UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Determinación de la Condición Fisiológica de Semillas de Cuatro Variedades de Guayaba (*Psidium guajava)*

Jorge Ernesto Guevara Ohara

Universidad Nacional de Colombia

Facultad, Ciencias Agropecuarias

Palmira, Colombia

2017

Determinación de la Condición Fisiológica de Semillas de Cuatro Variedades de Guayaba (*Psidium guajava)*

Jorge Ernesto Guevara Ohara

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencia Agrarias

Director (a):

Carlos Iván Cardozo Conde, Ph.D.

Profesor Asociado

Línea de Investigación:

Fisiología de Cultivos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad, Ciencias Agropecuarias

Palmira

2017

(Dedicatoria o lema)

A mi familia por su apoyo incondicional y a todas las personas que contribuyeron durante el desarrollo de esta investigación.

Agradecimientos

A mi padre Jorge Mario Guevara Espinal, por su apoyo moral y Económico durante el desarrollo y culminación de esta etapa de mi vida.

Al profesor Carlos Iván Cardozo Conde, por su apoyo, colaboración, confianza y calidad humana durante el desarrollo y culminación de esta investigación.

A Luis Guillermo Santos por su colaboración.

Hermes, por su apoyo económico para la realización de este trabajo de investigación.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA Sede Palmira, por formarme como profesional.

A CORPOICA PALMIRA, por suministrar los materiales del Banco de Germoplasma de Guayaba, sin los cuales no habría sido posible desarrollar esta investigación, en especial al Doctor Álvaro Caicedo y Eberto Rodríguez.

Al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) por permitirme guardar las semillas en los cuartos de conservación.

A Mónica Ibarra, laboratoristas de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, por su valiosa colaboración.

A Fanny Gil y Juan Domínguez por su apoyo en el laboratorio de viabilidad del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Resumen

La semilla de cuatro variedades de *Psidium guajava* fueron estudiadas por su tolerancia a la desecación y almacenamiento bajo condiciones controladas de conservación. Los niveles de latencia fueron superiores para la semilla recién extraída de los frutos. Durante el desarrollo de la tolerancia a la desecación se presentó un aumento en la germinación y el vigor a medida las semillas perdían humedad y después del almacenamiento durante 3 meses a -20°C con un contenido de humedad del 5%. Sin embargo, el aumento de la germinación y del vigor en las condiciones anteriormente mencionadas vario de acuerdo con la variedad, lo que indica que existen diferencias genéticas entre los cuatro materiales estudiados. Así mismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la variable viabilidad en esta fase de la investigación, lo que permitió clasificar las semillas de los cuatro materiales como probablemente ortodoxas. Por otra parte, el ensayo de confirmación (tolerancia al almacenamiento) permitió confirmar que las semillas de las cuatro variedades de guayaba estudiadas presentan un comportamiento intermedio en el almacenamiento, debido a que las semillas no conservan su calidad fisiológica (Viabilidad Germinación y Vigor) cuando son almacenadas con un contenido de humedad del 5% a -20°C durante un año. Finalmente, la fase de la tolerancia a la desecación permite clasificar las semillas hasta un comportamiento probablemente ortodoxo, mientras que la fase de tolerancia al almacenamiento permite conocer la dinámica de la conservación de la calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y vigor) durante el tiempo, facilitando de esta manera una correcta interpretación del comportamiento de las semillas bajo ambientes controlados de conservación.

Palabras clave: Calidad Fisiológica, Tolerancia a la Desecación, Tolerancia al Almacenamiento, Semilla, Latencia, Viabilidad, Germinación y Vigor.

Abstract

The seed of four varieties of *Psidium guajava* were studied for the tolerance to desiccation and storage under controlled conservation conditions. The dormancy levels were higher for the freshly harvested seed. During the development of the tolerance to desiccation, there was an increase in the germination and vigor, when the seeds lost moisture and after storage for 3 months at -20 ° C with a moisture content of 5%. However, the increase of germination and vigor in the above-mentioned conditions, varied according to the variety indicating that there are genetic differences among the four materials studied. Likewise, no statistically significant differences were found with respect to the viability variable in this phase of the investigation, which allowed to classify the seeds of the four materials as probably orthodox. The confirmation test (storage tolerance) confirmed that the seeds of the four varieties of guava studied present an intermediate storage behavior, because the seeds do not retain the physiological quality (Viability Germination and Vigor) when Are stored with a moisture content of 5% at -20 ° C for a year. Finally, the tolerance to desiccation allows to classify the seeds until a probable orthodox behavior, while the phase of tolerance to the storage allows to know the dynamics of the conservation of the physiological quality (Viability, Germination, and vigor) during the time, thus facilitating a correct interpretation of the behavior of the seeds under controlled environments of conservation.

Key words: Physiological quality, Desiccation tolerance, Storage tolerance, Seed, Dormancy, Viability, Germination, and vigor.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **V**

Abstract ..... **VI**

Lista de figuras ..... **IX**

Lista de tablas ..... **X**

Principales abreviaturas **11**

Introducción **12**

1 Revisión de literatura **14**
1.1 Antecedentes del cultivo de Guayaba *(Psidium guajava)* 14
1.2 Generalidades del cultivo de guayaba (*Psidium guajava*) 15
1.2.1 Ecofisiología del cultivo de *Psidium guajava* 16
1.2.2 Fenología del cultivo de P*sidium guajava* 17
1.2.3 Biología floral del cultivo de *Psidium guajava* 18
1.3 Taxonomía de *Psidium guajava* 18
1.4 Morfología de *Psidium guajava* 19
1.5 Semillas de *Psidium guajava* 20
1.6 Importancia del cultivo de *Psidium guajava* 21
1.7 Variedades de guayaba estudiadas 22
1.8 Conservación de los recursos fitogenéticos 23
1.9 Clasificación fisiológica de las semillas 23
1.10 Longevidad de las semillas 24
1.11 Tolerancia a la desecación 24
1.12 Semillas recalcitrantes 28
1.13 Semillas intermedias 30
1.14 Semillas ortodoxas 31
1.15 Deterioro de semillas en almacenamiento 32
1.16 Pruebas de Viabilidad (Tetrazolio) 34
1.17 Germinación 35
1.18 Vigor 35
1.19 Latencia 37

2 Materiales y métodos **39**
2.1 Localización 39
2.2 Variedades de *Psidium guajava* 39
2.2.1 Caracterización morfológica de los frutos de las cuatro variedades 39
2.2.2 Extracción de semillas 40
2.2.3 Caracterización morfo-anatómica de las semillas de las variedades 40
2.3 Desarrollo del protocolo de Tetrazolio para *Psidium guajava* 40
2.4 Clasificación fisiológica de las semillas 42
2.4.1 Etapa 1. Tolerancia a la desecación 42
2.4.2 Etapa 2. Tolerancia al almacenamiento 43

2.5 Variables evaluadas 44
2.6 Análisis estadístico 44

3 Resultados y discusión de resultados 47
3.1 Caracterización morfológica de los frutos de las cuatro variedades 47
Los resultados de las variables cualitativas y cuantitativas se presentan en las Tablas 8 y 9 y en la figura 2. 47
3.1.1 Caracteres cualitativos de los frutos 47
3.1.2 Caracteres cuantitativos de los frutos 49
3.2 Caracterización morfo-anatómica de las semillas 50
3.2.1 Caracteres cualitativos de las semillas de las cuatro variedades 50
3.2.2 Caracteres cuantitativos de las semillas . 51
3.3 Determinación del protocolo para viabilidad en semilla de guayaba. 52
3.4 Clasificación fisiológica de las semillas de *Psidium guajava* 59
3.4.1 Etapa 1: Tolerancia a la desecación 59
3.4.2 Etapa 2: Tolerancia al almacenamiento 63

4 Conclusiones 78

Anexos 79

Bibliografías 85

Lista de figuras

Pág.

Figura 1 Partes del fruto de *Psidium guajava* 47
Figura 2 Caracteres cualitativos de los frutos (forma, color de epicarpo mesocarpo y endocarpo) 48
Figura 3 Caracteres cualitativos de las semillas de las cuatro variedades de *Psidium guajava*. **A** forma obovada, **B** dentada, **C** clavada, **D** oblonga **E**. Ovoide **F**. Reniforme 51
Figura 4 Descripción Anatómica de las semillas de *Psidium guajava* 51
F**igura 5** Parámetros para determinar los patrones topográficos de las semillas de *Psidium guajava* 54
Figura 6 Patrones topográficos en la determinación de la concentración de Tetrazolio y tiempo de exposición de las semillas de *Psidium guajava* en condiciones de laboratorio (T 26±2°C y 40% HR) 56
Figura 7 Patrones topográficos en la determinación de la concentración de Tetrazolio y tiempo de exposición de las semillas de *Psidium guajava* en condiciones controladas de temperatura (40°C) 57
Figura 8 A Corte longitudinal lateral, **B**. Semillas después de la realización del corte, **C**. Embrión después de la exposición al Tetrazolio, **D**. Semillas con diferentes grados de tinción después de la exposición al Tetrazolio 58
Figura 9 Dinámica de la Viabilidad, Germinación y Vigor de las semillas de la variedad Palmira ICA I durante el almacenamiento en condiciones controladas de conservación 66
Figura 10 Dinámica de la Viabilidad, germinación y vigor de las semillas de la variedad Cimpa Pulpa Roja durante el almacenamiento en condiciones controladas de conservación 69
Figura 11 Dinámica de la Viabilidad, Germinación y Vigor de las semillas de la variedad Manzana durante el almacenamiento en condiciones controladas de conservación 72
Figura 12 Dinámica de la Viabilidad, Germinación y Vigor de las semillas de la variedad Cl-0440A durante el almacenamiento en condiciones controladas de conservación 75

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *Psidium guajava*..... 18
Tabla 2 Características principales de las frutas de las cuatro variedades de *Psidium guajava* .. 22
Tabla 3 Factores evaluados en el ensayo 1, utilizando Tetrazolio como indicador de Viabilidad en condiciones de laboratorio (T 26°C y 40% HR) 41
Tabla 4 Factores evaluados en el ensayo 2 utilizando Tetrazolio como indicador de Viabilidad en condiciones controladas de temperatura (40°C) 41
Tabla 5 Listado de tratamientos del ensayo 1 y 2 (combinación de factores) 42
Tabla 6 Factores evaluados en la determinación del potencial de conservación de las semillas de las cuatro variedades de guayaba 43
Tabla 7 Listado de tratamientos (combinación de factores) 45
Tabla 8 Variables cualitativas de los frutos de las cuatro variedades 47
Tabla 9 Variables cuantitativas de los frutos de las cuatro variedades de *Psidium guajava* 49
Tabla 10 Caracteres cuantitativos de las semillas de las cuatro variedades de *Psidium guajava* 52
Tabla 11 Resultados de viabilidad (Tetrazolio) obtenidos en condiciones de laboratorio (T 26±2°C y 40% HR) y en condiciones contraladas de temperatura (40°C). 53
T**abla 12** Etapa de pre-condicionamiento de la semilla..... 58
Tabla 13 Etapa de preparación de la Prueba de Tetrazolio 58
Tabla 14 Resultados de las pruebas de viabilidad, Germinación y Vigor en la etapa 1 (tolerancia a la desecación) 59

Principales abreviaturas

g: gramos
Tz: Tetrazolio
bh: base húmeda
cm: centímetros
ISTA: International Seed Testing Association
AOSA: Association of Official Seed Analysts
CH: contenido de humedad
T: Temperatura
HR: Humedad Relativa
RFT: Recursos Fito-genéticos
°C: grados centígrados
mm: milímetro
URG: Unidad de Recurso Genéticos
PU: Peso Unidad
ABA: ácido abscísico
LEA: abundantes al final de la embriogénesis
ROS: sustancias reactivas de oxigeno
AOS: especie de oxigeno activo
CHE: contenido de humedad en equilibrio
PN: plantas normales

Introducción

La guayaba (*Psidium guajava*) es nativa de américa central pertenece a la familia de las Myrtaceae. en la actualidad se cultiva en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Rojas-Garbanzo, Zimmermann, Schulze-Kaysers, & Schieber, 2016). En Colombia, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, (CORPOICA) es la encargada del mejoramiento genético y conservación en el país.

En los últimos 100 años se ha producido un aumento en la pérdida de la diversidad genética de los cultivos agrícolas y de la biodiversidad en los sistemas naturales por lo que es necesario realizar esfuerzos para la conservación de los recursos fitogenéticos (RFG) (Fu, Ahmed, & Diederichsen, 2015). Actualmente, hay más de 7.4 millones de muestras de germoplasma de semilla conservadas en 1750 bancos de genes de todo el mundo (FAO, 2014). La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, (CORPOICA) reporta 71 accesiones de guayaba conservadas en campo. Una de las estrategias de conservación son los bancos de genes, pero para ello se requiere estudiar el comportamiento fisiológico de las semillas en condiciones controladas de almacenamiento *ex situ.*

Según la FAO, (2014) los bancos de germoplasma de todo el mundo poseen colecciones muy diversas de RFG, y su objetivo general es la conservación a largo plazo y la accesibilidad del germoplasma vegetal para los fitomejoradores, investigadores y otros usuarios. Los RFG constituyen el material de partida para el mejoramiento de cultivos, y su conservación es esencial para la seguridad alimentaria y nutricional del mundo. Por otra parte en los bancos de germoplasma se necesita realizar un mejor seguimiento del deterioro de la semilla, con pruebas que permitan complementar los resultados de las pruebas de germinación tradicionales (Fu, Ahmed, & Diederichsen, 2015).

Los bancos de germoplasma tienen como objetivo conservar la viabilidad de las semillas de una amplia cantidad de especies por un periodo indeterminado de tiempo. Sin embargo la longevidad de las semillas (es decir, el período de supervivencia) varía entre las especies y está condicionada

por la genética, el medio ambiente predominante durante la formación del fruto, la maduración de la semilla y el manejo pos-cosecha (Hong & Ellis, 1996).

Las semillas pierden su viabilidad durante el almacenamiento; por lo tanto, se requieren evaluaciones del deterioro de las semillas en el tiempo para fines de regeneración del germoplasma (Christina., Wheeler, & Grotenhuis, 2005, Probert, Daws, & Hay, 2009). El almacenamiento *ex situ*, permite conservar la viabilidad de las semillas durante largos periodos de tiempo, es por esto, que los bancos de genes son un elemento clave para la conservación de los RFG. Las manifestaciones químicas y fisiológicas que ocurren durante el deterioro de la semilla es la pérdida de su capacidad germinativa. Es por esto, que para el mantenimiento comercial de semillas o para el establecimiento de bancos de germoplasma, además de conocer las condiciones óptimas de almacenamiento, es importante conocer la capacidad germinativa de las mismas (Martínez Maldonado, 2012) .

Con base en lo anterior, el adjetivo del presente trabajo es desarrollar un protocolo para la valoración de la calidad fisiológica de la semilla (Viabilidad y Germinación) y posteriormente determinar la condición fisiológica de la semillas (recalcitrante, intermedio u Ortodoxo) bajo ambientes controlados de conservación *ex situ*.

1 Revisión de literatura

1.1 Antecedentes del cultivo de Guayaba *(Psidium guajava)*

Es escasa la referenciación bibliográfica relacionada con la semilla de guayaba y mucho menos con la conservación *ex situ*. Se encuentran algunos documentos más enfocados a los frutos de la guayaba y algunos relacionados con la germinación para la obtención de plántulas como se relacionan a continuación.

García Mogollón, Cury Regino, & Dussán Sarria, (2011) determinaron el comportamiento pos-cosecha y evaluaron la calidad de la fruta fresca de guayaba en diferentes condiciones de almacenamiento; concluyeron, que la temperatura y humedad relativa de almacenamiento afectan las propiedades físico-químicas del fruto de guayaba e influyen en la fisiología de la maduración.

Cartillo, Sinuco, Solarte, & Melgarejo, (2011) realizaron un estudio comparativo de los compuestos volátiles de tres variedades de guayaba blanca durante la maduración de los frutos; concluyeron que la formación de compuestos volátiles en los frutos de guayaba es un proceso dinámico en el cual la concentración de los constituyentes cambia tanto cuantitativa como cualitativamente según la variedad, el estado de madurez y la procedencia.

Olaya Zea & Restrepo Sanchez, (2012) encontraron altas correlaciones entre el contenido de fenoles libres y la actividad antioxidante, de los extractos etanolitos obtenidos de los frutos de guayaba en los diferentes estados de madurez. Por otro lado, se obtuvieron baja correlación entre el contenido de fenoles y el contenido de vitamina C.

Méndez Natera, Moreno, & Moya, (2009) evaluaron el efecto de diferentes combinaciones de sustratos sobre la producción de plántulas de guayaba; afirmaron que la germinación es mayor en arena, en comparación con los tratamientos arena + suelo y suelo. A la vez mencionaron que el suelo presentó las peores condiciones para la germinación. Por otra parte Meza & Bautista, (2007) indican que el remojo de las semillas de guayaba durante 24 horas favorece el proceso de germinación y emergencia de plántulas.

Serrato Tejeda, (2012) indica que el paso de las semillas de guayaba por el tracto digestivo del mono aullador negro (Alouatta pigra), acelera la germinación y aumenta el porcentaje final de semillas germinadas en comparación con las semillas extraídas de frutos y expuestas a digestores artificiales. Somarriba, (1986) menciona que el paso de las semillas de guayaba a través del tracto digestivo de los bovinos no afecta su germinación.

1.2 Generalidades del cultivo de guayaba (*Psidium guajava*)

Castaño Cano & Montes Ballesteros,(2014) mencionan que el origen de la guayaba (*Psidium guajav*a) es incierto, pero se le ubica en Mesoamérica; fue propagada por los españoles y portugueses en todas las zonas tropicales del mundo. Actualmente se extiende desde México, Centroamérica, hasta Sudamérica. Se adapta en lugares con temperaturas de 16-34°C, precipitación de 800-1000 mm, con una HR de 36-96%. Existen reportes de que en Colombia algunas variedades se han cultivado hasta los 1,700 msnm y en Venezuela hasta 1,800 (García, 2010). En Colombia la guayaba se cultiva especialmente en sistemas agro-silvopastoriles o en forma semi-silvestre (Cartillo et al., 2011).

Según Gonzales Gaona, Padilla Ramirez, Reyes Muro, Perales de la Cruz, & Villagrana, (2002) algunos nombres étnicos de *Psidium guajava* L. son Guayaba o Guyaba (en español), Goyave o Goyavier (en francés), Guyaba o Goeajaaba (en Holanda), Goiaba o Goaibeira (en portugués), Guava o Kuawa (en Hawai), Guava o Jambu batu (en Malasia). Numerosas tribus de India, África Tropical y Filipinas le denominan Bayabas. Las comunidades indígenas de América Central y Suramérica emplean los nombres Pichi, Posh y Enandi, entre otros.

En las últimas décadas, se han realizados progresos con relación a la propagación in vitro del cultivo de guayaba, a través de la organogénesis y la embriogénesis somática mediante la manipulación de los medios de cultivo. Por otra parte, algunos de los problemas de la guayaba son la corta vida útil de las frutas y la sensibilidad al estrés abiótico lo que requiere la atención de los investigadores. La inserción de genes que controlan la biosíntesis de etileno podría ser una alternativa para aumentar la vida útil de las frutas de guayaba (Rai, Asthana, Jaiswal, & Jaiswal, 2010).

Algunos logros obtenidos en guayaba a través de enfoques moleculares; los cuales han sido útiles para la caracterización de la diversidad genética entre cultivares o especies son: estimación de la diversidad molecular de 41 genotipo de guayaba (Prakash, Narayanaswamy, & Sondur, 2002), determinación de la relación genética entre 13 cultivares en el norte de la India (Dahiya, Archak, & Karihaloo, 2002) e identificación de genes de interés comercial y mejora a través de la tecnología de transformación genética (Raí, et al., 2010).

1.2.1 Ecofisiología del cultivo de *Psidium guajava*

La ecofisiología vegetal estudia las respuestas fisiológicas de las plantas frente a diferentes condiciones ambientales. En la agricultura, la ecofisiología ha contribuido al desarrollo de especies tolerantes a condiciones ambientales extremas al mismo tiempo ha permitido una mayor comprensión de las diferencias en el crecimiento vegetal bajo diversos ambientes. Por otro lado los factores climáticos relacionados con la producción, como la temperatura y el régimen de lluvias, se consideran los más críticos para el crecimiento de las plantas. La radiación solar y la humedad relativa también interfieren en el crecimiento y desarrollo de las plantas pero no son limitantes, debido a que se pueden manipular por densidades de siembra o sombríos.

Solarte Cruz,(2013) menciona que para comprender la productividad de las plantas anuales y perennes es importante el estudio integrado de la fotosíntesis, el crecimiento, la translocación y el almacenamiento de asimilados. La capacidad fotosintética foliar, que se ha definido como la tasa fotosintética por unidad de área foliar, varia como resultado de la luz, la temperatura y la disponibilidad de agua, así como de la edad y de los aspectos genéticos. La guayaba se caracteriza por su gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones climáticas debido a que se puede encontrar desde el nivel del mar hasta los 2.000 m; crece en una amplia variedad de climas, desde secos hasta húmedos, con precipitaciones de 1.000 a 2.000 mm por año y temperaturas medias de 20-30°C; requiere buena exposición solar y es resistente a la salinidad y a la sequía.

Según Solarte Cruz, (2013) la tendencia diaria del potencial hídrico en el cultivo de guayaba presenta una disminución desde las primeras horas de la mañana, con mínimos al medio día y nueva recuperación en la tarde. La magnitud de tal disminución depende de la variedad y de las

condiciones climáticas de la zona. Por otra parte la tendencia de los cursos diarios de la transpiración en guayaba depende de las condiciones ambientales de la región. De igual forma la tasa fotosintética del cultivo de guayaba (μmoles CO_2/m^2s^1) varía de acuerdo con la variedad y con las condiciones donde está establecido el cultivo. La disminución de la tasa fotosintética (μmoles CO_2/m^2s^1), producto de las condiciones ambientales (altas temperaturas y alta radiación solar) varía de acuerdo con el material.

1.2.2 Fenología del cultivo de P*sidium guajava*

La fenología estudia el tiempo, la duración y la abundancia de eventos cíclicos de la vida de las plantas impulsados por los factores ambientales (Morisette, Richardson, & Knapp, 2009). Así mismo establece el registro cronológico de las diferentes fases de crecimiento y desarrollo de las plantas y su posible correlación con las condiciones ambientales durante un período de tiempo (Fuentes Fiallo, Granda, & Lemes Hernandez, 2001). El crecimiento de las plantas depende de la interacción del genotipo con las condiciones ambientales, es por esto que se presentan diferencias en el estado de desarrollo de genotipo idénticos establecidos en diferentes condiciones ambientales.

Los estudios de fenología de la guayaba muestran que el período vegetativo del árbol inicia en la mitad de la primavera y finaliza en otoño; durante este período la guayaba sufre varios cambios fisiológicos que se manifiestan producto de las señales ambientales entre los cuales están el crecimiento del tallo, el rompimiento de la latencia de las yemas, el incremento en el diámetro del tronco, la iniciación floral, el desarrollo y la maduración del fruto (Fuentes Fiallo et al., 2001). Por otra parte, se diferencian cuatro fases de desarrollo reproductivo en el cultivo de guayaba, entre los cuales están la formación de yemas florales, la diferenciación floral, la floración y el crecimiento del fruto, cuya duración disminuye considerablemente a menor altitud como resultado de las diferencias en temperatura.

La fase reproductiva del cultivo de guayaba; especialmente la floración y la formación de los frutos coinciden con el periodo de lluvias, lo que indica que esta fase requiere un balance positivo de

agua. Las fases más sensibles y más influenciadas por los factores ambientales en el cultivo de guayaba son; la formación de yemas, flores y cuajado del fruto (Solarte Cruz, 2013).

1.2.3 Biología floral del cultivo de *Psidium guajava*

Las plantaciones propagadas por semillas del cultivo de guayaba presentan cierto grado de variabilidad, es por esto la importancia del conocimiento de la biología floral de este cultivo lo cual es de gran utilidad para iniciar un programa de mejoramiento. Las flores son epigíneas, heteroclamídeas, actinomorfas y hermafroditas; cuyo diámetro oscila entre 35-50 mm. El número de estambres por flor varía entre 300-600, cuyos filamentos alcanzan una longitud comprendida entre 2-16 mm dispuestos en varias filas. El período completo de desarrollo de la yema floral se divide en 10 etapas o estadíos, partiendo del momento en que se hacen identificable las yemas hasta el día anterior a la antesis (Caraballo, 2001).

Al momento de la apertura de la flor casi todas las anteras están dehiscentes, lo que afirma la presencia de autopolinización, sin embargo la presencia de abejas (*Apis melifera* L.), inmediatamente después de la antesis confirma la existencia de polinización cruzada, la cual de acuerdo con algunos actores alcanza un 35,6% en *Psidium guajava* (Caraballo, 2001).

1.3 Taxonomía de *Psidium guajava*

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *Psidium guajava*

Reino	Vegetal
División	Spermatophyta
Subdivisión	Angiospermas
Clase	Dicotiledonea
Orden	Mirtales
Suborden	Myrtineae
Familia	Myrtaceae
Genero	Psidium
Especie	guajava l

Fuente: (García, 2010)

1.4 Morfología de *Psidium guajava*

Gonzales Gaona, Padilla Ramirez, & Reyes Muro, (2002) mencionan que la guayaba (*Psidium guajava*) es un arbusto arborescente, de 3 a 10 metros de altura, con el tronco corto y con ramas cerca de la superficie del suelo que varían de 10 a 30 cm de diámetro. La corteza es lisa de color café rojizo, escamosa, la cual desprende delgadas escamas. Las hojas miden de 5 a 18 cm de largo y de 3 a 6.5 cm de ancho de color amarillo verdoso y se arquean cerca del margen.

De acuerdo con García, (2010) la raíz principal es pivotante que proporciona un buen anclaje; esta da origen a las raíces secundarias, las cuales proliferan en gran cantidad y se encuentran cerca de la superficie del suelo. En suelos profundos las raíces secundarias pueden adquirir el grosor y longitud de la raíz principal alcanzando hasta 4 metros de profundidad, razón por la cual las plantas propagadas por estaca o acodo no sufren de volcamiento, debido a que estas raíces proporcionan un buen anclaje. La zona de las raíces activas se encuentra de 0-30 centímetros de profundidad. Las raíces de la planta de guayaba pueden soportar la humedad durante periodos cortos, si el tiempo se prolonga pueden morir por asfixia.

García, (2010) el fruto de guayaba, es una baya, que según la variedad puede ser redondo puede tener la forma de una pera, epicarpo de color verde amarillo a amarillo rosado, pulpa de color blanco, amarilla o rosada, pesan entre 50 gramos hasta 1,000 gramos. Presenta un crecimiento doble sigmoidea o sea que tiene dos puntos máximos de crecimiento.

Garces Granada (1987) los frutos de guayaba son el resultado del crecimiento del receptáculo y el ovario. La pulpa del fruto o sea la parte comestible tiene su origen en las paredes de los carpelos que conforman el ovario. El incremento en el volumen o crecimiento del pericarpio de *Psidium guajava* se debe a la multiplicación celular y posteriormente al alargamiento y rompimiento de paredes de muchas células, como también, al alargamiento radial de las células que rodean tanto los haces conductores como las esclereidas. Por otra parte es importante mencionar que la temperatura y la humedad relativa de almacenamiento afectan las propiedades físico-químicas del fruto de guayaba e influyen en la fisiología de la maduración (García Mogollón et al., 2011).

1.5 Semillas de *Psidium guajava*

Las semillas son utilizadas para la producción de plántulas las cuales sirven como patrones, así mismo la producción de plantas, mediante el uso de semillas tiene grandes ventajas, para el establecimiento de grandes extensiones comerciales. Este cultivo presenta variación genética, producto del cruzamiento entre genotipos, la cual es una desventaja en los sistemas de producción de este cultivo.

Meza & Bautista, (2007) reportan que las semillas de guayaba presentan valores promedios de longitud de 3,43±0,06 mm; ancho 2,58±0,05 mm; espesor de 1,67±0,04 mm y valores promedios en cuanto a peso de 1,37±0,5 g/100 semillas. Además, las semillas de guayaba son reniformes de borde lisos. La germinación de la semilla de guayaba es epigea, ocurre a través de la salida de la radícula por el rompimiento lateral de la testa, respuesta que se inicia entre el séptimo y décimo día después de la siembra, dependiendo del tratamiento pre-germinativo.

Castaño Cano & Montes Ballesteros, (2014) las semillas de guayaba: tardan entre 2 a 3 semanas para germinar. En algunos casos son sometidos a tratamientos químicos para mejorar su germinación, las plántulas se trasplantan cuando tienen entre 30 a 40 cm de altura, el gran inconveniente que existe es que su producción no garantiza calidad de los frutos debido a la variabilidad de la descendencia. Serrato Tejeda, (2012) indica que la semilla de *Psidium guajava* presenta una testa lignificada lo que podría ser responsable de los bajos porcentajes de germinación en condiciones naturales.

Simão & Takaki, (2008) la semilla de guayaba no germina en la oscuridad, pero si muestran respuestas positivas a la luz, lo que indica que la germinación está controlada por fitocromo B, el cual es inducido por la luz. De igual forma la alternancia de temperaturas induce la germinación en condiciones de luz y oscuridad. Rai, Jaiswal, & Jaiswal, (2008). En muchos casos la suspensión temporal de la germinación de las semillas de guayaba se debe a altas concentraciones de sacarosa y ABA; así mismo la acumulación de estos compuestos ofrece ventajas para la conservación de genotipos elites deseables del cultivo de guayaba.

1.6 Importancia del cultivo de *Psidium guajava*

La formación de compuestos volátiles en la guayaba es un proceso dinámico en el cual la concentración de los constituyentes cambia tanto cuantitativa como cualitativamente según la variedad, el estado de madurez y la procedencia (Cartillo et al., 2011).

Los frutos de guayaba son considerados altamente nutritivos, debido a que contienen altos niveles de ácido ascórbico, que es de tres a seis veces mayor que el de los frutos de naranja. Por lo tanto, la producción de guayaba especialmente por los altos niveles de compuestos antioxidantes, es un enfoque realista para aumentar la ingesta de antioxidantes en la dieta de los seres humanos (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, & Hawkins Byrne, 2006). La fibra dietética de la pulpa y del epicarpo es un antioxidante de origen vegetal; se cree que desempeña un papel muy importante en la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas (Jiminez-Escrig, Rincon, Pulido, & Saura-Calixto, 2001).Los extractos fotoquímicos aislados a partir de hojas de guayaba han demostrado tener múltiples efectos para mejorar enfermedades causadas por patógenos microbianos (Gutiérrez, Mitchell, & Solis, 2008).

Los compuestos fenólicos existentes en las hojas de guayaba juegan un papel importante en la actividad antioxidante mediante la captación de radicales libres (Tachakittirungrod, Okonogi, & Chowwanapoonpohn, 2007). Estudios farmacológicos realizados en guayaba indican el inmenso potencial de esta planta como tratamiento para la diarrea, gastroenteritis, enteritis rotavirus, heridas, acné, placa dental, malaria, alergias, tos, diabetes, trastorno cardiovascular, enfermedades musculares, dolencias inflamatorias incluyendo el reumatismo y el dolor menstrual, enfermedades del hígado y cáncer (Gutiérrez et al., 2008). La administración oral de licopeno purificado a partir de guayaba tiene efecto beneficioso sobre la inhibición de la migración de leucocitos y la estabilización de la membranas de los mastocitos, así como en la protección contra los efectos del estrés oxidativo, la modulación de mediadores de la inflamación y la inhibición de la expresión de genes que participan en la inflamación (Vasconcelos et al., 2017).

La semilla de guayaba contiene cantidades variables de macronutrientes y micronutrientes, con un alto contenido de fibra dietética. De igual forma contienen cantidades significativas de compuestos bio-activos tales como ácido ascórbico, fibra dietética insoluble, por ende, la extracción de estos

compuestos de la semilla de guayaba, sería una alternativa viable para prevenir diversas enfermedades (Uchoa-thomaz et al., 2014).

1.7 Variedades de guayaba estudiadas

La mayor parte de la producción de guayaba en el país proviene de plantas obtenidas de semilla de origen sexual, razón por la cual se presenta una gran heterogeneidad. La variedad Palmira ICA I fue introducida en el año 1961 de Trinidad y Tobago, mientras que la variedad Cl-0440A fue introducida del estado de la Florida de Estados Unidos. Por otro lado el híbrido "Manzana" fue introducido de Tailandia por Lozano-Ordoñezel, la cual es el resultado del cruzamiento entre dos variedades vietnamitas auto-fecundadas por 7 generaciones (Lozano, Toro, Garcia, & Ramiro, 2002).Por otra parte la variedad Cimpa Pulpa Roja es proveniente de Santander Colombia. Algunas características de las variedades estudiadas, se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2 Características principales de las frutas de las cuatro variedades de *Psidium guajava*

Parámetros	Palmira ICA I	Cimpa Pulpa Roja	Manzana	Cl-0440A
Longitud cm	8.5		7.2	
Ancho cm	6.5		7.7	
Largo/Ancho	1.3		0.94	
Forma	Operada		Redonda	
Peso (g)	172		400	
Color de Pulpa	Roja		Blanca	
Corteza mm	1		1.4	
Corteza (g)	16		21.2	
Solidos Solubles (55%)	10.49		10.6	
Acidez (%)	0.52		0.48	
SST/acidez	20.17		22.1	
Semilla (%)	4.5		2.72	
Jugo (%)	15		28	
Vitamina C (mg/100 ml)	108.9		230	
Pectina (%)	0.68		0.47	
Uso mesa	x		x	
Uso jugo-néctar	x		x	
Uso bocadillo-jalea	x			
Uso concentrado				
Uso cascos	x		x	

1.8 Conservación de los recursos fitogenéticos

La pérdida de la diversidad genética de las plantas cultivadas y de sus parientes silvestres es respuesta a las condiciones cambiantes del ambiente y prácticas culturales. Los bancos de colecciones de genes han sido creados para la conservación de más de 6 millones de muestras de las cuales más del 90% se almacenan como semillas (Nagel et al., 2009).

El objetivo de la conservación de los RFG es mantener las semillas en condiciones donde permanezcan viables durante un periodo determinado de tiempo, de igual forma, deben ser regeneradas antes de que pierdan la capacidad de germinar (Hay & Whitehouse, 2017). Sin embargo, no deben ser regeneradas innecesariamente, por los altos costos de regeneración y el riesgo de la pérdida de la integridad genética a través de factores como la deriva genética, contaminación por el intercambio de polen, contaminación de las semillas y etiquetado incorrecto (Kameswara Rao, Dulloo, & Engels, 2016). Por otra parte Roberts, (1991) menciona, que la manera más segura y económica y conveniente de conservar los recursos genéticos de la mayoría de las plantas de cultivo es mediante el almacenamiento de semillas a largo plazo.

Según (Martinez, 2014) la conservación *ex situ* implica el desarrollo de colecciones de RFG y presenta ventajas de tipo práctico frente a la conservación *in situ* ya que, al concentrarse el material genético y la información asociada al mismo; se reducen costos, se mejora el control y se facilita el suministro de material a científicos a usuarios en general. Sin embargo, este tipo de conservación, por su carácter estático, tiene el inconveniente intrínseco de no permitir la continuación de los procesos evolutivos.

1.9 Clasificación fisiológica de las semillas

Hong & Ellis, (1996) afirman que la longevidad de las semillas (periodo de supervivencia) varía de manera importante entre especies. Puede también variar entre accesiones que han sido catalogadas dentro de una especie debido a diferencias de genotipo y origen. Las influencias de proveniencia en la longevidad potencial resultan de los efectos ambientales acumulativos durante la maduración de la semilla, recolección, secamiento, condiciones de pre-almacenamiento, tiempo de recolección de la semilla, duración de secamiento y el periodo siguiente antes de que la semilla

sea almacenada. La semilla con baja humedad (5-10%), es la base para la conservación *ex situ* de semillas ortodoxas. Sin embargo, incluso en condiciones de almacenamiento idénticas hay una amplia variación en la vida útil de las semillas entre especies (Probert et al., 2009).

Según Hong & Ellis, (1996) las semillas con comportamiento ortodoxo en el almacenamiento *ex situ* se pueden almacenar satisfactoriamente por tiempos prolongados en condiciones ambientales apropiadas, sin embargo, la longevidad absoluta de las accesiones puede variar notoriamente entre especies aun en las mismas condiciones ambientales. Por otra parte, el mantenimiento de la viabilidad de las semillas de especies con comportamiento recalcitrante e intermedio es problemático. En general el almacenamiento a término medio es posible para especies con comportamiento intermedio siempre que las condiciones de almacenamiento estén bien definidas y bien controladas, a la vez el almacenamiento a corto plazo es lo que mejor se adapta para semillas que presenta un comportamiento recalcitrante.

1.10 Longevidad de las semillas

La longevidad hace referencia al tiempo de conservación de la semilla con alto potencial germinativo. La longevidad de la semilla es difícil de predecir, sin embargo, el envejecimiento acelerado es un método que permite evaluar la longevidad de las semillas comerciales y de investigación (Gutiérrez et al., 2008, Ellis & Roberts, 1980). De igual forma, se puede encontrar variación en la longevidad de las semillas durante el almacenamiento dentro de una misma especie.

1.11 Tolerancia a la desecación

De acuerdo con, Kranner & Birtic, (2005) la mayoría de los organismos vivos dependen de la disponibilidad de agua. Sin embargo, algunas formas de vida, entre ellas las plantas y los hongos, pero muy pocos animales, pueden sobrevivir en estado deshidratado. Todo esto está relacionado con mecanismos bioquímicos que confieren tolerancia a la desecación en organismos fotosintéticos y no fotosintéticos de igual forma. Es importante considerar que el primer daño causado por la eliminación de agua, es probablemente el aparecimiento de los radicales libres los cuales causan la muerte de los tejidos intolerantes. Dado que los radicales libres dañan el metabolismo, se requieren mecanismos de protección y reparación durante la desecación y

rehidratación, respectivamente. Además, la longevidad prolongada en estado deshidratado depende de la capacidad de eliminar el efecto de los radicales libres, utilizando antioxidantes tales como el ascorbato, tocoferoles, compuestos fenólicos y enzimas de procesamiento de los radicales libres.

Hong & Ellis, (1996) mencionan, que la determinación del grado de tolerancia a la desecación y comportamiento de las semillas en almacenamiento debe realizarse dentro de una especie con base en los resultados de varios lotes de semillas, no con base en un solo lote de semillas. Por otra parte, es importante mencionar; que los lotes de semillas deben obtenerse de diferentes fuentes como sea posible; por ende, en ningún caso se deben mezclar los diferentes lotes de semillas con lo que se realicen los ensayos. La sensibilidad de las semillas a la desecación impone limitaciones para la conservación del germoplasma a largo plazo; por la incapacidad para almacenar las semillas, con bajo contenido de humedad a bajas temperaturas (Patricia Berjak & Pammenter, 2013). Las semillas ortodoxas toleran la desecación, mientras las recalcitrantes son sensibles a la deshidratación (Patricia Berjak & Pammenter, 2008).

Según Tweddle, Dickie, Baskin, & Baskin, (2003) la capacidad de las semillas para sobrevivir a la desecación es un rasgo funcional importante y es parte integral de la ecología de regeneración de la planta. La sensibilidad de la semilla a la desecación disminuye a medida que el hábitat se vuelve más seco, y posiblemente también más frío, aunque esta observación requiere una interpretación cautelosa. La sensibilidad a la desecación es más común en zonas relativamente húmedas y en semillas no latentes. Por otra parte en la mayoría de especies de plantas con flores, las semillas después de madurez fisiológica entran a un estado de reposo en ambiente seco (almacenamiento en campo), lo que les permite sobrevivir a condiciones ambientales adversas después de la dispersión, tales como períodos de frío y/o sequía (Joët, Ourcival, & Dussert, 2013).

Pammenter & Berjak, (2000) afirman que, la sensibilidad a la desecación de las semillas impone limitaciones en una amplia gama de condiciones ambientales en las que puede ocurrir el éxito reproductivo. Sin embargo, hay una escasez de datos relacionados concretamente con la ecología de las semillas recalcitrantes. Aunque los ecologistas de semillas estudian la composición de los bancos de semillas del suelo rara veces informan sobre la respuesta a la desecación de las semillas

de interés. Por otra parte las semillas ortodoxas, son aquellas que se caracterizan por tolerar la desecación y se pueden almacenar en estado seco durante un largo periodo de tiempo a bajas temperaturas (Angelovici, Galili, Fernie, & Fait, 2010).

Berjak & Pammenter, (2013) mencionan que existen características físicas intracelulares que confieren tolerancia a la desecación como la presencia de proteínas insolubles dentro de vacuolas, que proporcionan la resistencia mecánica contra el colapso celular de las semillas. De igual forma la acumulación de almidón y lípidos proporcionan mayor capacidad de amortiguamiento. A la vez la condensación de la cromatina que coincide con el cese de la replicación y la transcripción, y el desmantelamiento ordenado del cito-esqueleto son otras características observadas, que al parecer están asociadas con la adquisición de tolerancia a la desecación.

Hoekstra, Golovina, & Buitink, (2001) durante la pérdida de agua, la disminución del volumen celular provoca aglomeraciones de los componentes citoplasmáticos, aumentando la posibilidad de interacciones moleculares que pueden causar desnaturalización de proteínas y fusión de membranas. Existen una amplia gama de compuestos que pueden prevenir tales interacciones moleculares adversas, entre ellos prolina, glutamato, glicina-betaina, manitol, sorbitol, fructanos, trehalosa y sacarosa. Crowe, Carpenter, & Crowe, (1998) afirman que la tolerancia a la desecación, se debe a la acumulación de grandes cantidades de disacáridos, entre los más comunes, sacarosa y trehalosa; estos azúcares estabilizan las membranas y proteínas en estado seco, muy probablemente por medio de enlaces de hidrógeno con los residuos polares de las macromoléculas.

La presencia de oligosacáridos confieren la tolerancia a la desecación a semillas de algunas especies (Koster & Leopold, 1988, Taji et al., 2002). Sin embargo, las semillas de algunas especies de leguminosas acumulan oligosacáridos en su mayoría estaquiosa, mientras que las semillas de otras especies acumulan niveles variables derivados de galactosil de ciclitoles (Horbowicz et al., 1994).Black, Corbineau, Gee, & Come, (1999) resaltan, que la reducción del contenido de agua induce la tolerancia a la desecación mediante cambios en los que podrían participar las dehidrinas, lo cual, no está relacionado con la interacción con rafinosa.

Delahaie et al., (2013) indican que las semillas ortodoxas adquieren tolerancia a la desecación durante la maduración, sin embargo, las semillas recalcitrantes son incapaces de sobrevivir al secado. Estas semillas sensibles a la desecación constituyen un modelo interesante para análisis comparativos entre especies filogenéticamente cercanas que son tolerantes a la desecación. Por otra parte, es importante mencionar la importancia de las proteínas LEA (abundantes al final de la embriogénesis) como moléculas de protección, tanto en la sequía como en la tolerancia a la desecación. Las LEA son pequeñas proteínas hidrofílicas, en gran parte no estructurada y termoestable que se sintetizan en las semillas ortodoxas a mediados y a finales de la maduración.

Las proteínas LEA se acumulan en diferentes estructuras de las plantas tolerantes a la desecación, tales como semillas y tejidos vegetativos; la contribución de las proteínas LEA, en la adquisición de la tolerancia a la desecación es ampliamente reconocida, aunque los mecanismos moleculares precisos aún no se comprenden totalmente (Amara, Capellades, Ludevid, Pagès, & Goday, 2013).

Tunnacliffe & Wise, (2007) proponen que las proteínas LEA son multifuncionales y podrían tener las siguientes funciones; protección enzimática durante el secado, escudos moleculares y antioxidante. Estas funciones son específicas para cada uno de los grupos en los que se dividen las proteínas LEA. Las proteínas LEA ocupan espacios intracelulares, para evitar el colapso celular en tejidos con bajo contenido de humedad; esta capacidad multifuncional es probablemente atribuible en gran parte a su plasticidad estructural. Hara, Terashima, Fukaya, & Kuboi, (2003) afirman que las dehidrinas facilitan la aclimatación de plantas al frio, al actuar como proteínas de captación de radicales libres, protegiendo de esta manera el sistema de membranas bajo estrés por frio. En el 2008, Hundertmark & Hincha, exponen que las proteínas LEA tienen la capacidad de estabilizar enzimas poco estables (lábiles) en condiciones de estrés. De igual forman, mencionan que la mayoría de los genes que codifican las proteínas LEA, tienen respuesta al ABA.

El óxido nítrico puede ser utilizado para la detoxificación de sustancias reactivas a oxígeno (ROS), su papel en la respuesta a la desecación en semillas sigue siendo poco conocido (Bai et al., 2011). Las especies de oxigeno activo (AOS) se generan, durante la desecación, germinación y envejecimiento de las semillas; lo que puede conducir a un estrés oxidativo y daño celular,

culminando con el deterioro de la semilla; también podrían tener una función reguladora en los cambios de expresión génica durante el desarrollo de la semilla (Bailly et al., 2004).

1.12 Semillas recalcitrantes

La rápida pérdida de la diversidad genética de las plantas ha dado lugar a una serie de iniciativas en los bancos de germoplasma. Estos bancos proporcionan el germoplasma que permite mantener y gestionar la variación natural dentro de las especies. Alrededor del 75 al 80% de especies de angiospermas producen semillas ortodoxas que pueden sobrevivir con bajos contenidos de humedad y soportar el almacenamiento prolongado a -20°C. Por el contrario, del 5 al 10% de las especies de angiospermas producen semillas recalcitrantes que no toleran la desecación y las bajas temperaturas (Walters et al., 2013). Berjak & Pammenter, (2001) señalan que las semillas recalcitrantes permanecen constantemente activas metabólicamente.

El contenido de humedad de las semillas recalcitrantes, son mucho mayores que el de las semillas ortodoxas, al mismo tiempo las semillas recalcitrantes se caracterizan por ser más grandes en comparación con las semillas ortodoxas. Los altos contenidos de humedad de las semillas recalcitrantes es lo que las hace sensible a la desecación y a daños causado por el frio (Chin & Krishnapillay, 1989). Las semillas recalcitrantes son aquellas que no se someten a maduración en la fase final de su desarrollo, de igual forma; toleran muy poco la desecación y con frecuencia son sensibles al frío (Patricia Berjak, Farrant, & Pammente, 1989).

Según Chin & Krishnapillay, (1989) las semillas recalcitrantes y ortodoxas difieren mucho en su ecología y morfología. Las semillas recalcitrantes pertenecen a especies perennes de zona tropical húmeda en algunos casos, también provienen de árboles de clima templado o especies acuáticas, mientras que la mayoría de las semillas ortodoxas provienen de especies anuales que crecen en campos abiertos. Así mismo, las semillas recalcitrantes tienen mayor variación en la forma y tamaño de los cotiledones en comparación con las semillas ortodoxas.

Las semillas recalcitrantes se caracterizan por tener en su fase de crecimiento elevados niveles de citoquininas, las cuales tienen gran importancia en la movilización de los asimilados al inicio de la germinación. Además, se caracterizan por acumular almidón y algunos azúcares solubles, los

cuales están disponibles en el inicio inmediato de la germinación de la semilla. Por otro lado, los niveles de ABA en los tejidos embrionarios, durante la maduración de la semilla, son insignificantes, en muchos casos aumenta en el pericarpio, lo que impone cierta restricción a la germinación. A la vez el ABA es necesario para la adquisición de la tolerancia a la desecación en semillas. Sin embargo, el ABA por si solo es incapaz de conferir dicha tolerancia en semillas recalcitrantes.

Actualmente no existe un método para mantener la viabilidad de las semillas recalcitrantes intacta durante un periodo largo de tiempo. Esto se debe a que no pueden secarse; ni almacenarse a temperaturas bajo cero, debido a que mueren por los daños causados por la congelación (formación de hielo). Además, algunas semillas recalcitrantes tropicales pueden también sufrir daños por causa del frio a temperaturas de 10-15 °*C* y aun en temperaturas más bajas (Hong & Ellis, 1996) El propósito del almacenamiento de semillas en los bancos de germoplasma es mantener la diversidad genética por un largo periodo de tiempo. Las semillas recalcitrantes, requieren de altos contenidos de humedad para mantener la viabilidad por un periodo de tiempo relativamente corto.

Las respuestas a la crio-conservación de las semillas no ortodoxas o embriones, varían según la especie, genotipo, velocidad de secado, uso de crio-protectores, tasa de congelación, descongelación y la tasa de rehidratación (Kozlowski & Pallardy, 2002). La crio-preservación, el enfriamiento del material biológico y el posterior almacenamiento a temperaturas ultra bajas (-196 °C en nitrógeno líquido), es actualmente un enfoque prometedor para la conservación de germoplasma a largo plazo de las semillas recalcitrantes de una gran cantidad de especies (Ballesteros, Sershen, Varghese, Berjak, & Pammenter, 2014, Roach et al., 2008) . por otra parte, existen varios tipos de aguas asociadas con la sensibilidad a la desecación que tienen ciertas correspondencias, en las semillas que toleran la desecación (Pammenter, Vertucci, & Berjak, 1991).

Las semillas recalcitrantes son metabólicamente activas, por lo que su estado de desarrollo es cada vez más avanzado y de igual forma su sensibilidad a la desecación aumenta (Farrant, Pammenter, & Berjak, 1986). Algunas semillas recalcitrantes contienen algunas capas carnosas y gruesas que

rodean el embrión lo que sirve como mecanismo para resistir la pérdida de agua(Daws, Garwood, & Pritchard, 2006; Xia, Daws, Stuppy, Zhou, & Pritchard, 2012).

La formación de hielo intracelular no es necesariamente letal. Algunos autores muestran que las células pueden sobrevivir al hielo intracelular si los cristales localizados en el citoplasma son pequeños (Wesley-Smith, Berjak, Pammenter, & Walters, 2014) sin embargo Wesley-Smith, Walters, Pammenter, & Berjak, (2015) indican que los daños provocados por el hielo intracelular son evidentes en los brotes, por ende el nuevo crecimiento se produce a partir de focos aislados de células de los meristemos; siendo de esta manera el tamaño de estos focos los que determinan el vigor del rebrote.

La emisión de oxigeno reactivo durante la crio-conservación de las semillas recalcitrantes de especies tropicales y subtropicales, suelen estar asociados con necrosis en los meristemos apicales, reduciéndose el crecimiento y desarrollo de las plántulas (Patricia Berjak, Varghese, & Pammenter, 2011). Las enzimas ß-1,3-glucanasas y quitinasas ofrecen cierta protección contra en ataque de hongos, durante el almacenamiento de muchas especies recalcitrantes de las zonas tropicales y subtropicales (Anguelova-Merhar, Calistru, & Berjak, 2003).

1.13 Semillas intermedias

Las semillas intermedias de origen tropical pueden ser almacenadas con contenidos de humedad en equilibrio (CHE) con HR 50% (9-10% de contenido de humedad) y 10 °*C* por más de 5 y 6 años, respectivamente, sin pérdida de viabilidad. Por otra parte las semillas intermedias de origen templado también se conservan bien con CHE con un 50% HR pero a temperaturas más frescas de 5 a -20 ºC (Hong & Ellis, 1996).

Las semillas intermedias fueron descubiertas en la década de 1990 (Ellis et al., 1991;Ellis et al., 1990)**.**Las semillas intermedias sufren daños por las bajas temperaturas de almacenamiento. Estos daños son producto de la cristalización de la molécula de triacilglicerol; manifestándose cuando los lípidos cristalizados se exponen al agua. En 2003,Crane, Miller, Van Roekel, & Walters, señalan, que las semillas con comportamiento intermedio mueren si son expuestas al agua cuando el Triacilglicerol se cristaliza.

Según Crane, Kovach, Gardner, & Walters, (2006) La molécula de triacilglicerol juega un papel muy importante en la fisiología del almacenamiento de las semillas. A la vez Walters et al., (1998) indica que la molécula de triacilglicerol sirve como depósito para protectores en las reacciones de envejecimiento de las semillas. Así mismo, el Triacilglicerol puede tener un efecto adverso si las semillas se encuentran dañadas al momento de exponerlas a temperaturas criogénicas (Stanwood, 1987; C.W Vertucci, 1989). Por otra parte, se cree que la coalescencia de los cuerpos de aceite durante la imbibición de las semillas influyen en la expresión de vigor de las plántulas (Huang, 1992).

En general, las semillas intermedias extraídas en la madurez toleran la desecación con CHE entre 40-50% de HR (alrededor de un 10% de contenido de humedad) para el café arábiga, y un 7% para algunos *Citrus spp*. Otro rasgo de las semillas intermedias de origen tropical es que la longevidad de las semillas (7-10% de contenido de humedad) disminuye con la reducción en la temperatura de almacenamiento por debajo los 10 ºC (Hong & Ellis, 1996) los daños producidos inmediatamente después del secamiento en semillas con un 7-12% de contenido de humedad dependen de la especie.

1.14 Semillas ortodoxas

Vertucci & Roos, (1990) señalan que, los protocolos establecidos para el almacenamiento óptimo de semillas no tienen en cuenta la composición química de las diferentes especies de semillas, el estado fisiológico de la semilla, y el estado físico del agua dentro de la semilla. Sin embargo Kozlowski & Pallardy, (2002) indican que las semillas ortodoxas tienen una vida relativamente larga, con la capacidad de soportar la deshidratación hasta bajos contenido de humedad, sin perder la viabilidad. Las semillas ortodoxas se pueden almacenar a temperaturas entre 2°C y -20°C, aunque algunas semillas se han almacenado a temperaturas súper bajas -40°C, -70°C o -196°C, pero no han sido mejor que -20°C para el almacenamiento de semillas de un gran número de especies. En la actualidad los bancos de germoplasma almacenan las semillas ortodoxas, con contenidos de humedad de 3-7% a -18°C, con el propósito de conservar la viabilidad por periodos considerables de tiempo (Ellis & Hong, 2006).

Las semillas ortodoxas pueden desecarse, sin daños, a bajos niveles de contenidos de humedad y en una amplia gama de ambientes. Su longevidad se aumenta con la disminución del contenido de humedad en almacenamiento; las semillas maduras sobreviven a la desecación con bajos contenidos de humedad por lo menos del 2-6% dependiendo de la especie (Hong & Ellis, 1996). Las semillas que toleran la desecación cuentan con una serie de mecanismos; incluyendo azúcares y proteínas que estabilizar las macromoléculas y los antioxidantes que contrarrestan los daños causados por las ROS, estos mecanismos protectores son a menudo inducidos por el secado y por la expresión de algunos genes (Alpert, 2006). Durante el secado aumenta dramáticamente la viscosidad celular de las semillas ortodoxas convirtiéndose el citoplasma en un estado vítreo; esta vitrificación es producto de la acumulación de azúcares reductores y proteínas LEA los cuales actúan de manera conjunta en este proceso (Buitink & Leprince, 2008).

Pammenter & Berjak, (1999) mencionan que existen mecanismos que han sido implicados en la adquisición y el mantenimiento de la tolerancia a la desecación en semillas ortodoxas, (las características físicas de las células y los componentes intracelulares como ser la acumulación de reservas insoluble y acumulación de sustancias protectoras en las cuales se incluyen las LEA, sacarosa y otros oligosacáridos). Las semillas ortodoxas tienen una esperanza de vida, de muchos años, décadas o siglos, dependiendo de la especie (Walters et al., 2005).

1.15 Deterioro de semillas en almacenamiento

McDonald, Nelson, & Roos, (1986) mencionan, que una vez las semillas recolectadas y secadas puedan mantener su viabilidad durante periodos variables de tiempos, dependiendo de las condiciones de almacenamiento. En la gran mayoría de los casos se ha demostrado que a menor temperatura y menor el contenido de humedad más largo es el período de viabilidad (Roberts, 1972) .Por consiguiente, el almacenamiento en los bancos de germoplasma en estas condiciones, permite la conservación de semillas. Por otra parte, la longevidad de las semillas en almacenamiento es afectada por la temperatura y los niveles de humedad durante el periodo de conservación (Bass & Stanwood, 1978). Klepper & Wilhelmi, (1979) señalan que los rendimientos de los forrajes no son afectados por el almacenamiento de las semillas bajo cero a largo plazo si las semillas al momento de almacenarlas son de alta calidad.

McDonald, Nelson, & Bewley, (1986) señalan, que altos contenidos de humedad en semillas están asociados con un mayor daño a la fracción de fosfolípidos; por lo tanto el contenido de agua juega un papel importante en el deterioro de las membranas, particularmente a temperaturas elevadas; por esta razón, se considera el primer evento de la perdida de la viabilidad. De la misma manera, menciona que los tocoferoles, son captadores de radicales libres y se estima que moléculas de este compuesto puede ofrecer una protección antioxidante.

De acuerdo con McDonald, Nelson, & Roberts, (1986) los efectos de las condiciones inadecuadas de almacenamiento son acumulativos, cuanto más largo sea el tiempo de exposición, más daño se observa y finalmente, las semillas son incapaces de germinar en condiciones óptimas de germinación; por lo tanto, el deterioro comienza, cuando la semilla madura en la planta madre, a una velocidad que depende de las condiciones ambientales. Agregando a lo anterior, existen innumerables síntomas de deterioro, pero la mayoría de ellos parecen ser consecuencia de la pérdida de integridad de la membrana, cambios en la estructura molecular de los ácidos nucleicos y la reducción en la actividad enzimática.

La longevidad de las semillas ortodoxas en el almacenamiento se incrementa al disminuir el contenido de humedad. Independientemente, la longevidad también se incrementa al disminuir la temperatura (McDonald, Nelson, & Roberts, 1986).por otro lado, las semillas recalcitrantes son intolerante a la deshidratación y a la refrigeración (Cheng & Song, 2008).

Delouche, (2002)El deterioro de las semillas puede ser visto como un complejo de cambios que ocurren con el pasar del tiempo; los resultandos es la disminución de la capacidad germinativa de la semilla. Por otra parte; deterioro empieza después que la semilla alcanza la maduración fisiológica y continua hasta perder su capacidad de germinar, de igual modo; que la duración del proceso de deterioro es determinada principalmente por la interacción entre herencia genética, su contenido de humedad y la temperatura. En otras palabras, el deterioro se caracteriza por ser un proceso inexorable o inevitable, irreversible, así mismo existen diferencias inherentes entre especies cuanto a la longevidad de la semilla, a la ves es importante mencionar que el deterioro es mínimo en la maduración de la semilla; así mismo; la velocidad de deterioro varía entre lotes de

semillas de la misma variedad; de igual manera; puede variar entre semillas individuales dentro de un lote.

1.16 Pruebas de Viabilidad (Tetrazolio)

La prueba topográfica de Tetrazolio; es una prueba bioquímica, que se utiliza para realizar evaluaciones rápidas de la viabilidad de semillas que presentan latencia profunda, o de semillas no germinadas después de la prueba de germinación; de igual forma esta prueba es utilizada para detectar daños mecánicos o daños producidos por insectos en determinados lotes de semillas. Así mismo, Durante el proceso de coloración, es importante que las semillas estén completamente cubiertas con la solución de Tetrazolio y no estén expuestos a la luz. La temperatura y el tiempo de tinción dependen de la especie con la que estemos trabajando (ISTA, 2016). Por otra parte, las pruebas de Tetrazolio han sido de gran utilidad para la determinación del vigor en semillas de algunos cultivos (Santos, Novembre, & Marcos-Filho, 2007).

Según AOSA, (2010)**.** Afirma que las pruebas de Tetrazolio fueron desarrolladas para proporcionar estimaciones rápidas de viabilidad de las semillas. Estas pruebas son útiles para complementar los resultados de las pruebas de germinación, calificación del vigor y diagnóstico de las causas del deterioro de las semillas. A la vez la prueba de Tetrazolio proporciona una base fiable para la toma de decisiones de la viabilidad de los lotes de semillas, obteniendo resultados rápidos (uno o dos días), en lugar de semanas como el caso de las pruebas de germinación.

Las pruebas de Tetrazolio se originaron en Alemania, durante la década de 1940, George Lakon y sus colegas descubrieron que los tejidos embrionarios tenían que estar vivos y respirar para que la semilla germinara normalmente (AOSA, 2010). Estos trabajos bioquímicos llevaron al desarrollo de una prueba topográfica (método de tinción de las estructuras para determinar la viabilidad de la semilla). En los primeros experimentos utilizaron productos químicos tóxicos como el selenio y el telurio para evaluar la viabilidad, lo que limitó su utilidad en los análisis de semillas.

En la prueba topográfica de Tetrazolio, las semillas son puestas a embeber en una solución incolora de Cloruro (2, 3,5, Trifenil Tetrazolio) que se utiliza como un indicador para mostrar el proceso de reducción que va en el interior de las células vivas. En este proceso, los iones H liberados

durante la respiración de los tejidos vivos son transferidos por un grupo de enzimas, especialmente deshidrogenasa, e interactúan con el Tetrazolio, que se reduce a un compuesto estable rojo no difusible llamado formazán. Sin embrago la no disponibilidad de un protocolo para realizar estimaciones honradas para la toma de decisiones referente a la viabilidad de semillas de guayaba (*Psidium guajava*), se hiso necesario realizar un protocolo específico para realizar dichas estimaciones en esta investigación, el cual facilita un procedimiento básico para la evaluacion de la viabilidad de las semillas de esta especie. A la vez es importante mencionar que una semilla viable es aquellas que tiene la capacidad de transformarse en una planta normal una vez completado el proceso de germinación.

1.17 Germinación

La valoración de la germinación desde el punto de vista fisiológico hace referencia a la emisión de radícula. sin embargo la valoración de la germinación desde un punto tecnológico hace referencia al porcentaje de plántulas normales producidas durante la prueba de germinación (ISTA, 2016).

El proceso de germinación, es una secuencia de eventos que dan como resultado la transformación de un embrión en estado quiescente en una plántula normal. Este proceso involucra una serie de eventos: 1) absorción de agua causando el hinchamiento y la ruptura de la testa de la semilla; 2) inicio de la actividad enzimática y del metabolismo respiratorio; translocación y asimilación de reservas nutritivas en las regiones de crecimiento del embrión y 3) crecimiento y división celular que provoca la emergencia de radícula y posteriormente el desarrollo de una plántula normal. Por otra parte, es importante mencionar que la temperatura, oxigeno, agua y luz son factores que juegan un papel muy importante durante el proceso de germinación.

1.18 Vigor

Según la AOSA, (2009) el vigor de las semillas depende de las propiedades que determinan su rápido potencial de emergencia y adaptación de las plántulas bajo un rango de condiciones de campo. Por otra parte; la pérdida del vigor está relacionada con la reducción de la habilidad de las semillas para llevar acabo sus funciones fisiológicas que le permitan desarrollarse y convertirse en

una planta bajo condiciones naturales; lo anteriormente descrito tiene una relación directa con el envejecimiento fisiológico o deterioro el cual comienza antes de la cosecha y continua durante el almacenamiento.

Perez Garcia & Pita Villamil, (2012). Mencionan que el vigor de un lote de semillas se define como el conjunto de propiedades que determinan el nivel de actividad y capacidad de las semillas durante la germinación y posterior emergencia de las plántulas. Las semillas con buen comportamiento se consideran semillas de alto vigor. Además, afirman que el vigor de un lote de semillas es el resultado de la interacción de una serie de características de las semillas como ser: constitución genética, condiciones ambientales y nutricionales a las que estuvo expuesta la planta madre durante el periodo de formación, grado de madures y grado de deterioro de las semillas. Así mismo es importante mencionar que un lote de semillas con alto vigor producirá más plántulas normales y con tasas elevadas de crecimiento.

De acuerdo con (AOSA, 2009). El vigor son medidas más sensibles de la calidad de las semillas en comparación con las pruebas de germinación estándar, debida a que los resultados de las pruebas de germinación estándar son el producto de una primera lectura y el recuento final del ensayo. Sin embargo, las pruebas de vigor de la semilla son más estrictas y efectivas para determinar la calidad fisiológica de un lote de semillas. Delouche, (2002) mencionan que el vigor de las semillas y el deterioro están fisiológicamente relacionados. El deterioro tiene una connotación negativa, en cuanto que el vigor tiene una connotación extremamente positiva; el vigor disminuye a medida que el deterioro aumenta. El deterioro es el proceso de envejecimiento y muerte de las semillas, en cuanto vigor es el principal componente de la calidad afectado por el proceso de deterioro.

Las pruebas de germinación son realizadas en óptimas condiciones de manera de obtener los mejores resultados (germinadores humidificados, temperatura óptima) por un determinado periodo de tiempo, lo que permitir que las semillas de baja calidad fisiológica germinen y desarrollen plántulas normales.

Las pruebas de germinación es una medida aceptada para evaluar el efecto final del deterioro de las semillas, o sea, pérdida de la capacidad de germinar. A la vez las pruebas de vigor son designadas para evaluar uno, varios o la mayoría de los efectos menores del deterioro sobre el potencial fisiológico de las semillas (James C. Delouche, 2002).

Algunas técnicas para evaluar el vigor según ISTA 2016

La prueba de conductividad eléctrica permite medir la lixiviación de electrolitos de tejidos vegetales, siendo utilizado en semillas de algunas especies. La prueba de envejecimiento acelerado, consiste en someterlas durante distintos períodos de tiempo (horas, días, semanas) a condiciones de alta humedad relativa y temperatura. De esta manera es factible causar un deterioro artificial en un corto período de tiempo, mejorando así las posibilidades para estudiar las manifestaciones del mismo en un mayor número de especies.

1.19 Latencia

Las semillas latentes no tienen la capacidad de germinar bajo cualquier combinación de factores ambientales que son favorables para que se produzca el proceso de germinación. La latencia se puede clasificar en tres grandes grupos (física, fisiológica y combinada).

Según Baskin & Baskin, (2004) la latencia física es causada por una o varias capas impermeables al agua de las células de empalizadas en las semillas. A la vez el uso de la escarificación química o mecánica promueve la germinación en semillas que presentan este comportamiento.

La latencia fisiológica en semillas es asociada al bajo potencial de crecimiento del embrión o la incapacidad del embrión para romper las estructuras de la testa y del endospermo. Por otra parte, este tipo de latencia está asociado con la presencia de compuestos inhibidores de la germinación (ABA, cumarina, ácidos grasos, ácido cafeico, ácido feralico y compuestos fenólicos) y a niveles endógenos insuficientes de ácido giberélico. La presencia de los compuestos inhibidores son los principales responsables de la no germinación de una gran cantidad de especies de semillas en el mundo. Por otro lado, estos compuestos se encuentran ubicados en los diferentes partes de la semilla.

Latencia combinada (Fisica+Fisiologica), es producto de la presencia de una capa impermeable al agua combinada con la latencia del embrión (fisiológica), por lo tanto, la semilla necesita de un periodo corto de tiempo para salir de su inactividad (almacenamiento en seco o en campo), durante este tiempo la testa se mantiene la impermeabilidad al agua (Baskin & Baskin, 2004).

2 Materiales y métodos

2.1 Localización

Las investigaciones se realizaron en la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, en el laboratorio de fisiología vegetal, banco de germoplasma *in situ* de CORPOICA, cuartos de conservación y laboratorio de viabilidad de la Unidad de Recursos Genéticos (URG) del Centro Internacional del Agricultura Tropical (CIAT), ubicado en el municipio de Palmira, Colombia.

2.2 Variedades de *Psidium guajava*

Se estudiaron semillas de cuatro variedades de guayaba (Palmira ICA I, Cimpa Pulpa Roja, Cl-0440A y Manzana) de gran importancia económica para el banco de germoplasma de CORPOICA.

2.2.1 Caracterización morfológica de los frutos de las cuatro variedades

Se seleccionaron 5 plantas de cada una de las variedades dentro de la plantación del programa de mejoramiento de guayaba de CORPOICA-Palmira de 7 años de edad. Cada planta constituyó una unidad experimental y de cada una de ellas se obtuvieron caracteres cualitativos y cuantitativos de cuatro frutos (unidad de muestreo) recolectados en madurez fisiológica del tercio medio de cada una de las plantas seleccionadas.

Variables evaluadas en los frutos de las cuatro variedades

Variables cualitativas

Forma de los frutos: fue determinada de manera visual de acuerdo con los criterios establecidos por Molero, Molina, & Casassa-Padrón, en el 2003.

Color del epicarpo, endocarpo, mesocarpo: fue determinado a partir de la medición visual utilizando la carta de colores RHS (The Royal Horticultural Society).

Variables cuantitativas

Peso de pulpa, endocarpo y peso total del fruto: fue determinado mediante el pesaje de los frutos en una balanza analítica METTLER TOLEDO PB303-S. El peso fue reportado en gramos (g).

Grosor de pulpa, diámetro polar, diámetro ecuatorial: cada fruto de midió longitudinal y transversalmente en cm, con la ayuda de un calibrador o pie de rey digital Mitutoyo.

Número de semillas por fruto: Se determinó mediante el conteo de las semillas que contenía cada fruto de cada uno de los materiales.

2.2.2 Extracción de semillas

Inicia con la realización de un corte transversal de los frutos, se retira el endocarpo con la semilla y se lava con abundante agua hasta lograr una separación total del mucílago. Inmediatamente después se realizó la determinación del contenido de humedad inicial para posteriormente ubicarlas en el cuarto de secado de la URG (HR 10% y 20°C) de CIAT hasta obtener los contenidos de humedad preestablecidos para la investigación.

2.2.3 Caracterización morfo-anatómica de las semillas de las variedades

Se registraron caracteres morfológicos externos como forma, color, textura y tamaño de las semillas. Se midió diámetro polar, diámetro ecuatorial y grosor. La unidad experimental consistió en 50 semillas (2 réplicas de 25) y 3 repeticiones (total 150 semillas). Se registró el Peso Unidad (PU) (g/100 semillas) de cada variedad (4 repeticiones con el método de octaneo). Así mismo se identificó la conformación morfo-anatómica interna de la semilla.

2.3 Desarrollo del protocolo de Tetrazolio para *Psidium guajava*

Para los estudios de la condición fisiológica de las semillas es necesario tener establecido un protocolo de Viabilidad (Tz); el cual para el caso de la semilla de guayaba no está disponible en la literatura.

Se trabajó con la variedad Palmira ICA I, con un contenido de humedad (bh) de 10%. Los parámetros clave a identificar para establecer un protocolo de Tetrazolio, son el tipo de corte, la concentración de Tz, tiempo de exposición y temperatura. Para determinar la concentración de Tz y el tiempo de exposición se realizaron dos ensayos. 1) En condiciones de laboratorio (T 26°C y 40% HR y 2) en condiciones controladas de temperatura (40°C) (**Tabla 3 y 4**).

Las semillas utilizadas en la determinación del protocolo de Viabilidad (Tz); primeramente, se colocaron en un proceso de imbibición durante 12 horas, después se les realizó un corte longitudinal lateral, posteriormente las semillas fueron ubicadas en oscuridad con el propósito de que la solución de Tetrazolio hiciera reacción al momento de entrar en contacto con las partes esenciales de las semillas. Al cabo de este periodo de tiempo, las semillas fueron retiradas y lavadas con abundante agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Las lecturas se realizaron con la ayuda de un estereoscopio, con una cámara adaptada a sus lentes; con la cual se tomaron las fotografías y se observó la tinción de los tejidos vitales de cada embrión.

Tabla 3 Factores evaluados en el ensayo 1, utilizando Tetrazolio como indicador de Viabilidad en condiciones de laboratorio (T 26°C y 40% HR)

Factor	Descriptor	Niveles	Descripción
1	Concentraciones de Tz.	3	0.1% ,0.5% y 1%
2	Tiempo de exposición	3	4, 8 y 12 horas

Tabla 4 Factores evaluados en el ensayo 2 utilizando Tetrazolio como indicador de Viabilidad en condiciones controladas de temperatura (40°C)

Factor	Descriptor	Niveles	Descripción
1	Concentraciones de Tz.	3	0.1% ,0.5% y 1%
2	Tiempo de exposición	3	1, 2 y 3 horas

Diseño experimental

Se evaluaron 9 tratamientos en cada uno de los ensayos, mediante el uso de un diseño completo al azar con arreglo factorial (3x3) (**Tabla 5**). En la evaluación de los tratamientos, la unidad experimental consistió en 50 semillas (2 réplicas de 25) y 3 repeticiones (total 150 semillas). Con base en el peso unidad; se calculó el número de semillas requeridas para todos los tratamientos. Para la realización de las pruebas se utilizaron 30 gramos g de semillas de la variedad Palmira

ICAI. La separación de medias se realizó mediante la prueba de Duncan con un 5% de probabilidad.

Tabla 5 Listado de tratamientos del ensayo 1 y 2 (combinación de factores)

Condiciones de laboratorio (T 20°C 40%HR)			**Condiciones controladas de Temperatura (40°C)**		
Tratamientos			**Tratamientos**		
N°	**F1**	**F2**	**N°**	**F1**	**F2**
1	0.1	4.0	1	0.1	1.0
2	0.1	8.0	2	0.1	2.0
3	0.1	12.0	3	0.1	3.0
4	0.5	4.0	4	0.5	1.0
5	0.5	8.0	5	0.5	2.0
6	0.5	12.0	6	0.5	3.0
7	1.0	4.0	7	1.0	1.0
8	1.0	8.0	8	1.0	2.0
9	1.0	12.0	9	1.0	3.0

2.4 Clasificación fisiológica de las semillas

Para la determinación de la condición fisiológica de la semilla Hong y Ellis, recomiendan dos etapas. La primera tolerancia a la desecación y la segunda tolerancia al almacenamiento.

Para la primera etapa se utilizó la metodología facilitada por de Hong y Ellis en1996 (**anexo 1**) donde se determina el probable comportamiento de las semillas (ortodoxo, intermedio o recalcitrante). El segundo estudio pretende confirmar la condición fisiológica de las semillas y se realiza mediante un ensayo factorial.

2.4.1 Etapa 1. Tolerancia a la desecación

El contenido de humedad (bh); fue determinado en una balanza analizadora de humedad, mediante la toma de cuatro repeticiones de 1 gramo, tomadas a partir de un lote de semillas de 1500 gramos de cada una de las variedades estudiadas.

Para evaluar la viabilidad utilizando Tetrazolio como indicador se establecieron tres unidades experimentales. La unidad experimental consistió en 50 semillas (2 réplicas de 25) y 3 repeticiones (total 150 semillas).

Para evaluar la germinación se establecieron tres unidades experimentales. La unidad experimental consistió en 150 semillas (3 réplicas de 50) y 3 repeticiones (total 450 semillas).

Para la realización de las pruebas iniciales, se hiso uso de 36 g de semilla fresca por variedad. Las evaluaciones iniciales consistieron en determinar el contenido de humedad inicial (bh), viabilidad (utilizado Tetrazolio como indicador) y germinación de las semillas recién-mente extraídas de los frutos (semillas frescas), El resto de semillas fueron colocadas en un cuarto de secado (T: 20ºC y HR: 10%) de la URG del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) para que perdieran humedad de acuerdo con la metodología utilizada **(Anexo 1).**

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con 3 repeticiones. La separación de medias de los tratamientos se hizo mediante la prueba de Duncan con un 5% de probabilidad.

2.4.2 Etapa 2. Tolerancia al almacenamiento

Para determinar la tolerancia al almacenamiento se realizó un ensayo factorial. De igual forma se utilizaron semillas de las cuatro variedades. Los contenidos de humedad de acuerdo con el objetivo de la investigación se lograron mediante la exposición de las semillas en un cuarto de secado (T: 20ºC y HR: 10%) de la URG del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Los factores evaluados en la tolerancia al almacenamiento Según Hong y Ellis, (1996); se ilustran en la **Tabla 6.**

Tabla 6 Factores evaluados en la determinación del potencial de conservación de las semillas de las cuatro variedades de guayaba

Factor	Descriptor	Niveles	Descripción
1	Variedades	4	(Palmira ICA I, Cimpa Pulpa Roja, Cl-0440A y Manzana)
2	C. Humedad	3	10 ,7.5 y 5%
3	Almacenamiento	2	7 ±2°C y –20°C
4	Tiempo de almacenamiento	3	4, 8 y 12 meses

En esta fase de la Investigación; para evaluar contenido de humedad y viabilidad (utilizando Tetrazolio como indicador) y germinación de las semillas de las cuatro variedades de guayaba; se hiso uso de los procedimientos descritos en la **etapa 1**.

Diseño experimental

Se evaluaron 72 tratamientos, mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial (4x3x2x3**) (Tabla 7**). Con base en el peso unidad (1g/100 semillas), se calculó el peso requerido para todas las pruebas. Para las pruebas se necesitaron 170 g de semilla, por cada variedad. La separación de medias se realizó mediante la prueba de Duncan con un 5% de probabilidad.

2.5 Variables evaluadas

Viabilidad: Se hiso referencia a la semilla catalogadas como viables en una solución de Tetrazolio del 1% durante tres horas de exposición en condiciones controladas de temperatura (40ºC).

Germinación: Se hiso referencia al porcentaje plántulas normales (PN) obtenidas al final de la prueba de germinación (30 días). Las pruebas fueron montadas en papel de germinación (HPT 20F2) y ubicadas en una cámara de germinación bajo condiciones controladas de fotoperiodo (8/16) y temperatura (35/20ºC). Se realizaron tres lecturas (10, 20 y 30 días).

Vigor: Se hiso referencia al porcentaje de plantas normales (PN) en la segunda lectura (20 días) de la prueba de germinación.

2.6 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para detectar diferencias entre tratamientos y para determinar diferencias entre medias de tratamientos se utilizó la prueba de DUNCAN con un nivel de probabilidad de 5 %. Los resultados fueron analizados en el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System 9.4).

Tabla 7 Listado de tratamientos (combinación de factores)

	Tratamientos			
No	**F1**	**F2**	**F3**	**F4**
1	Palmira ICA I	10.0	7± 2	4
2	Palmira ICA	10.0	7± 2	8
3	Palmira ICA I	10.0	7± 2	12
4	Palmira ICA	10.0	-20	4
5	Palmira ICA I	10.0	-20	8
6	Palmira ICA	10.0	-20	12
7	Palmira ICA I	7.5	7± 2	4
8	Palmira ICA	7.5	7± 2	8
9	Palmira ICA I	7.5	7± 2	12
10	Palmira ICA	7.5	-20	4
11	Palmira ICA I	7.5	-20	8
12	Palmira ICA	7.5	-20	12
13	Palmira ICA I	5.0	7± 2	4
14	Palmira ICA	5.0	7± 2	8
15	Palmira ICA I	5.0	7± 2	12
16	Palmira ICA	5.0	-20	4
17	Palmira ICA I	5.0	-20	8
18	Palmira ICA	5.0	-20	12
19	Manzana	10.0	7± 2	4
20	Manzana	10.0	7± 2	8
21	Manzana	10.0	7± 2	12
22	Manzana	10.0	-20	4
23	Manzana	10.0	-20	8
24	. Manzana	10.0	-20	12
25	Manzana	7.5	7± 2	4
26	Manzana	7.5	7± 2	8
27	Manzana	7.5	7± 2	12
28	Manzana	7.5	-20	4
29	Manzana	7.5	-20	8
30	Manzana	7.5	-20	12
31	Manzana	5.0	7± 2	4
32	Manzana	5.0	7± 2	8
33	Manzana	5.0	7± 2	12
34	Manzana	5.0	-20	4
35	Manzana	5.0	-20	8
36	Manzana	5.0	-20	12
37	Cimpa Pulpa Roja	10.0	7± 2	4
38	Cimpa Pulpa Roja	10.0	7± 2	8
39	Cimpa Pulpa Roja	10.0	7± 2	12
40	Cimpa Pulpa Roja	10.0	-20	4

	Tratamientos			
No	**F1**	**F2**	**F3**	**F4**
41	Cimpa Pulpa Roja	10.0	-20	8
42	Cimpa Pulpa Roja	10.0	-20	12
43	Cimpa Pulpa Roja	7.5	7± 2	4
44	Cimpa Pulpa Roja	7.5	7± 2	8
45	Cimpa Pulpa Roja	7.5	7± 2	12
46	Cimpa Pulpa Roja	7.5	-20	4
47	Cimpa Pulpa Roja	7.5	-20	8
48	Cimpa Pulpa Roja	7.5	-20	12
49	Cimpa Pulpa Roja	5.0	7± 2	4
50	Cimpa Pulpa Roja	5.0	7± 2	8
51	Cimpa Pulpa Roja	5.0	7± 2	12
52	Cimpa Pulpa Roja	5.0	-20	4
53	Cimpa Pulpa Roja	5.0	-20	8
54	Cimpa Pulpa Roja	5.0	-20	12
55	Cl-0440A	10.0	7± 2	4
56	Cl-0440A	10.0	7± 2	8
57	Cl-0440A	10.0	7± 2	12
58	Cl-0440A	10.0	-20	4
59	Cl-0440A	10.0	-20	8
60	Cl-0440A	10.0	-20	12
61	Cl-0440A	7.5	7± 2	4
62	Cl-0440A	7.5	7± 2	8
63	Cl-0440A	7.5	7± 2	12
64	Cl-0440A	7.5	-20	4
65	Cl-0440A	7.5	-20	8
66	Cl-0440A	7.5	-20	12
67	Cl-0440A	5.0	7± 2	4
68	Cl-0440A	5.0	7± 2	8
69	Cl-0440A	5.0	7± 2	12
70	Cl-0440A	5.0	-20	4
71	Cl-0440A	5.0	-20	8
72	Cl-0440A	5.0	-20	12

3 Resultados y discusión de resultados

3.1 Caracterización morfológica de los frutos de las cuatro variedades

Los resultados de las variables cualitativas y cuantitativas se presentan en las **Tablas 8 y 9 y en la figura 2.**

3.1.1 Caracteres cualitativos de los frutos

Tabla 8 Variables cualitativas de los frutos de las cuatro variedades

Variedades	Forma del Fruto	Color de Epicarpo	Color de Mesocarpo	Color de Endocarpo
Palmira ICA I	Piriforme	Amarillo	Rosado	Rosado
Manzana	Redondo	Verde	Blanco	Blanco
Cimpa Pulpa Roja	Piriforme	Amarillo	Rosado	Rosado
Cl-0440A	Redondo	Amarillo	Rosado	Rosado

La forma de los frutos fue diferente según los materiales. La variedad Palmira ICA I y Cimpa Pulpa Roja presentaron una forma piriforme. La variedad Manzana y Cl-0440A exhibieron una forma redonda **(Figura 2**). La forma de los frutos de las variedades Manzana y Cl-0440A coinciden con los reportados por Jiménez Lozano, Pinzón Almanza, & Flórez Muñoz,(2009). La forma de los frutos de las variedades Palmira ICA y Cimpa Pulpa roja concuerdan con el sistema de clasificación propuesto por Sánchez-Urdaneta & Peña-Valdivia, (2011).

Figura 1 Partes del fruto de *Psidium guajava*

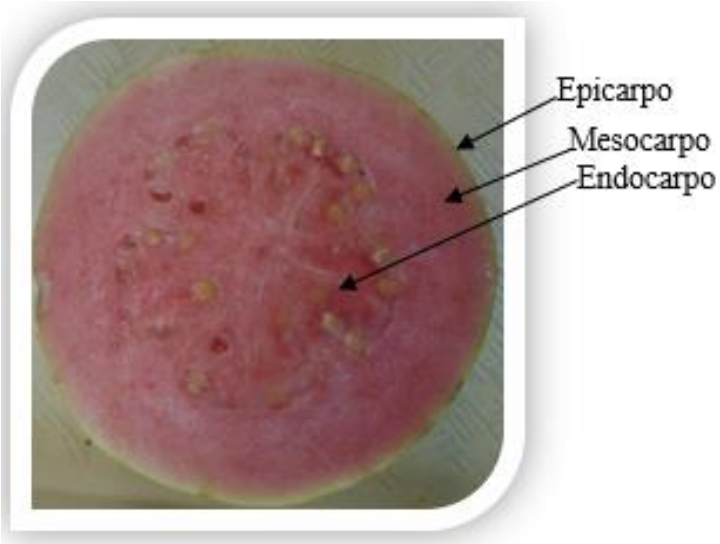


Figura 2 Caracteres cualitativos de los frutos (forma, color de epicarpo mesocarpo y endocarpo) de las cuatro variedades de *Psidium guajava*

Las variedades presentaron diferentes tonalidades de color del epicarpo con predominancia del color amarillo para las variedades Palmira ICA I, Cimpa Pulpa Roja y Cl-0440A mientras que la variedad Manzana presentó una tonalidad verde (**Figura 2**). Estos resultados coinciden con lo reportado por Gutierrez Devia, 2013; Jiménez Lozano et al., (2009), que mencionan la predominancia del color amarillo en la coloración del epicarpo de la mayoría de los frutos de las diferentes variedades de *Psidium guajava*. Gutierrez Devia, (2013) reportó diferencias entre introducciones con respecto a la tonalidad del color del epicarpo.

Las variedades Palmira ICA I, Cimpa Pulpa Roja y Cl-0440A presentaron una coloración rosada a nivel de mesocarpo y endocarpo, mientras que la variedad Manzana mostró una coloración blanca en ambos componentes (**Figura 2**). Gutierrez Devia, (2013) menciona que los frutos de *Psidium guajava* presentan diferentes coloraciones de mesocarpo y endocarpo según la variedad. Yam Tzec, Villaseñor Perea, Kriuchkova Romantchik, Soto Escobar, & Peña Peralta, (2010) reportan que el color de la pulpa puede ser blanco, crema o rosado; estas diferencias están relacionadas con los componentes genéticos de cada uno de los materiales.

3.1.2 Caracteres cuantitativos de los frutos

Tabla 9 Variables cuantitativas de los frutos de las cuatro variedades de *Psidium guajava*

Variedades / Variables	Palmira ICA I			Cimpa Pulpa Roja			Cl-0440A			Manzana		
	n=20			n=20			n=20			n=20		
	X	σ	CV	X	σ	CV	X	σ	CV	X	σ	CV
Diámetro polar (cm)	8.21	0.71	8.66	7.47	0.55	7.36	7.11	0.54	7.56	8.03	0.49	6.05
Diámetro ecuatorial (cm)	6.21	0.34	5.49	5.91	0.36	6.15	7.10	0.60	8.42	7.88	0.35	4.39
Grosor de pulpa (cm)	0.97	0.14	14.61	0.76	0.10	12.55	1.44	0.16	11.13	1.55	0.21	13.33
Peso de pulpa (g)	108.86	18.62	17.10	83.01	11.08	13.35	136.93	14.28	10.43	207.52	18.98	9.15
Peso de endocarpo (g)	41.49	5.31	12.8	51.50	10.29	19.98	43.74	5.45	12.47	84.06	8.48	10.09
Peso de fruto (g)	150.35	20.49	13.63	134.51	19.12	14.22	180.67	15.28	8.45	291.58	22.17	7.72
Numero de semillas/fruto	348.95	64.97	18.62	574.9	136.33	23.71	227.5	44.75	19.67	517	61.87	11.96

Los resultados promedios para las variables diámetro polar y diámetro ecuatorial de los frutos indican que la variedad Palmira ICA I presenta el mayor diámetro polar con relación a las otras variedades (8.21± 0.71cm) mientras que la variedad Manzana exhibió el mayor diámetro ecuatorial (7.88±0.35 cm). De acuerdo con Orduz-Rodríguez, Monroy, Fischer, & Herrera, (2009) el crecimiento y el desarrollo de los frutos está determinado por las condiciones climáticas de la región y por la variedad cultivada. Por otra parte, el tamaño final de los frutos está asociado con el proceso de expansión celular (aumento del volumen de agua en las células) lo que explica que en una misma planta se pueden encontrar frutos con diferentes tamaños.

La variedad Manzana presentó mayor peso de pulpa y de endocarpo (**Tabla 9**) mientras que, la variedad Cimpa Pulpa Roja obtuvo el menor peso de pulpa. Por otra parte, la variedad Palmira ICA I presentó el menor peso de endocarpo. Las variedades Manzana y Cl-0440A expresaron el mayor grosor de pulpa en comparación con los otros materiales (**Tabla 9**). Estas diferencias se deben a que existen diferencias genéticas muy bien marcadas entre cada una de las variedades estudiadas y pueden ser importantes para la industria de alimentos. Algunos autores señalan, que estos caracteres pueden ser utilizados para la selección de plantas superiores dentro de una misma especie (Sanchez Urdaneta et al., 2007, Gonzaga Neto, Fernandes Bezerra, & de Souza Costa, 2003). Por otra parte, estas diferencias en algunos casos, podrían atribuirse al manejo agronómico debido a que las plantas con excesivo crecimiento vegetativo y con poda poco frecuente, conlleva

a la presencia de frutos pequeños, por consiguiente, el incremento de la masa de los frutos se debe en muchos casos a la poda (Gonzaga Neto et al., 2003).

El peso promedio de los frutos cambió según la variedad. La variedad Manzana fue la que presentó en mayor peso promedio (291.58 ± 22.17 g) mientras que la variedad Cimpa Pulpa Roja manifestó el menor peso promedio (134.51 ± 19.12 g); no obstante, estos pesos son considerados ideales para la comercialización de frutos según los objetivos del programa de mejoramiento de CORPOICA.

Las variedades Cimpa Pulpa Roja y Manzana presentaron valores superiores en el número de semilla por fruto (**Tabla 9**); lo que está relacionado directamente con el peso del endocarpo de los frutos de estas dos variedades. Por otra parte, Las variedades Palmira ICA I y Cl-040A obtuvieron valores inferiores en el número de semillas por fruto. Estos resultados no coinciden con lo reportado por Sanchez Urdaneta et al., (2007) donde señala, que el número de semillas en los frutos de *Psidium guajava* está relacionado con la masa de los mismos. Este análisis demuestra que existen diferencias genéticas entre las variedades estudiadas y que el número de semillas por fruto en algunas variedades está relacionado con el peso del endocarpo.

3.2 Caracterización morfo-anatómica de las semillas

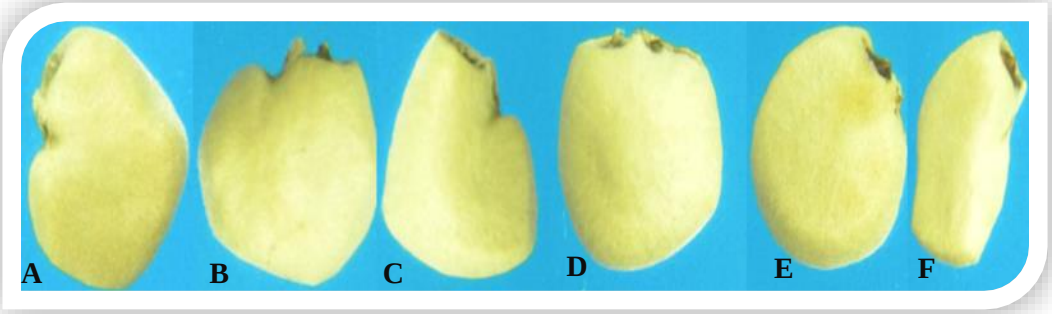
3.2.1 Caracteres cualitativos de las semillas de las cuatro variedades

Las semillas presentaron una testa de textura ligeramente lisa de color crema. Por otra parte, la semilla presenta diferentes formas: obovada, dentada, clavada, oblonga, ovoide y reniforme (**Figura 3**). Estos resultados coinciden con lo reportado por (Sánchez-Urdaneta & Peña-Valdivia, 2011).

Las semillas presentan una testa de consistencia dura, la cual no es impedimento para el proceso de imbibición lo que podría descartar la probable presencia de latencia física en las semillas de *Psidium guajava*. De igual forma, presentan un micrópilo notorio (**Figura 4**) que se encuentra rodeado con abundante mucílago al momento de la extracción de las semillas del fruto. El endospermo micrópilar, tiene como función proteger a la radícula y ayudar al rompimiento de la testa durante el proceso de germinación, mientras que el resto del endospermo contiene las

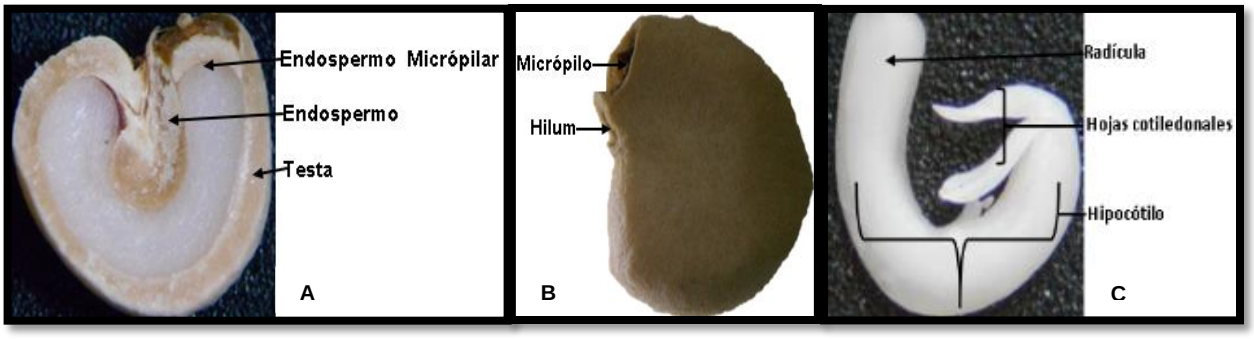
sustancias de reserva que requiere el embrión para iniciar su actividad durante el proceso de germinación.

Figura 3 Caracteres cualitativos de las semillas de las cuatro variedades de *Psidium guajava*. **A** forma obovada, **B** dentada, **C** clavada, **D** oblonga **E**. Ovoide **F**. Reniforme



El embrión de la semilla de *Psidium guajava*, contiene todas sus partes (Radícula, Hipocótilo, hojas cotiledonales) completamente desarrollados al momento de la extracción de la semilla de frutos que se encuentra en madurez fisiológica **(Figura 4**). Por lo que se descartaría la presencia de latencia morfológica en las semillas de esta especie.

Figura 4 Descripción Anatómica de las semillas de *Psidium guajava*



3.2.2 Caracteres cuantitativos de las semillas.

Las semillas de la variedad Cl-0440A presentaron el mayor diámetro polar y ecuatorial en comparación con las otras variedades. La variedad Manzana exhibió el mayor grosor con respecto a los otros materiales (**Tabla 10**). Estos datos muestran que el tamaño de las semillas de *Psidium*

guajava, varían de acuerdo con la variedad. De igual forma, estos resultados son similares con los reportados por Meza & Bautista, en el 2007.

Tabla 10 Caracteres cuantitativos de las semillas de las cuatro variedades de *Psidium guajava*

Variedades / Variables	Palmira ICA I			Cimpa Pulpa Roja			Cl-0440A			Manzana		
	n=150			n=150			n=150			n=150		
	X	σ	CV	X	σ	CV	X	σ	CV	X	σ	CV
Diámetro polar (mm)	3.46	0.13	3.67	3.36	0.04	1.25	3.60	0.12	3.46	3.31	0.11	3.18
Diámetro ecuatorial (mm)	2.62	0.06	2.47	2.57	0.08	3.06	3.01	0.11	3.79	2.69	0.13	4.95
Grosor de semilla (mm)	1.55	0.07	4.63	1.49	0.06	4.19	1.71	0.09	5.20	1.99	0.04	1.78
Peso unidad (gramos/100 semillas)	1.04	0.05	4.51	1.11	0.03	2.28	1.28	0.05	3.89	1.06	0.03	2.4

El Peso Unidad (gramos/100semillas) fue superior para la variedad Cl-0440A (1.28) y el menor (1.04) fue el de la variedad Palmira ICA lo que muestra diferencias en tamaños de las semillas de las variedades (**Tabla 10**). La superioridad del peso unidad (gramos/100semillas) de las semillas de la variedad Cl-0440A probablemente se debe a que el fruto contiene menor número de semillas con respecto a los otros materiales.

3.3 Determinación del protocolo para viabilidad en semilla de guayaba.

Los protocolos para estimar la viabilidad de las semillas comprenden la determinación del tipo de corte, la temperatura en la que se realiza la prueba, la concentración de la solución con sal de Tetrazolio (Tz) y el tiempo de exposición que permita una valoración inequívoca de la viabilidad con base en la interpretación de la reacción del Tz con las estructuras esenciales de la semilla.

Con base en pruebas preliminares y considerando el tamaño de las semillas el corte seleccionado fue longitudinal lateral (sin afectar el embrión) el cual permitió visualizar la testa, el endospermo y el embrión.

En la **Tabla 11** se presentan los resultados de los dos ensayos factoriales realizados para la determinación de la concentración de Tz y tiempo de exposición en condiciones de laboratorio (T 26±2°C y 40% HR) y en condiciones contraladas de temperatura (40°C).

Tabla 11 Resultados de viabilidad (Tetrazolio) obtenidos en condiciones de laboratorio (T 26±2°C y 40% HR) y en condiciones contraladas de temperatura (40°C).

Tratamiento	condiciones de laboratorio (T 26±2°C y 40% HR)		Viabilidad (%)	Condiciones contraladas de temperatura (40°C).		Viabilidad (%)
	Concentración de Tz (%)	Tiempo de Exposición(h)		Concentración de Tz (%)	Tiempo de Exposición(h)	
T1	0.1	4.0	94^{A}	0.1	1.0	93.33^{B}
T2	0.1	8.0	96.67^{A}	0.1	2.0	96^{A}
T3	0.1	12.0	98^{A}	0.1	3.0	96.67^{A}
T4	0.5	4.0	97.33^{A}	0.5	1.0	96^{A}
T5	0.5	8.0	97.33^{A}	0.5	2.0	96.67^{A}
T6	0.5	12.0	98^{A}	0.5	3.0	96.67^{A}
T7	1.0	4.0	97.33^{A}	1.0	1.0	97.33^{A}
T8	1.0	8.0	98^{A}	1.0	2.0	97.33^{A}
T9	1.0	12.0	98^{A}	1.0	3.0	98^{A}

***Promedios** con la misma letra en la misma columna no difieren significativamente al nivel de $P < 0.05$. Según la prueba de Duncan.

Los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio (T 26±2°C y 40% HR**)** indican que el tiempo de exposición, 8 horas con la solución del 0.1% fue suficiente para lograr interpretaciones topográficas razonables para estimar la viabilidad de la semilla. Sin embargo, cuando se utilizó 12 horas la lectura mejoró en 2% (96.6 y 98% respectivamente). Esta última no fue diferente con 0.5% de concentración con 12 horas de exposición (98%) ni con 1% y 8 horas de exposición (98%). Estos resultados indican que bajo condiciones de laboratorio la concentración de 0.1% y 12 horas de exposición sería la más recomendable (por menos costos del Tz) pero que si se quiere reducir el tiempo a 4-8 horas se podría con incrementos de la concentración de Tz hasta 1%. Una concentración de 0.1% y 4 horas de exposición podrían proporcionar datos no confiables para la determinación de la viabilidad de las semillas evaluadas.

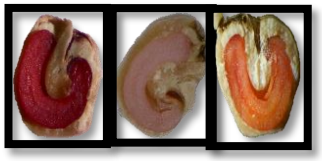
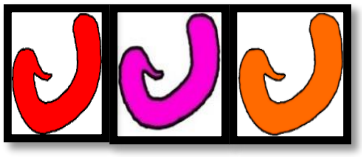
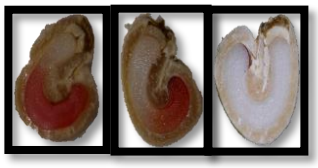
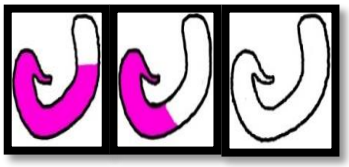
Los resultados obtenidos en condiciones controladas de temperatura (40°C) indican que el tiempo mínimo de exposición, 2 horas con la solución del 0.1% fue suficiente para lograr interpretaciones topográficas razonables para estimar la viabilidad de la semilla (96%). Sin embargo, cuando se utilizó 3 horas y una concentración de 1% la lectura mejoró en 2% (98%). Estos resultados indican que bajo condiciones controladas de temperatura (40°C) la concentración de 1% y 3 horas de exposición sería la más recomendable. Una concentración de 0.1% durante 1 hora en condiciones

controladas de temperatura 40°C, podrían proporcionar datos no confiables al momento de determinar la viabilidad de las semillas de esta especie.

Los patrones topográficos asociados con la viabilidad de las semillas de *Psidium guajava*, fueron determinados con base en los siguientes parámetros.

- Semillas que presentaron una tinción roja, rosada y naranja, en sus tejidos esenciales como ser radícula, hipocótilo, y hojas cotiledonales fueron clasificadas como viables.
- Semillas que no presentaban coloración >50% en uno de sus tejidos esenciales (radícula, hipocótílo y hojas cotiledonales) fueron clasificas como no viables.
- Semillas libres de coloración en los tejidos esenciales fueron clasificadas como no viables.

Figura 5 Parámetros para determinar los patrones topográficos de las semillas de *Psidium guajava*

Clases	Viabilidad	Descripción	Fotografía	Esquema
1	**Viables**	Semillas con tinción Roja, Rosada y Naranja.		
2	**No viables**	Semillas con ausencia de tinción en el embrión o en unas de sus partes esenciales (Radícula y Hipocótilo)		

Los resultados obtenidos en los ensayos factoriales fueron soportados con las imágenes obtenidas con las diferentes concentraciones de Tz y tiempos de exposición en los dos ambientes, **Figuras 6 y 7.** Los diferentes grados de tinción en el embrión, área donde se concentra la mayor actividad metabólica de la semilla, fue total para las semillas que fueron catalogadas como viables dentro de los parámetros definidos para realizar esta evaluación.

Los resultados obtenidos comparten los comentarios de la utilidad de la prueba de otros autores en el sentido de que las semillas viables de un lote determinado de semillas, tienen el potencial para germinar bajo condiciones ambientales favorables. La viabilidad determinada, mediante la prueba de Tetrazolio es el porcentaje o proporción de semillas viables de un lote de semillas (Sawma &

Mohler, 2002). Por otra parte, Carvalho, Grzybowski, Ohlson, & Panobianco, (2014) mencionan, que esta prueba facilita resultados fiables y precisos de la viabilidad de las semillas. De igual forma, este método es complicado y difícil de usar en semillas pequeñas (Borza, Westerman, & Liebman, 2007) . La prueba de Tetrazolio; ofrece rápida determinación de la viabilidad de 24-48 horas, lo cual es de suma importancia para la determinación de la viabilidad en semillas de especies que presentan latencia (Nogueira Soares, Elias, Gadotti, & Villela, 2016. Carvalho, Krzyzanowski, Ohlson, & Panobianco, 2013). Las semillas de *Psidium guajava* exhiben el fenómeno de latencia, lo que es un obstáculo para obtener rápidamente resultados de la viabilidad de las semillas mediante una prueba de germinación; es por esto, la importancia de determinar la concentración y tiempo de exposición de las semillas de guayaba en las dos condiciones estudiadas para determinar un protocolo de viabilidad necesario para avanzar en los estudios de estimación de la condición fisiológica de la semilla que se realizaron en esta misma investigación. Igualmente resulta útil para bancos de genes como el de CORPOICA. Es muy importante reconocer el grado de complejidad de las pruebas de viabilidad que van más allá de un simple: Rojo=Vivo, Blanco= Muerto. La correcta interpretación de las pruebas de Tetrazolio depende del conocimiento de las estructuras esenciales de la semilla, la precisión en la preparación de las semillas y la experiencia como también de la comprensión de los mecanismos de la prueba y sus limitaciones.(AOSA, 2010).

Figura 6 Patrones topográficos en la determinación de la concentración de Tetrazolio y tiempo de exposición de las semillas de *Psidium guajava* en condiciones de laboratorio (T 26±2°C y 40% HR)

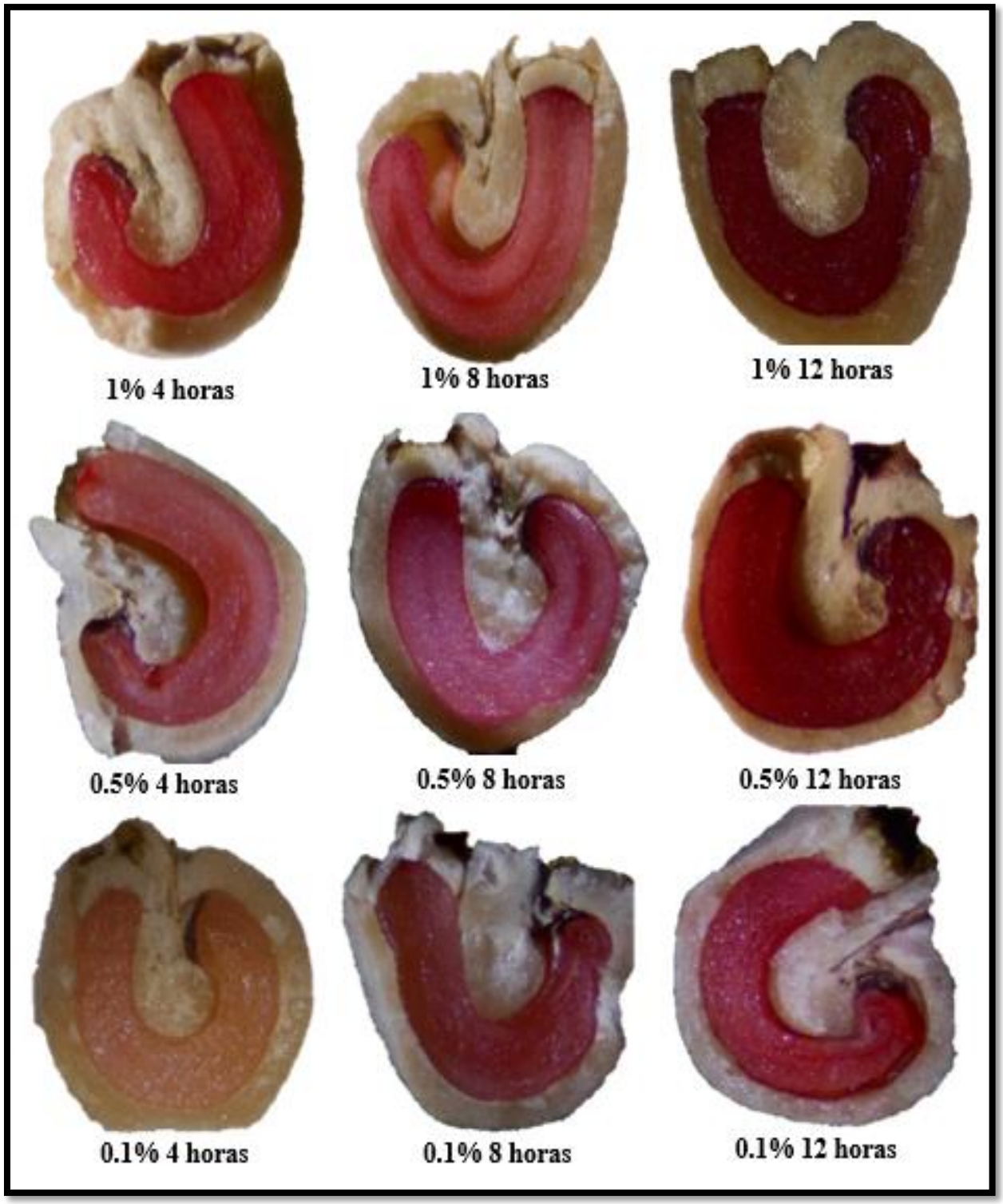


Figura 7 Patrones topográficos en la determinación de la concentración de Tetrazolio y tiempo de exposición de las semillas de *Psidium guajava* en condiciones controladas de temperatura (40°C)

Con base en todas las pruebas desarrolladas y considerando el tamaño de la semilla, la **Tabla 12 y 13** muestran el protocolo de Tetrazolio establecido para evaluar la calidad fisiológica (Viabilidad) de la semilla de guayaba.

Protocolo de viabilidad

Familia: Myrtaceae

Especie: *Psidium guajava*

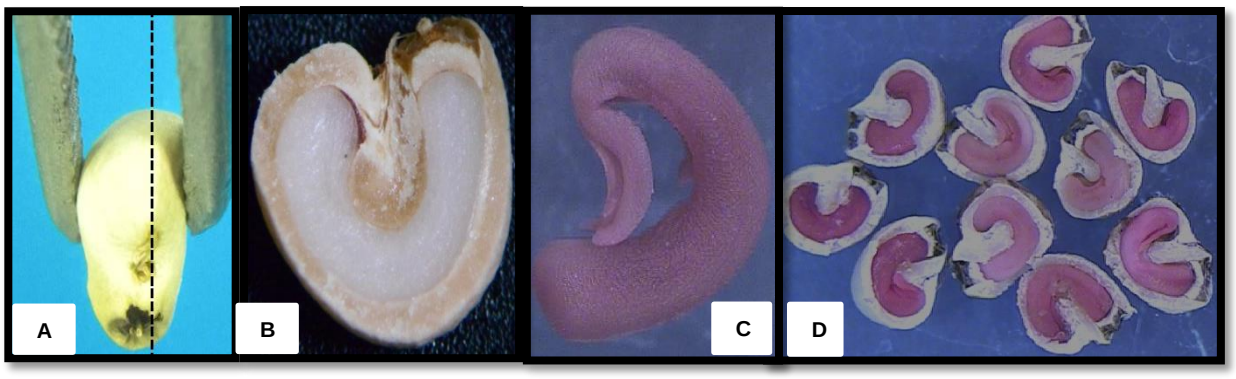
T**abla 12** Etapa de pre-condicionamiento de la semilla

Método	Tiempo (h)	Temperatura(°C)
Imbibición en agua	12	26-28

Tabla 13 Etapa de preparación de la Prueba de Tetrazolio

Método	Concentración TZ (%)	Tiempo(h)	Temperatura(°C)
Realizar un corte longitudinal lateral, dejando intacto embrión.	0.1	12	26-28
Realizar un corte longitudinal lateral, dejando intacto el embrión,	1	3	40

Figura 8 A Corte longitudinal lateral, **B**. Semillas después de la realización del corte, **C**. Embrión después de la exposición al Tetrazolio, **D**. Semillas con diferentes grados de tinción después de la exposición al Tetrazolio



3.4 Clasificación fisiológica de las semillas de *Psidium guajava*

3.4.1 Etapa 1: Tolerancia a la desecación

La viabilidad de la semilla de las cuatro variedades de *Psidium guajava* no presentaron sensibilidad a la desecación y al almacenamiento con un contenido de humedad de 5% durante 3 meses de conservación a -20°C. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos de humedad ni para la tolerancia al almacenamiento durante los 3 meses de almacenamiento (**Tabla 14**). De igual forma, con base a los resultados obtenidos se puede concluir con relación a la tolerancia a la desecación y al almacenamiento, que las semillas de las cuatro variedades presentaron un comportamiento probablemente ortodoxo, de acuerdo con los criterios de clasificación establecidos por (Hong & Ellis, 1996).

Tabla 14 Resultados de las pruebas de viabilidad, Germinación y Vigor en la etapa 1 (tolerancia a la desecación)

Variedad	Tipo de Prueba	Humedad de la Semilla (%)			3 meses de almacenamiento a -20°C con 5% de CH
		Inicial	10-12	5	
Palmira ICA I	Viabilidad (%)	98^{A}	98^{A}	95.33^{A}	95.33^{A}
	Germinación (%)	21.77^{B}	24.22^{B}	87.77^{A}	91.55^{A}
	Vigor (%)	2.66^{C}	3.33^{C}	19.33^{B}	53.99^{A}
Cimpa Pulpa Roja	Viabilidad (%)	98^{A}	98^{A}	95.33^{A}	94.66^{A}
	Germinación (%)	18.21^{C}	43.1^{B}	93.77^{A}	93.77^{A}
	Vigor (%)	3.33^{C}	3.77^{C}	42.44^{B}	49.99^{A}
Manzana	Viabilidad (%)	97.33^{A}	96.66^{A}	95.33^{A}	94.66^{A}
	Germinación (%)	7.99^{C}	23.77^{B}	79.1^{A}	74.88^{A}
	Vigor (%)	1.77^{C}	3.10^{BC}	8.22^{AB}	11.1^{A}
Cl-0440[a]	Viabilidad (%)	95.33^{A}	95.33^{A}	94^{A}	94^{A}
	Germinación (%)	18^{C}	24.22^{C}	33.99^{B}	45.77^{A}
	Vigor (%)	1.77^{D}	4.22^{C}	7.99^{B}	15.77^{A}

Viabilidad: fue determinado utilizando Tetrazolio como indicador de la viabilidad de las semillas de *Psidium guajava*.
Germinación: Esta variable fue determinada con base en lo establecido por el ISTA 2016, donde hace referencia al porcentaje de germinación únicamente a las plantas normales obtenidas al final de la prueba de germinación.
Vigor: El vigor hace referencia al porcentaje de plantas normales en la segunda lectura de la prueba de germinación (20 días).
*__Promedio__s con la misma letra en la misma fila no difieren significativamente al nivel de $P < 0.05$.

Este probable comportamiento ortodoxo de las semillas de las variedades de *Psidium guajava,* puede estar asociado a características físicas intracelulares que confieren la tolerancia a la desecación incluyendo la disposición de proteínas insolubles dentro de las vacuolas que proporcionan resistencia mecánica contra el colapso celular de las semillas (Patricia Berjak & Pammenter, 2013). Así mismo, las semillas ortodoxas se secan generalmente a bajos contenidos de humedad y se almacenan a bajas temperaturas (-20°C) de almacenamiento (Walters, 2015). Otras causas relacionadas con la tolerancia a la desecación son la acumulación de contenidos de reserva durante el desarrollo embrionario que causan cambios estructurales en la composición celular que dan protección, durante la desecación y el almacenamiento (Farrant, Pammenter, Berjak, & Walters, 1997). Las acumulaciones de los contenidos de reserva remplazan los contenidos de agua; como consecuencia la capacidad metabólica de las células disminuye, por la poca disponibilidad de fluido de agua en las células; sin embargo, la disponibilidad de las moléculas de agua que participan en las reacciones metabólicas permanece relativamente constante (Farrant & Walters, 1998; Pérez, Hill, & Walters, 2012).

Este probable comportamiento ortodoxo de las semillas de las cuatro variedades guayaba, se debe también posiblemente a la presencia de compuestos que evitan algunas interacciones moleculares (prolina, glutamato, glicina-betaina, manitol, sorbitol, fructanos, trehalosa y sacarosa) que afectan la viabilidad de las semillas durante la desecación y almacenamiento (Hoekstra et al., 2001). De igual forma la acumulación de sacarosa y trehalosa sirven como estabilizadores de membranas durante el proceso de desecación y almacenamiento (Crowe et al., 1998). Los disacáridos, oligosacáridos, el ABA y algunas proteínas específicas como las LEA y las de choque térmico (HSPs) juegan un papel muy importante en la tolerancia a la desecación en semillas (Hoekstra et al., 2001).

Los niveles iniciales de la germinacion (plantas normales) de las semillas de las cuatro variedades indican niveles variables de latencia en los cuatro materiales evaluados; encontradose diferencas estadisticamente significativas en cada una de las variedades con respecto a su contenido de humedad y despues del almacenamiento a -20°C **(Tabla 14**). En términos generales las 4 variedades presentaron latencia al inicio y fue disminuyendo con el contenido de humedad pero

Manzana y CI-0440A mostraron ser latencias más profundas que en Cimpa pulpa roja y Palmira ICA-I. La latencia resultó ser mayor en semillas con el contenido de humedad inicial (semillas recien extraidas del fruto) en cada una de las variedades ligado porbaablemente a altos contenidos de ABA en la etapa final de la maduración que evita la viviparia en semillas ortodoxas. La variedad CI-0440A mostró el porcentaje de germinacion mas bajo (o en su defecto el mayor grado de latencia). (**Tabla 14**). Después de 3 meses de conservación a -20°C, los niveles de latencia fueron CI-0440A 48.28%; Manzana 19.78%; Palmira ICA I 3.78% y Cimpa pulpa roja 0.9%. Fiona & Stephen, (2016) menciona que la latencia presente en las semillas durante la cosecha puede perderse durante el secado y el almacenamiento. Sin embrago, Baradwaj, Rao, Baskin, & Kumar, (2016) afirman que el almacenamiento en seco es eficicente para la liberacion de latencia fisiologica no profunda en semillas.

Estos resultados de la dinamica de la germinacion durante la desecacion y el almacenamiento de las semillas a -20°C durante 3 meses (**Tabla 14**), indican que existen mecanismos que favorecen la liberacion de la latencia durante el secado y el almacenamiento a -20° durante 3 meses de las semillas de las cuatro variedades de *Psidium guajava*. Estos resultados coinciden con lo reportado por; Cruz & Cicero, (2008); Pukacka & Czubak, (2014); Tompsett & Pritchard, (1998); Uzzo, Modolo, Matthes, & Carvalho, (2013) donde mencinan, que la germinacion disminuye a medida las semillas pierden humedad. De igual forma, Roberts & Christensen, (1972), Hong & Ellis, (1996) indican, que la disminucion de la germinacion durante el secado y almacenamiento varia de acuerdo con la especie.

El vigor de las semillas de las cuatro variedades de *Psidium guajava*, presentó un aumento a medida las semillas perdieron humedad y después del almacenamiento de semillas con un contenido de humedad del 5% a -20°C durante tres meses, encontandose de esta manera diferencias estadisticamente significativas con respecto a su contenido de humedad y después del almacenamiento de las semillas de cada una de las variedades (**Tabla 14**). El aumento del vigor de las semillas durante el secado y el almacenamiento varió entre materiales lo que indica que existen diferencias genéticas entre las variedades estudiadas. Baradwaj, Rao, Baskin, & Kumar, (2016) afrima que el almacenamiento en seco favorece la velocidad de germinacion de las semillas que presentan latencia fisiologica no propunda.

Las semillas de la variedad Palmira ICA I y Cimpa Pulpa Roja, presentaron valores superiores con respecto a la variable vigor a medida las semillas perdían humedad y después del almacenamiento con un contenido de humedad del 5% a -20°C durante tres meses, mientras, las variedades Manzana y Cl-0440A, presentaron valores inferiores con respecto a la variable vigor a medida que las semillas perdían humedad y después del almacenamiento con un contenido de humedad del 5% a -20°C durante tres meses (**Tabla 14**). Estos resultados coinciden con lo reportado por Sharma & Sharma, (2016) donde encontraron un aumento del vigor de las semillas de *Rheum australe* después del almacenamiento. Por otra parte, Martínez Maldonado, (2012) encontró un aumento del vigor en las semillas de *Annona squamosa* después del almacenamiento.

Las pruebas de Vigor fueron diseñadas para identificar la tolerancia de lotes de semillas a condiciones de estrés (medido principalmente con la germinación). La actividad enzimática, reparación de las membranas y la tasa de crecimiento de las plantas son aspectos fisiológicos complejos que determinan la expresión del potencial fisiológico y en cierta medida la condición física y saludable de las semillas J C Delouche, Caldwell, Delouche, & Caldwell, (1960) . De igual forma Miller & McDonald, (1975) afirman, que la pérdida del vigor precede a la pérdida de la viabilidad de las semillas.

Por último es importante mencionar que la diferencia observada entre el porcentaje de viabilidad y el porcentaje de germinación, corresponde al porcentaje de semillas frescas o semillas viables no germinadas (**Tabla 14 y Anexo 7**)

3.4.2 Etapa 2: Tolerancia al almacenamiento

Variedad Palmira ICA I

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 10%, a 7±2 °C, presentó una disminución en la viabilidad a los 12 meses de conservación, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, mientras que las semillas almacenadas con un contenido de humedad del 7.5% y 5% en estas mismas condiciones de temperaturas (7±2 °C) conservaron la viabilidad durante los 4, 8 y 12 meses de almacenamiento (**Figura 9A, C y E**). Por otra parte, las semillas de esta misma variedad almacenadas a -20 °C con un contenido de humedad del 10% y 5% exhibieron una disminución en la viabilidad durante los 12 meses de almacenamiento encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embrago las semillas con un contenido de humedad del 7.5% conservadas en estas mismas condiciones de temperatura (-20 °C) conservaron su viabilidad durante los 4, 8 y 12 meses de almacenamiento (**Figura 9B, D y F**).

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 10% a 7±2 °C durante 12 meses de conservación, presentaron un aumento en la germinación a los 4 meses de almacenamiento, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (**Figura 9A**). Sin embargo, la germinación se mantuvo contante durante los 8 y 12 meses de conservación en estas condiciones. Por otra parte, las semillas de esta misma variedad almacenadas con un contenido de humedad del 10% a -20 °C durante 12 meses de conservación exhibieron un aumento en la germinación a los 8 meses de almacenamiento y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (**Figura 9B**). La germinación disminuyó a los 12 meses de conservación.

La germinación de la semilla almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a 7±2 °C durante 12 meses; presentó una disminución en la germinación a los 4 meses de conservación y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (**Figura 9C**). Sin embargo, la germinación se mantuvo parcialmente constante durante los 8 y 12 meses de almacenamiento. Por otro lado, la germinación de las semillas de este material almacenadas con un contenido de humedad del 7.5% a -20 °C durante 12 meses, mostraron una disminución en la

germinación a partir de los 4 meses, pero superior a los 12 meses de conservación (**Figura 9D**) y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 5% a 7±2 °C durante 12 meses de conservación, presentaron un aumento en la germinación a partir de los 4 meses de almacenamiento y se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (**Figura 9E**). No obstante, la germinación se mantuvo constante durante los 8 y 12 meses de conservación. Por otra parte, las semillas de esta misma variedad almacenadas con un contenido de humedad del 5% a -20 °C durante 12 meses de conservación exhibieron un aumento en la germinación a partir de los 4 meses de almacenamiento y se mantuvo hasta los 8 meses de conservación (**Figura 9F**). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. A los 12 meses de almacenamiento su germinación disminuyo significativamente.

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 10% a 7±2 °C durante 12 meses de conservación presentó un aumento en el vigor a los 4 meses de almacenamiento en cual se mantuvo constante hasta 12 meses y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (**Figura 9A**). Las semillas de esta misma variedad almacenadas con un contenido de humedad del 10% a -20 °C durante 12 meses de conservación mostraron un aumento en el vigor a los 4 meses de almacenamiento, pero disminuyó a los 8 y 12 meses de conservación (**Figura 9B**) encantándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

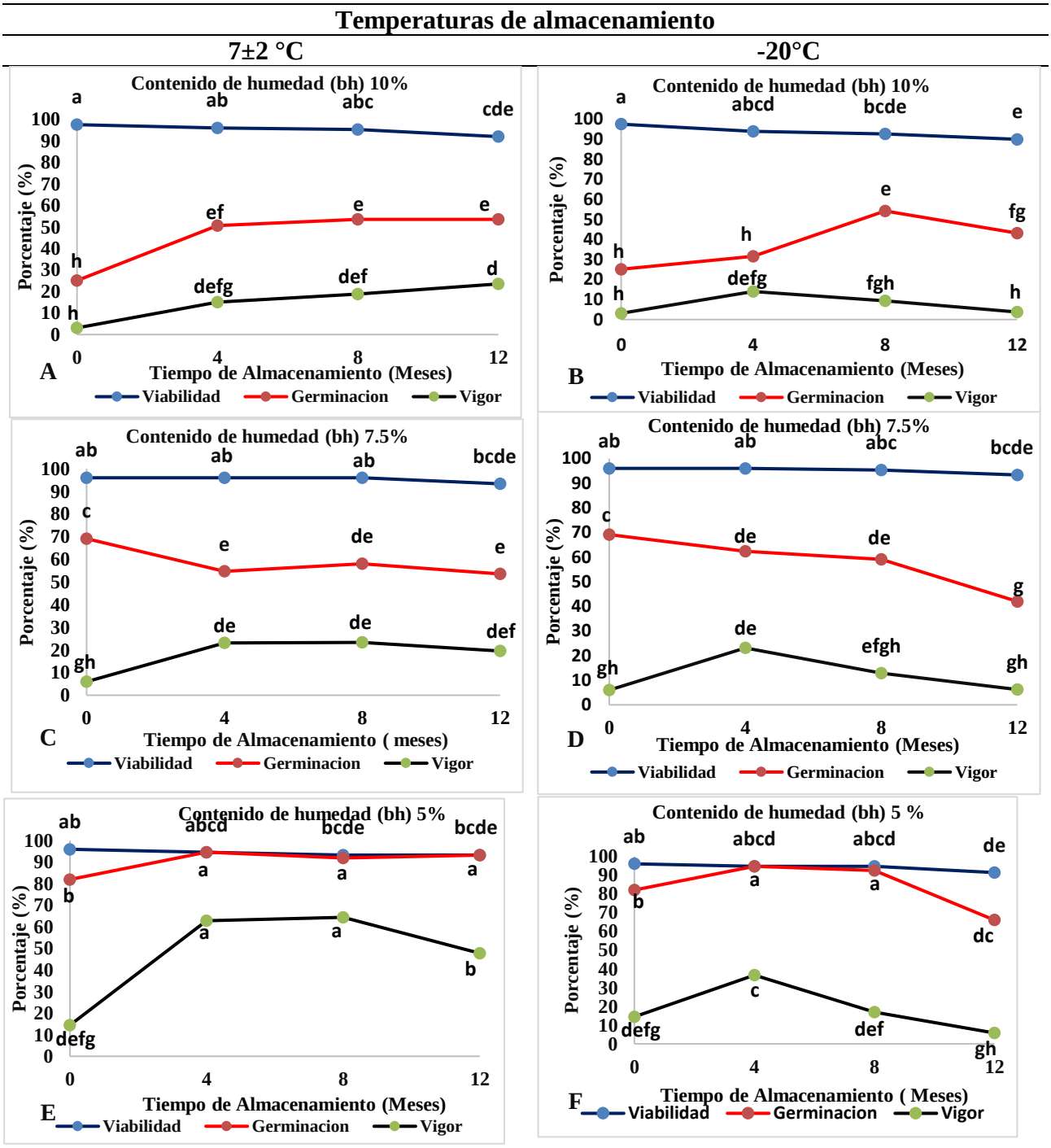
La semilla almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a 7±2 °C durante 12 meses; mostraron un aumento en el vigor a los 4 meses de conservación. Encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (**Figura 9C**). Sin embargo, el vigor se mantuvo constante durante los 8 y 12 meses de almacenamiento. De igual forma, las semillas de este material almacenadas con un contenido de humedad del 7.5% a -20 °C durante 12 meses, presentaron un aumento en el vigor a los 4 meses de conservación (**Figura 9D**) pero se redujo a los 8 y 12 meses del almacenamiento; encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 5% a 7±2 °C durante 12 meses de conservación, presentó un aumento en el vigor a los 4 meses de almacenamiento, se mantuvo hasta los 8 meses y disminuyó a los 12 meses de conservación **(Figura 9E)**. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Así mismo, las semillas de esta misma variedad almacenadas con un contenido de humedad del 5% a -20 °C durante 12 meses de conservación; exhibieron un aumento en el vigor a los 4 meses, produciéndose una disminución a partir de los 8 y 12 meses de almacenamiento **(Figura 9F**),encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos**.**

En resumen, las semillas de la variedad de guayaba Palmira ICA I almacenadas a -20 °C durante 12 meses mostraron un efecto negativo en la conservación de la calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) de las semillas almacenadas con los tres niveles de contenido de humedad (**Figura 9B, D, y F)**. Por otra parte, las semillas de esta misma variedad almacenadas a 7±2 °C durante 12 meses con un contenido de humedad del 10%, 7.5%, fueron afectadas negativamente en su calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor). Las semillas almacenadas con un contenido de humedad del 5% conservaron su calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) (**Figura 9A, C, y E).** Por lo tanto, se propone que las semillas de guayaba de la variedad Palmira ICA I presentan un comportamiento fisiológico intermedio en el almacenamiento.

Finalmente es importante mencionar que la diferencia observada entre el porcentaje de viabilidad y el porcentaje de germinación, corresponde al porcentaje de semillas frescas o semillas viables no germinadas (**Figura 9 y Anexo 9**).

Figura 9 Dinámica de la Viabilidad, Germinación y Vigor de las semillas de la variedad Palmira ICA I durante el almacenamiento en condiciones controladas de conservación



Viabilidad: se encontraron diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (P<0.05).
Germinación: se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos (P<0.05).
Vigor: se encontraron diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (P<0.05).
***Promedios:** con la misma letra no difieren significativamente al nivel de P < 0.05.

Variedad Cimpa Pulpa Roja

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 10%, 5% a 7±2 °C, presentaron una disminución significativa en la viabilidad a los 12 meses de conservación, este mismo comportamiento se observó en semillas almacenadas a -20 °C. (**Figura 10A, B, E y F**). Por otra parte, las semillas almacenadas con un contenido de humedad del 7.5% a 7±2 °C y -20 °C, mantuvieron sin diferencias significativas la viabilidad durante los 12 meses. (**Figura 10C y D**).

La semilla almacenada a 7±2 °C con un contenido de humedad del 10% durante 12 meses, presentó un aumento significativo en la germinación a los 4 meses de almacenamiento (**Figura 10A**). De igual forma, la germinación se mantuvo contante durante los 12 meses de conservación en estas condiciones. Por otra parte, las semillas de esta misma variedad almacenadas con un contenido de humedad del 10% a -20 °C durante 12 meses aumentaron significativamente su germinación a los 4 meses de almacenamiento (**Figura 10B**). La germinación se mantuvo hasta los 8 meses y se presentó una disminución a los 12 meses de conservación. La semilla almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a 7±2 °C durante 12 meses; mantuvo la germinación sin diferencias significativas. (**Figura 10C)**. Por otro lado, la germinación de las semillas de este material, almacenadas con un contenido de humedad del 7.5% a -20 °C durante 12 meses presentaron un aumento significativo en la germinación a los 4 meses. La germinación se mantuvo durante 8 meses de conservación (**Figura 10D**) y se redujo significativamente a los 12 meses.

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 5% a 7±2 °C durante 12 meses de conservación presentaron germinación constante durante los primeros 4 y 8 meses con una disminución significativa a partir de los 12 meses. (**Figura 10E**). Por otro lado, la semilla almacenada con un contenido de humedad del 5% a -20 °C durante 12 meses presentó una disminución significativa en la germinación a partir de los 8 meses de almacenamiento (**Figura 10F**).

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 10% a 7±2 °C, presentó un aumento en el vigor a los 4, 8 y 12 meses de almacenamiento encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (**Figura 10A**). Asimismo, la semilla de esta misma variedad

almacenadas con un contenido de humedad del 10% a -20 °C durante 12 meses de conservación mostraron un aumento en el vigor a los 4 meses (**Figura 10B**). No obstante, el vigor disminuyó a partir de los 8 meses de conservación. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. La semilla almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a 7±2 °C conservó el vigor durante los 12 meses de almacenamiento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (**Figura 10C**). Por otro lado, el vigor de la semilla almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a -20 °C, mostró un aumento en el vigor a los 4 meses, pero con una disminución a partir de los 8 meses. (**Figura 10D**). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. El vigor de la semilla almacenada con un contenido de humedad del 5% a 7±2 °C mostró un aumento a los 4 meses de almacenamiento manteniéndose ligeramente constante hasta los 8 meses y produciéndose una disminución a los 12 meses (**Figura 10E**). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Así mismo, las semillas de esta misma variedad almacenadas con un contenido de humedad del 5% a -20 °C presentaron un aumento en el vigor a los 4 meses con una disminución significativa a partir de los 8 meses **(Figura 10F**).

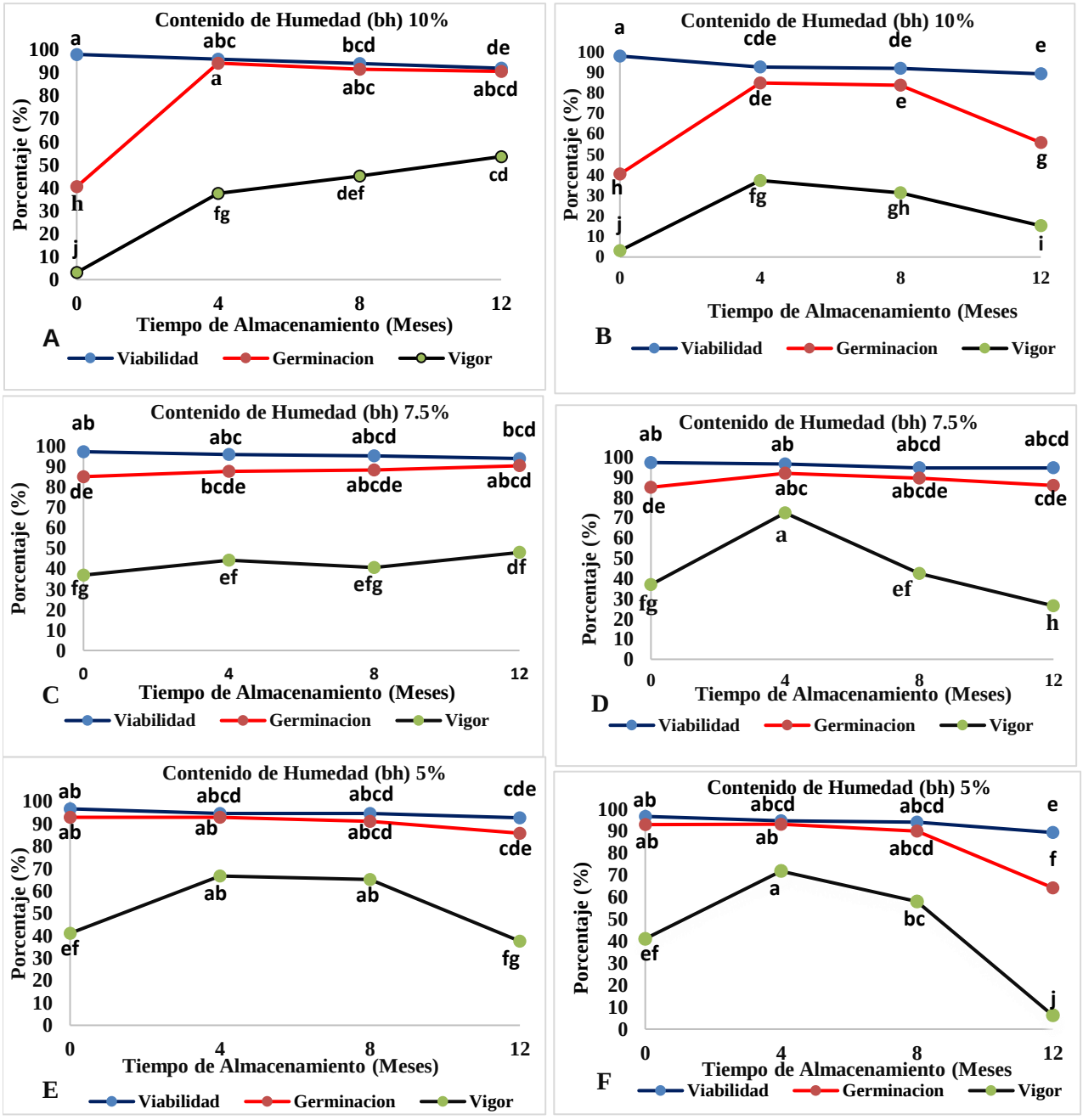
En resumen, las semillas de la variedad de guayaba Cimpa Pulpa Roja almacenadas a -20 °C durante 12 meses mostraron un efecto negativo en la conservación de la calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) de las semillas almacenadas con un contenido de humedad de 10% 7.5% y 5% (**Figura 10B, D, y F)**. Por otra parte, las semillas de esta misma variedad almacenadas a 7±2 °C durante 12 meses con contenidos de humedad del 10%, 7.5% y 5% afectaron únicamente la conservación de la calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) de las semillas con un contenido de humedad del 7.5% y 5%. Las semillas almacenadas con un contenido de humedad del 10% conservaron su calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) (**Figura 10A, C, y E)**. Por lo tanto, se propone que las semillas de guayaba de la variedad Cimpa Pulpa Roja presentan un comportamiento fisiológico intermedio en el almacenamiento.

Finalmente es importante mencionar que la diferencia observada entre el porcentaje de viabilidad y el porcentaje de germinación, corresponde al porcentaje de semillas frescas o semillas viables no germinadas (**Figura 10 y Anexo 10**).

Figura 10 Dinámica de la Viabilidad, germinación y vigor de las semillas de la variedad Cimpa Pulpa Roja durante el almacenamiento en condiciones controladas de conservación

Temperaturas de almacenamiento

7±2 °C | **-20°C**



Viabilidad: se encontraron diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (P<0.05).
Germinación: se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P<0.05).
Vigor: se encontraron diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (P<0.05).
***Promedios:** con la misma letra no difieren significativamente al nivel de P < 0.05.

Variedad Manzana

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 10%, 7.5% y 5%, a 7±2 °C; conservaron la viabilidad sin diferencias significativas durante los 12 meses de almacenamiento (**Figura 11A, C y E**). Por otra parte, la semilla de este material almacenada a -20 °C en los tres contenidos de humedad presentaron una disminución significativa en la viabilidad durante los 12 meses de conservación (**Figura 11B, D y F**).

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 10% a 7±2 °C durante 12 meses de conservación, presentó un aumento en la germinación a los 4, 8 y 12 meses de almacenamiento, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (**Figura 11A**). Por otra parte, la semilla de esta misma variedad almacenada con un contenido de humedad del 10% a -20 °C presentaron una disminución significativa en la germinación a partir de los 8 meses de almacenamiento (**Figura 11B**).

La germinación de la semilla almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a 7±2 °C durante 12 meses presentó un aumento significativo progresivo en la germinación a partir de los 4 y hasta los 8 meses y se mantuvo constante hasta los 12 meses de evaluación. (**Figura 11C)**. Por otro lado, la germinación de la semilla almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a -20 °C durante 12 meses mostró un aumento significativo a los 4 meses manteniéndose constante hasta los 8 meses (**Figura 10D**) con una disminución significativa a los 12 meses.

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 5% a 7±2 °C durante 12 meses de conservación, presentó un aumento significativo en la germinación a los 4 meses (**Figura 11E**). No obstante, la germinación disminuyó significativamente a los 8 y 12 meses. Por otra parte, la semilla almacenada con un contenido de humedad del 5% a -20 °C presentó un aumento en la germinación a los 4 meses y se mantuvo ligeramente constante hasta los 8 meses (**Figura 11F**) y disminuyó significativamente a los 12 meses.

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 10% a 7±2 °C durante 12 meses, presentó un aumento significativo en el vigor a los 4 meses (**Figura 11A**) se redujo a los 8 meses y se mantuvo constante hasta los 12 meses. De igual forma, las semillas de esta misma variedad

almacenadas con un contenido de humedad del 10% a -20 °C conservaron el vigor sin diferencias significativas durante los 12 meses (**Figura 11B).**

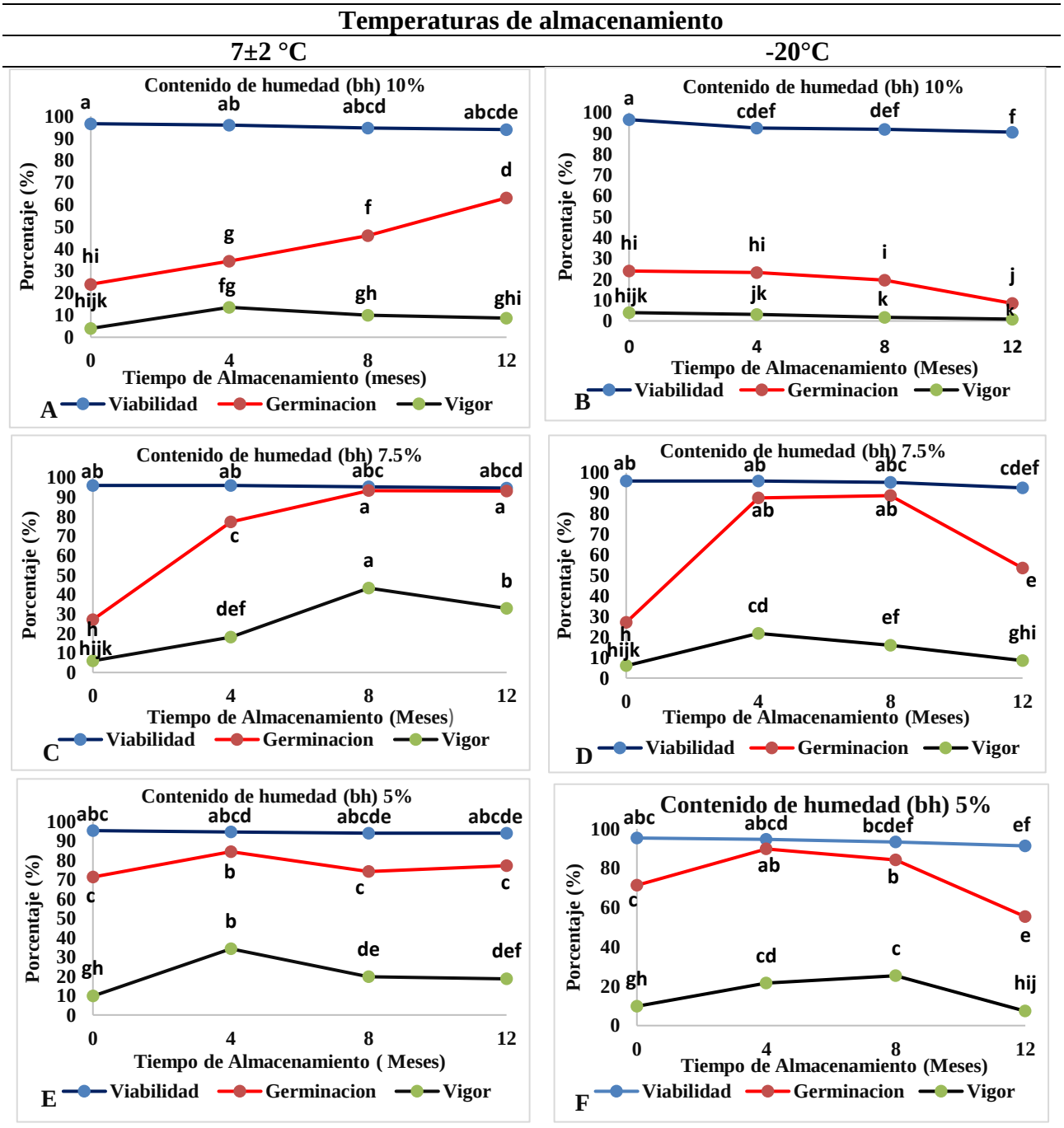
La semilla almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a 7±2 °C durante 12 meses; mostró un aumento significativo en el vigor a los 4 y 8 meses (**Figura 11C**). Sin embargo, el vigor disminuyó a los 12 meses. De igual forma, la semilla de este material almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a -20 °C presentó un aumento en el vigor a los 4 meses de conservación (**Figura 11D**); produciéndose una disminución significativa a los 12 meses.

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 5% a 7±2 °C durante 12 meses. presentó un aumento significativo en el vigor a los 4 meses produciéndose una disminución a los 8 y12 meses de conservación **(Figura 11E)**. Así mismo, la semilla de esta misma variedad almacenadas con un contenido de humedad del 5% a -20 °C durante 12 meses presentó un aumento en el vigor a los 4 meses; se conservó hasta los 8 meses y disminuyó significativamente a los 12 meses **(Figura 11F)**.

En resumen, las semillas de la variedad de guayaba Manzana almacenadas a -20 °C durante 12 meses mostraron un efecto negativo en la conservación de la calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) de las semillas almacenadas con un contenido de humedad de 10% 7.5% y 5% (**Figura 11B, D, y F)**. Por otra parte, las semillas de esta misma variedad almacenadas a 7±2 °C durante 12 meses con un contenido de humedad del 10% y 5% fueron afectadas en su calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) mientras que las semillas almacenadas con un contenido de humedad del 7.5% conservaron su calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) (**Figura 11A, C, y E).** Por lo tanto, se propone que las semillas de guayaba de la variedad Manzana presentan un comportamiento fisiológico intermedio en el almacenamiento.

Finalmente es importante mencionar que la diferencia observada entre el porcentaje de viabilidad y el porcentaje de germinación, corresponde al porcentaje de semillas frescas o semillas viables no germinadas (**Figura 11 y Anexo 11**).

Figura 11 Dinámica de la Viabilidad, Germinación y Vigor de las semillas de la variedad Manzana durante el almacenamiento en condiciones controladas de conservación



Viabilidad: se encontraron diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (P<0.05).
Germinación: se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos (P<0.05).
Vigor: se encontraron diferencia altamente significativa entre los tratamientos (P<0.05).
***Promedios:** con la misma letra no difieren significativamente al nivel de P < 0.05.

Variedad CI-0440A

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 10% a 7±2 °C conservaron la viabilidad durante los 12 meses de almacenamiento. Sin embargo, las semillas con este mismo contenido de humedad almacenadas a -20 °C presentaron una disminución significativa en la viabilidad a los 12 meses de conservación (**Figura 12A y B)**. Por otra parte, la semilla almacenada, con contenidos de humedad del 7.5% y 5% a 7±2 °C y -20 °C no presentaron disminución significativa en la viabilidad (**Figura 12 C, D, E y F**).

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 10% a 7±2 °C durante 12 meses presentó un aumento significativo en la germinación a los 4 meses. Se mantuvo constante durante los 8 y 12 meses (**Figura 12A**). Por otra parte, la semilla almacenada con un contenido de humedad del 10% a -20 °C exhibieron un aumento significativo en la germinación a los 4 meses (**Figura 12B**). La germinación se mantuvo hasta los 8 meses y disminuyó a los 12 meses de conservación.

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a 7±2 °C durante 12 meses; presentó un aumento significativo en la germinación a los 4 meses (**Figura 12C)**. La germinación disminuyó a los 8 meses y se mantuvo constante hasta los 12 meses. Por otro lado, la semilla almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a -20 °C presentó un aumento significativo en la germinación a los 4 meses (**Figura 12D**). Asimismo, se produjo una disminución en la germinación durante los 8 y12 meses.

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 5% a 7±2 °C durante 12 meses presentó un aumento significativo en la germinación a los 4, meses conservándose hasta los 12 meses (**Figura 12E**). Por otro lado, la semilla almacenada con un contenido de humedad del 5% a -20 °C presentó un aumento significativo en la germinación a los 4 meses de almacenamiento y se mantuvo constante hasta 12 meses (**Figura 12F**).

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 10% a 7±2 °C durante 12 meses, presentó un aumento de manera significativa en el vigor a los 4, 8 y 12 meses (**Figura 12A**). Así mismo la semilla almacenada con un contenido de humedad del 10% a -20 °C mostró un aumento

significativo en el vigor a los 4 meses (**Figura 12B**). El vigor disminuyó significativamente durante los 8 y 12 meses.

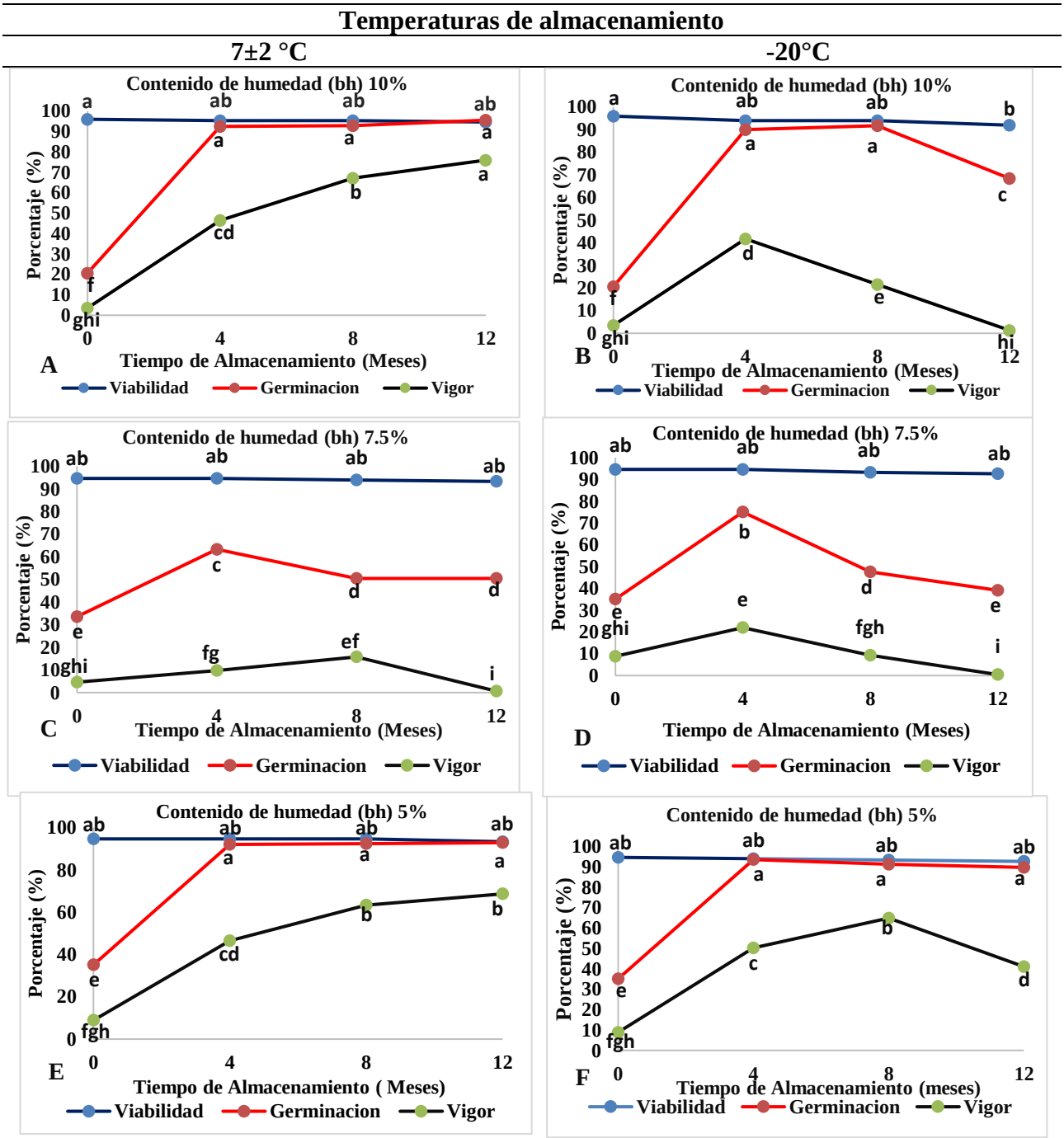
La semilla almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a 7±2 °C durante 12 meses, conservó el vigor a los 4 meses. Se produjo una disminución significativa a los 12 meses de conservación (**Figura 12C**). Por otro lado, la semilla almacenada con un contenido de humedad del 7.5% a -20 °C mostró un aumento en el vigor a los 4 meses. Disminuyó significativamente a los 8 y 12 meses de conservación; (**Figura 12D**).

La semilla almacenada con un contenido de humedad del 5% a 7±2 °C durante 12 meses, mostró un aumento significativo en el vigor a los 4 y 8 meses. Se mantuvo ligeramente constante hasta los 12 meses (**Figura 12E**). Así mismo, la semilla almacenada con un contenido de humedad del 5% a -20 °C mostraron un aumento significativo en el vigor a los 4 y 8 meses produciéndose una disminución a los 12 meses **(Figura 12F**).

En resumen, la temperatura de almacenamiento (-20 °C), afectó de manera negativa la conservación de la calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) de las semillas de la variedad Cl-0440A, almacenadas con un contenido de humedad de 10% 7.5% y 5% durante 12 meses (**Figura12B, D, y F)**. Por otra parte, las semillas de esta misma variedad almacenadas a 7±2 °C durante 12 meses con un contenido de humedad del 7.5% y 5%; fueron afectadas en su calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) mientras que las semillas almacenadas con un contenido de humedad del 10% conservaron su calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) (**Figura 12A, C, y E).** Por lo tanto, se propone que las semillas de guayaba de la variedad Cl-0440A, presentan un comportamiento fisiológico intermedio en el almacenamiento.

Finalmente es importante mencionar que la diferencia observada entre el porcentaje de viabilidad y el porcentaje de germinación, corresponde al porcentaje de semillas frescas o semillas viables no germinadas (**Figura 12 y Anexo 12**).

Figura 12 Dinámica de la Viabilidad, Germinación y Vigor de las semillas de la variedad Cl-0440A durante el almacenamiento en condiciones controladas de conservación



Viabilidad: se encontraron diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (P<0.05).
Germinación: se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos (P<0.05).
Vigor: se encontraron diferencia altamente significativa entre los tratamientos (P<0.05).
***Promedios:** con la misma letra no difieren significativamente al nivel de P < 0.05.

La semilla de las cuatro variedades de *Psidium guajava*, presentaron niveles variables de latencia con respecto a su contenido de humedad en las dos condiciones de almacenamiento. Por otra parte, la temperatura de almacenamiento favoreció la liberación de la latencia en las semillas de las cuatro variedades de *Psidium guayaba*. De igual forma, algunas de las condiciones de almacenamiento evaluadas indujeron nuevamente la latencia después de un determinado periodo de tiempo de conservación. Estos resultados coinciden con lo reportado por Crawford, Steadman, Plummer, Cochrane, & Probert, (2007), Perez Garcia, Gomez Campo, & Ellis, (2009) González-Benito, Pérez-García, Tejeda, & Gómez-Campo, (2011) donde afirman que la latencia de las semillas puede ser liberada o inducida durante el almacenamiento. Por otro lado Hay & Timple, (2016), afirma que, cualquier tipo de latencia que esté presente en las semillas al momento de la cosecha puede perderse durante el secado. Por otra parte, los resultados obtenidos con las semillas de las cuatro variedades de guayaba no coinciden con los encontrados por Zulhisyam A, Zakaria, Shazani, & Jamaludin, (2013) en estudios similares con semillas de *Carica papaya.*

La latencia en la semilla de *Psidium guajava* pudo ser liberada durante el secado de las semillas y después de un periodo determinado de tiempo de almacenamiento. Por otro lado, las temperaturas de almacenamiento que favorecieron la liberación de la latencia durante el periodo de conservación, fueron relacionadas con el contenido de humedad con el que la semilla es almacenada y el genotipo (interacción genotipo*temperatura*CH). En este sentido, Baradwaj et al., (2016) afirman que el almacenamiento en seco favorece la liberación de la latencia fisiológica no profunda presente en semillas de algunas especies. De igual forma , Zhou, Lu, Tan, Baskin, & Baskin, (2015) mencionan, que el almacenamiento en seco por 6 meses seguido de una estratificación fría favorece la liberación de latencia fisiológica intermedia en semillas.

Las semillas de las cuatro variedades de guayaba toleran la deshidratación hasta bajos contenidos de humedad lo cual esta probablemente relacionado con la presencia de algunos compuestos que evitan interacciones moleculares adversas durante la desecación; prolina, glutamato, glicina, manitol, sorbitol, fructanos, trehalosa y sacarosa (Hoekstra, Golovina, & Buitink, 2001); sin embargo, el almacenamiento a bajas temperaturas (-20°C) durante los 12 meses de conservación afecto de manera negativa la conservación de la calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y

Vigor) de las semillas de las cuatro variedades de *Psidium guajava.* Por otra parte, las condiciones de almacenamiento a 7±2 °C conservaron la calidad fisiológica de las semillas de las cuatro variedades de guayaba lo que indica que las semillas de los cuatro materiales presentan un comportamiento intermedio en el almacenamiento.(Hong & Ellis, (1996) mencionan que los contenidos de humedad critico de las semillas intermedias por debajo de los cuales ocurre la pérdida de la viabilidad durante el almacenamiento hermético varía considerablemente con la especie, grado de madurez y/o manejo después de la recolección. En general las semillas extraídas de los frutos al momento de la madurez toleraron la deshidratación hasta 7 -10%; una característica más de las semillas intermedias de origen tropical. Igualmente, el hecho de que la longevidad de las semillas secas (contenido de humedad de 7 a 10%) se redujo con el descenso de la temperatura de almacenamiento por debajo de 10°C.

En resumen las semillas de las cuatro variedades de guayaba presentan un comportamiento intermedio en el almacenamiento, sin embargo el contenido de humedad con el cual las semillas conservan su calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) varia de acuerdo con la variedad. Este comportamiento está relacionado probablemente con el origen de cada una de las variedades estudiadas. Por otro lado algunos estudios mencionan que las condiciones edafo-climaticas afecta de manera negativa algunos procesos fisiológicos de algunos genotipos de este cultivo, lo cual se puede relacionar con la deficiente acumulación de algunos metabolitos secundarios los cuales juegan un papel muy importante en la conservación de la calidad fisiológica de la semilla.

4 Conclusiones

Los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos de frutos y semillas de *Psidium guajava* varían de acuerdo con la variedad, lo que indica que existen diferencias genéticas entre los materiales estudiados.

La mejor combinación para determinar la viabilidad de las semillas de *Psidium guajava* en condiciones de laboratorio es una solución de 0.1% Tz durante 12 horas de exposición. En condiciones controladas de temperatura (40°C) la combinación es una solución de 1% Tz durante 3 horas de exposición.

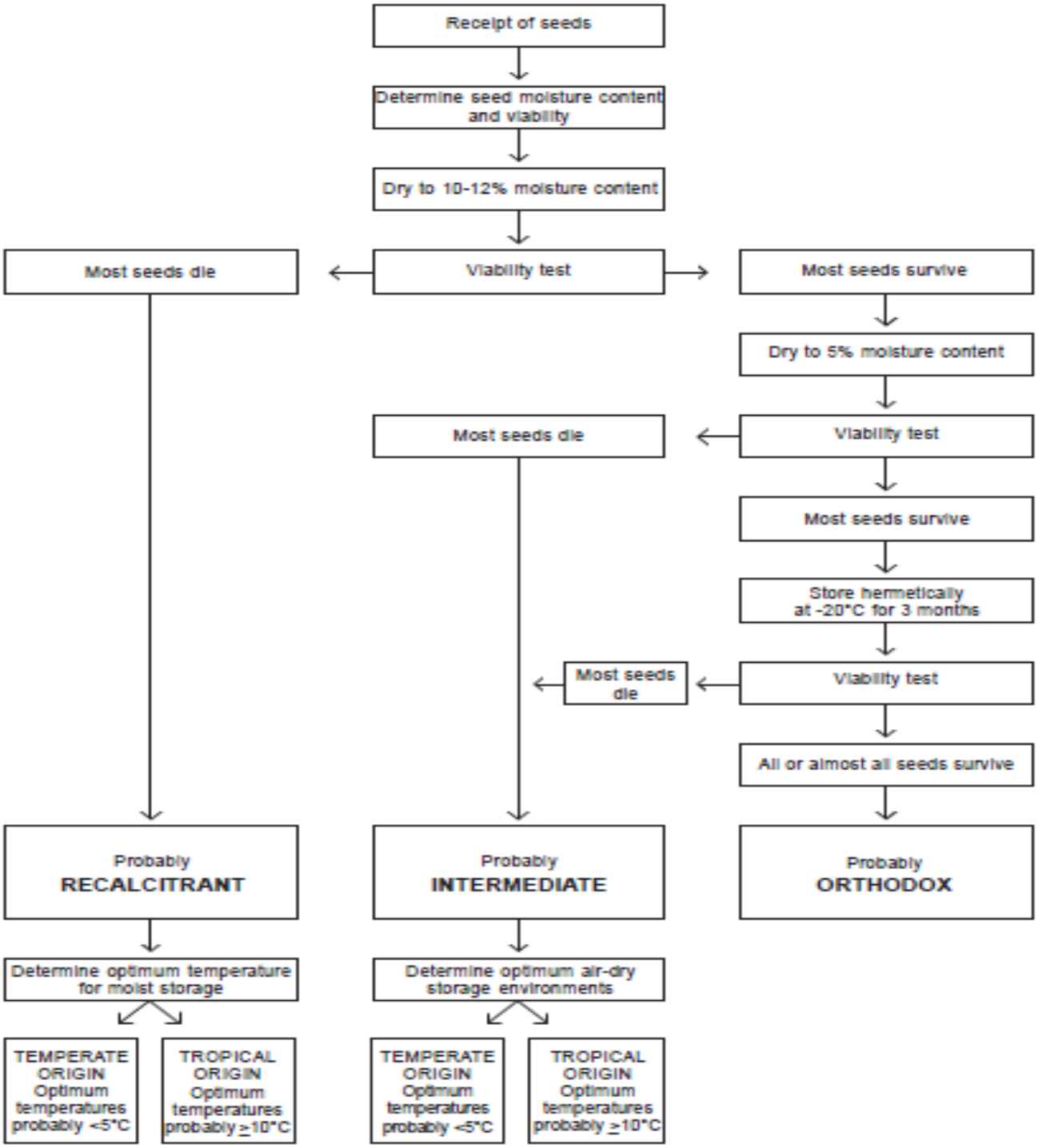
La liberación de la latencia durante el secado y el almacenamiento varía de acuerdo con la variedad lo que indica que existen diferencias genéticas entre los materiales estudiados, por otra parte este comportamiento está relacionado probablemente con el centro de origen de cada uno de los materiales.

La semilla de las cuatro variedades de *Psidium guajava,* toleraron la deshidratación hasta 5% de contenido de humedad y almacenamiento a -20°C durante tres meses. Sin embargo, no fue suficiente para determinar el comportamiento fisiológico de la semilla. El estudio de conservación por un año, con cuatro variedades con diferentes contenidos de humedad y bajas temperaturas fue determinante para proponer la clasificación Intermedia para las semillas de *Psidium guajava*.

El contenido de humedad con el cual las semillas de *Psidium guajava* conservan su calidad fisiológica (Viabilidad, Germinación y Vigor) en condiciones controladas de temperatura (7±2 °C), varía de acuerdo con la variedad, lo que indica que existen diferencias genéticas entre los materiales estudiados.

Anexos

Anexo 1 Protocolo para determinar comportamiento de semillas (Hong y Ellis.1996).



Anexo 2. ANOVA; Determinación del protocolo de Tetrazolio

Fuente de Variación	Temperatura ambiente	Temperatura controlada (40°C(
Repeticiones	sd	Sd
Concentración	Sd	**
Tiempo	sd	**
Concentración*tiempo	sd	**

Anexo 3. ANAVA; Confirmación del potencial fisiológico de las semillas de la variedad Palmira ICA I

Fuente de Variación	Viabilidad	Germinación	Vigor
Repeticiones	sd	sd	sd
Contenido de Humedad	sd	***	***
Repetición*Contenido de humedad	sd	sd	sd
Temperatura	sd	***	***
Contenido de humedad*Temperatura	sd	sd	***
Repetición*Contenido de Humedad*Temperatura	sd	sd	sd
Tiempo	***	***	***
Contenido de Humedad* Tiempo	sd	***	**
Tiempo*Temperatura	sd	***	**
Contenido de Humedad*Tiempo*Temperatura	**	***	**

Anexo 4. ANAVA; Confirmación del potencial fisiológico de las semillas de la variedad Cimpa Pulpa Roja

Fuente de Variación	Viabilidad	Germinación	Vigor
Repeticiones	sd	sd	sd
Contenido de Humedad	**	***	***
Repetición*Contenido de humedad	sd	sd	sd
Temperatura	**	***	***
Contenido de humedad*Temperatura	sd	***	***
Repetición*Contenido de Humedad*Temperatura	sd	sd	sd
Tiempo	**	***	***
Contenido de Humedad* Tiempo	sd	***	***
Tiempo*Temperatura	sd	***	***
Contenido de Humedad*Tiempo*Temperatura	**	**	**

Anexo 5. ANAVA; Confirmación del potencial fisiológico de las semillas de la variedad Manzana

Fuente de Variación	Viabilidad	Germinación	Vigor
Repeticiones	sd	sd	sd
Contenido de Humedad	sd	***	***
Repetición*Contenido de humedad	sd	sd	sd
Temperatura	**	***	***
Contenido de humedad*Temperatura	sd	***	***
Repetición*Contenido de Humedad*Temperatura	sd	sd	sd
Tiempo	**	***	***
Contenido de Humedad* Tiempo	sd	***	***
Tiempo*Temperatura	sd	***	**
Contenido de Humedad*Tiempo*Temperatura	**	**	***

Anexo 6. ANAVA; Confirmación del potencial fisiológico de las semillas de la variedad Cl-0440A

Fuente de Variación	Viabilidad	Germinación	Vigor
Repeticiones	sd	**	sd
Contenido de Humedad	sd	***	***
Repetición*Contenido de humedad	sd	***	sd
Temperatura	**	***	***
Contenido de humedad*Temperatura	sd	***	***
Repetición*Contenido de Humedad*Temperatura	sd	**	sd
Tiempo	**	***	***
Contenido de Humedad* Tiempo	sd	***	***
Tiempo*Temperatura	sd	***	***
Contenido de Humedad*Tiempo*Temperatura	**	**	***

Anexo 7. Porcentaje de plantas normales, plantas anormales, semillas frescas y semillas no viables de *Psidium guajava* en la etapa 1 (tolerancia a la desecación)

Variedades	Variables	CH (%)			3 meses
		Inicial	10	5	-20°C
Palmira ICA I	Plantas normales (%)	21.77	24.22	87.77	91.55
	Plantas anormales (%)	0	0	0.22	0.66
	Semillas frescas (%)	76.23	73.78	7.56	3.78
	Semillas no viables (%)	2	2	4.45	4.01
Cimpa Pulpa Roja	Plantas normales (%)	18.21	43.1	93.77	93.77
	Plantas anormales (%)	0	0	0.44	0.88
	Semillas frescas (%)	79.79	54.9	1.56	0.88
	Semillas no viables (%)	2	2	4.23	4.47
Manzana	Plantas normales (%)	7.99	23.77	79.1	74.88
	Plantas anormales (%)	0	0	0.22	0.88
	Semillas frescas (%)	89.34	72.89	16.23	19.78
	Semillas no viables (%)	2.67	3.34	4.45	4.46
Cl-0440A	Plantas normales (%)	18	24.22	33.99	45.77
	Plantas anormales (%)	0.22	0	0	0.22
	Semillas frescas (%)	77.33	71.11	60.01	48.23
	Semillas no viables (%)	4.45	4.67	6	5.78

Anexo 8. Porcentaje de plantas normales, plantas anormales, semillas frescas y semillas no viables en la caracterización inicial de las semillas de *Psidium guajava.*

Variedad	Nivel de desecación (%)	Plantas normales (%)	Plantas anormales (%)	Semillas frescas (%)	Semillas no viables (%)
Palmira ICA I	10	25.11	0	72.44	2.45
	7.5	69.11	0.44	26.89	3.56
	5	81.99	0.22	14.01	3.78
Cimpa Pulpa Roja	10	40.49	0	57.51	2
	7.5	85.1	0.22	12.23	2.45
	5	92.88	0.44	3.78	2.9
Manzana	10	23.99	0	72.67	3.34
	7.5	27.11	0	68.89	4
	5	71.33	0.22	24	4.45
Cl-0440A	10	20.66	0	75.34	4
	7.5	33.55	0	61.11	5.34
	5	35.11	0.22	59.55	5.12

Anexo 9. Porcentaje de plantas normales, plantas anormales, semillas frescas y semillas no viables de la variedad Palmira ICA I en la etapa 2 (tolerancia al almacenamiento)

Contenido de humedad (%)	Variables	Tiempo de Almacenamiento					
		4 meses		8 meses		12 meses	
		7±2 °C	-20°C	7±2 °C	-20°C	7±2 °C	-20°C
10	Plantas normales (%)	50.66	31.55	53.55	54.21	53.55	43.1
	Plantas anormales (%)	0.44	0.22	0	0.44	0.22	0.22
	Semillas frescas (%)	45.34	62.45	41.78	38.45	38.45	46.9
	Semillas no viables (%)	3.56	5.78	4.67	6.9	7.78	9.78
7.5	Plantas normales (%)	54.66	62.33	57.99	59.1	53.55	41.99
	Plantas anormales (%)	0.22	0	0.22	0.66	0.22	0
	Semillas frescas (%)	41.34	33.67	38.01	36.23	39.78	51.34
	Semillas no viables (%)	3.78	4	3.78	4.01	6.45	6.67
5	Plantas normales (%)	94.66	94.66	91.99	92.44	93.33	66
	Plantas anormales (%)	0	0	0	0	0.66	0.22
	Semillas frescas (%)	0	0	1.34	2.22	0	25.33
	Semillas no viables (%)	5.34	5.34	6.67	5.34	6.01	8.45

Anexo 10. Porcentaje de plantas normales, plantas anormales, semillas frescas y semillas no viables de la variedad Cimpa Pulpa Roja en la etapa 2 (tolerancia al almacenamiento)

Contenido de humedad (%)	Variables	Tiempo de Almacenamiento					
		4 meses		8 meses		12 meses	
		7±2 °C	-20°C	7±2 °C	-20°C	7±2 °C	-20°C
10	Plantas normales (%)	94.22	84.88	91.55	83.77	90.66	55.77
	Plantas anormales (%)	0	0.44	0.22	0.22	0	0.44
	Semillas frescas (%)	1.78	7.78	2.45	8.23	1.34	33.56
	Semillas no viables (%)	4	6.9	5.78	7.78	8	10.23
7.5	Plantas normales (%)	87.77	92	88.44	89.55	90.44	85.99
	Plantas anormales (%)	0.22	0	0	0.44	0	0
	Semillas frescas (%)	8.23	4.66	6.89	4.45	3.56	8.67
	Semillas no viables (%)	3.78	3.34	4.67	5.56	6	5.34
5	Plantas normales (%)	92.88	93.11	91.1	89.99	85.77	64.22
	Plantas anormales (%)	0.88	0.22	0.44	0.22	0.22	0.22
	Semillas frescas (%)	1.78	1.55	3.56	4.01	6.89	25.11
	Semillas no viables (%)	4.46	5.12	4.9	5.78	7.12	10.45

Anexo 11. Porcentaje de plantas normales, plantas anormales, semillas frescas y semillas no viables de la variedad Manzana en la etapa 2 (tolerancia al almacenamiento)

Contenido de humedad (%)	Variables	Tiempo de Almacenamiento					
		4 meses		8 meses		12 meses	
		7±2 °C	-20°C	7±2 °C	-20°C	7±2 °C	-20°C
10	Plantas normales (%)	34.44	23.33	45.99	19.55	63.1	8.44
	Plantas anormales (%)	0.22	0.44	0	0.22	0	0.44
	Semillas frescas (%)	61.55	69.33	48.67	72.45	30.9	82.22
	Semillas no viables (%)	3.78	6.9	5.34	7.78	6	8.9
7.5	Plantas normales (%)	77.33	87.77	93.33	88.88	93.11	53.55
	Plantas anormales (%)	0	0.22	0.44	0.22	0	0.44
	Semillas frescas (%)	18.67	8.23	2	6.45	1.55	39.11
	Semillas no viables (%)	4	3.78	4.23	4.45	5.34	6.9
5	Plantas normales (%)	84.44	89.77	74.22	84.22	71.11	55.33
	Plantas anormales (%)	0	0	0	0.22	0.22	0
	Semillas frescas (%)	10.22	4.89	19.78	9.11	22.89	36
	Semillas no viables (%)	5.34	5.34	6	6.45	5.78	8.67

Anexo 12. Porcentaje de plantas normales, plantas anormales, semillas frescas y semillas no viables de la variedad Cl-0440A en la etapa 2 (tolerancia al almacenamiento)

Contenido de humedad (%)	Variables	Tiempo de Almacenamiento					
		4 meses		8 meses		12 meses	
		7±2 °C	-20°C	7±2 °C	-20°C	7±2 °C	-20°C
10	Plantas normales (%)	94.22	90.44	92.88	91.77	93.55	68.44
	Plantas anormales (%)	0	0	0.22	0	0.44	0.22
	Semillas frescas (%)	2.89	3.56	2.45	2.23	1.11	23.56
	Semillas no viables (%)	4.67	6	4.45	6	4.9	7.78
7.5	Plantas normales (%)	63.33	75.1	50.44	47.55	50.44	39.11
	Plantas anormales (%)	0.22	0	0.22	0	0	0
	Semillas frescas (%)	31.33	19.56	43.56	45.78	42.89	53.55
	Semillas no viables (%)	5.12	5.34	5.78	6.67	6.67	7.34
5	Plantas normales (%)	91.99	93.55	92.44	91.24	92.88	89.77
	Plantas anormales (%)	0.44	0	0	0.44	0	0
	Semillas frescas (%)	2.67	0.44	2.22	2.09	0.44	2.89
	Semillas no viables (%)	4.9	6	5.34	6.23	6.67	7.34

Bibliografías

Alpert, P. (2006). Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *Journal of Experimental Biology*, *209*(9), 1575–1584. https://doi.org/10.1242/jeb.02179

Amara, I., Capellades, M., Ludevid, M. D., Pagès, M., & Goday, A. (2013). Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing LEA Rab28 gene. *Journal of Plant Physiology*, *170*(9), 864–873. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.01.004

Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A. R., & Fait, A. (2010). Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science*, *15*(4), 211–218. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.003

Anguelova-Merhar, V. S., Calistru, C., & Berjak, P. (2003). A study of some biochemical and histopathological responses of wet-stored recalcitrant seeds of Avicennia marina infected by Fusarium moniliforme. *Annals of Botany*, *92*(3), 401–408. https://doi.org/10.1093/aob/mcg154

AOSA. (2009). *Seed vigor testing handbook*. (B. Riad, E. Sabry, M.-F. Julio, & M. Miller B, Eds.). USA.

AOSA. (2010). *AOSA/SCST Tetrazolium Testing Handbook*. (A. Logan Miller & J. Peters, Eds.).

Bai, X., Yang, L., Tian, M., Chen, J., Shi, J., Yang, Y., & Hu, X. (2011). Nitric oxide enhances desiccation tolerance of recalcitrant Antiaris toxicaria seeds via protein S-nitrosylation and carbonylation. *PloS One*, *6*(6), 1–11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020714

Bailly, C., Bailly, C., Allan, A. C., Amor, Y., Chevion, M., Levine, A., … Zhang, X. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, *14*(2), 93–107. https://doi.org/10.1079/SSR2004159

Ballesteros, D., Sershen, Varghese, B., Berjak, P., & Pammenter, N. W. (2014). Uneven drying of zygotic embryos and embryonic axes of recalcitrant seeds: Challenges and considerations for cryopreservation. *Cryobiology*, *69*(1), 100–109. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.05.010

Baradwaj, R. G., Rao, M. V, Baskin, C. C., & Kumar, T. S. (2016a). Non-deep simple morphophysiological dormancy in seeds of the rare Alpinia galanga : a first report for Zingiberaceae. *Seed Science Research*, (March), 1–6. https://doi.org/10.1017/S0960258516000039

Baradwaj, R. G., Rao, M. V, Baskin, C. C., & Kumar, T. S. (2016b). Non-deep simple morphophysiological dormancy in seeds of the rare Alpinia galanga : a first report for Zingiberaceae. *Seed Science Research*, (June), 1–6. https://doi.org/10.1017/S0960258516000039

Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, *14*(1), 1–16+. https://doi.org/10.1079/SSR2003150

Bass, L. N., & Stanwood, P. C. (1978). Long-Term Preservation of Sorghum Seed as Affected by Seed Moisture, Temperature, and Atmospheric Environment. *Crop Science*, *18*(4), 575. https://doi.org/10.2135/cropsci1978.0011183X001800040012x

Berjak, P., Farrant, J. M., & Pammente, N. W. (1989). *The Basis of Recalcitrant Seed Behaviour*. (R. B. Taylorson, Ed.). https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0617-7_8

Berjak, P., & Pammenter, N. W. (2001). Seed recalcitrance, current perspective. *South African Journal of Botany*, *67*(2), 79–89. https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)31111-X

Berjak, P., & Pammenter, N. W. (2008). From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. *Annals of Botany*, *101*(2), 213–28. https://doi.org/10.1093/aob/mcm168

Berjak, P., & Pammenter, N. W. (2013). Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 478. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00478

Berjak, P., Varghese, B., & Pammenter, N. W. (2011). Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. *Seed Science Research*, *21*(3), 187–203. https://doi.org/10.1017/S0960258511000110

Black, M., Corbineau, F., Gee, H., & Come, D. (1999). Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology*, *120*(2), 463–72. https://doi.org/10.1104/PP.120.2.463

Borza, J. K., Westerman, P. R., & Liebman, M. (2007). Comparing Estimates of Seed Viability in Three Foxtail (Setaria) Species Using the Imbibed Seed Crush Test with and Without Additional Tetrazolium Testing. *Weed Technology*, *21*(2), 518–522. https://doi.org/10.1614/WT-06-110

Buitink, J., & Leprince, O. (2008). Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus Biologies*, *331*(10), 788–795. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.08.002

Caraballo, B. M. (2001). Biología floral del guayabo (Psidium guajava L .) en la en la planicie de Maracaibo, Zulia, Venezuela. *Revista de La Facultad de Agronomía*, *18*, 41–55.

Cartillo, J., Sinuco, D. C., Solarte, M. E., & Melgarejo, Lu. M. (2011). ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE TRES VARIEDADES DE GUAYABA BLANCA (Psidium guajava L.) DURANTE SU MADURACIÓN. *COLOMBIANA DE QUÍMICA*, *40*, 79–90. Retrieved from http://www.bdigital.unal.edu.co/25692/1/23150-80374-1-PB.pdf

Carvalho, T. C. de, Grzybowski, C. R. de S., Ohlson, O. de C., & Panobianco, M. (2014). Adaptation of the tetrazolium test method for estimating the viability of sorghum seeds. *Journal of Seed Science*, *36*, 246–252. https://doi.org/10.1590/2317-1545v32n2713

Carvalho, T. C. De, Krzyzanowski, F. C., Ohlson, O. D. C., & Panobianco, M. (2013). Tetrazolium test adjustment for wheat seeds. *Journal of Seed Science*, *35*(3), 361–367. https://doi.org/10.1590/S2317-15372013000300013

Castaño Cano, J. L., & Montes Ballesteros, J. C. (2014). *ESTUDIO INTEGRAL DE Psidium guajava EN UN SISTEMA SILVOPASTORIL EN EL MUNICIPIO DE TURBO ANTIOQUÍA*. UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA – UNAD.

Cheng, H.-Y., & Song, S.-Q. (2008). Possible Involvement of Reactive Oxygen Species Scavenging Enzymes in Desiccation Sensitivity of Antiaris toxicaria Seeds and Axes. *Journal of Integrative Plant Biology*, *50*(12), 1549–1556. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00723.x

Chin, H. F., & Krishnapillay, B. (1989). Seed Moisture: Recalcitrant vs. Orthodox Seeds'. *Crop Science Society of America*, (14), 15–22. Retrieved from file:///C:/Users/Jorge/Desktop/TODO 2016/psidium guajava/Patricia Berjak/New folder/4.pdf

Christina., W., Wheeler, L. M., & Grotenhuis, J. M. (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research*, *15*(1), 1–20. https://doi.org/10.1079/SSR2004195

Crane, J., Kovach, D., Gardner, C., & Walters, C. (2006). Triacylglycerol phase and "intermediate" seed storage physiology: a study of Cuphea carthagenensis. *Planta*, *223*(5), 1081–1089. https://doi.org/10.1007/s00425-005-0157-0

Crane, J., Miller, A. L., Van Roekel, J. W., & Walters, C. (2003). Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of Cuphea seed. *Planta*, *217*(5), 699–708. https://doi.org/10.1007/s00425-003-1036-1

Crawford, A. D., Steadman, K. J., Plummer, J. A., Cochrane, A., & Probert, R. J. (2007). Analysis of seed-bank data confirms suitability of international seed-storage standards for the Australian flora. *Australian Journal of Botany*, *55*(1), 18. https://doi.org/10.1071/BT06038

Crowe, J. H., Carpenter, J. F., & Crowe, L. M. (1998). THE ROLE OF VITRIFICATION IN ANHYDROBIOSIS. *Annual Review of Physiology*, *60*(1), 73–103. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.73

Cruz, E. D., & Cicero, S. M. (2008). Sensitivity of seed to desiccation in cupuassu (Theobroma grandiflorum (Willd. ex Spreng.) K. Schum. - Sterculiaceae. *Scientia Agricola*, *65*(5), 557–560. https://doi.org/Doi 10.1590/S0103-90162008000500017

Dahiya, K., Archak, S., & Karihaloo, J. (2002). DNA Fingerprinting of Guava (Psidium guajava L.) Cultivars using RAPD Markers. *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, *15*(2), 112–115. Retrieved from http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijpgr&volume=15&issue=2&article=005

Daws, M. I., Garwood, N. C., & Pritchard, H. W. (2006). Prediction of desiccation sensitivity in seeds of woody species: a probabilistic model based on two seed traits and 104 species. *Annals of Botany*, *97*(4), 667–74. https://doi.org/10.1093/aob/mcl022

Delahaie, J., Hundertmark, M., Bove, J., Leprince, O., Rogniaux, H., & Buitink, J. (2013). LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. *Journal of Experimental Botany*, *64*(14), 4559–73. https://doi.org/10.1093/jxb/ert274

Delouche, J. C. (2002). Germinación, Deterioro y Vigor de Semillas. *SEED News*, *6*, 7. Retrieved from http://www.seednews.inf.br/espanhol/seed66/print_artigo66_esp.html

Delouche, J. C., Caldwell, P., Delouche, J. C., & Caldwell, W. P. (1960). Seed Vi Gor and Vigor Tests. *Journal Paper No. 883 of the Mississippi Agricultural Experiment Station*, *50*, 124–129.

Ellis, R. H., & Hong, T. D. (2006). Temperature sensitivity of the low-moisture-content limit to negative seed longevity-moisture content relationships in hermetic storage. *Annals of Botany*, *97*(5), 785–791. https://doi.org/10.1093/aob/mcl035

Ellis, R. H., Hong, T. D., & Roberts, E. H. (1990). An Intermediate Category of Seed Storage Behaviour? *Journal of Experimental Botany*, *41*(9), 1167–1174. https://doi.org/10.1093/jxb/41.9.1167

Ellis, R. H., Hong, T. D., Roberts, E. H., ELLIS, R. H., HONG, T. D., ROBERTS, E. H., … TOMPSETT, P. B. (1991). Effect of storage temperature and moisture on the germination of papaya seeds. *Seed Science Research*, *1*(1), 69–72. https://doi.org/10.1017/S0960258500000659

Ellis, R. H., & Roberts, E. H. (1980). Improved Equations for the Prediction of Seed Longevity. *Annals of Botany*, *45*(1), 13–30. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a085797

FAO. (2014). *Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*. *Comisión de Recursos genéticos para la Alimentación y la Agricultura*. Retrieved from www.fao.org/ publications

Farrant, J. M., Pammenter, N. W., & Berjak, P. (1986). The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant Avicennia marina seeds with storage time. *Physiologia Plantarum*, *67*(2), 291–298. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb02459.x

Farrant, J. M., Pammenter, N. W., Berjak, P., & Walters, C. (1997). Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. *Seed Science Research*, *7*(2), 135–144. https://doi.org/10.1017/S0960258500003470

Farrant, J. M., & Walters, C. (1998). Ultrastructural and biophysical changes in developing embryos of Aesculus hippocastanum in relation to the acquisition of tolerance to drying.

Physiologia Plantarum, *104*(4), 513–524. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040401.x

Fiona, H., & Stephen, T. (2016). No Title. *Seed Science Research*, *26*(4), 306–316. https://doi.org/10.1017/S0960258516000222

Fu, Y. B., Ahmed, Z., & Diederichsen, A. (2015). Towards a better monitoring of seed ageing under ex situ seed conservation. *Conservation Physiology*, *3*(1), 1–16. https://doi.org/10.1093/conphys/cov026

Fuentes Fiallo, V., Granda, M. ., & Lemes Hernandez, C. M. (2001). fenologia en plantas medicinales.pdf. *Rev Cubana Plant Med*.

Garces Granada, E. (1987). Estudio Anatómico y de los Procesosde Crecimiento del Fruto del Guayabo. *Agronomía Colombiana.*, *4*, 23–30. Retrieved from http://www.bdigital.unal.edu.co/23840/

García, M. A. (2010). Guia tecnica del cultivo de la guayaba. *Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria Y Forestal Enrique Alvarez Córdova*. Retrieved from http://www.centa.gob.sv/docs/guias/frutales/GUIA CULTIVO GUAYABA.pdf

García Mogollón, C., Cury Regino, K. I., & Dussán Sarria, S. (2011). Comportamiento poscosecha y evaluación de calidad de fruta fresca de guayaba en diferentes condiciones de almacenamiento. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, *64*(2), 6207–6212. Retrieved from http://www.bdigital.unal.edu.co/30567/

GONZAGA NETO, L., FERNANDES BEZERRA, J. E., & DE SOUZA COSTA, R. (2003). Competição De Genótipos De Goiabeira (Psidium Guajava L .) Na Região. *Revista Brasileira Da Fruticultura*, *25*(3), 480–482.

Gonzales Gaona, E., Padilla Ramirez, S., & REyes Muro, L. (2002). Guayaba en mexico. In *Guayaba en Mexico* (pp. 27–39). Retrieved from http://www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo_sectorial/Aguascalientes/6aguascalientes.pdf

Gonzales Gaona, E., Padilla Ramirez, S., Reyes Muro, L., Perales de la Cruz, M. . A., & Villagrana, F. (2002). *Guayaba su cultivo en Mexico*. Aguascalientes, Mexico. Retrieved from http://www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo_sectorial/Aguascalientes/6aguascalientes.pdf

GONZÁLEZ-BENITO, M. E., PÉREZ-GARCÍA, F., TEJEDA, G., & Gómez-Campo, C. (2011). Effect of the gaseous environment and water content on seed viability of four Brassicaceae species after 36 years storage. *Seed Science and Technology*, *39*(2), 443–451. https://doi.org/10.15258/sst.2011.39.2.16

Gutiérrez, R. M. P., Mitchell, S., & Solis, R. V. (2008). Psidium guajava: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, *117*(1), 1–27.

https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.025

Gutierrez Devia, A. A. (2013). *Evaluación de la calidad de frutos de guayaba*. Universidad Nacional de Colombia.

Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T., & Kuboi, T. (2003). Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, *217*(2), 290–298. https://doi.org/10.1007/S00425-003-0986-7

Hay, F. R., & Whitehouse, K. J. (2017). Rethinking the approach to viability monitoring in seed genebanks. *Conservation Physiology*, *5*(1), 831–840. https://doi.org/10.1093/conphys/cox009

Hay, R. F., & Timple, S. (2016). The longevity of desorbing and adsorbing rice seeds. *Seed Science Research*, *26*(4), 306–316. https://doi.org/10.1017/S0960258516000222

Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., & Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, *6*(9), 431–438. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02052-0

Hong, T. ., & Ellis, R. . (1996). *Protocolo para determinar el comportamiento del almacenamiento de semillas*. Roma, Italia.

Hong, T., & Ellis, R. (1996). Almacenamiento. *Manual de Semillsa de Árboles Tropicales*, 129–142.

Horbowicz, M., Obendorf, R. L., Amuti, K. S., Pollard, C. J., Angyal, S., Gallagher, R., … Seif, R. D. (1994). Seed desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols—review and survey. *Seed Science Research*, *4*(4), 385–405. https://doi.org/10.1017/S0960258500002440

Huang, a H. C. (1992). Oil Bodies and Oleosins in Seeds. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *43*(1), 177–200. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.001141

Hundertmark, M., & Hincha, D. K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana. *BMC Genomics*, *9*(1), 118. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-118

ISTA. (2016). *International Rules for Seed Testing* (Vol. 2016). https://doi.org/10.15258

Jiménez Lozano, L., Pinzón Almanza, M. I., & Flórez Muñoz, J. E. (2009). No TitleCARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ACCESIONES SILVESTRES DE GUAYABA. *CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ACCESIONES SILVESTRES DE GUAYABAActa Agronómica*, *58*(12), 1–8. Retrieved from file:///C:/Users/Jorge/Downloads/10419-58247-1-PB.pdf

Jiminez-Escrig, A., Rincon, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava Fruit (Psidium guajava L.) as a New Source of Antioxidant Dietary Fiber. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry, *49*(11), 5489–5493. https://doi.org/10.1021/jf010147p

Joët, T., Ourcival, J.-M., & Dussert, S. (2013). Ecological significance of seed desiccation sensitivity in Quercus ilex. *Annals of Botany*, *111*(4), 693–701. https://doi.org/10.1093/aob/mct025

Kameswara Rao, N., Dulloo, M. E., & Engels, J. M. M. (2016). A review of factors that influence the production of quality seed for long-term conservation in genebanks. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1–14. https://doi.org/10.1007/s10722-016-0425-9

Klepper, L., & Wilhelmi, K. (1979). Comparison Between Kjeldahl and Near Infrared Protein Analyses on Negative and Head Samples of Wheat1. *Crop Science*, *19*(6), 923. https://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183X001900060027x

Koster, K. L., & Leopold, A. C. (1988). Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology*, *88*(3), 829–32. https://doi.org/10.1104/PP.88.3.829

Kozlowski, T. T., & Pallardy, S. G. (2002). Acclimation and Adaptive Responses of Woody Plants to Environmental Stresses. *The Botanical Review*, *68*(2), 270–334. https://doi.org/10.1663/0006-8101(2002)068[0270:AAAROW]2.0.CO;2

Kranner, I., & Birtic, S. (2005). A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology*, *45*(5), 734–40. https://doi.org/10.1093/icb/45.5.734

Lozano, J. C., Toro, J. C., Garcia, R., & Ramiro, T. R. (2002). *Manual sobre el cultivo de Guayaba en Colombia*.

Martinez, I. (2014). *Conservación de recursos fitogenéticos*. Retrieved from http://www.coiaclc.es/wp-content/uploads/2016/05/Recursos.pdf

Martínez Maldonado, F. E. (2012). *Caracterización morfoanatómica de semillas de anón (Annona squamosa L.) y evaluación de algunos parámetros fisiológicos del proceso de germinación y latencia*. Universidad Nacional de Colombia Facultad.

McDonald, M. B., Nelson, C. J., & Bewley, J. D. (1986). Membrane Changes in Seeds as Related to Germination and the Perturbations Resulting from Deterioration in Storage. In *Physiology of Seed Deterioration* (pp. 27–45). Crop Science Society of America. https://doi.org/10.2135/cssaspecpub11.c2

McDonald, M. B., Nelson, C. J., & Roberts, E. H. (1986). Quantifying Seed Deterioration. In *Physiology of Seed Deterioration* (pp. 101–123). Crop Science Society of America. https://doi.org/10.2135/cssaspecpub11.c6

McDonald, M. B., Nelson, C. J., & Roos, E. E. (1986). Precepts of Successful Seed Storage. In *Physiology of Seed Deterioration* (pp. 1–25). Crop Science Society of America. https://doi.org/10.2135/cssaspecpub11.c1

MÉNDEZ NATERA, J. R., MORENO, M. J., & MOYA, J. F. (2009). Efecto de diferentes

combinaciones de sustratos (arena, suelo y/o bagazo de caña de azúcar) sobre germinación de semillas y altura de plantas de guayaba (Psidium guajava L.) Effect. *UDO Agrícola*, *9*(1), 121–125.

Meza, N., & Bautista, D. (2007). Morfología de semillas de guayabo (Psidium guajava L.), germinación y emergencia después del remojo en agua. *Fav. Agron.*, 265–270.

Miller, B., & McDonald, J. (1975). A REVIEW AND EVALUATION OF SEED VIGOR TESTS on JSTOR. *Association of Official Seed Analysts and the Society of Commercial Seed Technologists (SCST)*, *65*, 109–139. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/23432547?seq=1#page_scan_tab_contents

Molero, T., Molina, J., & Casassa-Padrón, A. (2003). Descripción morfológica de selecciones de Psidium guajava L. tolerantes y Psidium friedrichsthalianum (Berg.) Nied resistente a Meloidogyne incognita en el estado Zulia, Venezuela. *Revista de La Facultad de Agronomía*, *20*, 478–492. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182003000400008

Morisette, J. ., Richardson, A. ., & Knapp, A. . (2009). racking the rhythm of the seasons in theface of global change: phenological researchin the 21st century. *Frontiers in Ecology and the Environment*. https://doi.org/10.1890/070217

Nagel, M., Vogel, H., Landjeva, S., Buck-Sorlin, G., Lohwasser, U., Scholz, U., & Börner, A. (2009). Seed conservation in ex situ genebanks—genetic studies on longevity in barley. *Euphytica*, *170*(1–2), 5–14. https://doi.org/10.1007/s10681-009-9975-7

Nogueira Soares, V., Elias, S. G., Gadotti, G. I., & Villela, F. A. (2016). No TitleCan the Tetrazolium Test be Used as an Alternative to the Germination Test in Determining Seed Viability of Grass Species? *Crop Science*, *56*. https://doi.org/10.2135/cropsci2015.06.0399

Olaya Zea, J. A., & Restrepo Sanchez, L. P. (2012). ESTUDIO DEL CONTENIDO DE FENOLES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE GUAYABA EN DIFERENTES ESTADOS DE MADUREZ. *Acta Biol. Colomb.*, *17*, 611–624.

Orduz-Rodríguez, J. O., Monroy, H., Fischer, G., & Herrera, A. (2009). Crecimiento y desarrollo del fruto de mandarina (Citrus reticulata) "Arrayana" en condiciones del piedemonte del Meta, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, *3*(2), 149–60. https://doi.org/10.17584/rcch.2009v3i2.1208

Pammenter, N. W., & Berjak, P. (1999). A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Cambridge*, *9*(01–1999), 13–37. https://doi.org/10.1017/S0960258599000033

Pammenter, N. W., & Berjak, P. (2000). Some thoughts on the evolution and ecology of recalcitrant seeds. *Plant Species Biology*, *15*(2), 153–156. https://doi.org/10.1046/j.1442-1984.2000.00035.x

Pammenter, N. W., Vertucci, C. W., & Berjak, P. (1991). Homeohydrous (Recalcitrant) Seeds: Dehydration, the State of Water and Viability Characteristics in Landolphia kirkii. *Plant Physiology*, *96*(4), 1093–1098. https://doi.org/10.1104/pp.96.4.1093

Pérez, H. E., Hill, L. M., & Walters, C. (2012). An analysis of embryo development in palm: interactions between dry matter accumulation and water relations in Pritchardia remota (Arecaceae). *Seed Science Research*, *22*(2), 97–111. https://doi.org/10.1017/S0960258511000523

Perez Garcia, F., Gomez Campo, C., & Ellis, R. . (2009). Successful long-term ultra dry storage of seed of 15 species of Brassicaceae in a genebank: Variation in ability to germinate over 40 years and dormancy. *Seed Science and Technology*, *37*(3), 640–649. https://doi.org/10.15258/sst.2009.37.3.12

Perez Garcia, F., & Pita Villamil, J. M. (2012). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. *UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID*, 16.

Prakash, D. P., Narayanaswamy, P., & Sondur, S. N. (2002). Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *77*(3), 287–293. https://doi.org/10.1080/14620316.2002.11511494

Probert, R. J., Daws, M. I., & Hay, F. R. (2009). Ecological correlates of ex situ seed longevity : a comparative study on 195 species. *Annals of Botany*, 57–69. https://doi.org/10.1093/aob/mcp082

Pukacka, S., & Czubak, A. (2014). The effect of desiccation on viability and membrane lipid composition of Acer pseudoplatanus seeds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, *67*(3–4), 249–252. https://doi.org/10.5586/asbp.1998.031

Rai, M. K., Asthana, P., Jaiswal, V. S., & Jaiswal, U. (2010). Biotechnological advances in guava (Psidium guajava L.): recent developments and prospects for further research. *Trees*, *24*(1), 1–12. https://doi.org/10.1007/s00468-009-0384-2

Rai, M. K., Jaiswal, V. S., & Jaiswal, U. (2008). *Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (Psidium guajava L.)*. *Scientia Horticulturae* (Vol. 117). https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.04.011

Roach, T., Ivanova, M., Beckett, R. P., Minibayeva, F. V., Green, I., Pritchard, H. W., & Kranner, I. (2008). An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. *Physiologia Plantarum*, *133*(2), 131–139. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00986.x

Roberts, E. H. (1972). Storage Environment and the Control of Viability. In *Viability of Seeds* (pp. 14–58). https://doi.org/10.1007/978-94-009-5685-8_2

Roberts, E. H. (1991). 3. Genetic conservation in seed banks. *Biological Journal of the Linnean Society*, *43*(1), 23–29. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1991.tb00580.x

Roberts, E. H., & Christensen, C. M. (1972). *Viability of seeds*.

Rojas-Garbanzo, C., Zimmermann, B. F., Schulze-Kaysers, N., & Schieber, A. (2016). Characterization of phenolic and other polar compounds in peel and flesh of pink guava (Psidium guajava L. cv. "Criolla") by ultra-high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Food Research International*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.004

Sánchez-Urdaneta, A. B., & Peña-Valdivia, C. B. (2011). Descriptor morfológico para la caracterización del género Psidium. *Rev. Fac. Agron. (LUZ, 28*, 303–343.

Sanchez Urdaneta, A. ., Colmenares, C., Bracho, B., Ortega, J., Rivero, G., Gutierrez, G., & Paz, J. (2007). Caracterización morfológica del fruto en variantes de guayabo (Psidium guajava L .) en una finca del municipio Mara , estado Zulia Morphological characterization of guava fruit (Psidium guajava L .) in a farm at Mara municipality , Zulia state Resumen. *Fac.Agron.(LUZ).*, 282–302. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182007000200006

Santos, M. A. O., Novembre, A. D. L. C., & Marcos-Filho, J. (2007). Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. *Seed Science and Technology*, *35*(1), 213–223. https://doi.org/10.15258/sst.2007.35.1.19

Sawma, J. T., & Mohler, C. L. (2002). Evaluating seed viability by an unimbibed seed crush test in comparison with the tetrazolium test. *Weed Technology*, *16*(4), 781–786. https://doi.org/10.1614/0890-037X(2002)016[0781:ESVBAU]2.0.CO;2

Serrato Tejeda, C. (2012). *Efectos en la germinación de semillas de guayaba (Psidium guajava) consumidas por monos aulladores negros (Alouatta pigra) en Balancán, Tabasco, México.* BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.

Sharma, R. K., & Sharma, S. (2016). Seed longevity, germination and seedling vigour of Rheum australe D. Don: A step towards conservation and cultivation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.10.004

Simão, E., & Takaki, M. (2008). Effect of light and temperature on seed germination in Tibouchina mutabilis (Vell.) Cogn. (Melastomataceae). *Biota Neotropica*, *8*(2), 0–0. https://doi.org/10.1590/S1676-06032008000200006

Solarte Cruz, M. E. (2013). *ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS Y COMPUESTOS BIOACTIVOS DE GUAYABA (Psidium guajava L .) EN LA PROVINCIA DE VÉLEZ , SANTANDER-COLOMBIA María Elena Solarte Cruz (Psidiumguajava L .) EN LA PROVINCIA DE VÉLEZ , SANTANDER-COLOMBIA.* Universidad Nacional de Colombia.

Somarriba, E. (1986). Effects of livestock on seed germination of guava (Psidium guajava L.). *Agroforestry Systems*, *4*(3), 233–238. https://doi.org/10.1007/BF02028357

Stanwood, P. C. (1987). Survival of Sesame Seeds at the Temperature (−196°C) of Liquid

Nitrogen1. *Crop Science*, *27*(2), 327. https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183X002700020041x

Tachakittirungrod, S., Okonogi, S., & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, *103*(2), 381–388. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.034

Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., … Shinozaki, K. (2002). Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *29*(4), 417–426. https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01227.x

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(6–7), 669–675. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003

TOMPSETT, P. B., & PRITCHARD, H. W. (1998). The Effect of Chilling and Moisture Status on the Germination, Desiccation Tolerance and Longevity ofAesculus hippocastanumL. Seed. *Annals of Botany*, *82*(2), 249–261. https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0676

Tunnacliffe, A., & Wise, M. J. (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, *94*(10), 791–812. https://doi.org/10.1007/s00114-007-0254-y

Tweddle, J. C., Dickie, J. B., Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2003). Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology*, *91*(2), 294–304. https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00760.x

Uchoa-thomaz, A. M. A., Sousa, E. C., Carioca, J. O. B., Morais, S. M. De, Lima, A. De, Martins, C. G., … Rodrigues, L. L. (2014). Chemical composition, fatty acid profile and bioactive compounds of guava seeds (Psidium guajava L.). *Ciencia E Tecnologia de Alimentos*, *34*(3), 485–492. https://doi.org/10.1590/1678-457x.6339

Uzzo, R. P., Modolo, V. A., Matthes, L. A. F., & Carvalho, A. C. (2013). Desiccation effects on germination and vigor of hyophorbe palm. *Acta Horticulturae*, *1003*, 227–232. https://doi.org/10.1590/S0102-05362003000100019

Vasconcelos, A. G., Amorim, A. das G. N., dos Santos, R. C., Souza, J. M. T., de Souza, L. K. M., Araújo, T. de S. L., … Leite, J. R. de S. A. (2017). Lycopene rich extract from red guava (Psidium guajava L.) displays anti-inflammatory and antioxidant profile by reducing suggestive hallmarks of acute inflammatory response in mice. *Food Research International*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.017

Vertucci, C. . (1989). Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. *Plant Physiology*, *90*(4), 1478–85. https://doi.org/10.1104/PP.90.4.1478

Vertucci, C. W., & Roos, E. E. (1990). Theoretical Basis of Protocols for Seed Storage. *Plant*

Physiology, *94*(3), 1019–1023. https://doi.org/10.1104/pp.94.3.1019

Walters, C. (2015). Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta*, *242*(2), 397–406. https://doi.org/10.1007/s00425-015-2312-6

Walters, C., AMABLE, R. A., OBENDORF, R. L., Angell, C. A., Angell, C. A., ARGERICH, C. A., … Yaklich, R. W. (1998). Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research*, *8*(2), 223–244. https://doi.org/10.1017/S096025850000413X

Walters, C., Berjak, P., Pammenter, N., Kennedy, K., Raven, P., Pennisi, E., … Pritchard, H. W. (2013). Plant science. Preservation of recalcitrant seeds. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6122), 915–6. https://doi.org/10.1126/science.1230935

Walters, C., Walters, C., Wheeler, L. M., Grotenhuis, J. M., Baskin, C. C., Baskin, J. M., … Takahashi, T. A. (2005). Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research*, *15*(1), 1–20. https://doi.org/10.1079/SSR2004195

Wesley-Smith, J., Berjak, P., Pammenter, N. W., & Walters, C. (2014). Intracellular ice and cell survival in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of Acer saccharinum: An ultrastructural study of factors affecting cell and ice structures. *Annals of Botany*, *113*(4), 695–709. https://doi.org/10.1093/aob/mct284

Wesley-Smith, J., Walters, C., Pammenter, N. W., & Berjak, P. (2015). Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of Acer saccharinum. *Annals of Botany*, *115*(6), 991–1000. https://doi.org/10.1093/aob/mcv009

Xia, K., Daws, M. I., Stuppy, W., Zhou, Z.-K., & Pritchard, H. W. (2012). Rates of water loss and uptake in recalcitrant fruits of Quercus species are determined by pericarp anatomy. *PloS One*, *7*(10), e47368. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047368

Yam Tzec, J. A., Villaseñor Perea, C. A., Kriuchkova Romantchik, E., Soto Escobar, M., & Peña Peralta, M. Á. (2010). Una revisión sobre la importancia del fruto de Guayaba (Psidium guajava L.) y sus principales características en la postcosecha. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, *19*(4), 74–82. Retrieved from http://scielo.sld.cu/pdf/rcta/v19n4/rcta12410.pdf

Zhou, Y. M., Lu, J. J., Tan, D. Y., Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2015). Seed germination ecology of the cold desert annual isatis violascens (brassicaceae): Two levels of physiological dormancy and role of the pericarp. *PLoS ONE*, *10*(10), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140983

Zulhisyam A, K. A. K., Zakaria, N. . A., Shazani, S., & Jamaludin, M. H. Bin. (2013). Effect of storage temperature and seed moisture contents on papaya (Carica papaya L .) seed viability and germination. *Journal of Sustainability Science and Management*, *8*(1), 87–92.