

## Prueba de tetrazolio en semillas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.)

### Tetrazolium test for asparagus (*Asparagus officinalis* L.) seeds

Cinthia Belinda Valdivia Trujillo<sup>1\*</sup>; Cecilia Emperatriz Figueroa Serrudo<sup>2</sup>; Mercedes Flores Pimentel<sup>3</sup>

\*Autor de correspondencia

#### Resumen

El objetivo consiste en determinar el pre tratamiento más adecuado para la prueba de tetrazolio en semillas de espárrago. La metodología está dividida en dos etapas: en la primera, se analizan 140 semillas para la descripción morfológica, la estructura interna y la descripción del proceso de germinación. En la segunda etapa, se realizan los ensayos de viabilidad y germinación. En el ensayo de germinación se utilizan 400 semillas, se usa papel toalla como sustrato, con temperaturas alternas de 20 y 30 °C durante 28 días. En el ensayo de viabilidad se utilizan 1200 semillas y se emplea un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3x2x2. Los factores estudiados se clasifican en tres: forma de la humidificación (SP, EP, A), tiempo de humidificación (24 y 48 horas) y tiempo de inmersión en tetrazolio (12 y 24 horas). Entre los principales resultados se establece que la semilla de *Asparagus officinalis* es completa, tiene el endospermo córneo y el embrión se encuentra en la parte central. La semilla tiene una germinación hipogea, la germinación se inicia en promedio al séptimo día. En el ensayo de viabilidad se determina estadísticamente que la mejor condición es la combinación de los factores principales: forma de humidificación y tiempo de humidificación. Finalmente, se concluye que las semillas de espárrago necesitan de un pre tratamiento de 48 horas en agua para que el tetrazolio pueda reaccionar adecuadamente.

**Palabras clave:** *Asparagus officinalis*; semilla, morfología; germinación; viabilidad; tetrazolio; pre tratamientos.

#### Abstract

The objective is to determine the most suitable pretreatment for the tetrazolium test in asparagus seeds. The methodology is divided into trials, the first one is analyzed 140 seeds for morphologic description, internal structure and description of the germination process. In the second stage the tests of viability and germination is made. Second trial is included 400 seeds for the germination test using as a substrate paper towel, with alternating temperatures of 20 and 30 °C during 28 days. For viability test 1200 seeds is analyzed in a completely randomized design (CRD) with factorial distribution. Factors studied are: humidification type (TP, BP, W), humidification time (24 and 48 hours) tetrazolium immersion time (12 and 24 hours). *Asparagus officinalis* seed is complete, it has a corneus endosperm and in the central part is the embryo. It has a hypogeal germination, beginning germination approximately the seventh day. Viability test is showed that the best conditions were water soaking by 48 hours.

**Keywords:** *Asparagus officinalis*; seed; morphology; germination; viability; tetrazolium test; pre treatments.

#### 1. Introducción

La prueba de germinación del espárrago dura 28 días (ISTA, 2011) y la prueba de tetrazolio (ISTA, 2011) no cuenta con una metodología estandarizada. No obstante, el crecimiento de las agroexportaciones en el período 2010-2014 fue del 56 % con un aumento en los mercados de destino, productos exportados y agroexportadores (IICA, 2016). El Perú se ubica a nivel global como el primer país exportador de espárrago fresco, quinua y maca; el segundo de palta y mango frescos, el tercero de banano orgánico, el cuarto de pimientos y el quinto de uva de mesa, logros que lo han perfilado entre los diez países exportadores de alimentos más importantes del mundo (IICA, 2018).

En diciembre del 2017, el Índice de la Producción Agropecuaria (IPA) registró un significativo aumento de 11,47 % con respecto a diciembre 2016, debido a la mejora sustancial de la producción agrícola liderada por cultivos como la uva, arroz cáscara, maíz amarillo duro, plátano, papa, cebolla, cacao, alcachofa, espárrago, ajo, sandía, piña, pallar grano seco, entre otros (INEI, 2018). Los productos agrícolas que más incidieron al alza del IPA fueron la uva 106,89 %, el arroz cáscara 18,11 %, el maíz amarillo duro 37,37 %, el plátano 30,13 %, la papa 16,39 %, la cebolla 40,51 %, el cacao 33,53 %, la alcachofa 44,82 %, el espárrago 5,61 %, el ajo 27,42 %, la sandía 139,63 %, la piña 16,85 % y el pallar grano seco 44,12

<sup>1</sup>Departamento Académico de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria La Molina, Apartado postal 12 – 056 – La Molina, Lima, Perú. Email: [20070075@lamolina.edu.pe](mailto:20070075@lamolina.edu.pe)

<sup>2</sup>Departamento Académico de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria La Molina, Apartado postal 12 – 056 – La Molina, Lima, Perú. Email: [cecilia\\_figueroa@lamolina.edu.pe](mailto:cecilia_figueroa@lamolina.edu.pe)

<sup>3</sup>Departamento Académico de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Apartado postal 12 – 056 – La Molina, Lima, Perú. Email: [mflores@lamolina.edu.pe](mailto:mflores@lamolina.edu.pe)

% entre los principales (INEI, 2018). El valor bruto de la producción del espárrago a diciembre del 2016 fue 100 millones de soles; en cambio en diciembre del siguiente año alcanzó 105,7 millones de soles (SIEA, 2017). La producción nacional del espárrago en diciembre del 2016 alcanzó 32,8 miles de t; en cambio, en el mismo mes del 2017 se obtuvo 34,6 miles de t (INEI, 2018; SIEA, 2017). Por lo tanto, se decidió trabajar una propuesta para reducir el tiempo del análisis para las semillas de espárrago y así poder llenar el vacío de información que existía dentro de las normas ISTA. En este sentido, el objetivo principal de la investigación fue determinar las condiciones adecuadas para la prueba de viabilidad.

## 2. Materiales y métodos

Los ensayos se realizaron en la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM), ubicada en el distrito de La Molina, provincia de Lima, Perú, a 240 msnm aproximadamente.

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

### Material Vegetal

El Departamento Académico de Horticultura facilitó las semillas de *Asparagus officinalis* L. 'UC-157' F1 importadas de California Asparagus Seed and Transplant Inc. Las semillas fueron cosechadas el 2008 y conservadas a 7 °C bajo oscuridad en una bolsa hermética.

### Estudio Morfológico

En esta etapa se realizó la descripción morfológica de la estructura externa e interna de la semilla y del proceso de germinación, para los cuales se utilizaron 140 semillas que se separaron en tres grupos.

El primer grupo conformado por 20 semillas, fue para el estudio de la estructura interna. Previamente, las semillas fueron remojadas en agua por 24 horas, después fueron hervidas por 20 minutos, debido a la dureza de la semilla. Se realizaron cortes longitudinales y transversales a la semilla y se determinó la posición del embrión, la forma y sus componentes, así también se observó el endospermo. Por otro lado, se reconocieron los rasgos externos de la semilla. Se utilizó un estereoscopio de marca Leica con Zoom 2000, una navaja y lugol para el reconocimiento de las partes de la semilla. Al segundo grupo conformado por 20 semillas, se le midió el largo, el ancho y el espesor utilizando papel milimetrado. Luego las semillas fueron cortadas longitudinalmente para extraer el embrión y determinar su longitud. Finalmente, el tercer grupo, conformado por 100 semillas, se les puso a germinar en

papel toalla enrollado a temperatura ambiente. A partir del día siete se empezó a extraer la plántula más saludable y mejor desarrollada, con la finalidad de describir el proceso de germinación. Luego, las evaluaciones fueron cada dos días.

Se realizó una primera evaluación a los 10 días para cuantificar el número de plántulas normales, tal como lo establece Bekendam y Grob (1980) y AOSA (2005). Al finalizar la prueba, se llevó a cabo la segunda evaluación donde se identificaron plántulas normales y anormales, semillas frescas, duras, y muertas (Bekendam y Grob, 1980; AOSA, 2005), y se calcularon los respectivos porcentajes.

### Ensayo de Germinación

Los requerimientos para los ensayos de germinación de *Asparagus officinalis* fueron tomados de las normas ISTA (2011). Se utilizó un cuarto grupo de 400 semillas tomadas al azar. Luego se dividieron en 4 grupos de 100 semillas cada uno. Las semillas de cada repetición se colocaron con una adecuada separación sobre el papel toalla previamente humedecido con agua destilada. Finalmente, se procedió a enrollar cada papel toalla húmeda con las semillas y los cuatro rollos se colocaron en un envase de plástico con tapa, y este a su vez se puso dentro de la cabina de germinación Seedburo.

El sustrato se mantuvo húmedo durante los 28 días que duró el ensayo (ISTA, 2011). La temperatura dentro de la cabina fue alterna (20 °C por 16 horas y 30 °C durante 8 horas) (ISTA, 2011). La iluminación artificial se reguló automáticamente dentro de la cabina las 24 horas para asegurar un buen desarrollo de las plántulas que permitió una acertada evaluación (Figura 1).



Figura 1. Cabina de germinación Seedburo con luz artificial y control analógico de la temperatura

### Ensayo de Viabilidad

La preparación de la semilla, así como la evaluación y la cuantificación de los resultados se realizaron en base a las reglas establecidas por ISTA (2011) y por Adam (2007) para el género *Allium*. En el ensayo se utilizaron 1200 semillas conducidas en un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3x2x2 y 4 repeticiones.

Los tres factores para evaluar la viabilidad de las semillas de *Asparagus officinalis* fueron los siguientes:

- Factor “forma de la humidificación” (H): sobre papel (SP), entre papel (EP) y remojo en agua (A).
- Factor “tiempo de humidificación” (T): 24 y 48 horas
- Factor “tiempo de inmersión en tetrazolio” (I): 12 y 24 horas.

El experimento se inició humidificando las semillas con formas y tiempos diferentes (Figura 2).

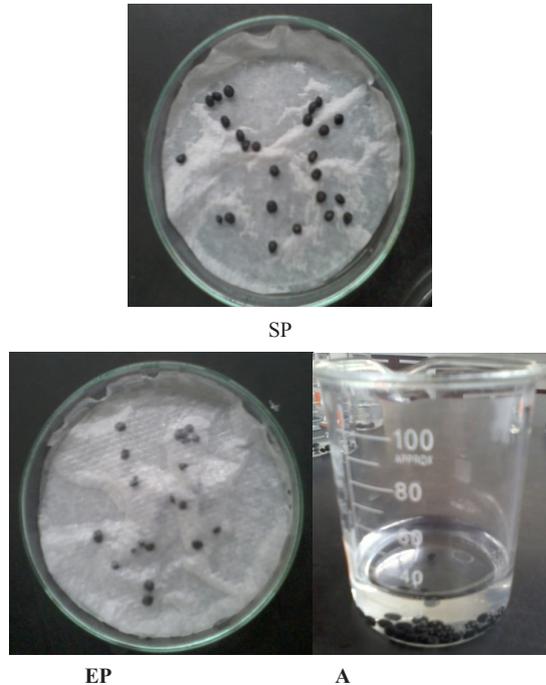


Figura 2. Forma de la humidificación. (SP) Sobre papel. (EP) Entre papel. (A) Remojo en agua

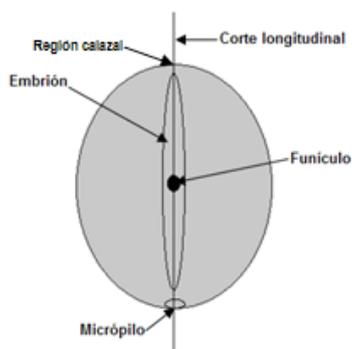


Figura 3. Esquema del corte longitudinal de la semilla de espárrago

Luego se hicieron cortes longitudinales a las semillas (Figura 3) y las mitades cortadas fueron colocadas en el tetrazolio al 0,5 % dentro de una estufa Selecta Conterm 464294 a 20 °C para facilitar la imbibición y la reacción del reactivo.

Los porcentajes de semillas viables y no viables se determinaron tomando como referencia los patrones de tinción propuestos por Adam (2007) para cebolla. Las semillas viables fueron aquellas con el embrión totalmente teñido o con mínimas zonas sin teñir, y las semillas no

viables fueron aquellas con zonas sin teñir, con mínimas zonas teñidas o aquellas en donde se observaron el punto de inserción entre el cotiledón y la plúmula sin teñir (Adam, 2007).

### 3. Resultados y discusión

#### Características Morfológicas

La semilla de *Asparagus officinalis* presenta testa, endospermo y embrión (Figura 5), tal como lo señala Stevens (2018) para la subfamilia Asparagoideae (Regalado, 1992). A esta semilla se la considera completa por contener los tres componentes. En cuanto a la testa y al endospermo son de consistencia dura, lo que coincide con las observaciones de Robbins y Borthwick (1925), quienes sostienen que la testa es de carácter lignificado y el endospermo es córneo. En la superficie externa de la semilla se ha observado al funículo como una cicatriz, y al micrópilo como una pequeña depresión de la testa (Figura 4). Esta última tiene color negro, finamente rugoso y poroso. Robbins y Borthwick (1925) también describieron a la testa de color negro, finamente rugosa y un tanto frágil (Figura 4).

Las semillas han presentado dos tipos de formas: achatada y redonda. Esto coincide con la descripción de Montes (1992), quien afirma que si dos óvulos desarrollan en una sola cavidad de la baya las superficies que entran en contacto llegarán a achatarse debido a la presión mutua; en cambio, si un óvulo individual desarrolla en la cavidad, su forma será completamente redondeada. El tamaño promedio de las semillas fue 3,8 mm de largo, 3,2 mm de ancho y 2,6 mm de espesor.

En las secciones longitudinales de la semilla se observa al embrión ubicado en la parte central de la semilla, rodeado por el endospermo (Figura 5), tal como lo indica Regalado (1992). El embrión presenta forma lineal y se encuentra paralelo al eje de la semilla respecto al funículo y micrópilo (Figura 5 A y B). El embrión se observa de color blanco, de estructura esbelta y filiforme, lo que señala Robbins y Borthwick (1925) para espárrago. El tamaño promedio del embrión fue de 3,5 mm (su tamaño varió respecto al tamaño de la semilla, más grande era la semilla, más grande era el embrión). El embrión está constituido por tres partes: cotiledón, plúmula y radícula (Figura 5 C y D). En la Figura 5 se observa que la radícula se ubica hacia el micrópilo y el cotiledón se orienta hacia la zona calazal y este es de ápice obtuso.

La semilla entera sin testa (Figura 5B) y la cortada longitudinalmente (Figura 5D) reaccionaron con el lugol debido probablemente a la presencia de hemicelulosa que se almacena en las paredes de las células (Montes, 1992).

#### Proceso de Germinación de las Semillas

En el proceso de germinación de *Asparagus officinalis* (Figura 6) se pudieron distinguir las tres fases propuestas por Herrera *et al.* (2006):

Fase de imbibición: Esta fase ocurrió entre los 0 y 6 días,

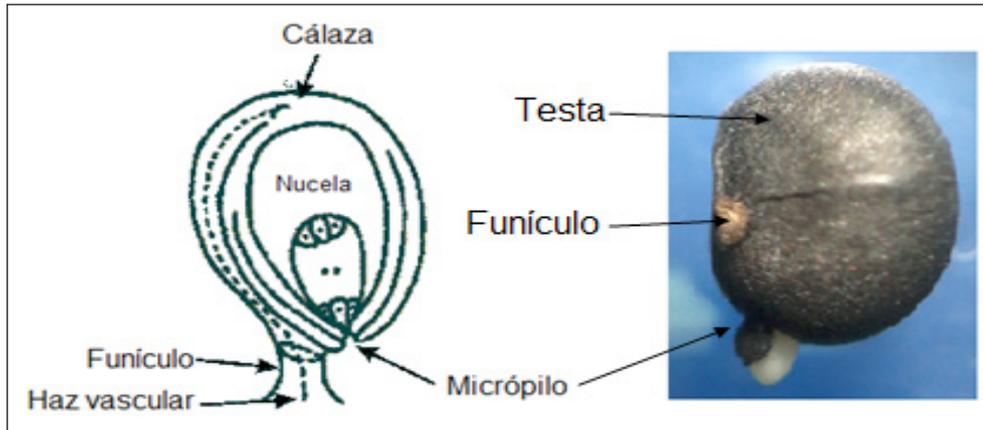


Figura 4. Superficie externa de la semilla de espárrago

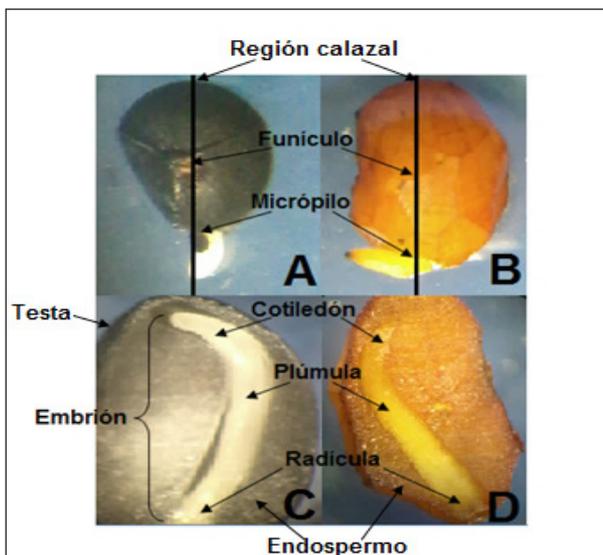


Figura 5. Características morfológicas

A) Semilla con testa y sin lugol, se muestra la orientación del corte longitudinal. B) Semilla sin la testa y con lugol, se muestra la orientación del corte longitudinal. C) Sección longitudinal de la semilla y sin lugol, se observa el embrión. D) Sección longitudinal de la semilla con lugol. Se observa el endospermo coloreado de amarillo.

y en este tiempo los tejidos de la semilla absorbieron una intensa cantidad de agua (Figura 6A). Dicho incremento estuvo acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria (García *et al.*, 2006).

Fase de activación de procesos metabólicos o germinación *sensu stricto*: En esta fase se dio inicio a la actividad enzimática y al metabolismo respiratorio, translocación y asimilación de las reservas alimenticias en las regiones de crecimiento del embrión (Vázquez *et al.*, 1997). La germinación *sensu stricto* no incluye, por lo tanto el crecimiento de la plántula, el cual comienza cuando la germinación termina (Bewley y Black, 1994).

Fase de emergencia de la radícula: En esta última fase se inició la emergencia de la radícula en el día siete (Figura 6B). Aquí concluyó el proceso de germinación (Bewley y Black, 1994) desde el punto de vista fisiológico. El crecimiento subsecuente es considerado un proceso separado (Herrera *et al.*, 2006). Los procesos que ocurren en la naciente plántula, tales como la movilización de las

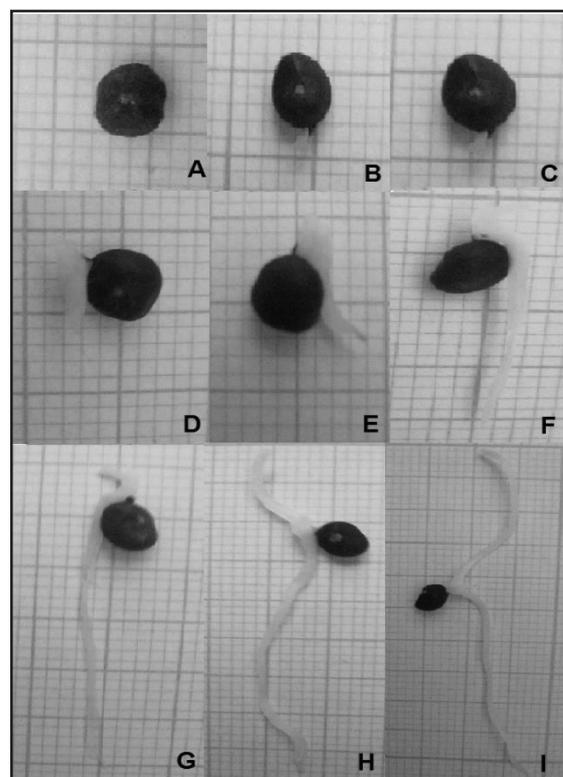


Figura 6. Proceso de germinación de *Asparagus officinalis*

A) La semilla empieza a absorber agua y se hincha.  
 B) Día 7, emergencia de la radícula (1 mm).  
 C) Día 9, crecimiento radicular (3 mm) y se inicia el crecimiento de los pelos absorbentes.  
 D) Día 11, crecimiento radicular (4.5 mm) e inicio de la elongación del epicotilo que empuja a la plúmula (1.5 mm).  
 E) Día 13, crecimiento radicular (5 mm) y elongación de la plúmula (2 mm).  
 F) Día 15, el crecimiento radicular es de 20 mm y la elongación de la plúmula (4 mm).  
 G) Día 17, el crecimiento radicular es de 26 mm y crecimiento de la plúmula (5 mm).  
 H) Día 19, el crecimiento radicular es de 30 mm y de la plúmula 12 mm.  
 I) Día 21, crecimiento radicular (42 mm) y elongación de la plúmula (23 mm).

principales reservas de almacenamiento no son parte de la germinación, sino son eventos postgerminación (Bewley y Black, 1994).

Entre los días 7 y 10, se observó el crecimiento solo de la radícula (Figura 6B y C). El día 11, el epicotilo empezó a elongarse y a empujar a la plúmula hacia al exterior (Figura 6D). En los días posteriores (13 y 15), la radícula

se incrementó 15mm; mientras que la plúmula creció 2mm más entre esos dos días (Figura 6E y F). Sin embargo, entre los días 17 y 19, la radícula creció apenas 4mm más, pero la plúmula se incrementó 7mm (Figura 6G y H). Finalmente, entre los días 19 y 21, tanto la radícula como la plúmula crecieron más, incrementándose 12 y 11mm, respectivamente (Figura 6H e I).

#### Ensayo de Germinación

En el ensayo de germinación se observó un número similar de plántulas normales y anormales, semillas muertas, y frescas entre las cuatro repeticiones (Tabla 1). De acuerdo a ISTA (2011), los resultados de una prueba de germinación pueden ser confiables solo si la diferencia entre las repeticiones más altas y las más bajas están dentro de las tolerancias aceptadas. La confiabilidad se verifica tomando el porcentaje promedio de las repeticiones y redondeándolo al número entero más cercano, y comparándolo con el rango máximo tolerado. El resultado es considerado confiable, si la diferencia entre las repeticiones más altas y más bajas no excede la tolerancia indicada (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de plántulas normales y anormales, y semillas frescas y muertas por repetición luego de 28 días

| Repetición              | Normales | Anormales | Frescas | Muertas |
|-------------------------|----------|-----------|---------|---------|
| I                       | 47       | 4         | 19      | 30      |
| II                      | 45       | 9         | 14      | 32      |
| III                     | 42       | 6         | 22      | 30      |
| IV                      | 46       | 7         | 15      | 32      |
| Sumatoria               | 180      | 26        | 70      | 124     |
| Diferencia              | 3        | 5         | 8       | 2       |
| Tolerancia <sup>1</sup> | 19       | 10        | 14      | 18      |
| Promedio                | 45       | 6.5       | 17.5    | 31      |
| Redondeo                | 45       | 7         | 17      | 31      |

<sup>1</sup>Tolerancias entre repeticiones más altas y más bajas de porcentajes de germinación en una prueba de germinación (prueba de dos colas a un nivel de significancia de 2,5 %) (ISTA, 2011).

#### Plántulas normales

En su mayoría fueron plántulas normales intactas, es decir con todas sus estructuras esenciales completas y bien desarrolladas (Bekendam y Grob, 1980; AOSA, 2005). Algunas plántulas presentaron ligera presencia de zonas necróticas en la parte radicular (Bekendam y Grob, 1980), pero estas no afectaron su desarrollo. Como se puede observar en la Tabla 1, el porcentaje de germinación alcanzado fue de 45 % con temperaturas alternas de 20 – 30 °C a los 28 días. Knaflewski (2008) obtuvo el 50 % de plántulas emergidas entre los 14 y 11 días con temperaturas constantes de 21 y 25 °C, respectivamente; mientras que Pill, Frett y Morneau (1991) obtuvieron porcentajes de germinación de 6, 90 y 91 % a temperaturas constantes de 10, 20 y 30 °C a los 22, 7 y 6 días, respectivamente. Cabe indicar que tanto Knaflewski (2008) y Pill *et al.* (1991) han trabajado con el cultivar ‘Mary Washington’ y ensayos con condiciones diferentes.

#### Plántulas anormales.

Las plántulas anormales que se observaron en las cuatro repeticiones fueron en su mayoría plántulas deformes que presentaron raíces primarias atrofiadas, podridas, mazudas y con geotropismo negativo (Bekendam y Grob, 1980; AOSA, 2005). El porcentaje total de estas fue de 7 % (Tabla 1). Según Camacho (1994), los compuestos fenólicos y otros compuestos volátiles que se encuentran en la cubierta de las semillas inhiben la germinación, pero en caso de haber germinación se producen radículas cortas, deformes y necrosadas de la punta.

#### Semillas frescas

Con respecto a las semillas no germinadas, se observaron que todas estaban turgentes por la absorción de agua. Es por eso, que a todas las semillas no germinadas y embebidas se las consideraron como semillas frescas. En la Tabla 1 se puede ver que representaron el 17 %, valor por encima del 5%, que obliga a verificar que las semillas tienen o no el potencial para producir plántulas normales a través de la prueba de viabilidad con tetrazolio (SENASA, 2007). Estas semillas que no germinaron probablemente se encuentren en estado de latencia, esto se debería a la presencia de sustancias químicas inhibitoras, fotosensibilidad (Salisbury y Ross, 1994) o factores no adecuados que bloquean el proceso de germinación, tales como la presencia de una testa lignificada (Robbins y Borthwick, 1925).

#### Semillas muertas

Las semillas muertas que se encontraron en la prueba fueron identificadas porque, después de presionadas, se deshicieron inmediatamente. También, se observó que las semillas estaban podridas interiormente debido a la consistencia blanda del endospermo y la superficie mohosa o mucilaginosa de la testa. Estas significaron el 31 % del total de semillas utilizadas en el ensayo (Tabla 1).

#### Ensayo de viabilidad

En el ensayo de viabilidad de *Asparagus officinalis*, los resultados se basaron en la propuesta de patrón de tinción obtenida después de la reacción del tetrazolio dentro de los tejidos de la semilla interactuando con los procesos bioquímicos de reducción en las células vivas gracias al hidrógeno de las deshidrogenasas (ISTA, 2011). De esta manera, las semillas viables tuvieron el embrión totalmente teñido o con mínimas zonas sin teñir (Figura 7), mientras que las semillas no viables no reaccionaron con el tetrazolio y por lo tanto, se mantuvieron sin teñir o con mínimas zonas teñidas a lo largo del embrión, y en algunos casos a nivel del punto de inserción entre el cotiledón y la plúmula (Figura 8). Por lo tanto, el uso de este reactivo permitió distinguir las células vivas del embrión que se colorearon de rojo, de las células muertas que permanecieron incoloras y de las células que respiraron débilmente o enfermas, que se colorearon de rosado (Peretti, 1994). En cuanto a la

intensidad de la coloración Peretti (1994) señala que esta depende de cuán activa es la solución preparada, en este experimento se utilizó una solución al 0,5 %, que parece resultó ser adecuada para la tinción ya que se encuentra dentro de lo permitido por ISTA (2011). En las semillas, también se observó una tinción a nivel del endospermo debido probablemente al excesivo remojo en tetrazolio.

En el análisis de varianza (ANVA) para semillas viables (Tabla 2) se observa que los factores principales “forma de humidificación” (H) y “tiempo de humidificación” (T) son altamente significativos, siendo el factor principal “tiempo de inmersión en tetrazolio” (I) no significativo. También resultó significativa la interacción H\*T, mientras que las interacciones H\*I, T\*I y la triple interacción resultaron no significativas. Los coeficientes de variabilidad fueron de 15,16 % para semillas viables y 15,21 % para semillas no viables.

Tabla 2. Análisis ANVA para semillas viables

| Fuente | GL | SC          | CM          | F calculado | Pr > F     |
|--------|----|-------------|-------------|-------------|------------|
| H      | 2  | 275.7916667 | 137.8958333 | 38.26       | <0.0001 ** |
| T      | 1  | 35.0208333  | 35.0208333  | 9.72        | 0.0036 **  |
| I      | 1  | 2.5208333   | 2.5208333   | 0.70        | 0.4085 ns  |
| H*T    | 2  | 28.7916667  | 14.3958333  | 3.99        | 0.0271 *   |
| H*I    | 2  | 0.5416667   | 0.2708333   | 0.08        | 0.9278 ns  |
| T*I    | 1  | 3.5208333   | 3.5208333   | 0.98        | 0.3296 ns  |
| H*T*I  | 2  | 4.0416667   | 2.0208333   | 0.56        | 0.5757 ns  |

ns diferencia no significativa.

\* diferencia significativa (p ≤ 0,05).

\*\* diferencia altamente significativa (p ≤ 0,001).

Como la interacción H\*T fue significativa no fue necesario comparar las medias con la prueba de Tukey al 0.05 para semillas viables de los factores H y T que resultaron altamente significativos. Sin embargo, la respuesta del factor “forma de humidificación” (H) depende del factor “tiempo de humidificación” (T) y viceversa. Por tal razón, se puede observar en la Tabla 3, que el nivel “remojo en agua” (A) del factor H en combinación con el nivel 48 horas del factor T presentan los mayores porcentajes y medias de semillas viables. Mientras que la combinación “sobre papel” (SP) con el nivel 24 horas tiene los menores porcentajes y medias de viabilidad. El proceso de humidificación proporciona a las semillas un aumento de tamaño, el reblandecimiento de las cubiertas seminales y la activación de los procesos biológicos de germinación que serán útiles en las etapas subsiguientes (Adam, 2007).

El factor “tiempo de inmersión en tetrazolio” (I) no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de las semillas al resultar no significativo. Es por eso, que en los niveles 12 y 24 horas (Tabla 3) casi no hay variaciones entre los porcentajes y las medias de viabilidad, lo que quiere decir, que con cualquiera de los dos niveles, los resultados van a ser muy semejantes. El tiempo que se requiere para producir una tinción aceptable depende del tipo de semilla, del método de preparación, de la sanidad y vigor de la semilla, de la concentración de la solución de análisis y especialmente de la temperatura (Adam, 2007).

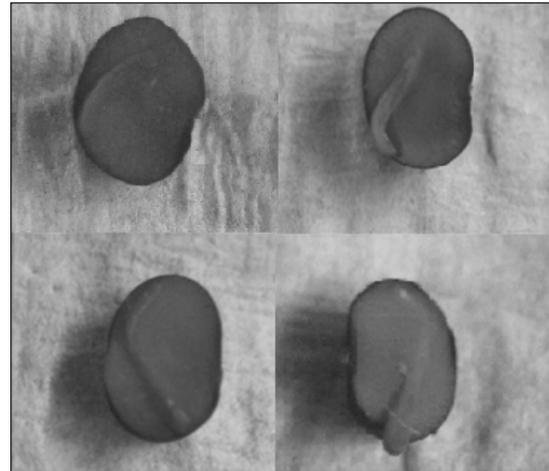


Figura 7. Semillas viables

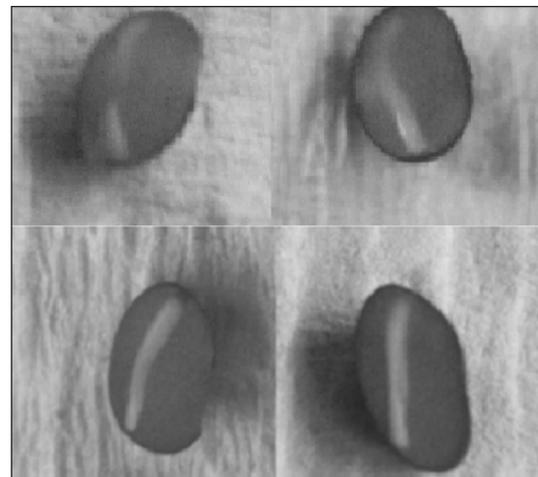


Figura 8. Semillas no viables

Tabla 3. Número de semillas viables de un total de 25 por cada repetición

| H     | SP   |      | EP   |      | A    |      |
|-------|------|------|------|------|------|------|
|       | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| T     | 12   | 24   | 12   | 24   | 12   | 24   |
| I     | 12   | 24   | 12   | 24   | 12   | 24   |
| 1     | 7    | 4    | 9    | 11   | 13   | 14   |
| 2     | 8    | 8    | 12   | 10   | 15   | 13   |
| 3     | 8    | 7    | 11   | 13   | 11   | 15   |
| 4     | 9    | 9    | 12   | 12   | 14   | 15   |
| Media | 8    | 7    | 11   | 12   | 13   | 14   |
| %     | 32   | 28   | 44   | 48   | 52   | 56   |

Factor H: Forma de la humidificación.

Factor T: Tiempo de humidificación.

Factor I: Tiempo de inmersión en tetrazolio.

SP: Sobre papel.

EP: Entre papel.

A: Agua.

#### 4. Conclusiones

La semilla de *Asparagus officinalis* L. ha sido descrita como completa, pues posee testa, endospermo y embrión. El espárrago ha mostrado una germinación hipogea que se ha iniciado en promedio al séptimo día. El ensayo de germinación bajo condiciones controladas estableció un porcentaje (45 %) por debajo del porcentaje de viabilidad más alto (64 %), por presentar latencia debido a la testa lignificada. Las condiciones más adecuadas para la prueba de viabilidad han sido determinadas por la interacción

de los factores principales “*forma de humidificación*” (H) y “*tiempo de humidificación*” (T): remojo en agua por 48 horas. Finalmente, se recomiendan en futuras investigaciones realizar diferentes cortes a la semilla para exponer al embrión y así lograr una mejor absorción del tetrazolio.

## 5. Literatura citada

- Adam, G. (2007) *Germinación, vigor, viabilidad, calidad y mejora de semillas de cebolla (Allium cepa L.)* (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Faculte Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique), Madrid.
- AOSA [Association of Official Seed Analysts]. 2005. *Seedling evaluation handbook*. Canada and United States.
- Bekendam, J. y Grob, R. 1980. Manual para evaluación de plántulas en análisis de germinación. España: Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero, Estación de Ensayo de Semillas.
- Bewley, J.D. and Black, M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. New York. United States: Plenum Press.
- Camacho, F. 1994. *Dormición de semillas. Causas y tratamientos*. México: Editorial Trillas.
- García, F., Roselló, J. y Santamarina, P. 2006. *Introducción al funcionamiento de las plantas*. España: Editorial Univ. Politécnica de Valencia.
- Herrera, J.; Alizaga, R.; Guevara, E. y Jiménez, V. (2006). *Germinación y crecimiento de la planta*. España: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 2018. *Estrategia del IICA en el país: 2016-2018*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Disponible en: <http://repositorio.iica.int/bitstream/11324/4186/1/BVE17089201e.pdf>
- IICA [Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura]. 2018. *Informe de rendición de cuentas 2014-2016: Representación del IICA en Perú / IICA*. Disponible en: <http://repositorio.iica.int/bitstream/11324/2655/1/BVE17038733e.pdf>
- INEA [Instituto Nacional de Estadística e Informática]. 2016. *Producción nacional: Informe técnico N° 02*. Perú. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Disponible en: <https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/boletines/03-informe-tecnico-n02-producción-nacional-dic2017.pdf>
- ISTA [International Seed Testing Association]. 2011. *International rules for seed testing*. Switzerland.
- Knaflewski, M. 2018. Minimum temperature and heat sum for seed germination and seedling emergence of asparagus. *Acta Hort.* 776: 465-470. doi: 10.17660/ActaHortic.2008.776.60
- Montes, A. 1992. *El cultivo de espárrago en el Perú*. Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina. Programa de Investigaciones en Hortalizas.
- Peretti, A. 1994. *Manual para análisis de semillas*. Primera edición. Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Pill, W.G.; Frett, J.J. and Morneau, D.C. 1991. Germination and seedling emergence of primed tomato and asparagus. Seeds under adverse conditions. *HortScience* 26(9): 1160-1162. Disponible en: <http://hortsci.ashspublications.org/content/26/9/1160.full.pdf>
- SIEA [Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias]. 2018. *Producción agropecuaria creció 2,6% en el 2017. Valor Bruto de la Producción Agropecuaria*. Ministerio de Agricultura y Riego. Disponible en: [http://siea.minagri.gob.pe/siea/sites/default/files/vbp-diciembre17\\_0.pdf](http://siea.minagri.gob.pe/siea/sites/default/files/vbp-diciembre17_0.pdf)
- Regalado, F. 1992. *Espárrago: Conducción de viveros*. Lambayeque. Perú: Colegio de Ingenieros del Perú. Consejo Departamental de Lambayeque.
- Robbins, W.W. y Borthwick, H.A. 1925. Development of the seed of *Asparagus officinalis*. *Botanical Gazette, volumen*, (80): 426.
- Salisbury, F. y Ross, C. 1994. *Fisiología vegetal*. México: Grupo Editorial Iberoamérica.
- Stevens, P.F. 2018. *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 14, Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>
- SENASA [Servicio Nacional de Sanidad Agraria]. 2007. *Manual de análisis de calidad de semillas de acuerdo a las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas (ISTA)*. Perú.
- Vázquez, C.; Orozco, A.; Rojas, M.; Sánchez, M.E. y Cervantes, V. 1997. La reproducción de las plantas: Semillas y meristemos. *La ciencia para todos, volumen* (157). Disponible en: [http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/157/htm/sec\\_5.htm](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/157/htm/sec_5.htm)