

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

EFEECTO DEL ACIDO GIBERELICO Y AGUA A 4° C EN LA GERMINACIÓN  
DE LAS SEMILLAS DE GUANABA (*Annona muricata* L.)

FRANCISCO JOSE AVILA LEON

Guatemala, mayo del 2005

b

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

EFFECTO DEL ACIDO GIBERELICO Y AGUA A 4° C EN LA GERMINACIÓN  
DE LAS SEMILLAS DE GUANABA (*Annona muricata* L.)

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

FRANCISCO JOSE AVILA LEON

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADEMICO DE

LICENCIADO

Guatemala, mayo del 2005

## UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

## RECTOR

Dr. M.V. LUIS ALFONSO LEAL MONTERROSO

## JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	DR. ARIEL ABDERRAMAN ORTIZ LOPEZ
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. ALFREDO ITZEP MANUEL
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. MANUEL DE JESUS MARTINEZ OVALLE
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. ERBERTO RAUL ALFARO ORTIZ
VOCAL CUARTO	Maestro JUVENCIO CHOM CANIL
VOCAL QUINTO	Maestro BAYRON GEOVANY GONZALEZ CHAVAJAY
SECRETARIO	Ing. Agr. PEDRO PELAEZ REYES

d

Guatemala, mayo del 2005

Honorable junta directiva  
Honorable tribunal examinador  
Facultad de agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Presente

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecida en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración el trabajo de tesis titulado

EFECTO DEL ACIDO GIBERELICO Y AGUA A 4° C EN LA GERMINACIÓN  
DE LAS SEMILLAS DE GUANABA (*Annona muricata* L.)

Presentado como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en sistemas de producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

En espera de su aprobación, me es grato presentarles mi agradecimiento.

Atentamente,

Francisco José Ávila León

## ACTO QUE DEDICO

A:

- DIOS  
Todopoderoso por concederme la oportunidad de alcanzar una de las metas más importantes de mi vida.
- MIS PADRES  
Francisco Ávila Jiménez  
Flor María León Salazar de Ávila  
Por su amor, consejos y apoyo incondicional, en todos estos años, e aquí el fruto de su esfuerzo, los amo mucho.
- MIS HERMANOS  
Flor María y Rubén, mis compañeros de toda la vida los quiero mucho.
- MI SOBRINO  
José Eduardo, el niño más lindo de este mundo.
- KARIN  
Por su cariño y amor durante este tiempo.
- MIS TIAS  
Con especial cariño a Tía Gis, Nelly y Cris.
- MI PRIMO  
Johnny José Fung Acón, por ser mi mejor amigo y un ejemplo a seguir como profesional.
- MIS AMIGOS  
Especialmente a Nancy, Sheny y Carol Müller.
- MIS PADRINOS  
DE GRADUACIÓN  
Ing. Agr. Karin E. Calderón Müller.  
Dr. Johnny José Fung Acón.

f

TESIS QUE DEDICO

A:

GUATEMALA.

LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

LA FACULTAD DE AGRONOMÍA.

MIS PAPAS

KARIN ELIZABETH CALDERON MÜLLER.

JOHNNY JOSE FUNG ACON.

TODOS MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS.

## AGRADECIMIENTOS

A:

El Ing. Agr. Francisco Javier Vásquez Vásquez, gracias por el apoyo y la confianza depositada en mi persona, pero sobre todo por compartir sus conocimientos para bien de mi formación profesional.

Mis compañeros, por su amistad y ayuda a lo largo de mi carrera y en la ejecución del presente estudio.

## INDICE GENERAL

CONTENIDO	página
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3. MARCO TEORICO	4
3.1 Marco Conceptual	4
3.1.1 Origen y diversidad de la especie	4
3.1.2 Características botánicas	6
3.1.3 La semilla	7
3.1.4 La semilla madura	7
3.1.5 Partes de la semilla	8
A. Embrión	8
B. Tejidos de almacenamiento	8
C. Cubiertas de la semilla	8
3.1.6 El proceso de germinación	9
3.1.7 Reproducción sexual	11
3.1.8 Morfología, anatomía de la semilla y composición química del endospermo de <i>Annona muricata</i> L.	12
3.1.9 La germinación	15
3.1.10 Etapa de activación	16
3.1.10.1 Imbibición de agua	16
3.1.10.2 Síntesis de enzimas	17
3.1.10.3 Elongación de las células y emergencia de la raíz	17
3.1.11 La temperatura	17

3.1.12 Factores que inhiben la germinación de las semillas	18
3.1.12.1 La dormancia de las semillas	18
3.1.12.2 Dormancia innata	18
A. Dormancia de cubierta de la semilla	19
B. Dormancia del embrión	19
3.1.13 Dormancia forzada	19
3.1.14 Dormancia inducida	19
3.1.15 Inhibidores químicos	20
3.1.16 Reguladores de crecimiento de las plantas	21
3.1.17 Aspectos históricos de las giberélinas	21
3.1.18 Efectos biológicos de las giberélinas	22
3.1.19 Mecanismos de acción de la giberéлина	22
3.1.19.1 Acido giberélico (GA3)	23
3.1.19.2 Giberélinas	23
3.1.20 Prueba de germinación	23
3.1.20.1 Pruebas directas	24
3.1.20.2 Pruebas indirectas	24
3.1.21 Antecedentes del uso de ácido giberélico en cultivos	24
A. Aceleración de la germinación y el crecimiento inicial de las plántulas de Macadamia ( <i>Macadamia integrifolia</i> )	24
B. Estudio sobre el letargo del <i>A. diversifolia</i> Saff. ( <i>Annonaceae</i> )	25
C. Efecto del ácido giberélico y el método de siembra en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de anona colorada <i>A. reticulata</i> L.	27
3.1.22 Prueba de tetrazolio	28
A. Principio	28
B. Procedimiento	29
C. Valuación	29

D. Ventajas y desventajas	30
3.1.23 Otras pruebas bioquímicas para viabilidad de semilla.	30
3.1.23.1 Método de coloración vital	30
3.1.23.2 Método de actividad enzimática	30
3.1.24 Método de Enzimas	
3.1.24.1 Catalasas	30
3.1.24.2 Peroxidasa	31
3.1.24.3 Pruebas de actividad de deshidrogenadas	31
A. Método selenita	31
3.1.24.4 Prueba de cloruro férrico para daño mecánico	31
3.1.24.5 Prueba de acetato indoxílico	32
A. Para daño en el pericarpio	32
3.1.24.6 Pruebas de conductividad	32
3.1.24.7 Prueba de embrión cortado	32
3.1.24.8 Prueba de rayos x	33
4. MARCO REFERENCIAL	34
4.1 Procedencia de las semillas a utilizar en el experimento	34
4.2 Lugar de experimento	35
5. OBJETIVOS	37
5.1 Objetivo general	37
5.2 Objetivos específicos	37
6. HIPÓTESIS	38
7. METODOLOGÍA	39

7.1	Material experimental	39
7.1.1	Materiales y métodos	39
7.2	Material vegetal	39
7.2.1	Procedencia de la semilla utilizada	39
7.3	Metodología experimental	39
7.3.1	Tratamientos	40
7.3.2	Unidad experimental	41
7.3.3	Modelo estadístico	41
7.4	Manejo del experimentos	42
7.4.1	Extracción y tratamiento de la semilla	42
7.4.2	Preparación de la solución de tetrazolio	42
7.4.3	Preparación de la solución de ácido giberélico	43
7.4.4	Aplicación del ácido giberélico	43
7.4.5	Germinación de la semilla	43
7.4.6	Pruebas de germinación de la semilla con diferentes periodos de almacenamiento	43
7.5	Variables de respuesta	43
a.	Porcentaje de germinación	43
b.	Velocidad de germinación	43
c.	Análisis económico	44
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
8.1	Porcentaje de germinación	45
8.2	Velocidad de germinación	47
9.	CONCLUSIONES	51
10.	RECOMENDACIONES	52
11.	BIBLIOGRAFÍA	53

## INDICE DE CUADROS

No.	CONTENIDO	Paginas
1.	Distribución de <i>Annona muricata</i> L., en Guatemala	5
2.	Clasificación taxonómica de <i>Annona muricata</i> L.	6
3.	Porcentaje de germinación de semillas frescas de <i>Macadamia</i> luego de diversos tratamientos.	25
4.	Germinación (%) de semilla de <i>annona colorada</i> <i>A. reticulata</i> L., tratadas con GA3	28
5.	Distribución y aleatorización de los tratamientos evaluados	41
6.	Análisis de varianza para el porcentaje de germinación en semillas de guanaba <i>A. muricata</i> L.	45
7.	Prueba de Duncan, para los tratamientos en los que se utilizó días de almacenamiento en semillas de guanaba <i>A. muricata</i> L.	46
8.	Prueba de Duncan, para los tratamientos en los que se utilizó ácido giberélico en semillas de guanaba <i>A. muricata</i> L.	47
9.	Análisis de varianza para la velocidad de germinación en semillas de guanaba <i>A. muricata</i> L.	47
10.	Prueba de Duncan, para el calculo de la velocidad de germinación utilizando días de almacenamiento en semillas de guanaba <i>A. muricata</i> L.	48
11.	Prueba de Duncan, para el calculo de la velocidad de germinación utilizando concentraciones de ácido giberélico en semillas de guanaba <i>A. muricata</i> L.	49
12.	Análisis económico del estudio	50

## INDICE DE FIGURAS

No.	CONTENIDO	Paginas
1.	Distribución mundial de <i>Annona muricata</i> L.	4
2.	Fórmula estructural del ácido giberélico	23
3.	Ubicación del Municipio de Sanarate	34
4.	Ubicación de la Ciudad Universitaria	36

Efecto del Acido Giberélico y Agua a 4° C en la germinación  
de las semillas de guanaba (*Annona muricata* L.)

Effect of the Gibberellic acid and Water at 4° C, on the germination of custard apple seeds (*Annona muricata* L.)

RESUMEN

Se estima que hay 2,200 especies de Anonáceas en el mundo. Estos frutales en Guatemala tienen una notable diversidad y adaptación a diferentes ambientes, y son un material rico para trabajos de hibridación, selección y propagación vegetativa. El alto valor nutritivo de los frutos, sus sabores y aromas muy distintos, así como de formas y colores atractivos, justifican esos esfuerzos.

En Guatemala la guanaba *Annona muricata* L., no se cultiva a escala comercial debido principalmente a su baja producción, (12 a 20 frutos por árbol por año), esto debido al desconocimiento del cultivo y principalmente a limitantes como la poca viabilidad de las semillas y problemas en la germinación.

En el presente estudio, se evaluó la respuesta del efecto del ácido giberélico, agua a 4° centígrados y diferentes tiempos de almacenamiento, en el mejoramiento de la viabilidad de las semillas de guanaba *A. muricata* L. La investigación se realizó en el laboratorio de Análisis de Calidad de Semilla, ubicado en el primer nivel del edificio T8 de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala. La semilla de guanaba proveniente del municipio de Sanarate, del Departamento del Progreso, recolectada en el mes de junio del año 2004.

La metodología utilizada, consistió en someter la semilla de guanaba a diferentes concentraciones de ácido giberélico y agua a 4° centígrados; así mismo la semilla fue almacenada en diferentes periodos (0 días, 15 días, 30 días y 80 días) a temperatura ambiente (22° centígrados).

Para la ejecución del experimento, se trabajo con 16 tratamientos, con 4 repeticiones distribuidos en un diseño Completamente al Azar y con arreglo combinatorio con dos factores, siendo la unidad experimental 25 semillas de guanaba.

Las variables de respuesta evaluadas fueron: porcentaje de germinación y velocidad de germinación. El trabajo se enmarcó dentro de los siguientes objetivos: Evaluar el efecto de diferentes sustancias (ácido giberélico y agua a 4° centígrados) y los tiempos de almacenamiento, en la viabilidad de la semilla de guanaba *A. muricata* L., bajo condiciones de laboratorio.

De acuerdo a los resultados encontrados en este estudio demostraron que: La concentración de 5,000 ppm superó a la de 1,000 ppm; siendo la primera de 58% y la segunda de 47.88% notándose un claro efecto del ácido giberélico. El siguiente tratamiento consistió en colocar la semilla a 4° centígrados reportando un 55.56% de germinación, en el cual no se encontró diferencias significativas con el tratamiento de 5,000 ppm descrito en el acápite antes mencionado.

En los tratamientos que se usó el tiempo de almacenamiento, el mejor tratamiento fue el de 80 días de almacenamiento, el cual reportó una velocidad de germinación de 76 días, dicho tratamiento fue el que reportó la menor velocidad de germinación, el tratamiento de treinta días reportó una velocidad de 143 días y el de 15 días reportó una velocidad de germinación de 171 días.

## 1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las especies del género *Annona* de la familia *Annonaceae*, han tenido su origen en América tropical, subtropical y otras en África; sin embargo, su cultivo se ha extendido a todos los continentes (17).

Entre las numerosas especies del género *Annona*, las más conocidas son: *A. reticulata* L., *A. squamosa* L., *A. cherimolla* Mill y *A. muricata* L., siendo esta última la denominada guanaba en los países de habla hispana, y la que presenta las mejores características para su industrialización (17).

La guanaba se encuentra ampliamente diseminada en los trópicos siendo muy apreciada por sus frutos. No se cultiva en escala comercial debido principalmente a su baja producción, (12 a 20 frutos por árbol por año), esto debido al desconocimiento del cultivo. Guatemala por ubicarse tanto en el área tropical como subtropical, así como por sus rasgos topográficos adquiere condiciones ecológicas de gran significancia, importantes para el desarrollo de especies vegetales incluyendo la guanaba *Annona muricata* L., cuyo cultivo esta marginado debido a la falta de asesoría técnica.

La guanaba es una fruta de gran potencial económico y de grandes propiedades alimenticias. A pesar de ser un recurso frutal promisorio, se han establecido muy pocas plantaciones comerciales. Lo anterior indica que se hace necesario incrementar los volúmenes de producción para suplir las necesidades del mercado, aumentando las áreas sembradas o incrementando los rendimientos por árbol. En los últimos años se ha llegado a considerar como un frutal digno de atención por las posibilidades agroindustriales que presenta en las regiones cálidas del mundo.

En esta investigación se evaluó principalmente el efecto del ácido giberélico, agua a 4° centígrados y días de almacenamiento, en el mejoramiento de la viabilidad de la semilla.

La investigación se realizó en el laboratorio de Análisis de Calidad de Semilla, ubicado en el primer nivel del edificio T8 de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

La metodología utilizada, consistió en someter la semilla de guanaba a diferentes concentraciones de ácido giberélico y agua a 4° centígrados; así mismo la semilla fue almacenada en diferentes periodos (0 días, 15 días, 30 días y 80 días) a temperatura ambiente (22° centígrados); para lo cual se utilizó un diseño Completamente al Azar con arreglo combinatorio. Las variables de respuesta en esta investigación fueron: Porcentaje de germinación, Velocidad de germinación y Análisis económico.

Los resultados encontrados en esta investigación demostraron que, los tratamientos en los que se utilizó ácido giberélico, el mejor tratamiento reportó en promedio un porcentaje de germinación de 58% utilizando 5,000 ppm, siguiéndole el tratamiento con agua a 4° centígrados en el que se observó un porcentaje de germinación del 55.56%. El tratamiento de 1,000 ppm reportó un 47.88% de germinación y el testigo un 44.88%.

En los tratamientos que se usó días de almacenamiento; el mejor tratamiento fue el de 80 días con una velocidad de germinación de 76 días, el tratamiento de treinta días reportó una velocidad de 143 días, quince días y cero días de almacenamiento reportaron una velocidad de 171 días y 186 días.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según el INE (2004), Guatemala reporta 822 fincas que producen guanaba *Annona muricata* L. sin conocimiento técnico, la superficie cultivada; con plantación en edad productiva es de 30 manzanas y no productivas es de 9 manzanas; el número de plantas dispersas es de 2,719 y la producción obtenida es de 928 quintales. Con estos datos podemos observar que Guatemala tiene muchas limitantes para la producción de guanaba (16).

Entre las limitantes importantes del cultivo de guanaba *Annona muricata* L. tres parecen ser las más notables, problemas en la germinación, dormancia y el crecimiento inicial de las plántulas, los cuales se han tratado de solucionar de diferentes maneras a través del uso de reguladores del crecimiento además de otras técnicas como la escarificación y remojo en agua.

Los investigadores buscan incrementar la viabilidad de la semilla, así como disminuir el periodo de germinación y producir plántulas en menor tiempo, en la búsqueda de opciones para su producción, se ha recurrido a usar los reguladores de crecimiento (ácido giberélico GA3) que estimula la germinación de ciertas especies de semillas que no son viables.

En ese sentido es de gran importancia realizar investigaciones apoyándose en técnicas pregerminativas ya que a nivel nacional la investigación científica sobre la viabilidad de la semilla de esta especie es escasa. Esta limitante dificulta la difusión de paquetes tecnológicos para las diferentes regiones donde se localiza la guanaba; y por ende su protección y comercialización.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. MARCO CONCEPTUAL

##### 3.1.1. Origen y diversidad de la especie

La mayoría de las especies del género *Annona* de la familia Annonaceae, han tenido su origen en América tropical y subtropical; otras lo son de África, y su cultivo se ha extendido a todos los continentes (18).

La guanaba es oriunda y muy común en América tropical y las islas del Caribe. De América fue llevada a otros países y continentes, como China, Australia y África. Se cultiva a menos de 300 m de altura sobre el nivel del mar en suelos variados y requiere alrededor de 100 mm. de precipitación anual. Es muy susceptible a las heladas, la distribución mundial de *Annona muricata* L., se presenta en la figura 1 (12).

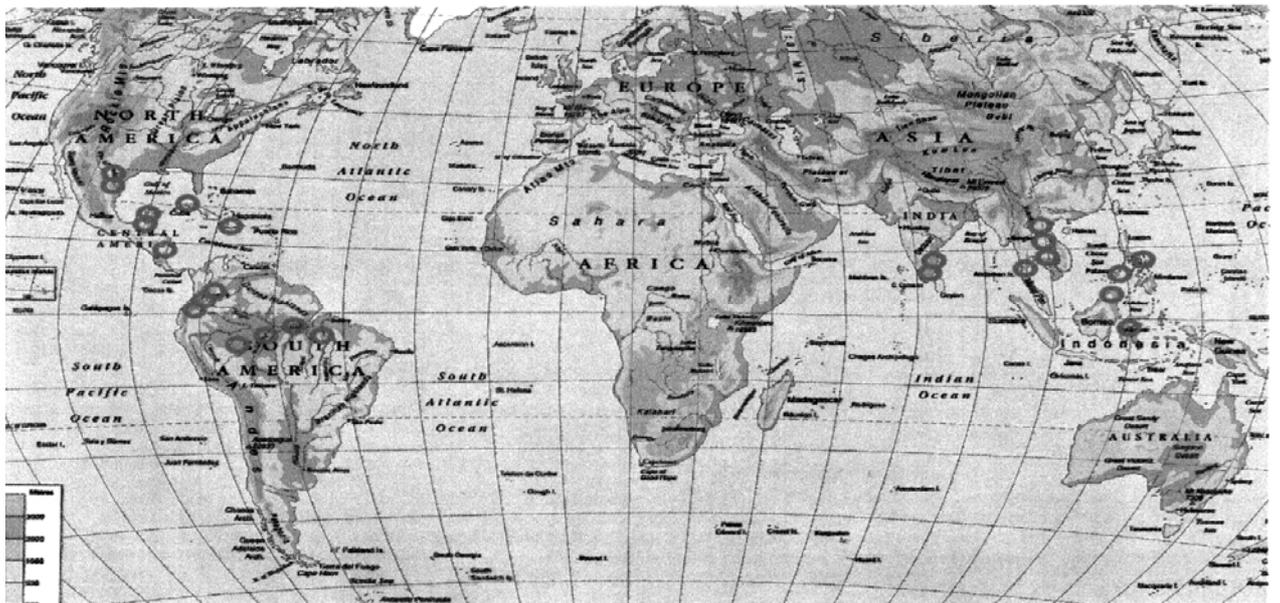


Figura 1. Distribución mundial de *Annona muricata* L. (Fuente Bridg 2000)

Es la familia más grande en el orden Magnoliales con alrededor de 130 géneros y 2,300 especies, se centra en los Trópicos del Viejo Mundo (9,29).

Según Lira de Parra (17), entre las numerosas especies del género *Annona*, las más conocidas son: *A. reticulata* L., *A. cherimila* Mill y *A. muricata* L., siendo esta última la denominada guanaba en los países de habla hispana, y la que presenta las mejoras características para su industrialización. En el cuadro 1, se puede observar la distribución de *Annona muricata* L., en Guatemala y en el cuadro 2, la clasificación taxonómica de *Annona muricata* L.

Cuadro 1. Distribución de *Annona muricata* L. en Guatemala. (Superficie en hectárea y producción en kilogramos). Fuente INE 2004

Departamento y cultivo	Número de Fincas	Superficie cultivada			Número de Plantas dispersas	Producción Obtenida (kg)
		Total (ha)	Con Plantación en edad			
			Productiva (ha)	No Productiva (ha)		
Guatemala	12	2.1	1.4	1.4	31	772.73
El Progreso	39	0	0	0	121	1,954.55
Sacatepéquez	1	1.4	0	1.4	0	0
Chimaltenango	5	0	0	0	22	272.73
Escuintla	70	0	0	0	403	3,454.55
Santa Rosa	51	2.8	1.4	1.4	97	2,863.44
Sololá	0	0	0	0	0	0
Totonicapán	0	0	0	0	0	0
Quetzaltenango	56	1.4	1.4	0	119	2,136.36
Suchitepéquez	35	0	0	0	87	772.73
Retalhuleu	114	2.1	1.4	0.7	246	3,272.73
San Marcos	31	9.1	9.1	0	132	3,590.91
Huhuetenango	5	0	0	0	11	136.36
Quiché	13	0	0	0	60	272.73
Baja Verapaz	42	0	0	0	152	1,636.36
Alta Verapaz	109	2.8	2.8	0	409	6,136.36
Petén	96	1.4	0.7	0.7	449	7,727.27
Izabal	50	2.8	2.8	0.7	133	3,409.09
Zacapa	26	0	0	0	47	818.18
Chiquimula	35	0.7	0.7	0	120	1,272.73
Jalapa	8	0	0	0	27	181.82
Jutiapa	24	0	0	0	53	1,500.0
Total Republica	822	26.6	21.7	5.6	2,719	42,181.83

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Annona muricata* L. (Fuente Cronquist 1884)

Reino	Plantae
Sub-reino	Embryobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Sub-clase	Magnolidae
Orden	Magnoliales
Familia	Annonaceae
Género	<i>Annona</i>
Especie	<i>Annona muricata</i> L.
Nombre Común	Guanaba

### 3.1.2 Características botánicas

Según Barahona (1) El árbol tiene 5-8 metros de altura, tallo único y ramificación simétrica. La fructificación comienza entre 3-5 años y alcanza su pleno desarrollo a los 6-8 años, según las condiciones de clima y suelo. Las hojas son oblongas o elípticas, coriáceas, con el haz de color verde brillante y el envés amarillo mate. Su longitud es de 6-18 centímetros.

Las flores, hermafroditas, se forman sobre ramitas cortas auxiliares o directamente sobre el tronco. Poseen tres sépalos color verde oscuro y seis pétalos de color cremoso. Los estambres son numerosos y dispuestos alrededor de los pistilos. Tienen abundantes ovarios (1).

Indica Villamil (39), el fruto es de forma ovoide, acorazonada o irregular, de color verde oscuro brillante, cuando tierno, y verde mate cuando está maduro. Su longitud varía entre 15-30 centímetros y su diámetro entre 10-20 centímetros; puede llegar a pesar cuatro kilogramos o más.

La corteza es débilmente coriácea, erizada de espinas carnosas y de sabor amargo. La pulpa es blanca, blanda, carnosa, jugosa de sabor muy agradable y ligeramente ácida.

El fruto verde presenta olor fuerte, el cual se torna suave y agradable a medida que avanza la maduración. La pulpa contiene numerosas semillas alargadas, de forma ovoide y comprimida con endospermo de construcción complicada y variable, de color oscuro brillante, con una longitud aproximada de dos centímetros (39).

### 3.1.3 La semilla

La semilla es el primordio seminal fecundado y maduro. Los tejidos que formaban la nucela, que estaban agrupados en dos capas, primaria y secundaria, se transforman respectivamente en tegmen (interior) y testa (exterior), que son las dos cubiertas de la semilla, cuyo conjunto forma el epispermo. En el interior de la semilla se encuentra el embrión, procedente de la fecundación del gameto femenino (oosfera) por el masculino (núcleo espermático); su forma es la de una plantita en miniatura. Rodeando al embrión se encuentra el endospermo o albumen, con funciones de reserva. A veces entre el epispermo y el endospermo se desarrolla un tejido de reserva que se denomina perispermo.

En el embrión se puede distinguir la gémula o yema Terminal del brote, una radícula o raíz inicial y los cotiledones, en número de uno, dos o más. Los cotiledones son las hojas iniciales y pueden tener funciones de asimilación fotosintética en el inicio de la germinación, funciones de reserva o ambas.

En algunas especies, al germinar las semillas los cotiledones quedan bajo tierra (germinación hipogea), ejerciendo en este caso funciones de reserva solamente. Si los cotiledones emergen a la luz en la germinación, ésta se denomina epigea (20).

### 3.1.4 La semilla madura

Según Hartman y Kester, Botánicamente, la semilla de las angiospermas es un óvulo maduro, encerrado dentro del ovario o fruto. Las semillas y los frutos de las diferentes especies varían mucho de aspecto, forma, tamaño, situación y estructura del embrión, así como en la presencia de tejidos de almacenamiento. Esas diferencias son útiles para su identificación. Desde el punto de vista del manejo de la semilla, no siempre es posible separarla del fruto, ya que a veces forman una unidad. En esos casos, el fruto mismo se trata como “semilla” como ocurre con el maíz y el trigo (14).

### 3.1.5 Partes de la semilla

La semilla tiene tres partes básicas: (a) el embrión, (b) los tejidos de almacenamiento de alimentos y (c) las cubiertas de la semilla.

#### A. Embrión

El embrión es una nueva planta que resulta de la unión, durante la fertilización, del gameto masculino con el femenino. Su estructura básica consiste en un eje con puntos de crecimiento en cada extremo, uno para el tallo y uno para la raíz y una o más hojas seminales (cotiledones) fijadas en el eje embrionario. Las plantas se clasifican según el número de cotiledones. Las plantas monocotiledóneas tienen un solo cotiledón, las dicotiledóneas (como el frijol o el durazno) tienen dos y las gimnospermas (como el pino y el Ginkgo) pueden tener hasta quince.

#### B. Tejidos de almacenamiento

Los tejidos de almacenamiento de la semilla pueden ser los cotiledones, el endospermo, el perispermo, o en las gimnospermas, el gametofito femenino haploide. Las semillas en las cuales el endospermo es grande y contiene la mayor parte del alimento almacenado se les llama semillas albuminosas; a aquellas que carecen de endospermo, o bien está reducido a una capa delgada que rodea al embrión, se les llama semillas exalbuminosas. En el último caso, la reserva alimenticia está en los cotiledones y el endospermo fue digerido por el embrión durante su desarrollo (14).

El perispermo, que se origina en la nucela, ocurre en unas cuantas familias de plantas como las Chenopodiaceae y la Caryophyllaceae, durante la formación de la semilla, es digerida por el endospermo en desarrollo.

#### C. Cubiertas de la semilla

Las envolturas de la semilla pueden estar formadas por las cubiertas de la misma, por los restos de la nucela y a veces por parte del fruto. Las cubiertas de la semilla, por lo común son una o dos (raramente tres) y se derivan de los tegumentos del óvulo.

Durante el desarrollo esas cubiertas se modifican y en la madurez presentan un aspecto característico. En general, la cubierta exterior de la semilla se seca, se endurece y engrosa, y toma cierta coloración que puede ser café o de otro tono. La cubierta interior usualmente queda delgada, transparente y membranosa. Dentro de esta capa se encuentran remanentes de la nucela y del endospermo, que a veces forman una capa distinta y continúa alrededor del embrión. Las cubiertas de la semilla proporcionan protección mecánica al embrión, haciendo posible manejar la semilla sin dañarla y permitiendo así, su transporte a grandes distancias y el almacenamiento por largos periodos de tiempo (14).

### 3.1.6 El proceso de germinación

Según Hartman y Kester, el primer estadio de la germinación, activación o despertar, puede completarse en un período de minutos o de horas.

La semilla seca absorbe agua, el contenido de humedad aumenta con rapidez y luego se estabiliza. La absorción inicial de agua significa la imbibición de la misma por los coloides de la semilla seca, lo cual ablanda las cubiertas de la semilla y ocasiona hidratación del protoplasma. Como resultado de ello, la semilla se hincha y sus cubiertas pueden romperse. Dado que la absorción de agua es en gran parte un proceso físico, puede efectuarse aun en semillas no viables.

Los componentes del sistema de sintetización de proteínas de las células (esto es, diversas moléculas de ADN y ARN) se activan. Después de la absorción de agua, este sistema es reactivado para permitir la continuación de la síntesis de proteínas. Las enzimas producidas por la síntesis de proteínas controlan las actividades metabólicas de la célula. Algunas de ellas fueron producidas durante el desarrollo de la semilla y deben volverse a activar. Otras se sintetizan después del comienzo de la germinación.

De las ligaduras de gran energía del trifosfato de adenosina (ATP) que se encuentra en las mitocondrias se vuelve disponible la energía requerida para la síntesis de proteínas. Algunos de esos sistemas se formaron durante el desarrollo de la semilla, se conservaron en la semilla latente y se reactivaron con la hidratación de las células.

El segundo estadio de la germinación significa digestión y translocación. La absorción de agua y la respiración ahora continúan en un ritmo constante.

Los sistemas celulares se han activado y los sistemas de síntesis de proteínas están funcionando para producir diversas nuevas enzimas, materiales estructurales, compuestos reguladores, ácidos nucleicos, etc., para efectuar las funciones celulares y sintetizar nuevos materiales. Aparecen enzimas y empiezan a digerir materias de reserva (grasas, proteínas, carbohidratos) contenidas en los tejidos de almacenamiento (cotiledones, endospermo, perispermo o megagametófito) a compuestos químicos más sencillos: Estos compuestos luego son translocados a los puntos de crecimiento del eje embrionario para usarse en el crecimiento y la formación de nuevas partes de la planta.

En diferentes especies de plantas, los patrones metabólicos dependen en gran parte de los tipos de reservas químicas de las semillas. Las grasas y los aceites se convierten enzimáticamente a ácidos grasos y finalmente a azúcares. Las proteínas de almacenamiento, presentes en la mayor parte de las semillas, constituyen una fuente de nitrógeno fundamental para la plántula en crecimiento. El almidón, presente en muchas semillas como una fuente de energía, se convierte en azúcar (14).

La secuencia de los patrones metabólicos que ocurren durante la germinación significa la activación de enzimas específicas en el momento adecuado y la regulación de su actividad. El control puede efectuarse dentro de las células por diversos procesos bioquímicos y pueden depender de la presencia de sustancias químicas específicas.

El tercer estadio de la germinación de semillas consiste en la división celular en los puntos de crecimiento separados del eje embrionario seguida de la expansión de las estructuras de la plántula. (El alargamiento celular y la emergencia de la radícula son indicadores tempranos de germinación y pueden marcar la terminación del primer estadio. La iniciación de la división celular en los puntos de crecimiento parece ser independiente de la iniciación del alargamiento de las células y puede no intervenir en forma directa con la emergencia de la radícula). Una vez que principia el crecimiento en el eje embrionario, aumenta el peso fresco y el peso seco de la plántula pero disminuye el peso de los tejidos de almacenamiento. La respiración, medida por la absorción de oxígeno, aumenta en forma constante con el avance del crecimiento. Finalmente, cesa la actividad metabólica en los tejidos de almacenamiento, excepto en las plantas en que los cotiledones se vuelven activos en la fotosíntesis.

A medida que avanza la germinación, pronto se pone de manifiesto la estructura de la plántula. El embrión está formado por un eje que tiene una o más hojas seminales o cotiledones.

El punto de crecimiento de la raíz, la radícula, emerge de la base del eje embrionario. El punto de crecimiento del brote, la plúmula, se encuentra en el extremo superior del eje embrionario, arriba de los cotiledones. El tallo de la plántula se divide en la sección situada debajo de los cotiledones, hipocótilo y la sección que se encuentra arriba, el epicótilo.

El crecimiento inicial de la plántula sigue dos patrones. Es un tipo de germinación Epigea, el hipocótilo, se alarga y eleva los cotiledones sobre el terreno. En el otro tipo, germinación hipogea, el alargamiento del hipocótilo no eleva los cotiledones arriba del nivel del suelo y sólo emerge el epicótilo. El patrón de germinación difiere entre plantas dicotiledóneas y plantas monocotiledóneas (14).

### 3.1.7 Reproducción sexual

Según Vidal Hernández (37), la reproducción por semilla, ha originado una gran heterogeneidad entre los árboles de una misma plantación, en relación a la altura de los árboles, tamaño, forma y números de frutos por árboles, esto constituye una de las principales causas de la baja producción por unidad cultivada. Esta situación, nos lleva a realizar una selección de los mejores árboles y propagarlos asexualmente.

Para la selección de las semillas es imprescindible que provenga de árboles vigorosos, sanos de producción precoz y elevado número de frutos. Como portainjertos se recomienda la Anona (*Annona reticulata* L.) por transmitir vigor al injerto. Por ser tolerante al descortezador del tallo y por presentar una amplia gama de adaptación edáfica. Lo mismo sería la Anona de corcho (*Annona glabra* L.) por ser tolerante a la salinidad y al mal drenaje.

Con este portainjerto podríamos ampliar el cultivo en, áreas donde el suelo podría ser limitante, sin embargo, con un doble injerto se podría aprovechar estas características, al emplear a la Anona *Annona reticulata* L., como puente. Además es también tolerante al descortezador del tallo de la guanaba.

Con la finalidad de poder recolectar los frutos para la obtención de las semillas, para producir los portainjertos es menester saber la época de floración y fructificación de estas tres especies. De agosto-noviembre, floración y marzo-abril, fructificación en Anona, febrero-abril, floración y agosto-septiembre, fructificación en Anona de corcho. Para la guanaba existen dos épocas de cosecha en mayo-julio y noviembre-diciembre.

El promedio de semillas por fruto es de 80 para Anona, 90 para la Anona de corcho y 96 para la guanaba. El número de semillas por kilogramo de fruta madura es de 200, 230 y 100 respectivamente. El número de semillas contenidas en un kilogramo es de 3,600, 2,900 y 2,800 respectivamente (37).

El número de días de almacenamiento para conservar la viabilidad de las semillas en un porcentaje de germinación superior al 90% es de 50 días para las tres especies. Asimismo, el porcentaje de germinación de la semilla es de 90 a 95% (Fuente Vidal 1997). El número de semillas utilizadas por metro cuadrado de semillero es de 410, 380 y 390 respectivamente. El número de días necesario para la germinación de las semillas es de 40 días aproximadamente. La edad óptima para realizar el trasplante de semillero a vivero después de la germinación es de 60, 50 y 80 días respectivamente. En relación al número de días necesarios para el desarrollo de los portainjertos antes de injertar es de 180 días para la Anona, 160 días para la Anona de corcho y 210 días para la guanaba. En lo que respecta al injerto se recomienda el enchapado lateral con un 90% de prendimiento, y en un lapso de 3 meses el injerto estará listo para la siembra.

En relación al fenómeno de incompatibilidad se ha comprobado que se presenta en Saramuyo *Annona squamosa* L., Anona de corcho *Annona glabra* L., Anona espinosa *Annona spinosa* y en Rolinea *Rollinia jimenezii*.

Se cree que sobre llama, *Annona purpurea* Papausa, *Annona diversifolia*, Chirimoya, *Annona scleroderma* haya afinidad. Sobre guanaba cimarrona *Annona montana* y guanaba “sin fibra” *Annona muricata* L., el éxito es total. Sobre Chirimoyito *Annona globiflora*, existe ciertas dudas que serían conveniente aclarar ya que este portainjertos podría emplearse como enanizante (37).

### 3.1.8 Morfología, anatomía de la semilla y composición química del endospermo de (*Annona muricata* L.)

La semilla constituye la unidad biológica más importante y definitiva de las plantas superiores. La vitalidad de las semillas varía notablemente con la especie y depende, entre otras cosas, de la cantidad y calidad de sustancias químicas contenidas en el embrión y en los tejidos de reserva, lo mismo que de las estructuras que las protegen para su conservación; cada planta produce sus propias semillas, cuya composición química, constitución genética y organización estructural varían con la especie (9,38).

Las diferentes sustancias químicas contenidas en la semilla son de naturaleza estructural, funcional y de reserva, variando en cantidad, composición y propiedades que son genéticamente determinadas por la planta. Las causas que originan el deterioro de dichas sustancias y que conllevan a la pérdida de vigor y de germinación de las semillas son muy diversas y aún no se conocen por completo.

La guanaba *A. muricata* L., presenta una gran biodiversidad en Colombia y Brasil. La forma más conveniente de propagación es por semilla con porcentajes de germinación cercanos al 60%. Durante la presente década entre otros factores, el bajo porcentaje de germinación ha sido un limitante para el desarrollo y expansión de huertos comerciales en Guatemala.

En la fisiología de semillas, existen dos grandes grupos, semillas ortodoxas y recalcitrantes.

Las semillas de la familia Annonaceae, posiblemente, pertenecen a este último grupo, por presentar un alto contenido de lípidos y no admitir una reducción en el contenido de humedad para minimizar respiración, evitar oxidación de los lípidos y, por consiguiente, reducir la pérdida de viabilidad. La *A. muricata* L., no ha sido clasificada en variedades y es así como, se encuentran diferentes ecotipos o biotipos, tanto de plantas, como de frutos y de semillas, se han determinado y los tamaños de estas últimas están entre 5 y 20 mm de longitud con un peso promedio de 0,477 gr. La semilla de *A. muricata* L., proviene de óvulos anatropos, crasinucelados y bitegmentados, por lo cual se considera como una especie primitiva (38).

Vidal Bello, (35) menciona que características estructurales y de composición, tales como la testa, el endospermo de tipo ruminado, alto contenido de lípidos, compuestos como xiloglucano, válvulas higroscópica manejada por tapón estrofiolar son indicadores de simientes primigenias.

Las semillas de *A. muricata* L., se encuentran en un fruto que se deriva de un gineceo apocárpico de una flor con numerosos pistilos, ubicados sobre un receptáculo grande y carnoso, lo cual es característico de un fruto agregado.

La semilla es de color pardo oscura, lignificada y con alto contenido de taninos, su forma es oblongoelíptica, obovoide de tamaño variable desde 5\*5\*2 mm a 20\*10\*5 mm de largo \* ancho \* grueso.

En un fruto se encuentran numerosas semillas y su cantidad es variable según el tipo y, en promedio, se hallaron 93 semillas por kilogramo de fruta, con un peso que vario entre 0,3395 gr. y 0,5432 gr de cada semilla.

La semilla presenta una posición pendular unida a una placenta por un funículo bastante fuerte, con haz vascular bastante visible, el cual se proyecta para formar la rafe. Al desconectarse la semilla de la planta, se forma una depresión bastante prominente en el hilo, rodeada por una coronula (collarete) denominada hendidura hilar. Las células de la coronula son fibroescleroides de lumen estrecho, surcadas por células parenquimáticas de lumen amplio y bastante ricas en lípidos.

El micrópilo no es conspicuo; en las semillas se presenta en un tapón piramidal formado por células esclerenquimáticas, tipo braquiscleroides. El tapón presenta un fino canal que comunica el endospermo con la cavidad hilar, el cual recibe el nombre de tapón u opérculo micropilar. El rafe y el antirafe se encuentran entre los tejidos de la cubierta seminal. El rafe es la región comprendida entre el funículo y la cálaza, ubicada periféricamente y en un plano mediano, contiene más de un haz vascular que finaliza en la cálaza.

Existen, además, trazas vasculares poscalazales, por lo cual la semilla esta rodeada de una banda vascular ubicada en la periferia. Dicha banda se extiende desde el funículo hasta la cálaza y de ésta hasta el micrópilo, lo cual, caracteriza a semillas denominadas pericalazales (39).

La cubierta seminal procede del desarrollo de dos tegumentos presentes en el rudimento seminal. Básicamente, la cubierta se deriva del tegumento externo y, por lo tanto, es una semilla testal. La capa mecánica que da dureza y rigidez a la cubierta de la semilla madura se ubica en la mesotesta, la cual procede de la capa media del tegumento externo.

La capa mecánica esta constituida por fibras esclerenquimáticas de pared gruesa y lumen muy estrecho, dispuestas en dos paquetes, a veces tres, orientadas perpendicularmente entre sí, las cuales se lignifican progresivamente en la medida que la semilla crece y estas características son las que le dan la rigidez a la cubierta seminal. El tegumento interno se observa en semillas tiernas y jóvenes y esta constituido por tres capas que contienen taninos, las cuales, al madurar la semilla, se aplastan y no se visualizan. La epidermis externa está constituida por células de pared delgada más o menos cuboidales ó tangencialmente más alargadas. La semilla, al secarse, presenta una delgada capa transparente (papelillo) que la cubre y está conformada por la exotesta y restos de fruto (39).

Indica Valenzuela (33), que la semilla presenta un endospermo albuminoso, abundante, masivo y parenquimatoso, que rodea completamente el diminuto embrión, con paredes celulares poco gruesas y su consistencia es de tipo corneo, caracterizado por tener reservas de hemicelulosa.

El endospermo presenta agrietamientos, denominados ruminaciones, debido a la penetración de los tegumentos de la cubierta seminal.

Según Villamil (39), las ruminaciones están formadas por el tégmen o tejidos mesotestales y se lignifican de igual forma que la testa. El endospermo ruminado tipo *annonae* es típico de las *Annonaceae*. Caracterizado por no tener vascularización y porque circunda perfectamente el diminuto embrión, simulando un sistema biológico de irrigación que merece futuras investigaciones sobre esta peculiar distribución y función. Las ruminaciones comienzan a observarse desde estados muy tempranos de su desarrollo.

El endospermo de *A. muricata* L., esta compuesto por amilodextrina, especialmente en las células periféricas de las ruminaciones del endospermo y, además, se determinó presencia de amiloides, lípidos, cristales de calcio y proteínas en el mismo. Estas determinaciones coinciden con lo reportado por Stenzel (31), quien encontró, principalmente, amiloides, un xiloglucano compuesto por galactosa, xilosa y glucosa, bastante resistente y formando la parte principal de las paredes celulares y, además, se observa la presencia de galactomananas, sin presencia de material amiláceo y los lípidos son un

componente muy importante representando un 33 por ciento del peso del embrión. El embrión se encuentra en la parte basal central hacia la zona hilar, protegido de corrientes de aire o agua por el tapón micropilar. Es pequeño, mide 3 mm, lineal, recto, con dos cotiledones delgados y foliáceolanceolados. Se encuentra embebido en el endospermo. Los cotiledones están separados por una capa delgada de levulosa, se desarrollan dentro del endospermo a medida que se forma la plántula, no son fotosintéticos y son como haustorios para el embrión, los cuales caen junto con la cubierta seminal al formarse la plántula. En el embrión, se diferencian, perfectamente, radícula, hipocotilo y cotiledones; su consistencia es carnosa y se desprende fácilmente del endospermo hidratado; sus células son circulares, sin una distribución uniforme, con paredes formadas por amiloide y altos contenidos de lípidos (31).

### 3.1.9 La germinación

Según Ellis y Roberts, 1985 citado por Vásquez (35), la germinación para un tecnólogo en semillas es la emergencia y desarrollo del embrión de la semilla de sus estructuras fundamentales que indican la habilidad para desarrollar plantas normales bajo condiciones favorables de suelo. Para Hartmann y Kester, (14), la germinación es el proceso de reactivación metabólica de la semilla y la emergencia de la radícula y la plúmula, conducente a la producción de una plántula.

El desarrollo de la semilla y la germinación son etapas fisiológicas muy distintas del ciclo de vida de la planta.

El metabolismo durante el desarrollo de la semilla es fundamentalmente anabólico y está caracterizado por la síntesis básica y depósito de sustancias de reserva en los tejidos de almacenamiento y la deshidratación de los tejidos; la germinación se caracteriza por la movilización de polímeros de reserva y cambios cualitativos y cuantitativos de las enzimas catabólicas, en particular, en los órganos de almacenamiento.

Muchos genes involucrados en estos procesos están bajo estricta regulación temporal, expresándose sólo en determinadas etapas del ciclo de la planta (14).

Para que se realice el proceso de germinación Hartmann y Kester, (14), es necesario que se cumplan tres condiciones:

La semilla debe de ser viable, es decir que el embrión esté vivo y ser capaz de germinar.

La semilla no debe de estar en letargo ni el embrión quiescente, no deben existir barreras físicas o fisiológicas que induzcan al letargo ni barreras químicas para la germinación.

La semilla debe estar expuesta a las condiciones adecuadas, disponibilidad de agua, temperatura adecuada, provisión de oxígeno y en algunos casos de luz.

El proceso de germinación involucra la transición de las células de un estado deshidratado y baja actividad metabólica a un estado hidratado y de intensa actividad metabólica. El agua es absorbida por muchas semillas y en etapas sucesivas se desarrollará la germinación. Este proceso de germinación consta de 3 etapas consecutivas que son:

### 3.1.10 Etapa de activación

#### 3.1.10.1 Imbibición de agua

Corresponde a la rápida absorción de agua por los coloides presentes en la semilla seca que suavizan las cubiertas de la semilla e hidratan el protoplasma, como consecuencia la semilla se hincha y es posible que se rompan las cubiertas (14).

Es importante indicar que la imbibición es un fenómeno físico y que lo experimentan aún semillas muertas. En esta etapa se da un incremento paulatino de la actividad respiratoria. Esta etapa puede ser completada en un lapso de minutos a horas. El agua es absorbida por la semilla seca y el porcentaje de humedad aumenta rápidamente y luego se estabiliza. (Hartmann y Kester, 14).

### 3.1.10.2 Síntesis de enzimas

La actividad enzimática inicia rápidamente, a medida que se hidrata la semilla, estas enzimas se formaron durante el proceso de formación del embrión en la fecundación y otras que se sintetizan al iniciarse la germinación. La síntesis de enzimas durante la germinación requiere de moléculas de ARN que están presentes en el eje embrionario.

Es claro que el proceso de germinación está gobernado por la información genética contenida en el ADN de la célula y que este proceso implica dos eventos: la transcripción de instrucciones genéticas del ADN para formar moléculas específicas de ARN mensajero y el segundo evento consiste en la traducción de esa información por el ARN de transferencia para sintetizar proteínas específicas que son las enzimas que controlarán las complejas reacciones bioquímicas que participaran en el proceso de metabolismo y crecimiento. La energía necesaria se obtiene del ATP presente en las mitocondrias (14).

### 3.1.10.3 Elongación de las células y emergencia de la radícula

El primer signo visible de la germinación es la emergencia de la radícula, la cual resulta de elongación de las células más bien que de la división celular. Este fenómeno marca el fin de la etapa I (34).

### 3.1.11 La temperatura

En condiciones naturales determina la capacidad y la tasa de germinación, removiendo el letargo primario y secundario; en algunos casos es un factor que induce letargo secundario.

La tasa de germinación depende en gran parte del nivel de temperatura. El límite superior es cercano a 45 °C y el inferior está entre 3 y 5 °C. Muchas especies germinan alrededor de los 40 °C, pero las plántulas son anómalas; otras pueden germinar cerca del límite inferior de la temperatura, pero rara vez las plántulas son normales.

Los regímenes de temperaturas alternantes (20 °C en la noche y 30 °C en el día) parecen óptimos para las especies de zonas templadas, aunque resultados similares se obtienen con temperaturas constantes de 25 °C. Para las especies tropicales el ámbito de 25 a 30 °C es usualmente mejor (31). El ISTA, recomienda que las pruebas de germinación se realicen a temperaturas que oscilan entre 20 a 25 grados centígrados (17).

### 3.1.12 Factores que inhiben la germinación de las semillas

Uno de los principales problemas que afronta el tecnólogo en semillas es cuando efectúa una prueba de germinación pero se da cuenta que las semillas que se han cosechado y morfológicamente están bien, fallan al finalizar la prueba de germinación, preguntándose por qué estas semillas no germinan?. Tal como indica Ellis y Roberts (11), indican que existen básicamente cuatro causas porque no lo hacen, a saber:

1. Las semillas presentan dormancia
2. Las semillas se catalogan como semillas duras
3. Las semillas están vanas
4. Las semillas presentan un proceso lento de germinación

#### 3.1.12.1 La dormancia en las semillas

Para un tecnólogo en semillas la dormancia de la semilla es la condición en una semilla viable que le impide su germinación aún cuando se le han proporcionado las óptimas condiciones de (temperatura adecuada, agua óptima y aireación adecuada) para

que esta germine (34). Muchos autores indican que existen tres tipos de dormancia a saber:

### 3.1.12.2 Dormancia innata

También conocida como dormancia primaria o dormancia natural o dormancia endógena. Consiste en el cese de la germinación del embrión recién formado cuando aún está adherido a la planta madre, evitando que la semilla germine viviparamente (viviparidad: germinación de la semilla estando adherida a la planta madre) y aún también algún período corto de tiempo cuando la semilla es cosechada o dispersada naturalmente (34).

Esta dormancia se divide en dos tipos:

#### A. Dormancia de cubierta de semilla

Cuando una semilla se imbebe de agua y falla su germinación y si posteriormente se remueve la cubierta de la semilla o se extrae el embrión y germina, entonces la germinación la impide la cubierta de la semilla.

Es importante señalar que existen también las llamadas semillas duras que tampoco pueden germinar pero estas se diferencian de las primeras ya que las semillas duras son incapaces de imbibirse (34).

#### B. Dormancia del embrión

Ocurre cuando una semilla viable se le remueve su cubierta y no germina, algunos autores le llaman dormancia fisiológica.

### 3.1.13 Dormancia forzada

También conocida como dormancia ambiental es la condición que se presenta en una semilla viable la cual no germina debido a limitaciones ambientales.

Un ejemplo son aquellas semillas que no germinan cuando están enterradas, pero al remover el suelo al ser expuestas a la superficie germinan siendo el factor limitante la luz (34).

#### 3.1.14 Dormancia inducida

Después que una semilla ha perdido la dormancia innata es posible inducir un tipo de dormancia inducida, también conocida como dormancia secundaria que es el resultado de que a algunas semillas se les proporciona agua pero expuestas a un factor ambiental particular desfavorable para la germinación, ejemplo altas temperaturas o poco oxígeno (34).

#### 3.1.15 Inhibidores químicos

De muchas partes de las plantas se han extraído e identificado sustancias químicas que actúan como inhibidores de la germinación de las semillas. Según Hartmann y Kester, esas sustancias se producen durante el desarrollo del fruto y de la semilla y algunas de ellas se acumulan en el fruto, las cubiertas de la semilla y en el embrión.

Se producen dos clases generales de dichas sustancias. Una clase comprende a subproductos de procesos metabólicos cuya presencia puede ser incidental a un papel en la regulación de la germinación. Una segunda clase incluye hormonas vegetales de ocurrencia natural que controlan, no sólo la germinación de la semilla sino el crecimiento y desarrollo de la planta en general. Sin embargo, en nichos naturales específicos, es muy tentador creer que diferentes especies pueden evolucionar con sistemas genéticos que seleccionen sustancias químicas endógenas que se vuelven importantes para regular la germinación y aseguran la supervivencia en condiciones ambientales en particular adversas.

La mayoría de los frutos carnosos o sus jugos, inhiben de una manera poderosa la germinación de las semillas. Esto ocurre, por ejemplo, en cítricos, cucúrbitas, frutas de hueso, manzanas, pera, uvas y tomates (14).

En forma similar, muchos frutos secos y sus cubiertas, como las de guayule, *Pennisetum ciliare* y de trigo (*Triticum*) y las cápsulas de la mostaza (*Brassica*), pueden producir inhibición. Es indudable que esas sustancias desempeñan un papel biológico de importancia al prevenir la germinación prematura cuando las semilla aún están presentes en la planta madre. Donde las cubiertas de fruto permanecen con las semillas, el efecto de inhibición puede persistir en el periodo de germinación.

Por ejemplo, las semillas de remolacha contienen sustancias que despiden amoníaco, el cual interfiere con la germinación en los análisis de semilla, pero si esas semillas se plantan en el terreno, la lixiviación o la absorción del amoníaco por las partículas del suelo supera a este factor. El letargo en semillas de *Iris* se debe a un inhibidor de la germinación, soluble en agua y en éter, que se encuentra en el endospermo y que puede ser lixiviado de las semillas con agua o evitado con la separación del embrión. Se ha reportado que en las semillas de especies tropicales se encuentran distribuidos con amplitud inhibidores de la germinación.

En la ecología de ciertas plantas desérticas desempeñan un papel los inhibidores específicos de la germinación de las semillas.

Dichos inhibidores son lixiviados por las lluvias abundantes de remojo (que aseguran la supervivencia de las plántulas). Una lluvia ligera es insuficiente y a dichas sustancias se les ha llamado “pluviómetros químicos”.

Los inhibidores son una parte del sistema de control de la germinación que interviene en el letargo de semillas recién cosechadas de la clase III, donde el sitio de control se encuentra en las cubiertas de las semillas y está influenciado por la luz y la temperatura o queda dentro del embrión. Se ha encontrado que en esos casos el ácido abscísico está asociado en forma estrecha con la inhibición de la germinación, aunque no se conoce con certeza el mecanismo por medio del cual se ejerce dicha acción (14).

### 3.1.16 Reguladores del crecimiento de las plantas

Los reguladores del crecimiento de las plantas, se definen como compuestos orgánicos diferentes de los nutrientes que en pequeñas cantidades fomentan, inhiben o modifican de alguna u otra forma cualquier proceso fisiológico vegetal.

Para su estudio, estas sustancias se agrupan en cuatro grupos: Auxinas, Giberélinas, Citocininas e Inhibidores. Las hormonas de las plantas son reguladores producidos por las mismas plantas que en bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de estas.

En general, el término hormona se aplica solo cuando se refiere a los productos naturales de las plantas, sin embargo el término regulador no se limita a los compuestos sintéticos sino que pueden también incluir hormonas, dicho término puede aplicarse a cualquier material que pueda modificar los procesos fisiológicos de cualquier planta. El término regulador debe utilizarse en lugar de hormonas, al referirse a productos químicos agrícolas que se utilicen para controlar cultivos (20).

### 3.1.17 Aspectos históricos de las giberélinas

Es interesante saber que la investigación moderna sobre las auxinas surgió de las observaciones de Darwin en cuanto a la forma en que se doblan los coleótilos, y que las giberelinas las descubrieron los japoneses, a resultas de las observaciones e interés por la enfermedad “bakanae” del arroz *Oryza sativa* L. El descubrimiento de las giberelinas se atribuye a Kurosawa, un fitopatólogo que estudió las enfermedades en Formosa. La enfermedad bakanae había sido observada durante más de 150 años en Japón.

En las primeras etapas de la enfermedad, las plantas afectadas tenían con frecuencia una altura que superaba en un 50% o más la de las plantas sanas adyacentes. Pero formaban menos semillas. Así se dio el nombre de bakanae (plántula loca) a la enfermedad provocada por un hongo ascomiceto (la forma sexual se denomina *Gibberella fujikuroi* y la etapa asexual, *Fusarium moniliforme*).

En 1,926, Kurosawa descubrió que el medio en el que el hongo se había desarrollado estimulaba el crecimiento de las plántulas de arroz y maíz, aún cuando éstas no estuvieran infectadas por el hongo (26).

En 1,930, T. Yabuta y T. Hayashi fueron capaces de aislar e identificar un compuesto activo del hongo que ellos llamaron giberéline. Aunque la primera giberéline fue descubierta tan temprano como el ácido indolacético debido a la preocupación por éste y las auxinas sintéticas, la carencia de contacto posterior con los japoneses, y la segunda guerra mundial, el hemisferio occidental no se interesó en las giberélines hasta la década de 1,950.

### 3.1.18 Efectos biológicos de las giberélines

El efecto más sorprendente de asperjar plantas con giberélines es la estimulación del crecimiento. La aplicación de las giberélines puede terminar con el reposo de las semillas de muchas especies.

Las giberélines pueden provocar la floración en muchas especies que requieren temperaturas frías. Las giberélines incrementan el tamaño de muchos frutos jóvenes, como las uvas y los higos.

### 3.1.19 Mecanismos de acción de la giberélines

Uno de los ejemplos mejor conocidos de la inducción de enzimas debida a las hormonas, es la producción de  $\alpha$  – amilasa provocada por las giberélines en las aleuronas de cebada.

El GA3 puede reemplazar a u factor producto de  $\alpha$  – amilasa, generado mediante la germinación de semillas de cebada. Los embriones de cebada producen una giberéline natural que se traslada al interior de las capas de aleuronas de los endospermos, donde se produce la síntesis de enzimas. Estas enzimas, incluyendo amilasas, proteasas y lipasas, descomponen rápidamente las paredes celulares de los endospermos e hidrolizan después los almidones y proteínas, liberando así los nutrientes y la energía necesarios para el desarrollo de los embriones.

Se ha demostrado que el GA3 provoca la síntesis de novo de  $\alpha$  – amilasa en las células de las aleuronas. Así la actividad enzimática resultante de las giberélinas no se debe a la liberación de enzimas de alguna forma de enlace, sino al incremento de la actividad celular, debido a la formación de nuevas enzimas (27).

#### 3.1.19.1 Acido giberélico (GA3)

Nombre comercial: Acido giberélico; Sustancia activa: Giberéлина (Ga3); Formula estructural. (ver figura 2).

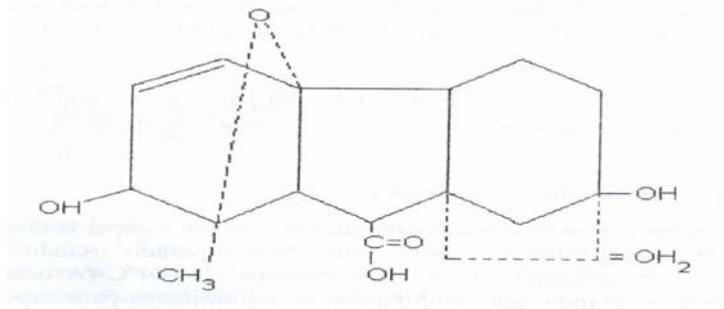


Figura 2. Formula estructural del ácido giberélico (Fuente Ortiz 2003)

#### 3.1.19.2 Giberélinas

Este grupo de hormonas de plantas tiene una actividad significativa en la fisiología de semillas. El ácido giberélico (GA3) promueve la germinación en algunos tipos de semillas con dormancia, aumentan el porcentaje de germinación, estimulan el crecimiento de la semilla. La respuesta a este tratamiento puede variar dependiendo del tipo de semilla. Las semillas son tratadas con ácido

giberélico dejándolas en remojo 24 horas antes en una solución de agua a concentraciones de 100 a 1000 ppm Hartmann y Kestler, (14).

### 3.1.20 Prueba de germinación

Es una forma de expresar la viabilidad de las semillas en la mayoría de los casos el objetivo principal de las pruebas de germinación a nivel de laboratorio es conocer la máxima expresión germinativa de las semillas en condiciones adecuadas de temperatura, humedad, oxígeno y sustrato entre otros (20).

Las pruebas de germinación determinan una muestra de la proporción de semillas que son capaces de germinar en condiciones favorables, sirve para obtener un valor estimado de plantas que se puede obtener.

#### 3.1.20.1 Pruebas directas

Evalúan la capacidad de germinación y las principales son las que se realizan en arena, papel y algún otro sustrato para germinación.

#### 3.1.20.2 Pruebas indirectas

Estiman la capacidad germinativa de la semilla, midiendo otros parámetros, tales como la actividad metabólica y enzimática. Entre estas se puede mencionar tetrazolium, índigo carmín e inspecciones de embriones. Estas son difundidas a mayor escala debido a la rapidez de la obtención del porcentaje (20).

### 3.1.21 Antecedentes del uso de ácido giberélico en cultivos

A. Aceleración de la germinación y el crecimiento inicial de las plántulas de Macadamia (*Macadamia integrifolia*).

Primer ensayo: Se usaron semillas de menos de un mes de cosechadas. Los tratamientos consistieron en remojar las semillas por 24 horas en 0, 10, 100, 500, 1,000 y 5,000 ppm de ácido

giberélico; a otro lote de semillas se le rajó la cubierta, a algunas usando un martillo y a otras se dejó que las rajara el sol, para lo cual se dejaron estas semillas remojándose en agua por 24 horas y luego se pusieron a secar por 2 días expuestas a pleno sol (ver cuadro 3). Finalmente algunas semillas se sembraron sin tratamiento previo, pero usando 3 posiciones de siembra: con la sutura abajo, arriba y al costado. En todos los casos las semillas fueron sembradas a 2 y 3 cm. de profundidad (2).

Cuadro 3. Porcentaje de germinación de semillas frescas de macadamia luego de diversos tratamientos. (Fuente Ruiz 1997)

Tratamientos	Tiempos después de siembra		
	1 mes	2 meses	6 meses
Testigo	7.0 de	48.0 b	64.0 c
Agua	12.0 cd	43.5 b	60.0 c
10 ppm GA3	21.0 bc	71.5 a	84.0 ab
100 ppm GA3	38.0 ab	72.5 a	80.0 ab
500 ppm GA3	37.0 ab	72.0 a	85.0 a
1000 ppm GA3	26.0 abc	80.0 a	83.0 ab
5000 ppm GA3	26.0 abc	82.5 a	93.0 a
Sutura abajo	12.0 cd	54.0 b	69.0 bc
Sutura lateral	2.0 e	39.5 b	56.0 c
Sutura arriba	3.0 de	41.5 b	52.0 c
Rajada a mano	12.0 cd	13.5 c	14.0 d
Rajada al sol	42.0	78.0	83.0 ab

La germinación inicial fue acelerada por los remojos en GA3 aunque inicialmente fue más alta para rajado al sol, posteriormente éste fue superado por el remojo en 5,000 ppm de GA3, que terminó siendo el tratamiento con mayor germinación final con 93.0%, seguido de las otras concentraciones de GA3 y el rajado al sol, sin diferencias estadísticas aunque si numéricas entre ellos a favor de 5,000 ppm de GA3 El testigo, el remojo en agua y las siembras en distintas posiciones, que equivalen a un testigo, fueron superados estadísticamente por los remojos en GA3 y el rajado al sol.

El rajado a mono fue superado estadísticamente por todos los demás tratamientos. Esto muestra claramente el efecto estimulante que tiene el GA3 y que ha sido encontrado para muchas otras especies como chirimoyo (2).

B. Estudio sobre el letargo de la *Annona diversifolia* Saff. (Annonaceae).

Las semilla de *Annona diversifolia* son abundantes en cada fruto (50 – 70), miden aproximadamente 20 mm de longitud y 10 mm de ancho; son de coloración cobriza, forma obloga – ovoide, testa dura y la presencia de un tegumento interno laminar que penetra a un endospermo masivo parenquimatoso y que le da su carácter ruminado (13).

El embrión esta cercano al hilo, mide de 4 a 5 mm de longitud y presenta una radícula y dos cotiledones laminares.

Los frutos se relectaron en el Ejido de Copoya, Chiapas, México. En octubre de 1995 y septiembre de 1996. Los ejemplares herborizados se encuentran en la escuela de Biología de la UNICACH.

Las semillas se separaron, lavaron y secaron a la sombra. Se almacenaron 4200 semillas durante un año a temperatura ambiente; mensualmente durante siete períodos se analizó una muestra aleatoria para determinar los porcentajes de germinación según la técnica entre papel. La viabilidad se comprobó mediante la técnica de TTC. Las concentraciones utilizadas de ácido giberélico fueron de  $10^{-3}$  a  $10^{-11}$  M. Como criterio de germinación se tomó la emergencia de la radícula, y las observaciones fueron realizadas a los 3, 6, 9 y 14 días de iniciado el experimento. Este se repitió, con ligeras variantes no significativas en cuanto a la lectura de datos, en 1996, controlando la temperatura en una germinadora Biotronette (28 – 30). El diseño estadístico utilizado fue el de ANOVA ( $\alpha=0.01$ ).

En semillas que han roto su latencia, la radícula emerge a los nueve días después de la siembra, en pocos casos a los siete. Con relación al tiempo de almacenamiento (lotes testigo) la germinación en estas semillas se incrementa con el tiempo de almacenamiento en ambos años, no obstante no se rompe totalmente la latencia; el porcentaje de germinación aumenta hasta alcanzar un 64% a los 51 días en 1996 (bajo condiciones de temperatura controlada) y un 42% a los 67 días en 1995 (en condiciones ambientales); conforme se incrementa el tiempo de almacenamiento, el porcentaje de germinación empieza a disminuir hasta un 32% en 1996 y 9% en 1995 a los 185 días de almacenamiento.

El letargo acumulado de todas las semillas tratadas, se rompe hasta en un 36% en 1996, lo que señala que de cada tres semillas dos permanecen latentes. En 1995 es únicamente de 19%, debido, tal vez, a que estuvieron en condiciones ambientales (13).

La germinación acumulada muestra, un patrón de Blackman, que señalarían a el tiempo de almacenamiento como factor importante, para la germinación. En ambos casos la máxima velocidad de germinación (7 días) coincide con los períodos de máxima germinación. Las diferencias de germinación en ambos años, indica que las variaciones de temperatura, talvez sean importantes en el control de la germinación de estas semillas.

Con relación a los tratamientos de ácido giberélico, se observa que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de probadas del fitorregulador y el testigo, resalta un incremento en la germinación por efecto de la concentración  $10^{-3}$  de GA3 de 42% en los lotes de 18 días que disminuye hasta un 8% durante el resto del experimento.

La diferencia total entre el testigo y el tratamiento es únicamente del 20%, lo que no coincide con el señalamiento de Campell y Popenoe, 1962, de que el ácido giberélico rompe la latencia de *Annona diversifolia*.

Los resultados anteriores señalan la importancia de un período corto de post maduración, que no coincide con el período de seis meses encontrado en nuestros experimentos de 1987-1988, este período puede ser únicamente de tres meses, el ácido giberélico no reduce el tiempo de latencia. Los resultados obtenidos señalan también que ni el tiempo de almacenamiento ni los tratamientos con ácido giberélico rompen totalmente la latencia; quizá sea necesario probar el efecto de la temperatura sobre el incremento de la germinación de estas semillas (13).

C. Efecto del ácido giberélico y el método de siembra en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de anona colorada ( *Annona reticulata* L.)

Semillas de anona colorada *Annona reticulata* L. tratadas con AG3 en concentraciones de 5000, 7500 y 10000 ppm, fueron sembradas en cama y bolsa, con el fin de acelerar la germinación y reducir el tiempo a injertación. Las variables dependientes eran germinación, altura y diámetro de plántula como medidas del crecimiento.

Las giberélinas promovieron la germinación, siendo más notable su acción cuando las semillas se colocaron en bolsa; también favorecieron el aumento en longitud y diámetro de las plántulas, expresión que fue más evidente en aquellas que crecieron en cama. No obstante la sensibilidad del anón a las giberélinas, esta no se considera una alternativa que permita a los viveristas disponer de patrones en un lapso más corto.

El GA3 aplicado a las semillas de anona colorada en una concentración de 10,000 ppm de manera consistente a través del período de observación, se presentó como la que ejerció un mayor efecto promotor de la germinación, el cual era significativo, en la semana 9 de registro de datos (ver cuadro 4) .

El efecto del sistema de siembra sobre la germinación de las semillas analizado al final de la evaluación, fue significativo, destacándose la colocación de la semilla en la bolsa como la mejor manera de iniciar la etapa de vivero (6).

Cuadro 4. Germinación (%) de semillas de anona colorada (*Annona reticulata* L.) tratadas con GA3. (Fuente Cartagena 1998)

GA3 (ppm)	<u>Semanas desde comienzo de germinación</u>		
	3	6	9
0	6.2 b	33.7 b	32.9 b
5000	14.3 ab	38.8 ab	38.1ab
7500	24.4 ab	53.3 a	50.11ab
10000	31.5 a	55.4 a	54.1 a

### 3.1.22 Prueba de tetrazolio

Esta prueba es ampliamente reconocida como un medio preciso para estimar la viabilidad en las semillas. Muchas veces se refiere a ella como una prueba rápida ya que solo necesita de unas cuantas horas para su realización (25).

Es extremadamente valioso para proveer la información inmediata para embarques de lotes de semilla sin tener que esperar la realización de pruebas de germinación.

#### A. Principio

Esta prueba distingue entre el tejido viable y el tejido muerto del embrión, sobre la base de que sus razones de respiración relativa son distintas en el estado hidratado.

La prueba utiliza la actividad de las deshidrogenasas como el índice de tasa de respiración y viabilidad de la semilla, estas enzimas reaccionan con los sustratos y liberan hidrógeno para ser oxidado, las soluciones de las sales de tetrazolio son incoloras pero al ser reducidas por el hidrógeno se transforman en formas de color rojo. La viabilidad de la semilla se interpreta de acuerdo al modelo topográfico que presenta la coloración del embrión y la intensidad de la misma.

#### B. Procedimiento

Las semillas primero inhibidas en un sustrato de agua para permitir la completa hidratación de todos los tejidos; para aplicar la solución de tetrazolio en ciertas especies es necesario hacer punciones o cortaduras; después de la hidratación las semillas son colocadas en la solución de tetrazolio a 35° C para una coloración completa, este proceso dura aproximadamente 2 horas posteriormente se bisecta la semilla a través del embrión y se analiza la coloración.

#### C. Valuación

A pesar de que los tejidos vivos de la semilla se coloran rojos la interpretación de los resultados para considerar la viabilidad, requiere habilidad y experiencia.

Tejidos sanos del embrión absorben el tetrazolio lentamente y desarrollan un color más claro que los tejidos magullados, viejos, congelados o alterados de otra manera (25).

El analista experimentado aprende a distinguir entre las semillas capaces de producir plantas normales y aquellas que se manchan anormalmente; esta prueba es a veces llamada prueba topográfica de tetrazolio, porque el modelo o topografía de la mancha es importante para su interpretación; muchas no están completamente muertas o completamente vivas, el modelo de coloración revela que las áreas en donde el embrión está vivo o muerto capacita al analista para determinar la viabilidad las áreas de división celular del embrión son las más importantes durante la germinación, y si no están coloreadas o anormalmente coloreadas, el potencial de germinación se debilita; por lo anterior el analista debe familiarizarse con las áreas cruciales de la división celular.

Otros factores que se deben observar cuidadosamente son la turgencia de los tejidos, fractura y magulladuras y cavidades producidas por insectos.

#### D. Ventajas y desventajas

La ventaja más obvia es la rapidez de la prueba, además que es igualmente útil para semillas en estado latente o no, aunque algunos consideren esto una desventaja si no se usa combinada con una prueba de germinación, así la prueba indica el porcentaje de germinación inmediata y la prueba de tetrazolio el porcentaje de semillas vivas y la diferencia entre ambas el porcentaje de semillas en estado latente.

La principal desventaja, la dificultad y experiencia necesaria para interpretar la prueba correctamente; y además ciertas agencias de certificación de semillas no se aceptan los resultados de esta prueba (25).

### 3.1.23 Otras pruebas bioquímicas para viabilidad de semilla

#### 3.1.23.1 Método de coloración vital

El principio de este método es la diferencia de coloración del tejido vivo y el tejido muerto cuando no son expuestos a ciertos tintes.

El método usado recientemente, el ácido sulfúrico, Carmina de indio y otras anilinas, colorean el tejido muerto azul, pero son incapaces de penetrar el tejido vivo, estos métodos son muy útiles principalmente en semillas de árboles forestales.

#### 3.1.23.2 Métodos de actividad enzimática

Estos miden la actividad enzimática de semillas inhibidas como indicador de su viabilidad se han medido las enzimas hidrolíticas como lipasas, distasas y amilasas, otro grupo de enzimas medidas ha sido las desmolasas que dividen en dos grupos; las oxidasas (catalasas y peroxidasas) y las deshidrogenadas (deshidratas); todas están incluidas en el proceso de respiración y por lo tanto correlacionadas con la viabilidad de la semilla.

#### 3.1.24 Método de enzimas

##### 3.1.24.1 Catalasas

Algunos trabajos han utilizado los contenidos de catalasa en las semillas y han estimado su viabilidad, aunque no crecen así la actividad de las catalasas varía durante el proceso de germinación, se han reportado niveles mayores de catalasa en semillas inmaduras, que en semillas maduras; por lo anterior y debido a la probabilidad de error en este método complicado lo hace poco confiable (25).

##### 3.1.24.2 Peroxidasa

Los contenidos de peroxidasa parecen mejor correlacionados con la viabilidad; Macharge (1990) usó una técnica en la cual el indicador era guayacol, el cual en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se transforma en tetraguayocoquina, que es azul; se hacía un pretratamiento de las semillas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> luego se molían las semillas y se hacían determinaciones colorimétricas; se obtuvieron resultados cercanos a las pruebas de germinación. Brucher (1991) utilizó un método similar en el cual la semilla no se molía el empapo las semillas por doce horas en una mezcla de guayacol y benzidina en dilución al 10% de soluciones saturadas de alcohol y luego tratadas con un reagente, este método permitió la evaluación de cada semilla por separado y los resultados fueron similares a los de la prueba de germinación; la desventaja de estos métodos es que el color desaparece rápidamente.

Se ha encontrado que las oxidasas desaparecen gradualmente de las semillas maduras por lo que son inapropiadas para pruebas de viabilidad.

#### 3.1.24.3 Pruebas de actividad de deshidrogenasas

Estas pruebas se basan en los cambios de color de ciertas sustancias dependiendo si están oxidadas o reducidas; la prueba tetrazolio es el mejor ejemplo de éstas, existe una prueba con azul de metileno, que debe cambiar a metileno incoloro, pero la prueba debe realizarse en vacío y un ambiente estéril, porque sino el azul de metileno, se oxida y se mantiene azul. Otra prueba utiliza la reducción de dinotrobenceno a un compuesto de nitrofenilhidroxilamina en presencia de amonio, que es rápida pero venenosa y la coloración desaparece rápido. El método se limita a estos sencillos pasos:

a. Método selenita: Se basa en la reducción de las sales de selenio que son incoloras a selenio elemental que es rojo debido a la actividad de deshidrogenasas de células vivas; el método usual es emparar las semillas de 24 a 48 horas a 20-30° C, luego son lavadas y se hace un análisis colorimétrico así: Si los embriones se colorean completamente e intensivamente de rojo son germinables; y si están coloreados tenuemente a incoloreados con manchas que suman más de la tercera parte de la superficie no son germinables, una desventaja de éste método es que los gases liberados son venenosos (25).

3.1.24.4 Prueba de cloruro férrico para daño mecánico: Las semillas dañadas mecánicamente se colorean de negro cuando son sumergidas en una solución FC13 al 20% durante 15 minutos; es un test sencillo y rápido.

#### 3.1.24.5 Prueba de acetato indoxílico

A. Para daño en el Pericarpio: Es una prueba rápida de laboratorio que revela daño en el Pericarpio, en la soya y semillas de otras leguminosas de colores pálidos las semillas se empapan durante 10 segundos en una solución de acetato indoxílico al 10.1% en 95% de amoniaco y se deja secar al aire; las lesiones se colorean verde púrpura y son fácilmente notadas.

#### 3.1.24.6 Pruebas de conductividad

Estas pruebas se basan en la diferencia de conductividad que tienen los tejidos vivos y muertos de una semilla se encontró que remojando un muestra de semillas durante varias horas bajo temperaturas controladas y midiendo la conductividad de la solución se refleja el nivel general de viabilidad de la muestra de semilla.

Las pruebas de conductividad se basan en la premisa de que al aumentar el deterioro de la semilla, la membrana celular se vuelve menos rígida y menos permeable al agua, permitiendo que el contenido de agua en la célula, escape a la solución y su conductividad eléctrica aumentaba. Estas pruebas tenían la desventaja de ser una prueba de gran tamaño donde 50 a 100 semillas eran remojadas al mismo tiempo y donde se obtenía una conductividad de todas las semillas, recientemente un instrumento comercial se ha desarrollado el cual provee indicación rápida acerca de la viabilidad de grupos de semillas y da sofisticación al concepto de prueba de conductividad, mejorando el valor y grado de confianza de los resultados de la prueba, sin embargo aun quedan dudas acerca de la confiabilidad de los resultados de la prueba en un rango de mediana calidad (25).

#### 3.1.24.7 Prueba de embrión cortado

Es una prueba que provee una forma única de encontrar la viabilidad de una semilla que puede reducir enormemente el tiempo requerido para estimar la viabilidad de una semilla latente; es particularmente utilizado con semillas de especies de árboles madereros para las cuales el tiempo de estimación de viabilidad puede reducirse drásticamente. Los embriones de semillas latentes son cuidadosamente removidos sin dañarlos y puestos en papel filtro húmedo bajo condiciones favorables, estos crecerán y se volverán verdes. Este método es especialmente valioso con semillas de árboles y arbustos en las cuales la latencia es un problema importante al evaluar la viabilidad de la semilla y también cuando la germinación dura hasta seis meses.

Los laboratorios que prueban cantidades considerables de semillas de arbustos y árboles rutinariamente utilizan éste método de prueba, sin embargo una prueba estándar de germinación puede llevarse a cabo para comprobar los resultados.

Una desventaja es que la prueba no revela daños en el embrión, aparte del daño en la raíz y eje de crecimiento donde puede detenerse la germinación normal de la semilla.

### 3.1.24.8 Prueba de rayos x

Aunque esta no es una prueba de viabilidad provee información que puede ser referente a esta, puede declarar deficiencias morfológicas que indican potencial estructural para viabilidad, sin embargo al usar diferentes tejidos vivos y muertos, con diferentes capacidades de absorción pueden usarse para distinguir la viabilidad de la semilla.

El beneficio del uso de los rayos x en pruebas de semillas es que se obtiene una indicación rápida de estructuras anormal o daño mecánico que puede impedir la germinación. Probablemente la mayoría con rayos x se ha hecho en semillas de remolacha dulce y árboles de bosque, en ambos casos es particularmente útil ya que revela la estructura interna de la semilla, dentro de la dura capacidad de ésta y muestra deficiencias en el desarrollo como fracturas mecánicas (25).

## 4. MARCO REFENCIAL

### 4.1 Procedencia de las semillas a utilizar en el experimento

La semilla de guanaba (*Annona muricata* L.), provino de Sanarate, municipio del Departamento de El Progreso (ver figura 3). Municipalidad de 2da. categoría, posee un área de 274.40 kilómetros cuadrados. Colinda al norte con Morales (Progreso) y Salamá (Baja Verapaz); al este con El Progreso y Sansare (Progreso) al sur con Jalapa (Jalapa) y Sansare (Progreso); al oeste con San Antonio La Paz (Progreso), San José del Golfo y Chuarrancho (Guatemala). Sanarate se encuentra ubicado en las siguientes coordenadas: latitud norte  $14^{\circ} 47' 02''$  y longitud oeste  $90^{\circ} 12' 15''$ . Se encuentra a una altura de 812.68 msnm.

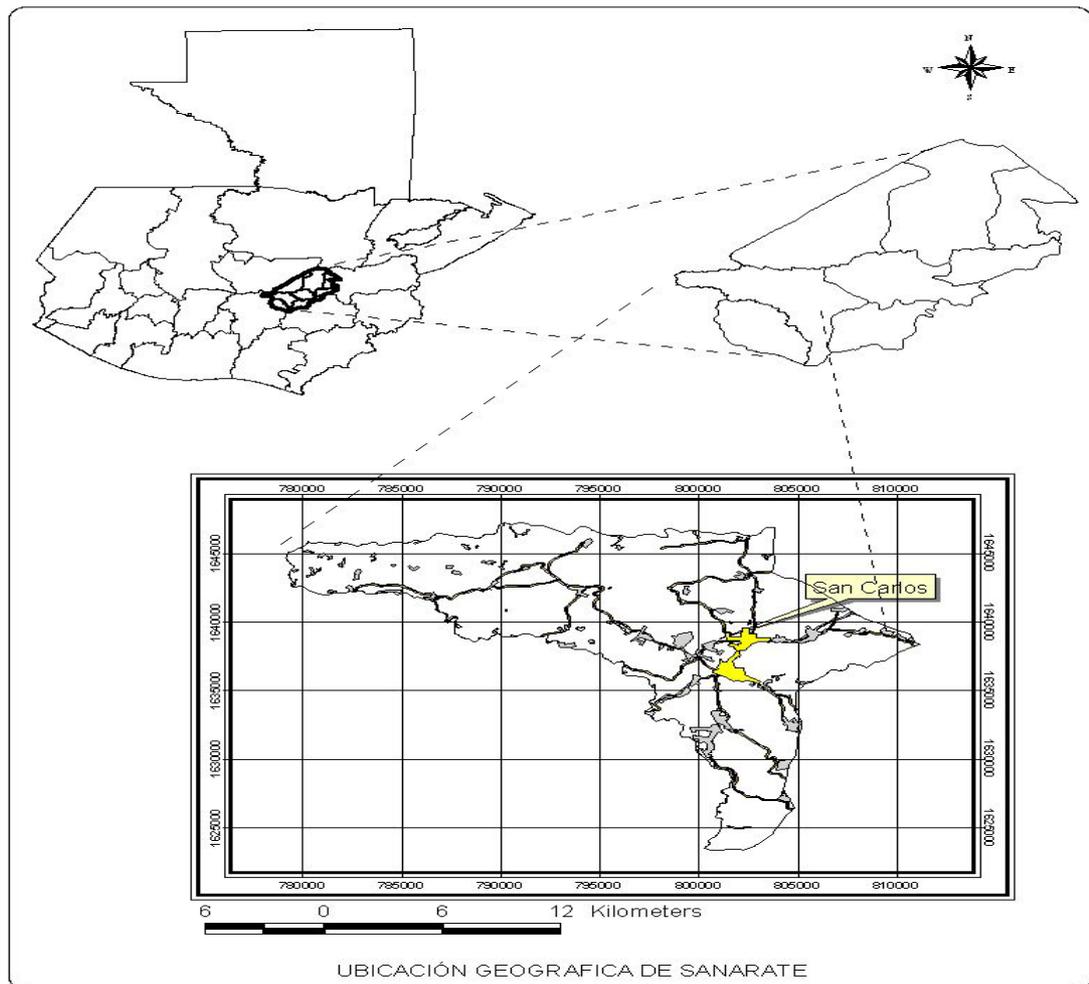


Figura 3. Ubicación del Municipio de Sanarate. (Fuente INE 2004)

#### 4.2 Lugar del experimento

La investigación se realizó en el laboratorio de Análisis de Calidad de Semilla, ubicado en el primer nivel del edificio T8 de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, localizada al sur de la Ciudad Capital, la cual se encuentra ubicada a una latitud norte de  $14^{\circ} 35' 11''$  y una longitud oeste  $90^{\circ} 31' 58''$  (ver figura 4).

El área experimental se encuentra a una altitud de 1,502 msnm, con una temperatura media anual de  $18.7^{\circ} \text{C}$ . y de acuerdo a Holdrige, mencionada por Rivera (26), esta área predomina la zona ecológica Bosque sub-tropical seco, además posee una precipitación media anual de 1,048 mm.

El área según Simons, mencionado por Rivera (26), pertenece a la serie de suelos Guatemala, con una textura franco-arcillo-arenosa en los primeros 25 centímetros de profundidad.

Según Aguilar Morán, mencionado por Rivera (26), la misma localización mencionada posee material madre como sigue: Ceniza Volcánica color claro, relieve casi plano, drenaje interno bueno, textura y consistencia franco-arcillosa, friable, peligro de erosión baja, fertilidad natural alta; además posee 16 ppm de nitrógeno, 35 ppm de fósforo, 370 ppm de potasio, 16 meg./100 grs. de calcio. La humedad relativa es de 79%, la evaporación media de 4.1, insolación media de 6.6, velocidad media del viento de 15.4, con una dirección de N.N.E.

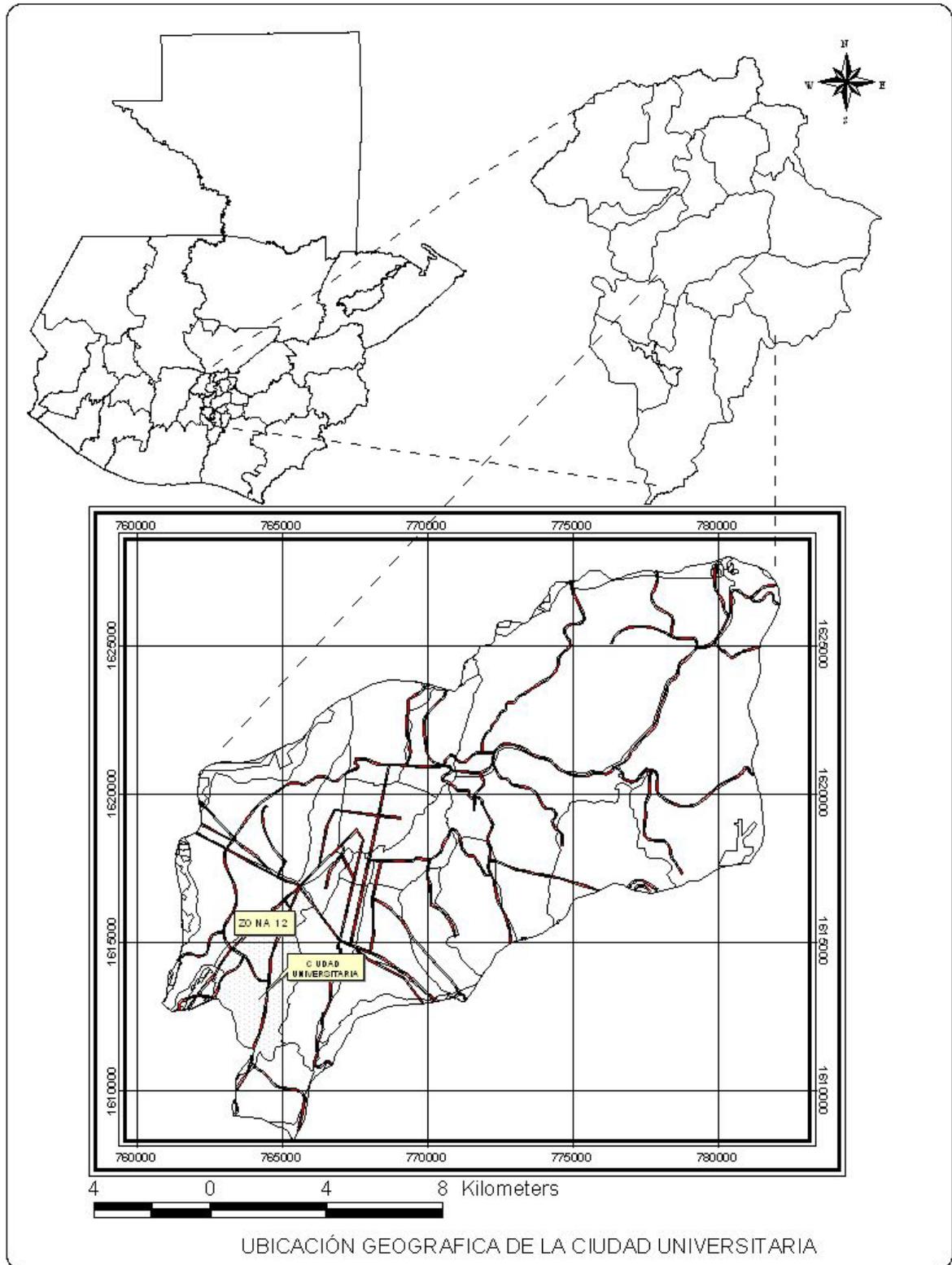


Figura 4. Ubicación de la Ciudad Universitaria. (Fuente INE 2004)

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del ácido giberélico y agua a 4° centígrados, en la viabilidad de la semilla de guanaba *Annona muricata* L. bajo condiciones de laboratorio.

### 5.2 Objetivos Específicos

- 5.2.1 Determinar la concentración de ácido giberélico que incremente la germinación de las semillas de guanaba *Annona muricata* L.
- 5.2.2 Establecer el efecto del tiempo de almacenamiento y la velocidad de germinación en la semilla de guanaba *Annona muricata* L. en su germinación.
- 5.2.3 Realizar análisis económico del estudio.

## 6. HIPOTESIS

- 6.1 Las semillas de guanaba *Annona muricata* L. responden a una concentración de ácido giberélico a evaluar y provocará diferencias significativas en el porcentaje de germinación que el resto de las concentraciones.
- 6.2 El porcentaje de germinación de las semillas de guanaba *Annona muricata* L. es afectado por el tiempo de almacenamiento.
- 6.3 Las semillas de guanaba *Annona muricata* L. responden a una interacción de ácido giberélico y agua a 4° centígrados, lo cual provocará diferencias significativas en el porcentaje de germinación que el resto de las interacciones.
- 6.4 Las semillas de guanaba *Annona muricata* L. responden a una interacción de agua a 4° centígrados y días de almacenamiento, lo cual provocará diferencias significativas en el porcentaje de germinación que el resto de las interacciones.

## 7. METODOLOGIA

### 7.1 Material experimental

#### 7.1.1 Materiales y métodos

La investigación se realizó en el laboratorio de Análisis de Calidad de Semilla, ubicado en el primer nivel del edificio T8 de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

### 7.2 Material vegetal

#### 7.2.1 Procedencia de la semilla utilizada

Se utilizó semillas de guanaba *Annona muricata* L. cosechada de árboles caracterizados por su producción promedio (12 a 24 frutos por año). La semilla provino del municipio de Sanarate, del Departamento de El Progreso, recolectada en junio del año 2,004. Después de colectada, la semilla fue almacenada en un cuarto con condiciones ambientales (20 a 25° C). La altitud del lugar de donde proviene la semilla colectada y utilizada en este ensayo es de 812.68 msnm.

### 7.3 Metodología experimental

Para este estudio se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo combinatorio. En el cual se evaluaron dos factores, con cuatro niveles cada uno.

FACTOR	NOMBRE	NIVELES
A	Días de Almacenamiento	A1 = 0 días de Almacenamiento A2 = 15 días de Almacenamiento A3 = 30 días de Almacenamiento A4 = 80 días de Almacenamiento
B	Concentración de GA3	B1 = 1,000 ppm B2 = 5,000 ppm B3 = 0 ppm + Agua a 4° C B4 = 0 ppm + Agua a 21° C (Testigo)

### 7.3.1 Tratamientos

Los tratamientos evaluados se identifican así:

- 1.- A1B1 = 0 días de almacenamiento y 1,000 ppm de GA3.
- 2.- A1B2 = 0 días de almacenamiento y 5,000 ppm de GA3.
- 3.- A1B3 = 0 días de almacenamiento y 0 ppm de GA3 + agua a 4° C.
- 4.- A1B4 = 0 días de almacenamiento y 0 ppm de GA3 + agua a 21° C.
- 5.- A2B1 = 15 días de almacenamiento y 1,000 ppm de GA3.
- 6.- A2B2 = 15 días de almacenamiento y 5,000 ppm de GA3.
- 7.- A2B3 = 15 días de almacenamiento y 0 ppm de GA3 + agua a 4° C.
- 8.- A2B4 = 15 días de almacenamiento y 0 ppm de GA3 + agua a 21° C.
- 9.- A3B1 = 30 días de almacenamiento y 1,000 ppm de GA3.
- 10.- A3B2 = 30 días de almacenamiento y 5,000 ppm de GA3.
- 11.- A3B3 = 30 días de almacenamiento y 0 ppm de GA3 + agua a 4° C.
- 12.- A3B4 = 30 días de almacenamiento y 0 ppm de GA3 + agua a 21° C.
- 13.- A4B1 = 80 días de almacenamiento y 1,000 ppm de GA3.
- 14.- A4B2 = 80 días de almacenamiento y 5,000 ppm de GA3.
- 15.- A4B3 = 80 días de almacenamiento y 0 ppm de GA3 + agua a 4° C.
- 16.- A4B4 = 80 días de almacenamiento y 0 ppm de GA3 + agua a 21° C.

### 7.3.2 Unidad experimental

Se encuentra representada por 25 semillas de guanaba *Annona muricata* L. que fueron colocadas en una bandeja de germinación (ver cuadro 5), con las siguientes dimensiones: 43 cm. de ancho, 48 cm. de largo.

Cuadro 5. Distribución y aleatorización de los tratamientos evaluados.

A4B1R2	A1B3R3	A1B4R1	A3B2R3
A1B4R2	A2B1R2	A2B1R1	A4B1R1
A1B1R1	A4B3R2	A3B1R3	A2B3R2
A3B4R2	A4B3R1	A1B2R4	A3B2R4
A1B2R3	A1B2R1	A2B2R4	A2B2R3
A3B4R1	A3B4R4	A2B3R1	A3B1R1
A2B4R1	A4B2R3	A4B2R1	A3B3R3
A3B3R1	A3B2R1	A3B1R4	A2B3R4
A1B3R2	A3B1R2	A3B3R4	A4B4R3
A3B4R3	A1B4R4	A1B4R3	A4B4R1
A3B2R2	A4B3R3	A2B1R3	A2B2R1
A1B2R2	A4B3R4	A4B2R4	A1B3R1
A1B1R2	A1B1R3	A1B3R4	A4B4R2
A3B3R2	A2B1R4	A2B4R2	A2B4R3
A2B3R3	A2B4R4	A2B2R2	A4B1R4
A4B2R2	A4B1R3	A4B4R4	A1B1R4

### 7.3.3 Modelo estadístico

El modelo estadístico asociado a este experimento es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Siendo que:

$Y_{ijk}$  = Porcentaje de germinación obtenido en la  $ij$  – ésima unidad experimental.

$\mu$  = Media general del porcentaje de germinación.

$\alpha$  = Efecto de la  $i$  – ésima concentración de ácido giberélico.

$\beta_j$  = Efecto del  $j$  – ésimo tiempo de almacenamiento.

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre la  $i$  – ésima, concentración de ácido giberélico y el  $j$  – ésimo tiempo de almacenamiento.

$E_{ij}$  = Error experimental asociado a la  $ij$  – ésima unidad experimental.

## 7.4 Manejo del experimento

### 7.4.1 Extracción y tratamiento de la semilla

Una vez los frutos llegaron a su madurez fisiológica, la semilla se extrajo manualmente retirándole la pulpa. Posteriormente se lavó con agua limpia y seco a la sombra. Se seleccionaron las semillas de mayor tamaño y con buen estado fitosanitario y se almacenaron a temperatura ambiente (22° centígrados).

### 7.4.2 Preparación de la solución de tetrazolio

Se realizó la prueba de Tetrazolio para determinar si el embrión de la semilla de guanaba era viable. Para la cual se usaron los siguientes reactivos:

Dihidrogenofosfato de Potasio, Dihidrogenofosfato de Sodio monohidratado y Mikrobiologie al 99%. Se usaron las siguientes cantidades de reactivos para

obtener 50 mililitros de la solución:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.19gr.),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (0.36gr.) y Mikrobiologie al 99% (0.25gr.).

#### 7.4.3 Preparación de la solución de ácido giberélico

El ácido giberélico se preparó, utilizando Biogib (ácido giberélico, polvo soluble), el cual se diluyó en alcohol al 80 %, para luego llevarlo a un litro (mil mililitros) con agua destilada. Para mil partes por millón se usó un gramo y para cinco mil partes por millón se usaron cinco gramos.

#### 7.4.4 Aplicación del ácido giberélico

Se aplicó la solución de ácido giberélico a las semillas de guanaba por 24 horas, en concentraciones de 5,000 ppm, 1,000 ppm, 0 ppm más agua a 4° centígrados y 0 ppm más agua a 21° centígrados, las cuales estuvieron almacenadas a temperatura ambiente (22° centígrados).

#### 7.4.5 Germinación de la semilla

Cumplido el tiempo de imbibición de las semillas, estas fueron envueltas en papel mayordomo (25 \* 30 cm.), para su germinación en bandejas de germinación.

#### 7.4.6 Pruebas de germinación de la semilla con diferentes periodos de almacenamiento

Los tiempos de almacenamiento fueron: 0 días, 15 días, 30 días y 80 días. Como criterio de germinación se utilizó la emergencia de la radícula. Las semillas se regaron todos los días y las observaciones se realizaron cada mes.

#### 7.5 Variables de respuesta

- a. Porcentaje de germinación: Se tomó el porcentaje de germinación de la semilla a los 90 días después de la siembra.
- b. Velocidad de germinación: Se tomó la velocidad de germinación al primer mes y al momento en que se reportó la mayor germinación en función del tiempo.
- c. Análisis económico: Evaluación "Costo/Efectividad" (C/E). Para determinar el tratamiento que presentó la mejor opción económica, se tomaron como base los costos por tratamiento (C/T), y el total de plantas germinadas por tratamiento, afectadas por el porcentaje de germinación (28).

$$C/E = \frac{\text{costo/tratamiento}}{\text{TPG/tratamiento}} = \text{costo/planta}$$

$$\text{TPG} * G$$

TPG = Total de plantas germinadas.

G = Porcentaje de plantas germinadas (ver cuadro 12).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Porcentaje de germinación

Los datos se sometieron a un análisis de varianza, el que indicó que para la variable porcentaje de germinación se encontró diferencias significativas para el factor días de almacenamiento y para las concentraciones de ácido giberélico; pero esta variable resultó no significativa para la combinación de días de almacenamiento y concentración de ácido giberélico, es decir no existió efecto en la interacción de los mismos (ver cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de Varianza para el porcentaje de germinación en semillas de guanaba *Annona muricata* L.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor de F	F Crítica (0.05)
Almacenamiento	3	17.82	5.94	6.12	2.80 *
Concentraciones	3	9.29	3.1	3.20	2.80 *
Almac.* Concen.	9	10.78	1.2	1.24	2.08 ns
Error Experimental	48	46.49	0.97		
Total	63	84.38			

Coefficiente de Variación = 13.88%

Al efectuar la prueba de medias de Duncan, el tratamiento de 30 días de almacenamiento reportó un porcentaje de germinación del 61.75%, dicho tratamiento fue el que reportó la mayor viabilidad; con quince días de almacenamiento el porcentaje de germinación se redujo al 55.25% y a los ochenta días 48.06%, siendo el testigo el que reporto menor porcentaje de germinación de 41.25% (ver cuadro 7).

Cuadro 7. Prueba de Duncan, para los tratamientos en los que se utilizó días de Almacenamiento en semillas de guanaba *Annona muricata* L.

DIAS DE ALMACENAMIENTO	MEDIA	GRUPO
30 días	61.75%	a
15 días	55.25%	ab
80 días	48.06%	bc
0 días	41.25%	c

Con relación a las concentraciones de ácido giberélico utilizadas (ver cuadro 8), la concentración de 5,000 ppm superó a la de 1,000 ppm; siendo la primera de 58% y la segunda de 47.88% notándose un claro efecto del ácido giberélico. El siguiente tratamiento consistió en colocar la semilla a 4° centígrados reportando un 55.56% de germinación, en el cual no se encontró diferencias significativas con el tratamiento de 5,000 ppm descrito en el acápite antes mencionado.

Cartagena V. (1998), evaluó la respuesta del porcentaje de germinación en semillas de annona colorada *Annona reticulata* L., utilizando ácido giberélico en dosis de 5,000 ppm; el mejor resultado que obtuvo fue de 38.8%, a nivel de campo.

En nuestro estudio utilizando 5,000 ppm de ácido giberélico, bajo condiciones de laboratorio en *Annona muricata* L., se obtuvo un 58% de germinación (ver cuadro 8); es decir un 20% más, que el porcentaje de germinación reportado por Cartagena.

Cuadro 8. Prueba de Duncan, para los tratamientos en los que se utilizó Acido giberélico en semillas de guanaba *Annona muricata* L.

ACIDO GIBERELICO (GA3)	MEDIA	GRUPO
5,000 ppm	58%	a
0 ppm + agua a 4° centígrados	55.56%	ab
1,000 ppm	47.88%	b
Agua a 21° centígrados (Testigo)	44.88	b

## 8.2 Velocidad de germinación

Los datos se sometieron a un análisis de varianza, encontramos que para la variable velocidad de germinación se encontró diferencias significativas para el factor días de almacenamiento y para las concentraciones de ácido giberélico; pero esta variable resultó no significativa para la combinación de días de almacenamiento y concentración de ácido giberélico, es decir no existió efecto en la interacción de los mismos (ver cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de Varianza para la Velocidad de Germinación en semillas de guanaba *Annona muricata* L.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor de F	F Crítica (0.05)
Almacenamiento	3	113785.47	37928.49	65393.95	2.80 *
Concentraciones	3	7.4	2.47	4.26	2.80 *
Almac.* Concen.	9	9.75	1.08	1.16	2.08 ns
Error Experimental	48	27.84	0.58		
Total	63	113830.46			

Coefficiente de Variación = 0.53%

Al efectuar la prueba de medias de Duncan (ver cuadro 10), el tratamiento a ochenta días de almacenamiento reportó una velocidad de germinación de 76 días, dicho tratamiento fue el que reportó la menor velocidad de germinación, el tratamiento de treinta días reportó una velocidad de 143 días y el de 15 días reportó una velocidad de germinación de 171 días.

Cuadro 10. Prueba de Duncan, para el calculo de la Velocidad de Germinación utilizando días de Almacenamiento en semillas de guanaba *Annona muricata* L.

DIAS DE ALMACENAMIENTO	MEDIA	GRUPO
0 días	186 días	a
15 días	171 días	b
30 días	143 días	c
80 días	76 días	d

Con relación a las concentraciones de ácido giberélico (ver cuadro 11), las concentraciones que tuvieron los mismos resultados fueron: 5,000 ppm de ácido giberélico, 1,000 ppm y 0 ppm de GA3 más agua a 4° centígrados, con una velocidad de germinación de 144 días. El tratamiento de agua a 21° grados centígrados no mostró diferencias significativas.

Castillo P. (1997), evaluó la respuesta de la velocidad de germinación en semillas de chirimoyo *Annona cherimola* Mill., utilizando 1,000 ppm de ácido giberélico; el mejor resultado que obtuvo fue de 57 días, en condiciones de campo.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en esta investigación la velocidad de germinación para *Annona muricata* L., es de 144 días utilizando 1,000 ppm de ácido giberélico; esto debido principalmente al tiempo de almacenamiento y a las condiciones de laboratorio, a cual fueron sometidas las semillas.

Cuadro 11. Prueba de Duncan, para el calculo de la Velocidad de Germinación utilizando concentraciones de Acido Giberélico en semillas de guanaba *Annona muricata* L.

Acido Giberélico (GA3)	MEDIA	GRUPO
0 ppm de GA3 más agua 21° C	145 días	a
0 ppm de GA3 más agua a 4° C	144 días	b
5,000 ppm	144 días	b
1,000 ppm	144 días	b

Cuadro 12. Análisis económico del estudio.

Tratamientos	Porcentaje de germinación	No. de plantas germinadas (Promedio)	Costo/tratamiento (Q)	Costo/efectividad (Q)
Tratamiento 1	164	41	695	10.36
Tratamiento 2	220	55	615	5.08
Tratamiento 3	248	62	595	3.87
Tratamiento 4	144	36	595	11.48

El costo de producir una planta en un vivero particular es de Q 15.00\*\* y realizando el análisis del costo efectividad el tratamiento que resultó económicamente rentable fue el de agua a 4° C con un costo unitario de Q 3.87/planta bajo condiciones de laboratorio.

\*\* Comunicación personal con el Ing. Alex Montenegro "Profruta".

## 9. CONCLUSIONES

1. Con 5,000 ppm de ácido giberélico se logra incrementar el porcentaje de germinación de 44.88% a 58% bajo condiciones de laboratorio.
2. Con ochenta días de almacenamiento se obtiene la mejor velocidad de germinación que es de 76 días.
3. El tratamiento con mayor rentabilidad fue el de agua a 4° C, con un valor por planta de Q 3.87.

## 10. RECOMENDACIONES

1. Validar los resultados de este estudio realizando pruebas donde se almacene la semilla de guanaba *Annona muricata* L., durante 80 días a temperatura ambiente (22° C).
2. Se recomienda efectuar otras evaluaciones aumentando la concentración de ácido giberélico; para explorar la posibilidad de incrementar el porcentaje de germinación bajo condiciones de laboratorio.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Barahona Cockrell, M. 2000. Jocote, anona y cas: tres frutas campesinas de América. Costa Rica, Euna. 151 p.
2. Barahona Cockrell, M; Sancho Barrantes, E. 2000. Fruticultura general. 2 ed. San José, CR, EUNED. 164 p.
3. Bleicher, E; Quelzia, M; Mosca, JL; Silva, C Dos. 1997. Growth aspects of reproductive phase of soursop tree (*A. muricata* L.). In Congreso internacional de anonáceas (1997, Chapingo, México). Memoria. Chapingo, México, Universidad Autónoma de Chapingo. 30 p.
4. Boesewindel, FD; Boumann, F. 1984. The seed embryology of angiosperms. Berlin, s.e. p. 568-608.
5. Bridg, H. 2000. Micropagation and determination of the in vitro stability of (*A. cherimola* Mill.) and (*A. muricata* L.). Bogotá, Universidad de Bogotá. 102 p. 1 CD.
6. Cartagena Valenzuela, JR; Bareto Osorio, JD. 1998. Efecto del ácido giberélico y el método de siembra en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *annona colorada* (*Annona reticulata* L.). Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 51(2):235-244.
7. Castillo Alcopar, P; Muñoz Pérez, R; Rubí Arriaga, M. 1997. Método de propagación del chirimoyo (*A. cherimola* Mill.), en Coatepec Habinas. In Congreso internacional de anonáceas (1997, Chapingo, México). Memoria. México, Universidad Autónoma de Chapingo. p. 25-26.
8. Cochran, WG; Cox, GM. 1978. Diseños experimentales. 2 ed. México, Trillas. 661 p.
9. Cronquist, A. 1884. Introducción a la botánica. Trad. AM Ambrosio. México, CECSA. 848 p.
10. Duarte, O; Villagrancia, J; Francioso, R. 1975. Efecto de algunos tratamientos en la propagación del chirimoyo, por semillas, estacas e injertos. In Annual Meeting (22., 1974, Santo Domingo, República Dominicana). 1975. Proceedings of the tropical region American Society for Horticultural Sciences. v. 18, p. 41-48.
11. Ellis, RH; Hong, TD; Roberts, EH. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. Rome, Italy, International Board for Plant Genetic Resources. v. 2, 667 p.
12. FAO, CL. 1993. Valor nutritivo en la alimentación humana de algunos cultivos autóctonos subexplotados de mesoamérica. Santiago, Chile. p. 4-5.
13. González Esquinca, AR; Luna Cazares, L; Álvarez Moctezuma JG; Paz Velazco, Y De la. 1997. Estudios sobre el letargo de (*A. diversifolia* Eaff.). In Congreso internacional de anonáceas (1997, Chapingo, México). Memoria. México, Universidad Autónoma de Chapingo. p. 32.
14. Hartmann, HT; Kestler, DE. 1988. Propagación de plantas; principio y prácticas. 2 ed. México, McGraw-Hill. 760 p.

15. Hernández, JE; León J. 1992. Cultivos marginados otra perspectiva de 1492. Roma, Italia. p. 42-90. (Colección FAO. Producción y Protección Vegetal no. 16).
16. INE (Instituto Nacional de Estadística, GT). 2004. Número de fincas censales, superficie cultivada y producción obtenida de cultivos permanentes y semipermanentes. tomo 3. 1CD.
17. ISTA (Internacional Seed Testing Association, SW). 1996. Internacional rules for seed testing. Zurich, Switzerland. 159 p.
18. Lira de Parra, M; Montes, M. 1989. Aspectos técnicos y económicos de la producción, transformación y comercialización de la guanaba (*Annona muricata* L.). In Reunión técnica de la red latinoamericana de agroindustria de frutas tropicales: producción, transformación de frutas tropicales (3., 1989, Manizales, Colombia). Recopilación de las conferencias dictadas. Venezuela, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia / FAO. p. 93-94.
19. Mosca, JL; Elesbao Alves, R; Filgueiras, H; Ferreira de Oliveira J. 1997. Determination of harvest index for soursop fruits (*A. muricata* L.). In Congreso Internacional de anonáceas (1997, Chapingo, México). Memoria, Universidad Autónoma de Chapingo. p. 45.
20. Océano, ES. 1999. Enciclopedia práctica de la agricultura y la ganadería. España. 769 p.
21. Ortiz Ba, PC. 2003. Efecto del ácido giberélico, el ácido clorhídrico y la escarificación, sobre la germinación de la semilla de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 43 p.
22. Palacios Rangel, MI; Cano García, GV. 1997. La comercialización de anonáceas en México. In Congreso internacional de anonáceas (1997, Chapingo, México). Memoria. México, Universidad Autónoma de Chapingo. p. 68-89.
23. Pawshe, YH; Patil, BN. 1997. Effect of pregermination seed treatment on the germination and vigour of seedlings in custard apple (*Annona squamosa* L.). *Annals of Plant Physiology* 11(2):150-154.
24. Reboucas, A. 1997. Aspectos generales de las anonáceas en Brasil. In Congreso internacional de anonáceas (1997, Chapingo, México). Memoria. México, Universidad Autónoma de Chapingo. p. 92-94.
25. Rivera Hernández, SE. 2001. Estudio sobre latencia y viabilidad de la semilla de bleo (*Amaranthus* sp.) en cuatro diferentes especies, en condiciones de los campos experimentales de la facultad de Agronomía. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 103 p.
26. Rodríguez, JC. 1998. Efecto de la aplicación de cinco concentraciones de ácido giberélico en la inducción a la geminación de semilla escarificada de aguacate (*Persea* sp.), en San Carlos Alzatate, Jalapa. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 46 p.

27. Ruiz Sarabia, E; Morett Alatorre, L. 1997. Las anonas en el México prehispánico. In Congreso internacional de anonáceas (1997, Chapingo, México). Memoria. México, Univesidad Autónoma de Chapingo. p. 19-22.
28. Sanin, H. 1995. Guía metodológica general para la preparación y evaluación de proyectos de inversión social. Chile, Instituto Latinoamericano y del Caribe de Planificación Económica y Social. 172p.
29. Smet, S de; Van Damme, P; Sheldeman, X; Romero, J. 1999. Seed structure and germination of cherimoya (*A. cherimola* Mill.). *Acta Horticulturae* no. 497:269-278.
30. Standley, PC; Steyeramak, J. 1946. Flora of Guatemala. Chicago, US, Chicago Natural Museum History, Fieldiana Botany. v. 24, pte. 4, p. 276-280.
31. Stenzel, NMC; Murata, IM; Neves, CSVJ. 2003. Superação da dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. *Ver. Brás. Frutic.* 25(2):s.p.
32. Toll Jubes, J; Martínez, H; Padilla, E; Oeste, CA. 1975. Efectos de escarificación, medio, posición de siembra y ácido gibberélico, sobre la germinación de semillas en chirimoya (*Annona cherimolia* Mill.). *Rev. Agron. N.O. Argent.* 12(1-2):161-172.
33. Valenzuela, JR; Osório, JD. 1998. Efecto del ácido giberélico y el método de siembra en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de anona colorada (*A. reticulata* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 51(2):235-244.
34. Van Damme, P; Scheldeman, X. 1999. El fomento del cultivo de la chirimoya en América Latina. *Unasyuva* 50(198):43-47.
35. Vásquez, F. 2004. El proceso de germinación y las causas del fallo en la germinación en las semillas de plantas superiores (correspondencia personal). Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía.
36. Vidal Bello, J; Noriega, G. 1997. La guanábana (*A. muricata* L.) una opción para el desarrollo agrícola en al costa grande del estado de Guerrero. In Congreso internacional de anonáceas (1997, Chapingo, México). Memoria. México, Universidad Autónoma de Chapingo. p. 5-6.
37. Vidal Hernández, L. 1997. Compatibilidad vegetativa de la guanábana, (*A. muricata* L.), sin fibra sobre diversos portainjertos de anonáceas. In Congreso internacional de anonáceas (1997, Chapingo, México). Memoria. México, Universidad Autónoma de Chapingo. p.27.
38. Vidal Hernández, L; Nieto Angel, D. 1997. Diagnostico técnico y comercial de la guanábana en México. In Congreso internacional de anonáceas (1997, Chapingo, México). Memoria. México, Universidad Autónoma de Chapingo. p. 1-17.
39. Villamil, H; Corchuelo, G; Valencia, M de. 1999. Morfología, anatomía de la semilla y composición química del endospermo de *Annona muricata* L. *Agronomía Costarricense* 16(1):19-23.