consideradas semillas viables, y aquellas cuyo embrión se mantiene intacto o con mínimas zonas teñidas a lo largo son consideradas semillas no viables.

5. Comparando los resultados del conteo entre germinación y viabilidad, los porcentajes de viabilidad de los niveles EP (entre papel) y A (remojo en agua), fueron superiores a los porcentajes de germinación, debido a que en el ensayo de viabilidad no se observa las semillas latentes, cosa que sí se observa en el ensayo de germinación y estas son consideradas dentro de las semillas no germinadas. Pero los del nivel SP (sobre papel), fueron menores al porcentaje de germinación, esto debido a que la forma de humificación fue probablemente la causa por la cual las semillas no imbibieron suficiente humedad para que pudieran absorber tetrazolio y reaccionar mostrando la tinción respectiva. Sin embargo, se obtuvo una excepción en la interacción de niveles SP(sobre papel), 24 horas de humidificación y 48 horas de inmersión en tetrazolio, debido a que es la única interacción de esta categoría que obtuvo mayor tiempo de remojo y mayor tiempo sumergido en el tetrazolio.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Se recomienda para la prueba de tetrazolio en espárrago, el remojo de las semillas en agua debería ser mayor a 48 horas para mejorar la tinción y disminuir el tiempo de inmersión en tetrazolio.
2. Debido al desconocimiento de los protocolos para evaluar la viabilidad de semillas de *Asparagus officinalis*, se recomienda hacer futuras investigaciones que detallen mejor los patrones de tinción en el embrión para clasificarlas como viables o no viables.

## **VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Alonso, JR. 2011. Manual de histología vegetal. Editorial Paraninfo. México. p. 215 y 216
- Arostegui, V; Diaz, M. 1992. Propagación de especies forestales nativas promisoras de Jenaro Herrera (Es). Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana –INIA. Perú.
- Azcon –Bieto, J; Talon M. 2008. Fundamentos de la fisiología vegetal. Mc Graw Hill Interamericana de España. p. 456.
- Barceló, J; Nicolás, G; Sabater, B; Sánchez, R. 2001. Fisiología vegetal. Ediciones Pirámide. p. 331, 333 y 371.
- Bekendam, J;Grob.R. 1980. Manual para evaluación de plántulas en análisis de germinación. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero, Estación de Ensayo de Semillas. España. p. 6, 38-40.
- Camacho, F. 1994. Dormición de semillas. Causas y tratamientos. Editorial Trillas.
- Camacho, F. 2011. Dormición de Semillas. Causas y tratamientos. Editorial Trillas. p. 70.
- Cantos, S. 2003. Semillas hortícolas. Guías de trabajos prácticos. *Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE)*. Argentina. Fecha de consulta: 29 de Octubre del 2013. Disponible en: <http://faa.unse.edu.ar/apuntes/hortic/hortic1.pdf>
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR). 1996. Recolección y manejo de semillas forestales. Curso para profesores “Mejoramiento genético, selección y manejo de fuentes semilleras y de semillas forestales”. Costa Rica. p. 71-73.
- Courtis, A. 2013. Germinación de semillas. Guía de estudios de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Cátedra de Fisiología Vegetal. Argentina. p. 16-18.
- Delgado de la Flor, F; Montauban del Solar, R; Hurtado, F. 1993. Manual de cultivo del espárrago. Proyecto TTA-UNALM. Lima-Perú. p. 9.
- Delouche, J; Wayne, T; Raspel, M; Lienhard, M. 1971. Prueba de viabilidad de la semilla con tetrazol. Estación Experimental Agrícola de la Universidad Estatal de Mississippi. México/ Buenos Aires. p. 1-3.

- Di Rienzo, J. A; Casanoves, F; Gonzalez, L. A; Tablada, E. M; Días, M. P; Robledo, C. W; Balzarini, M. G. 2008. Estadística para las ciencias agropecuarias. 7a ed. Editorial Brujas. Argentina. p. 258-269.
- Font Quer, P. 2001. Diccionario de botánica. Ediciones Península. Barcelona-España.
- García, F. 2003a. Germinación de Semillas. Documento de la Universidad Politecnica de Valencia. Fecha de consulta: 16 de Marzo del 2014. Disponible en:[http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema\\_17.htm](http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_17.htm)
- García, F. 2003b. Latencia de Yemas y Semillas. Documento de la Universidad Politecnica de Valencia. Fecha de consulta: 02 de Abril del 2014. Disponible en:[http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema\\_16.htm#Latencia](http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_16.htm#Latencia) de semillas.
- García, F; Roselló, J; Santamarina, P. 2006. Introducción al funcionamiento de las plantas. Editorial Univ. Politécnica de Valencia. España. p. 158, 163-169.
- Gilles, A. 2007. Germinación, vigor, viabilidad, calidad y mejora de semillas de cebolla (*Allium cepa L.*). Tesis. Universidad Politécnica de Madrid, España.
- Guimarães, M. 1981. Botânica: Morfologia interna das plantas (anatomia). NBL Editora. Brasil. p. 110
- Herrera, J; Alizaga, R; Guevara, E; Jiménez, V. 2006. Germinación y crecimiento de la planta. Vol. 4. Editorial Universidad de Costa Rica. España. p. 18.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, CR). 2010. Taller regional sobre la situación y perspectivas de las Buenas Prácticas Agrícolas en el Sur. Argentina. Fecha de consulta: 19 de Octubre del 2013. Disponible en: [http://www.iica.int/Esp/regiones/sur/argentina/Documents/Sanidad/BPA/Presentaciones/Mejora\\_competitividad\\_ADiaz.pdf](http://www.iica.int/Esp/regiones/sur/argentina/Documents/Sanidad/BPA/Presentaciones/Mejora_competitividad_ADiaz.pdf)
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática).2013.Producción nacional: Enero 2013. Informe técnico N° 03. Perú. Fecha de consulta: 19 de Octubre del 2013. Disponible en: <http://www.pcm.gob.pe/wp-content/uploads/2013/03/01-Produccion-Nacional-Ene-2013.pdf>.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2004. International Rules for Seed Testing. Switzerland. Anexe to chapter 5: Germination (5A-23).
- Jara, L. 1996. Biología de semillas forestales. CATIE. Costa Rica. p. 29.

- López, G. 2007. Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares: (especies silvestres y las cultivadas más comunes). Editorial Paraninfo. España. p. 239-240.
- Martón, JJ. 2013. Análisis morfológico de las semillas mediante modelos basados en la curva cardioide. Ediciones Universidad de Salamanca. España. p. 43-44
- Montes, A. 1977. El cultivo de espárrago en el Perú. Universidad Nacional Agraria la Molina. Programa de Investigaciones en Hortalizas. Perú. p. 8-9.
- Moreira,MA; González,W. 2002.Manejo agronómico yanálisis económico del cultivo de espárrago para condiciones tropicales: Una experiencia de diez años de investigación. Editorial Universidad de Costa Rica. p.133-136
- Moreno, E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 104-106.
- Peretti, A. 1994. Manual para análisis de semillas. Primera edición. Buenos Aires. Hemisferio Sur. p. 109.
- Pill, WG; Frett, JJ; Morneau, DC. 1991. Germination and seedling emergence of primed tomato and asparagus. Seeds under adverse conditions. Delaware *Agricultural Experiment Station*. College of Agricultural Sciences, University of Delaware. Estados Unidos. Fecha de consulta: 22 de Marzo del 2014. Disponible en: <http://hortsci.ashspublications.org/content/26/9/1160.full.pdf>
- Pontificia Universidad Católica de Chile. s.f. Espárrago. Fecha de consulta: 16 de Marzo del 2014. Disponible en: [http://www7.uc.cl/sw\\_educ/hortalizas/html/esparrago/diversidad\\_esparrago.html](http://www7.uc.cl/sw_educ/hortalizas/html/esparrago/diversidad_esparrago.html)
- Quispe, EM. 2012. Morfología, germinación y viabilidad de semillas de *Tigridia* sp (Iridaceae), procedentes de las Lomas de Villa María del Triunfo, Lima. Tesis. Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú. Facultad de Ciencias Departamento de Biología.
- Regalado, F. 1992. Espárrago: Conducción de viveros. Colegio de Ingenieros del Perú. Consejo Departamental de Lambayeque. Perú. p. 14.
- Reyes, P. 2007. Diseños de experimentos factoriales 2K. International Conference on Information Communication and Management (*ICICM*).Fecha de consulta: 02 de Abril del 2014. Disponible en:

w.icicm.com/files/EXPERIMENTOS\_FACTORIALES\_2K.doc

- Rivera, I;Rodriguez, JP. 1999. Perfil de mercado: Espárrago. Boletín Técnico INTA San Pedro. p. 4.
- Robbins, WW; Borthwick, HA. 1925. Development of the seed of *Asparagus officinalis*. Botanical Gazette. Vol. 80.Published by: The University of Chicago Press. Estados Unidos.p.426.
- Salisbury, F. & Ross, C. 1994. Fisiología vegetal. Grupo editorial Iberoamérica. México. p. 415.
- SENASA. 2007. Manual de Análisis de Calidad de Semillas de acuerdo a las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas (ISTA). Perú. Capítulo E. p. 2-9.
- Sierra,J. 2005. Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros.2ed. Universidad de Antioquia. Colombia. p. 132 y 133.
- SINAVIMO (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas). Espárrago. Buenos Aires – Argentina. Fecha de consulta: 12 de Octubre del 2013. Disponible en: <http://www.sinavimo.gov.ar>
- Soplín, H; Beingolea L. 1986. Curso de actualización a nivel profesional.Convenio INIPA-UNA/IEE, IEA. p. 66, 67 y 81.
- Sotomayor, D; Jiménez, P. 2008. Condiciones meteorológicas y dinámica vegetal del ecosistema costero lomas de Atiquipa (Caravelí – Arequipa) en el sur del Perú. Ecología aplicada, Vol.7 (1,2). p.1-8
- Stevens, PF. 2001. Angiosperm Phylogeny Website (APG). Versión 12, Julio 2012. Fecha de consulta: 15 de Octubre del 2013. Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Taiz, L; Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal. Vol. 2. Publicación de la Universitat Jaume I. p.140.
- Universidad de Granada. s.f. Diseños factoriales con tres factores. Capitulo 6. Fecha de consulta: 04 de Abril del 2014. Disponible en: <http://www.ugr.es/~bioestad/guiaspss/practica7/ArchivosAdjuntos/Factorial%20tres%20factores.pdf> Universidad de granada. España

- Universidad Nacional de Educación a Distancia. 2011. Diseños de investigación y análisis de datos. Tema 7. Madrid- España. Fecha de consulta: 04 de Abril del 2014. Disponible en:  
<http://www.psicocode.com/resumenes/tema7disenos.pdf>
- Universidad de Zaragoza. s.f. Análisis factorial. España. Fecha de consulta: 04 de Abril del 2014. Disponible en:  
<http://ciberconta.unizar.es/LECCION/factorial/FACTORIALEC.pdf>
- Universidad del Zulia. 1999. Germinación y emergencia de cuatro espárragos (*Asparagus spp.*) usados como follaje de corte. Revista de la Facultad de Agronomía. Fecha de consulta: 20 de Marzo del 2014. Disponible en:  
[http://www.revfacagronluz.org.ve/v16\\_2/v162z004.html](http://www.revfacagronluz.org.ve/v16_2/v162z004.html)
- Varela, SA; Arana, V. 2011. Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Cuadernillo N°3. Serie técnica: “Sistemas Forestales Integrados” Área Forestal - INTA EEA Bariloche.  
[http://inta.gob.ar/documentos/cuadernillo-no3-latencia-y-germinacion-de-semillas.-tratamientos-pregerminativos/at\\_multi\\_download/file/INTA\\_latencia.pdf](http://inta.gob.ar/documentos/cuadernillo-no3-latencia-y-germinacion-de-semillas.-tratamientos-pregerminativos/at_multi_download/file/INTA_latencia.pdf)
- Vázquez, C; Orozco, A; Rojas, M; Sánchez, ME; Cervantes, V. 1997. La reproducción de las plantas: Semillas y meristemas. Volumen 157 de la colección: La ciencia para todos. México. Fecha de consulta: 17 de Abril del 2014. Disponible en:  
[http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/157/htm/sec\\_5.htm](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/157/htm/sec_5.htm)

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: Medidas de las semillas y del embrión de *Asparagus officinalis*

N°	Semillas			Embrión
	Largo (mm)	Ancho (mm)	Espesor (mm)	Largo (mm)
1	4.0	3.1	2.8	3.9
2	4.2	3.8	2.6	4.0
3	3.8	3.5	2.9	3.2
4	3.9	3.6	2.8	3.7
5	3.9	3.2	2.5	3.8
6	3.8	3.5	2.6	3.5
7	4.0	3.0	2.5	3.5
8	3.9	3.1	2.8	3.7
9	3.7	2.9	2.2	3.6
10	3.5	2.8	2.1	3.3
11	3.6	3.1	2.8	3.2
12	3.8	3.1	2.2	3.6
13	3.9	3.4	2.8	3.7
14	3.8	3.6	3.0	3.7
15	3.2	3.1	3.0	3.1
16	3.1	2.9	2.7	3.0
17	3.8	3.2	2.4	3.5
18	3.9	3.1	2.5	3.5
19	4.1	3.0	2.3	3.8
20	3.9	3.2	2.9	3.6
<b>Prom.</b>	<b>3.8</b>	<b>3.2</b>	<b>2.6</b>	<b>3.5</b>

**ANEXO 2: Procedimiento ANVA de la prueba de tetrazolio en semillas de *Asparagus officinalis***

Clasificación de información de niveles

Factores	Nº	Niveles
H	3	A EP SP
T	2	24 48
I	2	12 24

Número de observaciones: 48

**ANEXO 3: Variable dependiente: Viable**

Sum of

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	350.2291667	31.8390152	8.83	<.0001
Error	36	129.7500000	3.6041667		
Corrected Total	47	479.9791667			

R-Square	CoeffVar	Root MSE	Viable Mean
0.729676	15.16244	1.898464	12.52083

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
H	2	275.7916667	137.8958333	38.26	<.0001 **
T	1	35.0208333	35.0208333	9.72	0.0036 **
I	1	2.5208333	2.5208333	0.70	0.4085 ns
H*T	2	28.7916667	14.3958333	3.99	0.0271 *
H*I	2	0.5416667	0.2708333	0.08	0.9278 ns
T*I	1	3.5208333	3.5208333	0.98	0.3296 ns
H*T*I	2	4.0416667	2.0208333	0.56	0.5757 ns

#### ANEXO 4: Variable dependiente: No viable

##### Sum of

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	350.2291667	31.8390152	8.83	<.0001
Error	36	129.7500000	3.6041667		
Corrected Total	47	479.9791667			

R-Square	CoeffVar	Root MSE	Noviable Mean
0.729676	15.21307	1.898464	12.47917

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
H	2	275.7916667	137.8958333	38.26	<.0001 **
T	1	35.0208333	35.0208333	9.72	0.0036 **
I	1	2.5208333	2.5208333	0.70	0.4085 ns
H*T	2	28.7916667	14.3958333	3.99	0.0271 *
H*I	2	0.5416667	0.2708333	0.08	0.9278 ns
T*I	1	3.5208333	3.5208333	0.98	0.3296 ns
H*T*I	2	4.0416667	2.0208333	0.56	0.5757 ns

ns diferencia no significativa

\* diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ )

\*\* diferencia altamente significativa ( $p \leq 0,001$ )

## ANEXO 5: Prueba Tukey para semillas viables

### ANEXO 5.1: Factor H

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	3.604167
Critical Value of Studentized Range	3.45676
Minimum Significant Difference	1.6406

#### Mean N H

A	15.1875	16	A
B	13.0000	16	EP
C	9.3750	16	SP

### ANEXO 5.2: Factor T

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	3.604167
Critical Value of Studentized Range	2.86818
Minimum Significant Difference	1.1115

#### Mean N T

A	13.3750	24	48
B	11.6667	24	24

### **ANEXO 5.3: Factor I**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	3.604167
Critical Value of Studentized Range	2.86818
Minimum Significant Difference	1.1115

#### **Mean N I**

A	12.7500	24	12
A			
A	12.2917	24	24

(Medias con la misma letra no son significativamente diferentes)

### **ANEXO 6: Prueba Tukey para semillas no viables**

#### **ANEXO 6.1: Factor H**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	3.604167
Critical Value of Studentized Range	3.45676
Minimum Significant Difference	1.6406

#### **Mean N H**

A	15.6250	16	SP
B	12.0000	16	EP
C	9.8125	16	A

### **ANEXO 6.2: Factor T**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	3.604167
Critical Value of Studentized Range	2.86818
Minimum Significant Difference	1.1115

#### **Mean N T**

A	13.3333	24	24
B	11.6250	24	48

### **ANEXO 6.3: Factor I**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	3.604167
Critical Value of Studentized Range	2.86818
Minimum Significant Difference	1.1115

#### **Mean N I**

A	12.7083	24	24
A			
A	12.2500	24	12

(Medias con la misma letra no son significativamente diferentes)